

*Allegato 9<sup>68</sup>*  
(art. 21 cpv. 2)

## **Procedura di campionatura e metodi di analisi per il controllo degli alimenti per animali**

La procedura di campionatura e i metodi di analisi per il controllo degli alimenti per animali sono conformi agli allegati I–VIII del regolamento (CE) n. 152/2009<sup>69</sup>.

<sup>68</sup> Nuovo testo giusta il n. II cpv. 1 dell'O del DEFR del 18 ott. 2017 (RU **2017** 6421). Aggiornato dal n. II cpv. 1 dell'O dell'UFAG del 23 apr. 2021 (RU **2021** 256) e dal n. II cpv. 2 dell'O dell'UFAG del 24 apr. 2023, in vigore dal 1° giu. 2023 (RU **2023** 218).

<sup>69</sup> Regolamento (CE) n. 152/2009 della Commissione del 27 gennaio 2009, che fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per animali, GU L 54 del 26.2.2009, pag. 1; modificato da ultimo dal regolamento di esecuzione (UE) 2022/893, GU L 155 dell'8.6.2022, pag. 24.

**▼ M3***ALLEGATO I***METODI DI CAMPIONAMENTO****1. FINALITÀ E CAMPO DI APPLICAZIONE**

I campioni destinati al controllo ufficiale degli alimenti per animali sono prelevati secondo le modalità sottoindicate. Tali campioni sono da considerarsi rappresentativi delle partite campionate.

Lo scopo del campionamento rappresentativo è di prelevare una piccola frazione di un lotto in modo che la determinazione di una caratteristica specifica di tale frazione rappresenti il valore medio della caratteristica del lotto. Il campionamento avviene mediante prelievo ripetuto di campioni elementari in diversi punti del lotto. Tali campioni elementari sono mescolati per formare un campione globale, dal quale sono ricavati a loro volta dei campioni finali rappresentativi per divisione rappresentativa.

Se, ad un controllo visivo, partite del mangime da sottoporre a campionamento mostrano una differenza di qualità dal resto del mangime dello stesso lotto, tali partite vengono separate dal resto del mangime e trattate come un sottolotto distinto. Qualora non fosse possibile suddividerlo in sottolotti, il mangime viene sottoposto a campionamento come lotto unico. In tali casi, ne è fatta menzione nel verbale di campionamento.

Se un mangime facente parte di un lotto di mangimi della stessa classe o con la medesima descrizione viene sottoposto a campionamento conformemente alle disposizioni del presente regolamento e risulta non soddisfare i requisiti UE, si presume che tutto il mangime di tale lotto non soddisfi i requisiti UE, a meno che, a seguito di un esame dettagliato, non risulti alcuna prova che confermi che anche il resto del lotto non soddisfa i requisiti UE.

**2. DEFINIZIONI**

- Lotto: quantità determinata di mangime che possiede caratteristiche comuni come l'origine, la varietà, il tipo di imballaggio, l'identità dell'imballatore, lo speditore o l'etichettatura e, nel caso di un processo produttivo, un'unità di produzione prodotta in un singolo impianto applicando parametri di produzione uniformi o più unità di produzione di questo tipo, se prodotte in ordine continuo e immagazzinate insieme.
- Partita campionata: lotto o parte identificata del lotto o del sottolotto.
- Campione sigillato: campione sigillato in modo tale da non essere accessibile senza la rottura o l'asportazione del sigillo.
- Campione elementare: quantità prelevata da un punto della partita campionata.
- Campione globale: insieme di campioni elementari prelevati da una stessa partita campionata.
- Campione ridotto: parte del campione globale ottenuta mediante riduzione rappresentativa di quest'ultimo.
- Campione finale: parte del campione ridotto o del campione globale omogeneizzato.
- Campione di laboratorio: campione destinato al laboratorio (come ricevuto dal laboratorio) che può essere il campione finale, il campione ridotto o il campione globale.

**▼ M3**

## 3. DISPOSIZIONI GENERALI

- Personale addetto al campionamento: i campioni sono prelevati da personale appositamente autorizzato dall'autorità competente.
  
- Il campione è sigillato in modo tale da non essere accessibile senza la rottura o l'asportazione del sigillo. Il marchio del sigillo è chiaramente identificabile e ben visibile. In alternativa, il campione può essere messo in un recipiente che, una volta chiuso, non possa essere aperto senza danneggiarsi irrimediabilmente e non possa quindi essere riutilizzato.
  
- Identificazione del campione: il campione è contrassegnato in modo indelebile e deve essere identificato in maniera tale da essere collegato inequivocabilmente al verbale di campionamento.
  
- Da ciascun campione globale sono prelevati almeno due campioni finali: almeno uno come controllo (verifica dell'applicazione della normativa) e uno per l'operatore del settore dei mangimi (difesa in caso di controversia). Infine, può essere prelevato un campione finale come riferimento. Nel caso che l'intero campione globale sia omogeneizzato, i campioni finali sono prelevati dal campione globale omogeneizzato, a meno che tale procedura non sia in contrasto con le norme vigenti nello Stato membro in materia di diritti degli operatori del settore dei mangimi.

## 4. STRUMENTI

- 4.1. Gli strumenti utilizzati per il campionamento sono realizzati con materiali che non possono contaminare i prodotti da campionare. Se destinati ad essere riutilizzati varie volte, gli strumenti sono di agevole pulizia, per evitare una contaminazione crociata.

4.2. **Strumenti raccomandati per il prelievo di campioni di alimenti solidi per animali**4.2.1. *Campionamento manuale*

## 4.2.1.1. Pala a fondo piatto e a bordi laterali verticali

- 4.2.1.2. Sonda a lungo setto o a partizioni. Le dimensioni della sonda sono adeguate alle caratteristiche della partita campionata (profondità del recipiente, misure del sacco ecc.) e alla dimensione delle particelle costituenti l'alimento.

Se la sonda presenta diverse aperture per fare sì che il campione sia prelevato in diversi punti lungo la sonda, le aperture sono separate da compartimenti o scalate in sequenza.

4.2.2. *Campionamento meccanico*

Per il prelievo di campioni di alimenti in flusso possono essere utilizzati strumenti meccanici appropriati, vale a dire che consentano di sottoporre a campionamento almeno l'intera sezione del flusso.

Il campionamento dei mangimi in movimento (a elevata velocità di flusso) può essere effettuato facendo uso di campionatori automatici.

4.2.3. *Divisori*

Se possibile e opportuno, per preparare campioni ridotti rappresentativi possono essere utilizzati strumenti che servono a dividere i campioni in parti approssimativamente uguali.

▼ **M3**

## 5. REQUISITI QUANTITATIVI PER QUANTO RIGUARDA IL NUMERO DI CAMPIONI ELEMENTARI

- I requisiti quantitativi di cui ai punti 5.1 e 5.2 riguardanti il numero di campioni elementari sono applicabili a partite di dimensioni massime di 500 tonnellate l'una e campionabili in modo rappresentativo. La procedura di campionamento descritta è ugualmente valida per i quantitativi superiori alla dimensione massima della partita campionata se non si tiene conto del numero massimo di campioni elementari indicato nelle tabelle che seguono; in tal caso il numero di campioni elementari è determinato dalla formula contenente la radice quadrata che figura nella parte corrispondente della procedura (cfr. punto 5.3) e la dimensione minima del campione globale aumentata in proporzione. Ciò non impedisce di suddividere un lotto grande in sottolotti più piccoli e di sottoporre a campionamento ciascun sottolotto seguendo la procedura descritta ai punti 5.1 e 5.2.
- La grandezza della partita da campionare deve essere tale da consentire il prelievo di campioni in ogni sua parte.
- Nel caso dei lotti o sottolotti molto grandi (> 500 tonnellate) e dei lotti trasportati o immagazzinati in un modo che non rende possibile effettuare campionamenti seguendo la procedura di cui ai punti 5.1 e 5.2 del presente capitolo, si adotta la procedura di campionamento indicata al punto 5.3.
- Qualora sia tenuto per legge a rispettare il presente regolamento nell'ambito di un sistema di monitoraggio obbligatorio, l'operatore del settore dei mangimi può discostarsi dai requisiti quantitativi di cui al presente capitolo al fine di tenere conto delle caratteristiche operative, purché dimostri in modo convincente all'autorità competente l'equivalenza della procedura di campionamento per quanto concerne la rappresentatività e previa autorizzazione dell'autorità competente.
- In casi eccezionali, quando non è possibile applicare i requisiti quantitativi del metodo di campionamento prescritto senza danneggiare il lotto in misura inaccettabile per il commercio (ad esempio a causa delle tipologie d'imballaggio, dei mezzi di trasporto, delle modalità di immagazzinamento ecc.), si può ricorrere a un metodo alternativo, a condizione che il campionamento sia il più rappresentativo possibile e che il metodo applicato sia chiaramente descritto e debitamente documentato.

5.1. **Requisiti quantitativi concernenti i campioni elementari per il controllo delle sostanze o dei prodotti distribuiti in modo uniforme negli alimenti per animali**5.1.1. *Alimenti solidi alla rinfusa*

Dimensioni della partita campionata	Numero minimo di campioni elementari
≤ 2,5 tonnellate	7
> 2,5 tonnellate	√ di 20 volte il numero di tonnellate che costituiscono la partita campionata (*), fino a un massimo di 40 campioni elementari

(\*) Se il risultato è un numero decimale, si arrotonda al numero intero superiore.

▼ **M3**5.1.2. *Alimenti liquidi alla rinfusa*

Dimensioni della partita campionata	Numero minimo di campioni elementari
≤ 2,5 tonnellate o ≤ 2 500 litri	4 (*)
> 2,5 tonnellate o > 2 500 litri	7 (*)

(\*) Nel caso in cui non sia possibile rendere omogeneo il liquido, il numero di campioni elementari deve essere aumentato.

5.1.3. *Alimenti in confezioni*

Gli alimenti (solidi e liquidi) possono essere confezionati in sacchetti, sacchi, barattoli, fusti ecc., ai quali si fa riferimento nella tabella come «unità». Le unità grandi (≥ 500 kg o litri) si campionano in base alle disposizioni prescritte per gli alimenti alla rinfusa (cfr. punti 5.1.1 e 5.1.2)

Dimensioni della partita campionata	Numero minimo di unità da cui deve essere prelevato (almeno) un campione elementare (*)
Da 1 a 20 unità	1 unità (**)
Da 21 a 150 unità	3 unità (**)
Da 151 a 400 unità	5 unità (**)
> 400 unità	$\frac{1}{4}$ della $\sqrt{\quad}$ del numero di unità che costituiscono la partita campionata (***), fino a un massimo di 40 unità

(\*) Qualora l'apertura di un'unità possa alterare i risultati dell'analisi (per esempio nel caso degli alimenti umidi deperibili), il campione elementare è costituito dall'unità non aperta.

(\*\*) Per le unità di contenuto non superiore a 1 kg o a un litro, il campione elementare è costituito dal contenuto di un'unità originaria.

(\*\*\*) Se il risultato è un numero decimale, si arrotonda al numero intero superiore.

5.1.4. *Alimenti minerali formellati o mattonelle di sali minerali*

Almeno un formellato o una mattonella da campionare per partita di 25 unità, per un massimo di quattro formellati o mattonelle.

Per i formellati o le mattonelle di peso unitario non superiore a 1 kg, il campione elementare è costituito dal contenuto di un formellato o di una mattonella.

5.1.5. *Foraggi grossolani/foraggio*

Dimensioni della partita campionata	Numero minimo di campioni elementari (*)
≤ 5 tonnellate	5
> 5 tonnellate	$\sqrt{\quad}$ di 5 volte il numero di tonnellate che costituiscono la partita campionata (**), fino a un massimo di 40 campioni elementari

(\*) Si riconosce che in determinate situazioni (ad esempio nel caso degli insilati) non è possibile prelevare i necessari campioni elementari senza provocare danni inaccettabili al lotto. In tali situazioni può essere applicato un metodo di campionamento alternativo. Prima dell'entrata in vigore del presente regolamento sarà approntata una guida per il campionamento di questo tipo di lotti.

(\*\*) Se il risultato è un numero decimale, si arrotonda al numero intero superiore.

**▼ M3****5.2. Requisiti quantitativi concernenti i campioni elementari per il controllo di costituenti o sostanze presumibilmente distribuiti negli alimenti per animali in maniera non uniforme**

Questi requisiti quantitativi concernenti i campioni elementari si applicano nei casi seguenti:

- controllo delle aflatossine, della segale cornuta, di altre micotossine e impurità botaniche nocive nelle materie prime per alimenti per animali,
- controllo della contaminazione crociata da un costituente, incluso il materiale geneticamente modificato, o da una sostanza presumibilmente non distribuita in modo uniforme nelle materie prime per alimenti per animali.

Nel caso che l'autorità di controllo sospetti fortemente che una tale distribuzione non uniforme si presenti anche in caso di contaminazione crociata da un componente o da una sostanza in un alimento per animali composto, si possono applicare i requisiti quantitativi indicati nella tabella che segue.

Dimensioni della partita campionata	Numero minimo di campioni elementari
< 80 tonnellate	Cfr. i requisiti quantitativi al punto 5.1. Il numero di campioni elementari da prelevare si moltiplica per 2,5.
≥ 80 tonnellate	100

**5.3. Requisiti quantitativi relativi ai campioni elementari nel caso di lotti molto grandi**

Nel caso di grandi partite campionate (> 500 tonnellate): numero di campioni elementari da prelevare = 40 campioni elementari +  $\sqrt{\text{delle tonnellate}}$  per il controllo di sostanze o prodotti ripartiti in modo uniforme nell'alimento, oppure 100 campioni elementari +  $\sqrt{\text{delle tonnellate}}$  per il controllo di costituenti o sostanze presumibilmente distribuiti in modo non uniforme nelle materie prime per alimenti per animali.

**6. REQUISITI QUANTITATIVI RIGUARDANTI IL CAMPIONE GLOBALE**

È richiesto un solo campione globale per partita.

	Natura degli alimenti	Dimensione minima del campione globale (*) (**)
6.1.	Alimenti alla rinfusa:	4 kg
6.2.	Alimenti in confezioni:	4 kg (***)

## ▼ M3

È richiesto un solo campione globale per partita.

	Natura degli alimenti	Dimensione minima del campione globale (*) (**)
6.3.	Alimenti liquidi o semiliquidi:	4 litri
6.4.	Alimenti minerali in formellati o mattonelle di sali minerali:	
6.4.1.	di peso unitario superiore a 1 kg	4 kg
6.4.2.	di peso unitario pari o inferiore a 1 kg	peso di quattro originari formellati o mattonelle
6.5.	Foraggi grossolani/foraggio	4 kg (****)

(\*) Se l'alimento da sottoporre a campionamento ha un valore elevato, si può prelevare una quantità inferiore di campione globale, purché ciò sia indicato e documentato nel verbale di campionamento.

(\*\*) Conformemente alle disposizioni del regolamento (UE) n. 619/2011 della Commissione, del 24 giugno 2011, che fissa i metodi di campionamento e di analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per animali riguardo alla presenza di materiale geneticamente modificato per il quale sia in corso una procedura di autorizzazione o la cui autorizzazione sia scaduta (GU L 166 del 25.6.2011, pag. 9), il campione globale per la verifica della presenza di materiale geneticamente modificato deve contenere almeno 35 000 semi/grani. Ciò significa che per il mais il campione globale deve essere pari ad almeno 10,5 kg e per la soia a 7 kg. Per altri semi e grani come orzo, miglio, avena, riso, segale, frumento e colza, il campione globale di 4 kg corrisponde a più di 35 000 semi.

(\*\*\*) Nel caso degli alimenti confezionati, è possibile che le dimensioni delle singole unità non consentano di prelevare 4 kg per il campione globale.

(\*\*\*\*) Qualora si tratti di foraggio grossolano o foraggio a basso peso specifico (ad esempio fieno o paglia), il campione globale deve essere di almeno 1 kg.

## 7. REQUISITI QUANTITATIVI RIGUARDANTI I CAMPIONI FINALI

*Campioni finali*

È richiesta l'analisi di almeno un campione finale. L'entità del campione finale destinato all'analisi deve essere non inferiore ai seguenti quantitativi:

Alimenti solidi	500 g (*) (**) (***)
Alimenti liquidi o semiliquidi	500 ml (*)

(\*) Conformemente alle disposizioni del regolamento (UE) n. 619/2011, il campione finale per la verifica della presenza di materiale geneticamente modificato deve contenere almeno 10 000 semi/grani. Ciò significa che per il mais il campione finale deve essere pari ad almeno 3 000 g e per la soia a 2 000 g. Per altri semi e grani come orzo, miglio, avena, riso, segale, frumento e colza, il campione finale di 500 g corrisponde a più di 10 000.

(\*\*) Se le dimensioni del campione globale sono considerevolmente inferiori a 4 kg o litri (cfr. note al punto 6), si può prelevare anche una quantità inferiore di campione finale, purché ciò sia indicato e documentato nel verbale di campionamento.

(\*\*\*) Nel caso del campionamento di legumi, cereali in grani e frutta a guscio per determinare i residui di antiparassitari, il campione finale deve essere di almeno 1 kg, conformemente alle disposizioni della direttiva 2002/63/CE della Commissione (GU L 187 del 16.7.2002, pag. 30).

**▼ M3**

8. METODO DI CAMPIONAMENTO PER LOTTI MOLTO GRANDI IMMAGAZZINATI O TRASPORTATI CON MODALITÀ CHE NON PERMETTONO IL PRELIEVO DI CAMPIONI DA TUTTO IL LOTTO.

8.1. **Principi generali**

Se le modalità di trasporto o di immagazzinamento di un lotto non consentono il prelievo di campioni elementari dall'intero lotto, è preferibile effettuare il campionamento quando il lotto è in movimento.

Nel caso dei grandi depositi per immagazzinare alimenti per animali, gli operatori vanno incoraggiati ad installare nel deposito attrezzature che consentano di effettuare il campionamento (automatico) su tutto il lotto immagazzinato.

In caso di applicazione delle procedure di campionamento previste dal presente capitolo 8, l'operatore del settore dei mangimi o un suo rappresentante viene informato sulla procedura di campionamento. Se contesta la procedura, l'operatore o il suo rappresentante deve consentire all'autorità competente di effettuare prelievi per il campionamento in tutto il lotto a proprie spese.

8.2. **Lotti grandi trasportati per nave**

8.2.1. *Campionamento dinamico di lotti grandi trasportati per nave*

È preferibile effettuare il campionamento di lotti grandi nelle navi quando il prodotto è in movimento (campionamento dinamico).

Il campionamento si effettua stiva per stiva (intendendo come stiva uno spazio separabile fisicamente). Le stive vengono comunque parzialmente svuotate l'una dopo l'altra, così che l'iniziale separazione fisica non sussiste più dopo il trasferimento nelle strutture di stoccaggio. Il campionamento può pertanto essere effettuato in funzione della separazione fisica iniziale o della separazione dopo il trasferimento nelle strutture di stoccaggio.

Le operazioni di scarico di una nave possono durare diversi giorni. Di norma, il campionamento deve essere effettuato ad intervalli regolari durante l'intera fase di scarico. La presenza di un ispettore ufficiale per il campionamento durante l'intera operazione di scarico non è tuttavia sempre possibile o opportuna. Pertanto, il campionamento può riguardare soltanto una parte (partita campionata) del lotto. Il numero di campioni elementari è determinato tenendo conto delle dimensioni della partita campionata.

In caso di campionamento di una parte di un lotto di mangimi della stessa classe o con la medesima descrizione e se tale parte del lotto non è risultata conforme ai requisiti UE, si presume che i risultati valgano per tutto il mangime di tale lotto, a meno che, a seguito di un esame dettagliato, non risulti prova alcuna della non conformità del resto del lotto ai requisiti UE.

La presenza di un ispettore è necessaria anche quando il campione ufficiale è prelevato automaticamente. Tuttavia, nel caso in cui il campionamento sia effettuato in modo automatico con parametri prefissati non modificabili nel corso dello stesso e i campioni elementari siano posti in un recipiente sigillato, così da prevenire possibili frodi, la presenza di un ispettore è richiesta solo all'inizio del campionamento, ogni volta che il recipiente dei campioni deve essere cambiato e alla fine del campionamento.

**▼ M3****8.2.2. *Campionamento statico di lotti trasportati per nave***

Se il campionamento è eseguito in modo statico, si applica la stessa procedura prevista per le strutture di stoccaggio (sili) accessibili dall'alto (cfr. punto 8.4.1).

Il campionamento si effettua sulla parte accessibile (dall'alto) del lotto/della stiva. Il numero di campioni elementari è determinato tenendo conto delle dimensioni della partita campionata. In caso di campionamento di una parte di un lotto di mangimi della stessa classe o con la medesima descrizione e se tale parte del lotto non è risultata conforme ai requisiti UE, si presume che i risultati valgano per tutto il mangime di tale lotto, a meno che, a seguito di un esame dettagliato, non risulti prova alcuna della non conformità del resto del lotto ai requisiti UE.

**8.3. *Campionamento di lotti grandi immagazzinati in depositi***

Il campionamento si effettua sulla parte accessibile del lotto. Il numero di campioni elementari è determinato tenendo conto delle dimensioni della partita campionata. In caso di campionamento di una parte di un lotto di mangimi della stessa classe o con la medesima descrizione e se tale parte del lotto non è risultata conforme ai requisiti UE, si presume che i risultati valgano per tutto il mangime di tale lotto, a meno che, a seguito di un esame dettagliato, non risulti prova alcuna della non conformità del resto del lotto ai requisiti UE.

**8.4. *Campionamento di strutture di stoccaggio (sili)*****8.4.1. *Campionamento di sili (facilmente) accessibili dall'alto***

Il campionamento si effettua sulla parte accessibile del lotto. Il numero di campioni elementari è determinato tenendo conto delle dimensioni della partita campionata. In caso di campionamento di una parte di un lotto di mangimi della stessa classe o con la medesima descrizione e se tale parte del lotto non è risultata conforme ai requisiti UE, si presume che i risultati valgano per tutto il mangime di tale lotto, a meno che, a seguito di un esame dettagliato, non risulti prova alcuna della non conformità del resto del lotto ai requisiti UE.

**8.4.2. *Campionamento di sili non accessibili dall'alto (chiusi)*****8.4.2.1. *Sili non accessibili dall'alto (chiusi) di dimensioni > 100 tonnellate***

Il mangime immagazzinato in siffatti sili non è campionabile in modo statico. Pertanto, qualora si debba campionare il mangime che si trova all'interno del silo e non vi sia possibilità di spostare la partita, occorre accordarsi con l'operatore affinché questi informi l'ispettore su quando sarà svuotato il silo, di modo che il campionamento possa essere eseguito con il mangime in movimento.

**8.4.2.2. *Sili non accessibili dall'alto (chiusi) di dimensioni < 100 tonnellate***

La procedura di campionamento prevede che si inserisca in un recipiente un quantitativo compreso fra 50 e 100 kg e che si prelevi da esso il campione. Le dimensioni del campione globale corrispondono alla totalità del lotto e il numero dei campioni elementari alla quantità tratta dal silo e immessa nel recipiente per il campionamento. In caso di campionamento di una parte di un lotto di mangimi della stessa classe o con la medesima descrizione e se tale parte del lotto non è risultata conforme ai requisiti UE, si presume che i risultati valgano per tutto il mangime di tale lotto, a meno che, a seguito di un esame dettagliato, non risulti prova alcuna della non conformità del resto del lotto ai requisiti UE.

**▼ M3****8.5. Campionamento di alimenti alla rinfusa in grandi contenitori chiusi**

Spesso tali lotti sono campionabili solo dopo essere stati scaricati. In certi casi non è possibile scaricare presso il punto di importazione o di controllo, per cui il campionamento va eseguito al momento dello scarico dei contenitori.

**9. ISTRUZIONI RELATIVE AI PRELIEVI, ALLA FORMAZIONE E ALL'IMBALLAGGIO DEI CAMPIONI****9.1. Aspetti generali**

Prelevare e formare i campioni senza inutili ritardi, prendendo le precauzioni necessarie per evitare qualsiasi alterazione o contaminazione del prodotto. Le superfici, i recipienti e gli strumenti impiegati devono essere puliti e asciutti.

**9.2. Campioni elementari**

I campioni elementari vanno prelevati a caso dall'insieme della partita da campionare e devono risultare d'entità approssimativamente uguale.

Il campione elementare è pari ad almeno 100 grammi o a 25 grammi in caso di foraggio grossolano o foraggio a basso peso specifico.

Qualora siano da prelevare meno di 40 campioni elementari, conformemente alle norme procedurali per il campionamento fissate al punto 8, le dimensioni di tali campioni sono determinate in funzione delle dimensioni prescritte per il campione globale da ottenere (cfr. punto 6).

In caso di campionamento di piccoli lotti di mangime confezionato da cui, in base ai requisiti quantitativi, sia da prelevare un numero limitato di campioni elementari, il campione elementare è dato dal contenuto di un'unità originaria di peso non superiore a 1 kg o di volume non superiore a un litro.

Per i campionamenti di mangime confezionato composto da piccole unità (ad esempio < 250 g), le dimensioni del campione elementare dipendono dalle dimensioni dell'unità.

**9.2.1. Alimenti alla rinfusa**

Eventualmente si può procedere al campionamento al momento della messa in movimento della partita da campionare (carico o scarico).

**9.2.2. Alimenti in confezioni**

Dopo aver selezionato il numero prescritto di unità da campionare secondo quanto indicato nel capitolo 5, prelevare con una sonda o con una pala una parte del contenuto di ciascuna di tali unità. All'occorrenza svuotare separatamente le unità.

**9.2.3. Alimenti liquidi o semiliquidi omogenei o omogeneizzabili**

Dopo aver selezionato il numero prescritto di unità da campionare secondo quanto indicato nel capitolo 5, prelevare una parte del contenuto di ciascuna unità, se necessario dopo omogeneizzazione.

I campioni elementari possono eventualmente essere prelevati al momento del travaso del prodotto.

▼ **M3**9.2.4. *Alimenti liquidi o semiliquidi non omogeneizzabili*

Dopo aver selezionato il numero prescritto di unità da campionare secondo quanto indicato nel capitolo 5, prelevare i campioni a diversi livelli.

I campioni possono essere prelevati anche al momento del travaso del prodotto, dopo eliminazione delle prime frazioni.

In entrambi i casi, il volume totale dei prelievi non deve essere inferiore a 10 litri.

9.2.5. *Alimenti minerali formellati o mattonelle di sali minerali*

Dopo aver selezionato il numero prescritto di formellati o mattonelle da campionare secondo quanto indicato nel capitolo 5, prelevare una parte da ciascun formellato o da ciascuna mattonella. Se si ha il sospetto che un formellato o una mattonella non sia omogeneo/a, può essere prelevato come campione l'intero formellato o l'intera mattonella.

Per i formellati o le mattonelle di peso unitario non superiore a 1 kg, il campione elementare è costituito dal contenuto di un formellato o di una mattonella.

9.3. **Formazione dei campioni globali**

Riunire i campioni elementari per costituire un unico campione globale.

9.4. **Formazione dei campioni finali**

Il materiale del campione globale va mescolato con cura <sup>(1)</sup>

— Introdurre ciascun campione in un contenitore/recipiente idoneo. Prendere tutte le precauzioni del caso per evitare qualsiasi modifica alla composizione del campione o qualsiasi contaminazione o alterazione fortuita durante il trasporto o lo stoccaggio.

— In caso di controllo di costituenti o sostanze distribuiti in modo uniforme nell'alimento, il campione globale può essere ridotto in modo rappresentativo a non meno di 2,0 kg o 2,0 litri (campione ridotto) <sup>(2)</sup>, possibilmente facendo uso di un divisore meccanico o automatico. Per la verifica della presenza di residui di antiparassitari nei legumi, nei cereali in grani e nella frutta a guscio, il campione ridotto deve essere di almeno 3 kg. Se la natura dell'alimento non consente di utilizzare un divisore o se non si dispone di un divisore, si può ridurre il campione con il metodo della suddivisione in quarti. Formare quindi dai campioni ridotti campioni finali (per controllo, difesa in caso di controversia e riferimento) di entità approssimativamente uguale e rispondenti alle prescrizioni quantitative di cui al capitolo 7. Se si controllano costituenti, incluso il materiale geneticamente modificato, o sostanze presumibilmente distribuiti in modo non uniforme nelle materie prime per alimenti per animali, il campione globale sarà:

— interamente omogeneizzato e successivamente diviso in campioni finali, oppure

— ridotto a non meno di 2 kg o 2 litri <sup>(3)</sup> servendosi di un divisore meccanico o automatico. Solo se la natura dell'alimento non consente di utilizzare un divisore si può ridurre il campione, qualora necessario, con il metodo della suddivisione in quarti. Per la verifica della presenza di materiale geneticamente modificato nel quadro del regolamento (UE) n. 619/2011, il campione ridotto deve contenere almeno 35 000 semi/grani per permettere di ottenere campioni finali di almeno 10 000 semi/grani ai fini di verifica dell'applicazione della normativa, per la difesa in caso di controversia e come riferimento [cfr. nota (\*\*\*) al capitolo 6 e nota (\*) al capitolo 7].

<sup>(1)</sup> Eventuali grumi vanno schiacciati, se necessario togliendoli dalla massa per poi reintegrarli.

<sup>(2)</sup> Ad eccezione del foraggio grossolano o del foraggio a basso peso specifico.

<sup>(3)</sup> Ad eccezione del foraggio grossolano o del foraggio a basso peso specifico.

▼ **M3**

9.5. **Imballaggio dei campioni**

Sigillare ed etichettare i recipienti o le confezioni in modo che non possano essere aperti senza violare il sigillo. L'etichetta completa deve essere incorporata nel sigillo.

9.6. **Invio dei campioni al laboratorio**

Il campione deve essere inviato senza indugio al laboratorio di analisi designato. Con esso vanno inviate anche le informazioni necessarie all'analista.

10. **VERBALI DEL CAMPIONAMENTO**

Per ogni campione va redatto un verbale che permetta di identificare in modo univoco la partita campionata e le sue dimensioni.

Il verbale deve anche recare nota di ogni eventuale scostamento rispetto alla procedura di campionamento prevista dal presente regolamento.

Oltre che al laboratorio di controllo ufficiale, il verbale va messo a disposizione dell'operatore del settore dei mangimi e/o del laboratorio designato dall'operatore del settore dei mangimi.

▼ **M3***ALLEGATO II***DISPOSIZIONI GENERALI RELATIVE AI METODI DI ANALISI DEGLI ALIMENTI PER ANIMALI****A. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LE ANALISI****1. Finalità**

Le modalità qui di seguito descritte riguardano la preparazione per l'analisi dei campioni, trasmessi ai laboratori di controllo dopo essere stati prelevati conformemente alle disposizioni di cui all'allegato I.

La preparazione dei campioni di laboratorio deve assicurare che le quantità pesate previste dai metodi di analisi siano omogenee e rappresentative dei campioni finali.

**2. Precauzioni necessarie**

Le modalità di preparazione dei campioni sono scelte in funzione dei metodi di analisi impiegati e dei costituenti o delle sostanze da controllare. È pertanto di fondamentale importanza assicurare che le modalità prescelte siano adeguate al metodo di analisi applicato e ai costituenti o alle sostanze da controllare.

Effettuare tutte le operazioni in modo da evitare, nei limiti del possibile, di contaminare il campione o di modificarne la composizione.

Effettuare le macinazioni, le miscele e le setacciature senza ritardi, esponendo il meno possibile il campione all'aria e alla luce. Evitare l'impiego di mulini o attrezzature per la macinazione suscettibili di riscaldare eccessivamente il campione.

Per gli alimenti particolarmente sensibili al calore si raccomanda la macinazione manuale. Assicurarsi altresì che l'apparecchiatura in se stessa non costituisca una fonte di contaminazione.

Se il campione non può essere preparato senza causare una variazione sensibile del contenuto di umidità, quest'ultimo va determinato prima e dopo la preparazione, secondo il metodo previsto nell'allegato III, parte A.

**3. Procedura****3.1. Procedura generale**

Il quantitativo da saggiare è prelevato dal campione finale. Il metodo del cono e della quartatura è sconsigliato, in quanto può dar luogo a quantitativi da saggiare con un elevato errore di ripartizione.

**3.1.1. Alimenti che possono essere macinati direttamente**

— Mescolare il campione finale setacciato e raccoglierlo in un recipiente appropriato pulito e asciutto, provvisto di chiusura ermetica. Mescolare di nuovo, al fine di garantire che l'omogeneizzazione sia completa, immediatamente prima di prelevare la quantità da analizzare (quantitativo da saggiare).

**3.1.2. Alimenti che possono essere macinati dopo essiccazione**

— Salvo diversa indicazione specifica nei metodi di analisi, essiccare il campione finale, in modo da portarne il contenuto di umidità ad un livello compreso tra l'8 e il 12 %, applicando il procedimento di pre-essiccazione indicato al punto 4.3 del metodo di dosaggio dell'umidità menzionato nell'allegato III, parte A. Procedere quindi come indicato al punto 3.1.1.

**▼ M3****3.1.3. Alimenti liquidi o semiliquidi**

- Raccogliere il campione finale in un recipiente appropriato pulito ed asciutto, provvisto di chiusura ermetica. Mescolare bene, al fine di garantire che l'omogeneizzazione sia completa, immediatamente prima di prelevare la quantità da analizzare (quantitativo da saggiare).

**3.1.4. Altri alimenti**

- Se il campione finale non può essere preparato secondo uno dei procedimenti di cui sopra, applicare qualsiasi altro procedimento di preparazione che consenta di ottenere quantitativi da saggiare omogenei e rappresentativi dei campioni finali.

**3.2. Procedura specifica in caso di esame mediante ispezione visiva o al microscopio o nei casi in cui sia omogeneizzato l'intero campione globale**

- In caso di esame mediante ispezione visiva (senza uso del microscopio), si adopera l'intero campione di laboratorio.
- In caso di esame al microscopio, il laboratorio può ridurre il campione globale o ridurre ulteriormente il campione ridotto. I campioni finali per la difesa in caso di controversia e di riferimento si prelevano seguendo una procedura equivalente a quella seguita per il campione finale ai fini di verifica dell'applicazione della normativa.
- Qualora l'intero campione globale sia omogeneizzato, i campioni finali si prelevano dal campione globale omogeneizzato.

**4. Conservazione e immagazzinamento dei campioni**

Conservare i campioni a una temperatura tale da non alterare la loro composizione. Nel caso dei campioni destinati all'analisi di vitamine o di sostanze particolarmente sensibili alla luce, conservarli in modo tale che non vengano alterati dalla luce.

**B. DISPOSIZIONI CONCERNENTI I REATTIVI E L'APPARECCHIATURA DA UTILIZZARE NEI METODI DI ANALISI**

1. Tutti i reattivi, in mancanza di altre indicazioni, specificate nel metodo di analisi, devono essere puri per analisi (p.a.). Per l'analisi degli elementi in traccia, la purezza dei reattivi deve essere controllata con una prova in bianco. A seconda del risultato ottenuto, può rendersi necessaria una purificazione supplementare dei reattivi.
2. Per le operazioni di dissoluzione, diluizione, risciacquo o lavaggio, menzionate nei metodi di analisi senza indicazioni riguardo alla natura del solvente o del diluente, deve essere utilizzata acqua. Di norma, l'acqua deve essere demineralizzata o distillata. In casi particolari, indicati nei metodi di analisi, deve essere sottoposta a procedimenti specifici di purificazione.
3. Tenuto conto dell'abituale equipaggiamento dei laboratori di controllo, l'apparecchiatura descritta nei metodi di analisi si limita agli strumenti e agli apparecchi speciali o rispondenti a prescrizioni d'uso specifiche. Detto materiale deve essere pulito, soprattutto per le determinazioni di quantità minime di sostanze.

**▼ M3****C. APPLICAZIONE DEI METODI DI ANALISI ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI****1. Procedura di estrazione**

Diversi metodi determinano una procedura di estrazione specifica. In linea di massima, è possibile applicare procedure di estrazione diverse da quella indicata nel metodo, a condizione che abbiano dimostrato un'efficienza di estrazione, per la matrice analizzata, equivalente a quella della procedura indicata nel metodo.

**2. Procedura di purificazione**

Diversi metodi determinano una procedura di purificazione specifica. In linea di massima, è possibile applicare procedure di purificazione diverse da quella indicata nel metodo, a condizione che abbiano dimostrato di produrre risultati, per la matrice analizzata, equivalenti a quelli prodotti dalla procedura indicata nel metodo.

**3. Numero di determinazioni**

Qualora si analizzino sostanze indesiderabili, se il risultato della prima determinazione risulta significativamente inferiore ( $> 50\%$ ) al valore della specifica oggetto di controllo, non è necessario procedere a ulteriori determinazioni, a condizione che si applichino le procedure appropriate in materia di qualità. In altri casi, è necessaria una seconda analisi (seconda determinazione) per escludere la possibilità di una contaminazione crociata interna o di uno scambio accidentale dei campioni. La media delle due determinazioni, che tiene conto dell'incertezza di misura, è utilizzata per verificare la conformità.

Se, nel controllare il contenuto dichiarato di una sostanza o di un dato ingrediente, il risultato della prima determinazione conferma il contenuto dichiarato (ossia, lo scarto tra il risultato dell'analisi e il contenuto dichiarato rientra in un margine di variazione accettabile), non è necessario ripetere la determinazione, purché siano rispettate le opportune procedure di qualità. In altri casi, è necessaria una seconda analisi (seconda determinazione) per escludere la possibilità di una contaminazione crociata interna o di uno scambio accidentale dei campioni. La media delle due determinazioni, che tiene conto dell'incertezza di misura, è utilizzata per verificare la conformità.

In alcuni casi il margine di variazione accettabile è definito da norme quali il regolamento (CE) n. 767/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 13 luglio 2009, sull'immissione sul mercato e sull'uso dei mangimi, che modifica il regolamento (CE) n. 1831/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio e che abroga le direttive 79/373/CEE del Consiglio, 80/511/CEE della Commissione, 82/471/CEE del Consiglio, 83/228/CEE del Consiglio, 93/74/CEE del Consiglio, 93/113/CE del Consiglio e 96/25/CE del Consiglio e la decisione 2004/217/CE della Commissione <sup>(1)</sup>.

**4. Comunicazione del metodo di analisi applicato**

Il rapporto di prova deve indicare il metodo di analisi applicato.

**5. Comunicazione dei risultati dell'analisi**

Il risultato deve essere espresso secondo le indicazioni fornite nel metodo di analisi con un numero appropriato di cifre significative e, ove necessario, corretto in funzione del contenuto di umidità del campione finale prima della sua preparazione.

<sup>(1)</sup> GU L 229 dell'1.9.2009, pag. 1.

**▼ M3****6. Incertezza di misura e tasso di recupero in caso di analisi di sostanze indesiderabili**

Per quanto riguarda le sostanze indesiderabili ai sensi della direttiva 2002/32/CE, un prodotto destinato all'alimentazione animale è considerato non conforme al livello massimo fissato quando il risultato d'analisi, relativo a un alimento con tenore di umidità del 12 %, è giudicato superiore al livello massimo, tenuto conto dell'incertezza di misura estesa e della correzione per il recupero. Al fine di valutare la conformità, si utilizza la concentrazione risultante dall'analisi, corretta per il fattore di recupero e dopo aver dedotto l'incertezza di misura estesa. Tale procedura è applicabile unicamente nei casi in cui il metodo d'analisi consenta la stima dell'incertezza di misura e la correzione per il fattore di recupero (non è possibile, ad esempio, in caso di analisi microscopica).

Il risultato dell'analisi è riportato come segue (quando il metodo d'analisi consente di valutare l'incertezza di misura e il tasso di recupero):

- a) corretto per il recupero, indicando il tasso di recupero. La correzione non è necessaria nel caso in cui il tasso di recupero sia compreso tra 90 e 110 %;
- b) nella forma « $x \pm U$ », dove  $x$  è il risultato dell'analisi e  $U$  l'incertezza di misura estesa, calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 che dà un livello di affidabilità del 95 % circa.

Tuttavia, qualora il risultato dell'analisi risulti molto inferiore (> 50 %) al valore della specifica oggetto di controllo, e a condizione che si rispettino le procedure appropriate in materia di qualità e l'analisi serva unicamente a verificare la conformità alle norme giuridiche pertinenti, il risultato dell'analisi può essere presentato senza correzioni per il recupero e, in questo caso, il tasso di recupero e l'incertezza della misura possono essere omessi.

*ALLEGATO III***METODI DI ANALISI PER IL CONTROLLO DELLA COMPOSIZIONE DELLE MATERIE PRIME PER ALIMENTI PER ANIMALI E DEGLI ALIMENTI COMPOSTI****A. DETERMINAZIONE DELL'UMIDITÀ****1. Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di umidità degli alimenti per animali. Nel caso degli alimenti contenenti sostanze volatili, ad esempio acidi organici, va osservato che oltre al contenuto di umidità si rileva anche un'importante presenza di materie volatili.

Il metodo non riguarda l'analisi dei prodotti lattieri in quanto materie prime per alimenti per animali, delle sostanze minerali e miscele essenzialmente composte di sostanze minerali, l'analisi dei grassi e oli vegetali, né quella dei semi e frutti oleaginosi.

**2. Principio**

Il campione è sottoposto a essiccazione in condizioni ben definite, varianti in funzione della natura dell'alimento. La perdita di peso è determinata per pesata. È necessario procedere a una preessiccazione quando si tratta di alimenti solidi aventi un elevato contenuto di umidità.

**3. Apparecchiatura**

3.1. Mulino da laboratorio costruito in materiale non assorbente l'umidità, facile a pulirsi, che permetta una macinazione rapida e uniforme senza provocare un sensibile riscaldamento, eviti al massimo il contatto con l'aria in ambiente esterno e risponda ai requisiti di cui ai punti 4.1.1 e 4.1.2 (ad esempio micromacinatori a martelli o a raffreddamento ad acqua, mulini a cono smontabili, macinatori a movimento lento o a dischi dentati).

3.2. Bilancia analitica (precisione 1 mg).

3.3. Recipienti asciutti, di vetro o di metallo inossidabile, provvisti di coperchi a chiusura ermetica; superficie utile che permetta di ottenere una ripartizione della quantità di prodotto su cui si opera dell'ordine di 0,3 g/cm<sup>2</sup>.

3.4. Stufa isoterma ( $\pm 2$  °C) a riscaldamento elettrico, adeguatamente ventilata, capace di assicurare una regolazione rapida della temperatura <sup>(1)</sup>.

3.5. Stufa a vuoto a riscaldamento elettrico regolabile munita di pompa a olio e di un dispositivo per l'introduzione di aria calda disidratata o di un agente disidratante (ad esempio ossido di calcio).

3.6. Essiccatore a piastra in metallo o in porcellana, spessa, perforata, contenente un efficace disidratante.

**4. Procedimento**

*Nota:* Le operazioni descritte in questo capitolo debbono essere effettuate immediatamente dopo l'apertura degli imballaggi contenenti i campioni. Le analisi vanno eseguite almeno due volte.

<sup>(1)</sup> Per l'essiccazione dei cereali nonché delle farine, semole e semolini, la stufa deve avere una capacità calorifica tale che, preventivamente regolata alla temperatura di 131 °C, possa raggiungere nuovamente tale temperatura in meno di 45 minuti, dopo avervi introdotto il numero massimo di campioni da essiccare simultaneamente. La stufa deve avere una ventilazione tale che, essiccando per due ore tutti i campioni di frumento tenero che essa può contenere, i risultati presentino una differenza inferiore allo 0,15 % rispetto ai risultati ottenuti con quattro ore di essiccazione.

**▼B**4.1. *Preparazione*4.1.1. *Alimenti per animali diversi da quelli menzionati ai punti 4.1.2 e 4.1.3*

Prelevare almeno 50 g di campione. Se necessario macinare o dividere in particelle di grandezza appropriata in modo da evitare ogni variazione del contenuto di umidità (cfr. punto 6).

4.1.2. *Cereali e semole*

Prelevare almeno 50 g di campione. Macinare in particelle di cui almeno la metà passi per un setaccio a maglie di 0,5 mm e non lasci più del 10 % di residuo su un setaccio a maglie rotonde di 1 mm di diametro.

4.1.3. *Alimenti liquidi o pastosi, alimenti costituiti essenzialmente da sostanze grasse*

Prelevare almeno 25 g di campione, pesati con l'approssimazione di 10 mg, e aggiungere una quantità appropriata di sabbia anidra, pesare con l'approssimazione di 10 mg e mescolare sino a ottenere un prodotto omogeneo.

4.2. *Essiccazione*4.2.1. *Alimenti per animali diversi da quelli menzionati ai punti 4.2.2 e 4.2.3*

Tarare, con la precisione di 1 mg, un recipiente (3.3), provvisto di coperchio. Pesare nel recipiente tarato, con l'approssimazione di 1 mg, circa 5 g di prodotto e ripartirli uniformemente. Porre il recipiente, senza coperchio, nella stufa preriscaldata a 103 °C. Per evitare che la temperatura della stufa scenda troppo, introdurre il recipiente nel più breve tempo possibile. Lasciare essiccare per quattro ore a partire dal momento in cui la stufa ha nuovamente raggiunto la temperatura di 103 °C. Rimettere il coperchio sul recipiente, estrarre quest'ultimo dalla stufa, lasciare raffreddare per 30-45 minuti nell'essiccatore (3.6) e pesare con l'approssimazione di 1 mg.

Nel caso di alimenti costituiti essenzialmente da sostanze grasse, lasciare essiccare per altri 30 minuti nella stufa a 130 °C. La differenza tra le due pesate non deve superare lo 0,1 % di umidità.

4.2.2. *Cereali, farine, semole e semolini*

Tarare, con la precisione di 0,5 mg, un recipiente (3.3), provvisto di coperchio. Pesare nel recipiente tarato, con l'approssimazione di 1 mg, 5 g circa di prodotto macinato e ripartirlo uniformemente. Porre il recipiente, senza coperchio, nella stufa preriscaldata a 130 °C. Per evitare che la temperatura della stufa scenda troppo, introdurre il recipiente nel più breve tempo possibile. Lasciare essiccare per due ore a partire dal momento in cui la stufa ha nuovamente raggiunto la temperatura di 130 °C. Rimettere il coperchio sul recipiente, estrarre quest'ultimo dalla stufa, lasciare raffreddare per 30-45 minuti nell'essiccatore (3.6) e pesare con l'approssimazione di 1 mg.

4.2.3. *Alimenti composti contenenti più del 4 % di saccarosio o lattosio: materie prime per mangimi quali carrube, prodotti a base di cereali idrolizzati, germi di malto, fettucce di barbabietola, «solubili» di pesce e zuccheri; alimenti composti contenenti più del 25 % di sali minerali con acqua di cristallizzazione.*

Tarare, con la precisione di 0,5 mg, un recipiente (3.3), provvisto di coperchio. Pesare nel recipiente tarato, con l'approssimazione di 1 mg, circa 5 g di prodotto e ripartirli uniformemente. Porre il recipiente, privo del coperchio, nella stufa a vuoto (3.5) preriscaldata a una temperatura di 80-85 °C. Per evitare che la temperatura della stufa scenda troppo, introdurre il recipiente nel più breve tempo possibile.

Portare la pressione a 100 Torr e lasciare essiccare a questa pressione per quattro ore in corrente d'aria secca e calda, o mediante un disidratante (300 g circa per 20 campioni). In quest'ultimo caso interrompere la connessione con la pompa a vuoto quando è raggiunta la pressione prescritta. Misurare la durata dell'essiccazione a partire dal momento

**▼B**

in cui la stufa ha nuovamente raggiunto la temperatura di 80-85 °C. Riportare poi con precauzione la stufa alla pressione atmosferica. Aprire la stufa, coprire immediatamente il recipiente con il coperchio, estrarlo dalla stufa, lasciarlo raffreddare per 30-45 minuti nell'essiccatore (3.6) e pesare con l'approssimazione di 1 mg. Essiccare per altri 30 minuti nella stufa a vuoto, alla temperatura di 80-85 °C, e pesare di nuovo. La differenza tra le due pesate non deve superare lo 0,1 % di umidità.

4.3. *Preessiccazione*4.3.1. *Alimenti per animali diversi da quelli menzionati al punto 4.3.2*

Gli alimenti solidi, il cui contenuto di umidità è elevato e rende difficile la macinazione, devono essere preessiccati nel modo indicato di seguito.

Pesare, con l'approssimazione di 10 mg, 50 g di prodotto *non macinato* (un grossolano spezzettamento può essere effettuato, se necessario, nel caso di alimenti compressi o agglomerati) in un recipiente appropriato (ad esempio, una piastra di alluminio di 20 × 12 cm con bordo di 0,5 cm). Lasciar essiccare in una stufa alla temperatura di 60-70 °C, sino a che il contenuto di umidità sia portato a un valore compreso tra l'8 e il 12 %. Togliere dalla stufa, lasciar raffreddare il prodotto non coperto nel laboratorio per un'ora e pesare con l'approssimazione di 10 mg. Macinare subito dopo come indicato al punto 4.1.1 ed effettuare l'essiccazione come indicato ai punti 4.2.1 o 4.2.3 secondo la natura dell'alimento.

4.3.2. *Cereali*

I cereali in granella aventi una percentuale di umidità superiore al 17 % debbono essere preessiccati nel modo indicato di seguito.

Pesare, con l'approssimazione di 10 mg, 50 g di cereali in granella non moliti in un recipiente appropriato (ad esempio una piastra di alluminio di 20 × 12 cm con bordo di 0,5 cm). Lasciare essiccare in una stufa per 5-7 minuti alla temperatura di 130 °C. Togliere dalla stufa, lasciar raffreddare il prodotto non coperto nel laboratorio per due ore e pesare con l'approssimazione di 10 mg. Molire subito dopo come indicato al punto 4.1.2 ed effettuare l'essiccazione come indicato al punto 4.2.2.

5. **Calcolo dei risultati**

Il contenuto di umidità (X), espresso in percentuale del campione, è dato dalle seguenti formule:

5.1. *Essiccazione senza preessiccazione*

$$X = \frac{(m - m_0)}{m} \times 100$$

dove

m = peso iniziale, in grammi, della quantità di prodotto sottoposta all'analisi,

m<sub>0</sub> = peso, in grammi, del campione essiccato.

5.2. *Essiccazione con preessiccazione*

$$X_p = \left[ \frac{(m_2 - m_0) \times m_1}{m_2} + m - m_1 \right] \times \frac{100}{m} = 100 \times \left( 1 - \frac{m_1 \times m_0}{m \times m_2} \right)$$

dove

m = peso iniziale, in grammi, della quantità di prodotto sottoposta all'analisi,

m<sub>1</sub> = peso, in grammi, della quantità di prodotto sottoposta all'analisi, dopo la preessiccazione,

m<sub>2</sub> = peso, in grammi, della quantità di prodotto sottoposta all'analisi, dopo la macinazione o frantumazione,

m<sub>0</sub> = peso, in grammi, del campione essiccato.

**▼B**5.3. *Ripetibilità*

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non supera lo 0,2 % di umidità (valore assoluto).

6. **Osservazione**

Qualora sia necessario procedere alla macinazione e questa comporti una variazione nel contenuto di umidità del prodotto, i risultati dell'analisi dei componenti dell'alimento devono essere corretti in funzione del contenuto di umidità del campione iniziale.

## B. DETERMINAZIONE DELL'UMIDITÀ NEI GRASSI E NEGLI OLI ANIMALI E VEGETALI

1. **Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di umidità (acqua ed altre materie volatili) dei grassi e degli oli animali e vegetali.

2. **Principio**

Il campione viene sottoposto ad essiccazione a 103 °C fino a cessazione della diminuzione di massa (la perdita di peso tra due pesate consecutive deve essere inferiore o pari a 1 mg). La perdita di peso è determinata per pesata.

3. **Apparecchiatura**

- 3.1. Recipiente a fondo piano, di materiale resistente alla corrosione, diametro da 8 a 9 cm, altezza di 3 cm circa.
- 3.2. Termometro con bulbo rinforzato e camera di espansione all'estremità superiore, tarato da circa 80 °C ad almeno 110 °C, lunghezza di 10 cm circa.
- 3.3. Bagno di sabbia o piastra elettrica riscaldante.
- 3.4. Essiccatore, contenente un efficace disidratante.
- 3.5. Bilancia per analisi.

4. **Procedimento**

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 20 g circa del campione omogeneizzato nel recipiente (3.1), essiccato e tarato, contenente il termometro (3.2). Riscaldare sul bagno di sabbia o sulla piastra riscaldante (3.3), agitando continuamente con il termometro, in modo da far salire la temperatura a 90 °C in circa 7 minuti.

Ridurre l'intensità del riscaldamento secondo la frequenza con la quale le bolle risalgono dal fondo del recipiente. La temperatura non deve superare i 105 °C. Continuare ad agitare raschiando il fondo del recipiente sino a quando non si formano più bolle.

Per assicurare l'eliminazione completa dell'umidità, riscaldare più volte a 103 ± 2 °C, raffreddando a 93 °C tra i riscaldamenti successivi. Lasciare quindi raffreddare nell'essiccatore (3.4) sino a temperatura ambiente e pesare. Ripetere l'operazione fino a quando la perdita di peso tra due pesate consecutive non supera i 2 mg.

*Nota* Un aumento del peso del campione dopo i ripetuti riscaldamenti indica un'ossidazione del grasso. In questo caso, calcolare il risultato basandosi sulla pesata effettuata immediatamente prima che il peso abbia incominciato ad aumentare.

5. **Calcolo dei risultati**

Il contenuto di umidità, espresso in percentuale del campione, è dato dalla seguente formula:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m}$$

**▼B**

dove

$m$  = peso, in grammi, della quantità di prodotto sottoposta all'analisi,

$m_1$  = peso, in grammi, del recipiente con il suo contenuto prima del riscaldamento,

$m_2$  = peso, in grammi, del recipiente con il suo contenuto dopo il riscaldamento.

I risultati inferiori allo 0,05 % debbono recare la dicitura «meno di 0,05 %».

*Ripetibilità*

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate sullo stesso campione, non deve oltrepassare lo 0,05 % in valore assoluto.

C. DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI PROTEINE GREGGE

1. **Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto in proteine gregge degli alimenti per animali a partire dal contenuto di azoto, dosato secondo il metodo di Kjeldahl.

2. **Principio**

Il campione viene mineralizzato in acido solforico in presenza di un catalizzatore. La soluzione acida è alcalinizzata con una soluzione d'idrossido di sodio. L'ammoniaca viene isolata per distillazione e raccolta in una quantità determinata di acido solforico, il cui eccesso è titolato con una soluzione standard d'idrossido di sodio.

In alternativa, l'ammoniaca liberatasi viene distillata in un eccesso di soluzione di acido borico e successivamente titolata con una soluzione di acido cloridrico o acido solforico.

3. **Reattivi**

- 3.1. Solfato di potassio.
- 3.2. Catalizzatore: ossido rameico (II) CuO o solfato di rame (II) pentaidrato  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
- 3.3. Zinco in granuli.
- 3.4. Acido solforico,  $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$ .
- 3.5. Acido solforico, soluzione volumetrica standard,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$ .
- 3.6. Acido solforico, soluzione volumetrica,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$ .
- 3.7. Acido solforico, soluzione volumetrica standard,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$ .
- 3.8. Indicatore rosso di metile: sciogliere 300 mg di rosso di metile in 100 ml di etanolo,  $\sigma = 95\text{-}96 \text{ \% (v/v)}$ .
- 3.9. Soluzione d'idrossido di sodio (è possibile usare quello di purezza tecnica),  $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$ .
- 3.10. Idrossido di sodio, soluzione standard volumetrica,  $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$ .
- 3.11. Idrossido di sodio, soluzione volumetrica standard,  $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$ .
- 3.12. Pietra pomice in granulati, lavata con acido cloridrico e calcinata.
- 3.13. Acetanilide (p.f. =  $114 \text{ }^\circ\text{C}$ , contenuto N = 10,36 %).
- 3.14. Saccarosio (esente da azoto).
- 3.15. Acido borico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ).
- 3.16. Soluzione d'indicatore rosso di metile: sciogliere 100 mg di rosso di metile in 100 ml di etanolo o metanolo.

**▼B**

3.17. Soluzione di verde di bromocresolo: sciogliere 100 mg di verde di bromocresolo in 100 ml di etanolo o metanolo.

3.18. Soluzione di acido borico (da 10 g/l a 40 g/l a seconda dell'apparecchiatura utilizzata)

Quando è applicato il metodo di determinazione colorimetrica del punto finale vanno aggiunti alle soluzioni di acido borico gli indicatori rosso di metile e bromocresolo. Nella preparazione di 1 litro di soluzione di acido borico, prima di portare a volume, aggiungere 7 ml di soluzione d'indicatore rosso metile (3.16) e 10 ml di soluzione di verde di bromocresolo (3.17).

A seconda dell'acqua utilizzata, il pH della soluzione di acido borico può variare da una partita all'altra. Per ottenere una prova in bianco positiva è spesso necessario un trattamento con una piccola quantità di alcali.

*Nota.*: L'aggiunta di circa 3-4 ml di NaOH (3.11) a 1 litro di soluzione di acido borico a 10 g/l dà in genere buoni risultati. Conservare la soluzione a temperatura ambiente e proteggerla dalla luce e da sorgenti di fumi di ammoniaca.

3.19. Acido cloridrico, soluzione volumetrica standard,  $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$ .

*Nota.*: Si possono utilizzare altre concentrazioni di soluzioni volumetriche (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 e 3.19) a condizione di apportare le necessarie correzioni nei calcoli. Le concentrazioni sono espresse sempre in cifre a quattro decimali.

#### 4. **Apparecchiatura**

Apparecchi per mineralizzazione, distillazione e titolazione secondo il metodo di Kjeldahl.

#### 5. **Procedimento**

##### 5.1. *Mineralizzazione*

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 1 g del campione e introdurlo nel pallone dell'apparecchio di mineralizzazione. Aggiungere 15 g di solfato di potassio (3.1), una quantità appropriata di catalizzatore (3.2) [da 0,3 g a 0,4 g di ossido rameico, oppure da 0,9 g a 1,2 g di solfato di rame (II) pentaidrato], 25 ml di acido solforico (3.4) e, se necessario, frammenti di pietra pomice (3.12). Mescolare.

Riscaldare il pallone prima moderatamente, agitando di tanto in tanto, se necessario, fino a carbonizzazione della massa e a scomparsa della schiuma; quindi scaldare più intensamente sino a ebollizione regolare del liquido. Il riscaldamento è adeguato se l'acido bollendo si condensa sulle pareti del pallone. Evitare che le pareti si surriscaldino e che particelle organiche vi aderiscano.

Quando la soluzione diventa limpida e di colore verde pallido prolungare l'ebollizione ancora per due ore. Lasciare quindi raffreddare.

##### 5.2. *Distillazione*

Aggiungere con precauzione un quantitativo d'acqua sufficiente a sciogliere completamente i solfati. Lasciar raffreddare. Aggiungere quindi, se necessario, qualche granulo di zinco (3.3). Procedere secondo il punto 5.2.1 o 5.2.2.

##### 5.2.1. *Distillazione in acido solforico*

Introdurre nel matraccio collettore dell'apparecchio di distillazione 25 ml misurati esattamente di acido solforico (3.5 o 3.7, a seconda del presunto contenuto di azoto) e qualche goccia di indicatore al rosso di metile (3.8).

**▼B**

Collegare il pallone di mineralizzazione al refrigerante dell'apparecchio di distillazione e immergere l'estremità di quest'ultimo per almeno 1 cm nel liquido del matraccio collettore (cfr. osservazione al punto 8.3). Versare lentamente nel pallone 100 ml di soluzione di idrossido di sodio (3.9) senza provocare una perdita di ammoniaca (cfr. osservazione al punto 8.1). Scaldare il pallone fino a distillazione completa dell'ammoniaca.

**5.2.2. Distillazione in acido borico**

Quando la titolazione del contenuto di ammoniaca del distillato è realizzata manualmente, si applica il metodo indicato di seguito. Quando l'unità di distillazione è interamente automatizzata, anche per quanto riguarda la titolazione del tenore di ammoniaca del distillato, seguire le istruzioni d'uso di tale unità fornite dal fabbricante.

Collocare un matraccio collettore contenente 25-30 ml della soluzione di acido borico (3.18) alla bocca d'uscita del refrigerante in modo che il tubo di evacuazione si trovi al di sotto della superficie dell'eccesso di soluzione di acido borico. Regolare l'unità di distillazione per ottenere 50 ml di soluzione di idrossido di sodio (3.9). Far funzionare l'unità di distillazione conformemente alle istruzioni fornite dal fabbricante ed eliminare l'ammoniaca liberatasi per distillazione aggiungendo la soluzione di idrossido di sodio. Raccogliere il distillato nella soluzione di acido borico. La quantità di distillato (tempo di distillazione in corrente di vapore) dipende dal tenore di azoto nel campione. Seguire le indicazioni fornite dal fabbricante.

*Nota:* In un'unità di distillazione semiautomatica l'aggiunta di eccesso di idrossido di sodio e la distillazione in corrente di vapore avvengono automaticamente.

**5.3. Titolazione**

Procedere conformemente al punto 5.3.1 o 5.3.2.

**5.3.1. Acido solforico**

Titolare l'eccesso di acido solforico nel matraccio collettore per mezzo di una soluzione d'idrossido di sodio (3.10 o 3.11) secondo la concentrazione dell'acido solforico usato, sino a raggiungere il punto finale.

**5.3.2. Acido borico**

Titolare il contenuto del matraccio collettore con la soluzione volumetrica standard di acido cloridrico (3.19) o con la soluzione volumetrica standard di acido solforico (3.6) per mezzo di una buretta e leggere la quantità di soluzione titolata utilizzata.

Quando è applicato il metodo di determinazione colorimetrica del punto finale, si raggiunge il punto finale all'apparire della prima traccia di colore rosa nel contenuto. Valutare il contenuto della buretta con l'approssimazione di 0,05 ml. La visualizzazione del punto finale può essere facilitata per mezzo di un rivelatore fotometrico.

È possibile farlo automaticamente per mezzo di un'unità di distillazione in corrente di vapore a titolazione automatica.

Seguire le istruzioni del fabbricante relative al funzionamento dell'unità di distillazione o del distillatore titolatore, a seconda dei casi.

*Nota:* Quando è utilizzato un sistema di titolazione automatica, con soluzione di acido borico all'1 % (3.18), la titolazione inizia non appena avviene la distillazione.

**▼ B**

In caso di utilizzo di un'unità di distillazione interamente automatica, anche la titolazione automatica dell'ammoniaca può essere eseguita applicando il metodo di determinazione del punto finale per mezzo di un sistema di titolazione potenziometrica del pH.

In questo caso si ricorre ad un titolatore automatico con pH-metro, tarato in maniera appropriata entro una gamma di valori compresa tra pH 4 e pH 7 conformemente ai normali metodi di taratura del pH in laboratorio.

Il punto finale in pH della titolazione è raggiunto a pH 4,6, che corrisponde al punto di inflessione (o di flesso) della curva di titolazione.

5.4. *Prova in bianco*

Per confermare che i reattivi sono esenti da azoto, effettuare una prova in bianco (mineralizzazione, distillazione e titolazione) sostituendo il campione con 1 g di saccarosio (3.14).

6. **Calcolo dei risultati**

I calcoli sono effettuati conformemente ai punti 6.1 o 6.2.

6.1. *Calcolo per la titolazione conformemente al punto 5.3.1*

Calcolare il tenore di proteine gregge, espresso in percentuale di peso, con la formula seguente:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

dove

$V_0$  = volume (ml) di NaOH (3.10 o 3.11) usato nella prova in bianco;  
 $V_1$  = volume (ml) di NaOH (3.10 o 3.11) usato nella titolazione del campione;

$c$  = concentrazione (mol/l) dell'idrossido di sodio (3.10 o 3.11);

$m$  = peso (g) del campione.

6.2. *Calcolo per la titolazione conformemente al punto 5.3.2*6.2.1. **Titolazione con acido cloridrico**

Calcolare il tenore di proteine gregge, espresso in percentuale di peso, con la formula seguente:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1,4 \times 6,25}{m}$$

dove

$m$  = peso (g) della quantità di sostanza sottoposta all'analisi;

$c$  = concentrazione (mol/l) della soluzione volumetrica standard di acido cloridrico (3.19);

$V_0$  = volume (ml) di acido cloridrico usato nella prova in bianco;

$V_1$  = volume (ml) di acido cloridrico usato per la quantità di sostanza sottoposta all'analisi.

6.2.2. **Titolazione con acido solforico**

Calcolare il tenore di proteine gregge, espresso in percentuale di peso, con la formula seguente:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2,8 \times 6,25}{m}$$

**▼ B**

dove

$m$  = peso (g) della quantità di sostanza sottoposta all'analisi;  
 $c$  = concentrazione (mol/l) della soluzione volumetrica standard di acido solforico (3.6);  
 $V_0$  = volume (ml) di acido solforico usato per la prova in bianco;  
 $V_1$  = volume (ml) di acido solforico (3.6) usato per la quantità di sostanza sottoposta all'analisi.

## 7. Verifica del metodo

### 7.1. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare:

- lo 0,2 % in valore assoluto per i contenuti di proteine gregge inferiori al 20 %;
- l'1,0 % rispetto al valore più elevato, per i contenuti di proteine gregge compresi fra il 20 e il 40 %;
- lo 0,4 % in valore assoluto per i contenuti di proteine gregge superiori al 40 %.

### 7.2. Precisione

Eseguire l'analisi (mineralizzazione, distillazione e titolazione) su 1,5-2,0 g di acetanilide (3.13) in presenza di 1 g di saccarosio (3.14); 1 g di acetanilide consuma 14,80 ml di acido solforico (3.5). Il recupero deve essere almeno del 99 %.

## 8. Osservazioni

- 8.1. L'apparecchiatura può essere di tipo manuale, semiautomatico o automatico. Se l'apparecchio richiede un travasamento tra mineralizzazione e distillazione, il travasamento deve essere effettuato senza perdite. Se il pallone dell'apparecchio di distillazione non è provvisto di un imbuto separatore, aggiungere la soluzione d'idrossido di sodio immediatamente prima di collegare il pallone al refrigerante, lasciando colare lentamente il liquido lungo le pareti.
- 8.2. Se il prodotto mineralizzato si solidifica, ricominciare la determinazione usando un quantitativo di acido solforico (3.4) superiore a quello indicato sopra.
- 8.3. Per i prodotti poveri di sostanze azotate, il volume di acido solforico (3.7) da introdurre nel matraccio collettore può essere ridotto, se necessario, a 10 o 15 ml e portato a 25 ml con acqua.
- 8.4. Per analisi ordinarie possono essere applicati metodi alternativi per determinare le proteine gregge, ma il metodo di Kjeldahl descritto in questa parte C costituisce il metodo di riferimento. L'equivalenza tra i risultati ottenuti con il metodo alternativo (ad esempio, il metodo Dumas) e quelli del metodo di riferimento va dimostrata per ciascuna matrice singolarmente. Dato che i risultati ottenuti con un metodo diverso, anche dopo verifica dell'equivalenza, possono deviare leggermente da quelli ottenuti con il metodo di riferimento, è necessario indicare nella relazione di analisi il metodo utilizzato per la determinazione delle proteine gregge.

## D. DETERMINAZIONE DELL'UREA

### 1. Finalità e campo d'applicazione

Il metodo consente di determinare il contenuto di urea negli alimenti per animali.

**▼ B****2. Principio**

Il campione è messo in sospensione nell'acqua in presenza di un chiarificante. La sospensione è filtrata. Il contenuto di urea del filtrato è determinato, dopo aggiunta di 4-dimetilamminobenzaldeide (4-DMAB), misurando la densità ottica alla lunghezza d'onda di 420 nm.

**3. Reattivi**

- 3.1. Soluzione di 4-dimetilamminobenzaldeide: sciogliere 1,6 g di 4-DMAB in 100 ml di etanolo al 96 % e aggiungere 10 ml di acido cloridrico ( $\rho_{20}$  1,19 g/ml). Questo reattivo si conserva soltanto per due settimane.
- 3.2. Soluzione di Carrez I: sciogliere in acqua 21,9 g di acetato di zinco,  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 3 g di acido acetico glaciale. Portare a 100 ml con acqua.
- 3.3. Soluzione di Carrez II: sciogliere nell'acqua 10,6 g di ferrocianuro di potassio,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Portare a 100 ml con acqua.
- 3.4. Carbone attivo non assorbente urea (eseguire un controllo).
- 3.5. Urea, soluzione allo 0,1 % (p/v).

**4. Apparecchiatura**

- 4.1. Agitatore rotativo a capovolgimento: circa 35-40 giri per minuto.
- 4.2. Provette: 160 × 16 mm, a tappo smerigliato.
- 4.3. Spettrofotometro.

**5. Procedimento****5.1. Analisi del campione**

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 2 g del campione ed introdurli con 1 g di carbone attivo (3.4) in un matraccio tarato da 500 ml. Aggiungere 400 ml di acqua e 5 ml di soluzione di Carrez I (3.2), agitare per circa 30 secondi e aggiungere 5 ml di soluzione di Carrez II (3.3). Mescolare per mezz'ora mediante l'agitatore rotativo a capovolgimento. Portare a volume con acqua, agitare e filtrare.

Prelevare 5 ml di filtrati limpidi ed incolore, introdurli nei tubi da prova con tappo smerigliato, aggiungere 5 ml di soluzione di 4-DMAB (3.1) e mescolare. Porre i tubi in bagnomaria a 20 °C (+/- 4 °C). Dopo 15 minuti, misurare la densità ottica della soluzione del campione con lo spettrofotometro a 420 nm rispetto alla soluzione della prova in bianco dei reattivi.

**5.2. Curva di taratura**

Prelevare volumi di 1, 2, 4, 5 e 10 ml della soluzione di urea (3.5), introdurli in matracci tarati da 100 ml e portare a volume con acqua. Prelevare 5 ml di ciascuna soluzione aggiungendo ogni volta 5 ml di soluzione di 4-DMAB (3.1), mescolare e misurare la densità ottica, come indicato dianzi, rispetto ad una soluzione testimone contenente 5 ml di 4-DMAB e 5 ml d'acqua, esente da urea. Tracciare la curva di taratura.

**6. Calcolo dei risultati**

Determinare la quantità d'urea, nella parte di campione sottoposta all'analisi, servendosi della curva di taratura.

Esprimere il risultato in percentuale del campione.

**7. Osservazioni**

- 7.1. Per contenuti di urea superiori al 3 %, ridurre la quantità di campione da sottoporre all'analisi a 1 g o diluire la soluzione originale, per non avere più di 50 mg d'urea in 500 ml.

**▼B**

- 7.2. Per bassi tenori di urea, aumentare la quantità di campione da sottoporre all'analisi fino a quando il filtrato resta limpido ed incolore.
- 7.3. Quando il prodotto contiene composti azotati semplici, ad esempio amminoacidi, si effettua la misurazione della densità ottica a 435 nm.

**E. DETERMINAZIONE DELLE BASI AZOTATE VOLATILI****I. PER MICRODIFFUSIONE****1. Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di basi azotate volatili, espresse in ammoniaca, degli alimenti per gli animali.

**2. Principio**

Il campione viene estratto con acqua, la soluzione viene chiarificata e filtrata. Le basi azotate volatili sono spostate per mezzo di una soluzione di carbonato di potassio per microdiffusione, raccolte in una soluzione di acido borico e titolate con acido solforico.

**3. Reattivi**

- 3.1. Soluzione al 20 % (p/v) di acido tricloroacetico.
- 3.2. Indicatore: sciogliere 33 mg di verde di bromocresolo e 65 mg di rosso di metile in 100 ml d'etanolo al 95-96 % (v/v).
- 3.3. Soluzione di acido borico: in un pallone tarato da 1 litro, sciogliere 10 g d'acido borico in 200 ml d'etanolo al 95-96 % (v/v) e 700 ml d'acqua. Aggiungere 10 ml di indicatore (3.2). Mescolare e aggiustare, se necessario, il colore della soluzione al rosso chiaro mediante aggiunta di una soluzione d'idrossido di sodio. 1 ml di questa soluzione consente di fissare al massimo 300 µg di ammoniaca.
- 3.4. Soluzione satura di carbonato di potassio: sciogliere 100 g di carbonato di potassio in 100 ml d'acqua portata all'ebollizione. Lasciar raffreddare e filtrare.
- 3.5. Acido solforico 0,01 mol/l.

**4. Apparecchiatura**

- 4.1. Agitatore rotativo a capovolgimento: circa 35-40 giri al minuto
- 4.2. Celle di Conway (cfr. figura), in vetro o in materia plastica.
- 4.3. Microburette, graduate a 1/100 ml.

**5. Procedimento**

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 10 g di sostanza e porli in un pallone tarato da 200 ml con 100 ml d'acqua. Mescolare o agitare il pallone, nell'agitatore rotativo, per 30 minuti. Aggiungere 50 ml della soluzione d'acido tricloroacetico (3.1), portare a volume con acqua, agitare vigorosamente e filtrare su un filtro a pieghe.

Prelevare con una pipetta 1 ml della soluzione di acido borico (3.3) nell'incavo centrale della cella Conway e, nella corona della cella, 1 ml del filtrato ottenuto dal campione. Coprire parzialmente con il coperchio ingrassato. Lasciar scolare rapidamente nella corona periferica 1 ml della soluzione satura di carbonato di potassio (3.4) e chiudere ermeticamente il coperchio. Agitare con precauzione la cella facendola rotare su un piano orizzontale in modo da assicurare la miscelazione dei due reattivi. Mantenere l'apparecchio per almeno quattro ore alla temperatura ambiente o per un'ora a 40 °C.

Titolare le basi volatili nella soluzione d'acido borico con la soluzione di acido solforico (3.5) per mezzo di una microburette (4.3).

Effettuare una prova in bianco applicando lo stesso procedimento, in assenza del campione da analizzare.

**▼ B****6. Calcolo dei risultati**

1 ml di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,01 mol/l corrisponde a 0,34 mg di ammoniaca.

Esprimere il risultato in percentuale del campione.

Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non supera:

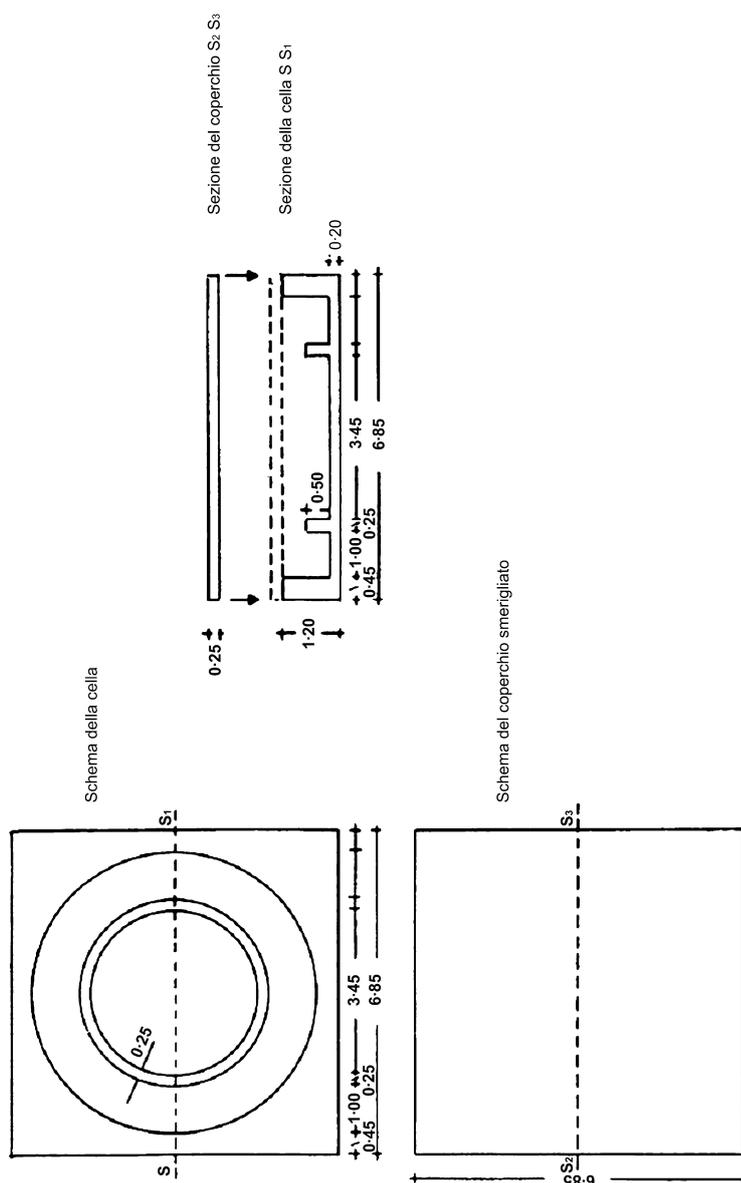
- il 10 %, in valore relativo, per i contenuti di ammoniaca inferiori a 1,0 %,
- lo 0,1 %, in valore assoluto, per i contenuti di ammoniaca uguali o superiori all'1,0 %.

**7. Osservazione**

Se il contenuto di ammoniaca del campione è superiore allo 0,6 %, diluire il filtrato iniziale.

**CONWAY CELL**

Scale 1/1



**▼B****II. PER DISTILLAZIONE****1. Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di basi azotate volatili, espresse in ammoniaca, delle farine di pesce non contenenti, praticamente, urea. Il metodo è applicabile unicamente a contenuti di ammoniaca inferiori a 0,25 %.

**2. Principio**

Il campione viene estratto con acqua, la soluzione è chiarificata e filtrata. Le basi azotate volatili sono portate/spostate all'ebollizione per aggiunta di ossido di magnesio e raccolte in una quantità determinata d'acido solforico il cui eccesso viene titolato di ritorno con una soluzione d'idrossido di sodio.

**3. Reattivi**

- 3.1. Soluzione al 20 % (p/v) di acido tricloroacetico.
- 3.2. Ossido di magnesio.
- 3.3. Emulsione antischiuma (ad esempio, silicone).
- 3.4. Acido solforico 0,05 mol/l.
- 3.5. Soluzione di idrossido di sodio (0,1 mol/l).
- 3.6. Soluzione allo 0,3 % (v/v) di rosso di metile in etanolo al 95-96 % (v/v).

**4. Apparecchiatura**

- 4.1. Agitatore rotativo a capovolgimento: circa 35-40 giri al minuto.
- 4.2. Apparecchio per distillazione del tipo Kjeldahl.

**5. Procedimento**

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 10 g di sostanza e introdurli in un pallone tarato da 200 ml con 100 ml d'acqua. Mescolare o agitare il pallone, nell'agitatore rotativo, per 30 minuti. Aggiungere 50 ml della soluzione d'acido tricloroacetico (3.1), portare a volume con acqua, agitare vigorosamente e filtrare su un filtro a pieghe.

Prelevare una quantità di filtrato limpido in funzione del presunto contenuto di basi azotate volatili (100 ml sono generalmente sufficienti). Diluire a 200 ml e aggiungere 2 g di ossido di magnesio (3.2) e qualche goccia di emulsione antischiuma (3.3). La soluzione deve risultare alcalina alla cartina tornasole, altrimenti aumentare la quantità di ossido di magnesio (3.2). Procedere conformemente ai punti 5.2 e 5.3 del metodo di analisi per la determinazione del contenuto di proteine gregge (parte C del presente allegato).

Effettuare una *prova in bianco* applicando lo stesso procedimento, in assenza del campione da analizzare.

**6. Calcolo dei risultati**

1 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol/l corrisponde a 1,7 mg di ammoniaca.

Esprimere il risultato in percentuale del campione.

**Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non supera, in valore relativo, il 10 % di ammoniaca.

**F. DETERMINAZIONE DEGLI AMMINOACIDI (TRIPTOFANO ESCLUSO)****1. Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo serve per determinare gli amminoacidi liberi (sia di sintesi che naturali) e totali (legati a peptidi e liberi) negli alimenti per animali mediante un analizzatore di amminoacidi. Il metodo è applicabile ai

**▼B**

seguenti amminoacidi: cist(e)ina, metionina, lisina, treonina, alanina, arginina, acido aspartico, acido glutammico, glicina, istidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina e valina.

Il metodo non distingue gli amminoacidi dai loro sali e non può distinguere la forma D degli amminoacidi dalla forma L; esso non è adatto per la determinazione del triptofano né degli analoghi idrossilati degli amminoacidi.

**2. Principio****2.1. Amminoacidi liberi**

Gli amminoacidi liberi sono estratti con acido cloridrico diluito. Le macromolecole azotate coestratte vengono fatte precipitare con acido solfosalicilico e vengono rimosse per filtrazione. La soluzione filtrata viene portata a pH 2,20. Gli amminoacidi sono separati mediante cromatografia a scambio ionico e determinati per reazione con la ninidrina e con rivelazione fotometrica a 570 nm.

**2.2. Amminoacidi totali**

La scelta della procedura dipende dagli amminoacidi oggetto dell'analisi. Cist(e)ina e metionina devono essere ossidate ad acido cisteico e al metionina sulfone prima dell'idrolisi. La tirosina deve essere determinata in idrolizzati di campioni non ossidati. Tutti gli altri amminoacidi elencati al punto 1 possono essere determinati sia nel campione ossidato sia in quello non ossidato.

L'ossidazione viene eseguita a 0 °C con una miscela di acido performico e di fenolo. L'eccesso del reagente di ossidazione viene decomposto con metabisolfito di sodio. Il campione ossidato o non ossidato è idrolizzato con acido cloridrico (3.20) per 23 ore. L'idrolizzato è regolato a pH 2,20. Gli amminoacidi sono separati mediante cromatografia a scambio ionico e determinati per reazione con la ninidrina e con rivelazione fotometrica a 570 nm (440 nm per la prolina).

**3. Reattivi**

Usare acqua bidistillata o di qualità equivalente (conduttività < 10 µS).

3.1. Perossido d'idrogeno, p (p/p) = 30 %.

3.2. Acido formico, p (p/p) = 98-100 %.

3.3. Fenolo.

3.4. Metabisolfito di sodio.

3.5. Idrossido di sodio.

3.6. Acido 5-solfosalicilico diidrato.

3.7. Acido cloridrico, densità circa 1,18 g/ml.

3.8. Citrato trisodico diidrato.

3.9. 2,2'-Tiodietanolo (tiodiglicole).

3.10. Cloruro di sodio.

3.11. Ninidrina.

3.12. Etere di petrolio, intervallo di ebollizione: 40-60 °C.

3.13. Norleucina o altro composto adatto ad essere utilizzato come standard interno.

**▼B**

- 3.14. Azoto gassoso (< 10 ppm di ossigeno).
- 3.15. 1-Ottanolo.
- 3.16. Amminoacidi.
- 3.16.1. Sostanze di riferimento elencate al punto 1. Composti puri non contenenti acqua di cristallizzazione. Essiccare sotto vuoto su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> per una settimana prima dell'uso.
- 3.16.2. Acido cisteico.
- 3.16.3. Metionina sulfone.
- 3.17. Soluzione di idrossido di sodio, c = 7,5 mol/l:  
sciogliere 300 g di NaOH (3.5) in acqua e portare a 1 litro.
- 3.18. Soluzione di idrossido di sodio, c = 1 mol/l:  
sciogliere 40 g di NaOH (3.5) in acqua e portare a 1 litro.
- 3.19. Soluzione di acido formico-fenolo:  
miscelare 889 g di acido formico (3.2) con 111 g d'acqua e aggiungere 4,73 g di fenolo (3.3).
- 3.20. Miscela di idrolisi, c = HCl 6 mol/l contenente 1 g di fenolo:  
aggiungere 1 g di fenolo (3.3) a 492 ml di HCl (3.7) e portare a 1 litro con acqua.
- 3.21. Miscela di estrazione, c = HCl 0,1 mol/l contenente 2 % di tiodiglicole: introdurre 8,2 ml di HCl (3.7) in circa 900 ml d'acqua e miscelare, aggiungere 20 ml di tiodiglicolo (3.9) e portare a 1 litro con acqua (non miscelare direttamente le sostanze di cui ai punti 3.7 e 3.9).
- 3.22. Acido 5-solfosalicilico: β = 6 %:  
sciogliere 60 g di acido 5-solfosalicilico (3.6) in acqua e portare a 1 litro con acqua.
- 3.23. Miscela di ossidazione (acido performico-fenolo):  
miscelare 0,5 ml di perossido di idrogeno (3.1) con 4,5 ml di soluzione di acido formico e fenolo (3.19) in un piccolo becher. Tenere in incubazione a 20-30 °C per un'ora per ottenere acido performico; lasciare raffreddare su un bagno di acqua gelata (15 min) prima di aggiungere il campione.  
  
Attenzione: evitare il contatto con la pelle e indossare indumenti di protezione.
- 3.24. Tampone citrato, c = Na<sup>+</sup> 0,2 mol/l, pH 2,20:  
sciogliere 19,61 g di citrato di sodio (3.8), 5 ml di tiodiglicole (3.9), 1 g di fenolo (3.3) e 16,50 ml di HCl (3.7) in circa 800 ml d'acqua. Portare il pH a 2,20. Portare a 1 litro con acqua.
- 3.25. Tamponi di eluizione preparati conformemente alle prescrizioni relative all'analizzatore (4.9).
- 3.26. Reattivo alla ninidrina preparato conformemente alle prescrizioni relative all'analizzatore (4.9).
- 3.27. Soluzioni standard di amminoacidi. Conservare queste soluzioni a temperatura inferiore a 5 °C.

**▼B**

## 3.27.1. Soluzione madre standard di amminoacidi (3.16.1).

$c = 2,5 \mu\text{mol/ml}$  di ciascuno in acido cloridrico.

Reperibile in commercio.

3.27.2. Soluzione madre standard di acido cisteico e metionina sulfone,  $c = 1,25 \mu\text{mol/ml}$ .

Sciogliere 0,2115 g di acido cisteico (3.16.2) e 0,2265 g di metionina sulfone (3.16.3) in tampone citrato (3.24) in un matraccio tarato da 1 litro e portare a volume con tampone citrato. Conservare a temperatura inferiore a 5 °C al massimo per 12 mesi. Questa soluzione non viene utilizzata se la soluzione madre standard (3.27.1) contiene acido cisteico e metionina sulfone.

3.27.3. Soluzione madre standard, ad esempio norleucina,  $c = 20 \mu\text{mol/ml}$ .

Sciogliere 0,6560 g di norleucina (3.13) in tampone citrato (3.24) in un matraccio tarato e portare a 250 ml con tampone citrato. Conservare a temperatura inferiore a 5 °C al massimo per 6 mesi.

3.27.4. Soluzione di taratura degli amminoacidi standard da usarsi con idrolizzati,  $c = 5 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$  di acido cisteico e metionina sulfone e  $c = 10 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$  di altri amminoacidi. Sciogliere 2,2 g di cloruro di sodio (3.10) in un becher da 100 ml con 30 ml di tampone citrato (3.24). Aggiungere 4,00 ml di soluzione madre standard di amminoacidi (3.27.1), 4,00 ml di soluzione madre standard di acido cisteico e metionina sulfone (3.27.2) e, se del caso, 0,50 ml di soluzione madre standard dello standard interno (3.27.3). Portare il pH a 2,20 con idrossido di sodio (3.18).

Trasferire quantitativamente in un matraccio tarato da 50 ml, portare a volume con tampone citrato (3.24) e miscelare.

Conservare a temperatura inferiore a 5 °C al massimo per 3 mesi.

Cfr. anche le osservazioni al punto 9.1.

## 3.27.5. Soluzione di taratura degli amminoacidi standard da usarsi con idrolizzati preparati secondo quanto prescritto al punto 5.3.3.1 e destinati all'uso con estratti (5.2). Preparare la soluzione di taratura secondo quanto indicato al punto 3.27.4, ma senza cloruro di sodio.

Conservare a temperatura inferiore a 5 °C al massimo per 3 mesi.

**4. Apparecchiatura**

## 4.1. Pallone a fondo arrotondato da 100 o 250 ml provvisto di refrigerante a ricadere.

## 4.2. Flacone di vetro borosilicatico da 100 ml con tappo a vite e guarnizione di gomma/teflon (ad esempio Duran, Schott) utilizzabile in stufa.

4.3. Stufa a ventilazione forzata con regolazione della temperatura avente una precisione superiore a  $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 4.4. pH-metro (a tre cifre decimali).

4.5. Filtro a membrana, da 0,22  $\mu\text{m}$ .

## 4.6. Centrifuga.

## 4.7. Evaporatore rotante sotto vuoto.

## 4.8. Agitatore meccanico o mescolatore magnetico.

**▼B**

- 4.9. Analizzatore di amminoacidi o apparecchiatura HPLC provvista di colonna a scambio ionico, dispositivo per ninidrina, derivatizzatore post-colonna e rivelatore fotometrico.

La colonna deve essere riempita di resine polistireniche sulfonate in grado di separare gli amminoacidi uno dall'altro e da altri prodotti reattivi alla ninidrina. Il flusso del tampone e del reattivo di ninidrina è garantito da pompe il cui grado di stabilità di portata è  $\pm 0,5$  % nell'intervallo tra l'analisi della soluzione di taratura e l'analisi del campione.

Con alcuni analizzatori di amminoacidi si possono utilizzare metodi di idrolisi in cui l'idrolizzato presenta una concentrazione di sodio di  $c = 0,8$  mol/l e contiene tutto l'acido formico residuo dalla fase di ossidazione. Altri apparecchi non consentono una separazione soddisfacente di certi amminoacidi se l'idrolizzato contiene troppo acido formico e/o presenta elevate concentrazioni di ioni sodio. In questo caso il volume dell'acido è ridotto a circa 5 ml mediante evaporazione dopo l'idrolisi e prima della regolazione del pH. L'evaporazione è eseguita sotto vuoto a temperatura non superiore a 40 °C.

5. **Procedimento**

5.1. *Preparazione del campione*

Il campione viene triturato in modo che possa passare attraverso un vaglio da 0,5 mm. I campioni molto umidi devono essere essiccati all'aria ad una temperatura non superiore a 50 °C o liofilizzati prima di essere triturati. I campioni ad alto tenore di grassi sono estratti con etere di petrolio (3.12) prima di essere triturati.

5.2. *Determinazione degli amminoacidi liberi negli alimenti per animali e nelle premiscele*

Pesare con l'approssimazione di 0,2 mg una quantità appropriata (1-5 g) del campione preparato (5.1) in una beuta e aggiungere 100,0 ml di miscela di estrazione (3.2.1). Agitare la miscela per 60 minuti con un agitatore o meccanico o miscelatore magnetico (4.8). Lasciar depositare il sedimento e pipettare 10,0 ml della soluzione surnatante in un becher da 100 ml.

Aggiungere 5,0 ml di soluzione di acido solfosalicilico (3.22) sempre agitando e continuare ad agitare con agitatore magnetico per 5 minuti. Filtrare o centrifugare il surnatante per rimuovere eventuali precipitati. Introdurre 10,0 ml della soluzione risultante in un becher da 100 ml e portare il pH a 2,20 con una soluzione di idrossido di sodio (3.18), trasferire in un matraccio tarato di volume appropriato utilizzando tampone citrato (3.24) e portare a volume con la soluzione tampone (3.24).

Se si usa uno standard interno, aggiungere 1,00 ml di standard interno (3.27.3) ogni 100 ml di soluzione finale e portare a volume con la soluzione tampone (3.24).

Procedere alla fase della cromatografia secondo quanto indicato al punto 5.4.

Se gli estratti non vengono cromatografati lo stesso giorno, conservarli a temperatura inferiore a 5 °C.

5.3. *Determinazione degli amminoacidi totali*

5.3.1. *Ossidazione*

Pesare, con l'approssimazione di 0,2 mg, da 0,1 a 1 g del campione preparato (5.1) in:

— un pallone a fondo arrotondato da 100 ml (4.1) per l'idrolisi in sistema aperto (5.3.2.3), o

**▼B**

- un pallone a fondo arrotondato da 250 ml (4.1) se è richiesta una bassa concentrazione di sodio, o
- un flacone da 100 ml dotato di tappo a vite (4.2) per l'idrolisi in sistema chiuso (5.3.2.4).

La porzione di campione pesata deve avere un contenuto d'azoto di circa 10 mg e un contenuto di umidità non superiore a 100 mg.

Introdurre il pallone o il flacone in un bagno di acqua e ghiaccio e raffreddare a 0 °C; aggiungere 5 ml di miscela di ossidazione (3.23) e miscelare con una spatola di vetro con un'estremità ricurva. Sigillare il pallone o flacone contenente la spatola con una pellicola impermeabile all'aria, introdurre il bagno di acqua e ghiaccio contenente il contenitore sigillato in un frigorifero a 0 °C e lasciarvelo per 16 ore. Dopo 16 ore togliere dal frigorifero e decomporre l'eccesso di reagente di ossidazione mediante l'aggiunta di 0,84 g di bisolfito di sodio (3.4).

Procedere come indicato al punto 5.3.2.1.

### 5.3.2. Idrolisi

#### 5.3.2.1. *Idrolisi dei campioni ossidati*

Aggiungere al campione ossidato, preparato conformemente al punto 5.3.1, 25 ml di miscela di idrolisi (3.20) avendo cura di risciacquare eventuali residui di campione che aderiscono alle pareti del recipiente e alla spatola.

Procedere come indicato al punto 5.3.2.3 o 5.3.2.4, a seconda del metodo di idrolisi utilizzato.

#### 5.3.2.2. *Idrolisi dei campioni non ossidati*

Pesare in un pallone a fondo arrotondato da 100 ml o 250 ml (4.1) o in un flacone da 100 ml con tappo a vite (4.2) (con l'approssimazione di 0,2 mg) una quantità da 0,1 a 1 g del campione preparato (5.1). La porzione di campione pesata deve avere un contenuto di azoto di circa 10 mg. Aggiungere con cautela 25 ml di miscela di idrolisi (3.20) e miscelare con il campione. Procedere come indicato al punto 5.3.2.3 o 5.3.2.4.

#### 5.3.2.3. *Idrolisi, sistema aperto*

Aggiungere 3 biglie di vetro alla miscela (preparata conformemente al punto 5.3.2.1 o 5.3.2.2) contenuta nel pallone e far bollire a ricadere per 23 ore a ebollizione continua. Al completamento dell'idrolisi, risciacquare il refrigerante con 5 ml di tampone citrato (3.24). Togliere il pallone e farlo raffreddare in un bagno di ghiaccio.

Procedere come indicato al punto 5.3.3.

#### 5.3.2.4. *Idrolisi, sistema chiuso*

Introdurre il flacone contenente la miscela, preparata conformemente al punto 5.3.2.1 o 5.3.2.2, in un forno (4.3) a 110 °C. Durante la prima ora, allo scopo di evitare un accumulo di pressione in conseguenza dello sviluppo di sostanze gassose e di evitare un'esplosione, porre il tappo a vite sopra al recipiente senza chiuderlo. Dopo un'ora, chiudere il recipiente con il tappo e lasciarlo nel forno (4.3) per 23 ore. Al completamento dell'idrolisi, togliere il flacone dal forno, aprire con cautela il tappo del flacone e introdurre il flacone in un bagno di acqua e ghiaccio. Lasciar raffreddare.

Secondo la procedura usata per la regolazione del pH (5.3.3), trasferire quantitativamente il contenuto del flacone in un becher da 250 ml o in un pallone a fondo tondo da 250 ml utilizzando tampone citrato (3.24).

Procedere come indicato al punto 5.3.3.

**▼B**

## 5.3.3. Regolazione del pH

Procedere, conformemente al punto 5.3.3.1 o 5.3.3.2, alla regolazione del pH, in funzione della tolleranza al sodio dell'analizzatore di amminoacidi (4.9).

5.3.3.1. *Per sistemi cromatografici (4.9) che richiedono una bassa concentrazione di sodio.*

Quando si impiegano analizzatori di amminoacidi che richiedono una bassa concentrazione di sodio (quando il volume dell'acido deve essere ridotto), è consigliabile utilizzare una soluzione madre standard interna (3.27.3).

In questo caso aggiungere 2,00 ml della soluzione standard interna (3.27.3) all'idrolizzato prima dell'evaporazione.

Aggiungere 2 gocce di 1-ottanolo (3.15) all'idrolizzato ottenuto conformemente alla procedura di cui al punto 5.3.2.3 o 5.3.2.4.

Utilizzando un evaporatore rotante (4.7), ridurre il volume a 5-10 ml sotto vuoto a 40 °C. Se il volume viene ridotto accidentalmente a meno di 5 ml, scartare l'idrolizzato e ricominciare l'analisi.

Portare il pH a 2,20 con soluzione di idrossido di sodio (3.18) e procedere conformemente al punto 5.3.4.

5.3.3.2. *Per tutti gli altri analizzatori di amminoacidi (4.9)*

Neutralizzare parzialmente gli idrolizzati ottenuti conformemente al punto 5.3.2.3 o 5.3.2.4, aggiungendovi con cautela, sempre agitando, 17 ml di soluzione di idrossido di sodio (3.17), facendo attenzione che la temperatura rimanga al di sotto di 40 °C.

Portare il pH a 2,20 a temperatura ambiente utilizzando la soluzione di idrossido di sodio di cui al punto 3.17 e, infine, una soluzione di idrossido di sodio conforme al punto 3.18. Procedere conformemente al punto 5.3.4.

## 5.3.4. Soluzione del campione per cromatografia

Trasferire quantitativamente l'idrolizzato portato a pH 2,20 (5.3.3.1 o 5.3.3.2) con tampone citrato (3.24) in un matraccio tarato da 200 ml e portare a volume con tampone (3.24).

Se non è stato ancora utilizzato uno standard interno, aggiungerne 2,00 ml (3.27.3) e portare a volume con tampone citrato (3.24). Miscelare accuratamente.

Procedere alla fase della cromatografia (5.4).

Se le soluzioni del campione non vengono cromatografate nello stesso giorno, conservarle a temperatura inferiore a 5 °C.

## 5.4. Cromatografia

Prima della cromatografia, portare l'estratto (5.2) o l'idrolizzato (5.3.4) a temperatura ambiente. Agitare la miscela e filtrarne una quantità appropriata attraverso un filtro a membrana da 0,22 µm (4.5). La soluzione limpida risultante viene sottoposta a cromatografia a scambio ionico utilizzando un analizzatore di amminoacidi (4.9).

L'iniezione può venire eseguita manualmente o automaticamente. È importante iniettare sempre la stessa quantità ( $\pm 0,5$  %) di soluzione nella colonna per l'analisi degli standard e dei campioni, salvo quando si usa uno standard interno; inoltre i rapporti sodio/amminoacidi nello standard e nelle soluzioni del campione devono essere il più possibile simili.

**▼ B**

La frequenza delle iniezioni della soluzione di taratura dipende dalla stabilità del reattivo ninidrina e del sistema analitico. La soluzione standard o del campione è diluita con tampone citrato (3.24) in misura tale che l'area del picco della soluzione standard sia compresa fra il 30 % e il 200 % dell'area del picco dell'amminoacido nel campione.

La cromatografia degli amminoacidi varierà leggermente secondo il tipo di analizzatore impiegato e la resina usata. Il sistema scelto deve essere in grado di separare gli amminoacidi uno dall'altro e dalle sostanze reattive alla ninidrina. Nel corso dell'operazione, il sistema cromatografico deve dare una risposta lineare alle variazioni delle quantità di amminoacidi introdotti in colonna.

Durante la fase di cromatografia, quando si analizza una soluzione equimolare (degli amminoacidi sottoposti a determinazione), si applicano i rapporti di altezza valle/picco citati più avanti. La soluzione equimolare deve contenere almeno il 30 % del carico massimo di ciascun amminoacido che può essere determinato con precisione tramite il sistema di analisi degli amminoacidi (4.9).

Per la separazione treonina-serina, il rapporto di altezza valle/picco del più basso dei due amminoacidi che si sovrappongono sul cromatogramma non deve superare 2/10 [se la determinazione viene effettuata solo su cist(e)ina, metionina, treonina e lisina, una insufficiente separazione di picchi adiacenti influirà sfavorevolmente sulla determinazione]. Per tutti gli altri amminoacidi la separazione deve essere maggiore di 1/10.

Il sistema deve poter separare la lisina da «artefatti di lisina» e dall'ornitina.

## 6. Calcolo dei risultati

Determinare le aree del picco del campione e della soluzione standard per ogni singolo amminoacido e calcolare la quantità (X) in g di amminoacido per kg di campione secondo la seguente formula:

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1\,000}$$

Se si usa uno standard interno moltiplicare per:  $\frac{D}{C}$

- A = area del picco dell'idrolizzato o dell'estratto
- B = area del picco della soluzione standard di taratura
- C = area del picco dello standard interno nell'idrolizzato o nell'estratto
- D = area del picco dello standard interno, soluzione standard di taratura
- M = peso molecolare dell'amminoacido determinato
- c = concentrazione dello standard in  $\mu\text{mol/ml}$
- m = peso del campione in g (corretto al peso originale se essiccato o sgrassato)
- V = ml totali di idrolizzato (5.3.4) o ml del volume di diluizione totale calcolati dell'estratto (6.1).

La cistina e la cisteina sono determinate entrambe sotto forma di acido cisteico negli idrolizzati di campione ossidato, ma calcolate come cistina ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ , M 240,30 g/mol) utilizzando un peso molecolare di 120,15 g/mol (=  $0,5 \times 240,30$  g/mol).

La metionina è determinata come metionina sulfone negli idrolizzati del campione ossidato, ma calcolata come metionina utilizzando il peso molecolare della metionina (149,21 g/mol).

**▼B**

La metionina libera aggiunta viene determinata dopo estrazione sotto forma di metionina; per il calcolo si usa lo stesso valore M.

- 6.1. Il volume della diluizione totale degli estratti (F) per la determinazione degli amminoacidi liberi (5.2) è calcolato come segue:

$$F = \frac{100 \text{ ml} \times (10 \text{ ml} + 5 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} \times \frac{V}{10}$$

V = volume dell'estratto finale.

7. **Valutazione del metodo**

Il metodo è stato testato nel 1990, nel corso di un confronto internazionale tra laboratori sulla base di quattro diversi alimenti per animali (alimento composto per suini, alimento composto per polli da ingrasso, concentrato proteico, premiscela). Le medie e le deviazioni standard ottenute dopo l'eliminazione dei risultati anomali figurano nelle seguenti tabelle:

**Medie in g/kg**

Materiale di riferimento	Amminoacido			
	Treonina	Cist(e)ina	Metionina	Lisina
Alimento composto per suini	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Alimento composto per polli da ingrasso	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Concentrato proteico	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premiscela	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = numero di laboratori partecipanti.

7.1. *Ripetibilità*

La ripetibilità (espressa come «deviazione standard entro il laboratorio») del confronto tra laboratori è presentata nelle seguenti tabelle:

**Deviazione standard entro il laboratorio (S<sub>r</sub>) in g/kg**

Materiale di riferimento	Amminoacido			
	Treonina	Cist(e)ina	Metionina	Lisina
Alimento composto per suini	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Alimento composto per polli da ingrasso	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Concentrato proteico	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Premiscela	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = numero di laboratori partecipanti.

## ▼B

**Coefficiente di variabilità (%) per la deviazione standard entro il laboratorio (S<sub>r</sub>)**

Materiale di riferimento	Amminoacido			
	Treonina	Cist(e)ina	Metionina	Lisina
Alimento composto per suini	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Alimento composto per polli da ingrasso	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Concentrato proteico	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premiscela	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = numero di laboratori partecipanti.

## 7.2. Riproducibilità

I risultati relativi alla deviazione standard tra laboratori ottenuti dal confronto tra laboratori figurano nelle seguenti tabelle:

**Deviazione standard tra laboratori (S<sub>r</sub>) in g/kg**

Materiale di riferimento:	Amminoacido			
	Treonina	Cist(e)ina	Metionina	Lisina
Alimento composto per suini	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Alimento composto per polli da ingrasso	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Concentrato proteico	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Premiscela	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = numero di laboratori partecipanti.

**Coefficiente di variabilità (%) per la deviazione standard tra laboratori (S<sub>r</sub>)**

Materiale di riferimento:	Amminoacido			
	Treonina	Cist(e)ina	Metionina	Lisina
Alimento composto per suini	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Alimento composto per polli	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Concentrato proteico	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premiscela	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = numero di laboratori partecipanti.

**▼ B****8. Utilizzo di materiali di riferimento**

La corretta applicazione del metodo può essere verificata ripetendo le misurazioni dei materiali di riferimento certificati, se disponibili. Si raccomanda di effettuare la taratura con una soluzione di taratura certificata di aminoacidi.

**9. Osservazioni**

- 9.1. A causa delle differenze tra gli analizzatori di aminoacidi, le concentrazioni finali delle soluzioni di taratura degli aminoacidi standard (cfr. punti 3.27.4 e 3.27.5) e dell'idrolizzato (cfr. punto 5.3.4) sono considerate valori indicativi.

Per tutti gli aminoacidi va verificato il range della risposta lineare dell'apparecchiatura.

La soluzione standard è diluita con tampone citrato per ottenere aree dei picchi al centro del range.

- 9.2. Se si fa uso di apparecchi per cromatografia liquida ad alta prestazione per analizzare gli idrolizzati, le condizioni sperimentali devono essere ottimizzate conformemente alle raccomandazioni del fabbricante.
- 9.3. L'applicazione del metodo agli alimenti per animali contenenti cloruro in misura superiore all'1 % (concentrato, alimenti a base di minerali, alimenti integrativi) potrebbe comportare una sottostima della metionina; va previsto pertanto un trattamento speciale.

**G. DETERMINAZIONE DEL TRIPTOFANO****1. Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo serve per la determinazione del triptofano totale e libero negli alimenti per animali. Esso non distingue la forma D dalla forma L.

**2. Principio**

Per la determinazione del triptofano totale, il campione è idrolizzato in ambiente alcalino con una soluzione satura di idrossido di bario e riscaldato a 110 °C per 20 ore. A idrolisi avvenuta, viene aggiunto lo standard interno.

Per la determinazione del triptofano libero, il campione è estratto in ambiente moderatamente acido in presenza dello standard interno.

Il triptofano e lo standard interno nell'idrolizzato e nell'estratto sono determinati per HPLC per mezzo di un rivelatore a fluorescenza.

**3. Reattivi**

- 3.1. Usare acqua bidistillata o di qualità equivalente (conduttività < 10 µS/cm).
- 3.2. Sostanza di riferimento (standard): triptofano (purezza/contenuto ≥ 99 %) essiccato sotto vuoto su pentossido di fosforo.
- 3.3. Standard interno: α-metil-triptofano (purezza/contenuto ≥ 99 %), essiccato sotto vuoto su pentossido di fosforo.
- 3.4. Idrossido di bario ottaidrato (prestare attenzione a non esporre eccessivamente il Ba(OH)<sub>2</sub>·8 H<sub>2</sub>O all'aria, per evitare la formazione di BaCO<sub>3</sub>, che potrebbe disturbare la determinazione) (cfr. osservazione al punto 9.3).
- 3.5. Idrossido di sodio.
- 3.6. Acido ortofosforico, p (p/p) = 85 %.
- 3.7. Acido cloridico, ρ<sub>20</sub> 1,19 g/ml.
- 3.8. Metanolo, di qualità HPLC.
- 3.9. Etere di petrolio, punto di ebollizione tra 40 e 60 °C.

**▼ B**

- 3.10. Soluzione di idrossido di sodio,  $c = 1 \text{ mol/l}$ :  
sciogliere 40,0 g di NaOH (3.5) in acqua e portare a 1 litro con acqua (3.1).
- 3.11. Acido cloridrico,  $c = 6 \text{ mol/l}$ :  
prelevare 492 ml di HCl (3.7) e portare a 1 litro con acqua.
- 3.12. Acido cloridrico,  $c = 1 \text{ mol/l}$ :  
prelevare 82 ml di HCl (3.7) e portare a 1 litro con acqua.
- 3.13. Acido cloridrico,  $c = 0,1 \text{ mol/l}$ :  
prelevare 8,2 ml di HCl (3.7) e portare a 1 litro con acqua.
- 3.14. Acido ortofosforico,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$ :  
prelevare 34 ml di acido ortofosforico (3.6) e portare a 1 litro con acqua (3.1).
- 3.15. Soluzione concentrata di triptofano (3.2),  $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ :  
in un matraccio tarato da 500 ml sciogliere 0,2553 g di triptofano (3.2) in acido cloridrico (3.13) e portare a volume con acido cloridrico (3.13). Conservare a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  al massimo per quattro settimane.
- 3.16. Soluzione concentrata di standard interno,  $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ :  
in un matraccio tarato da 500 ml sciogliere 0,2728 g di  $\alpha$ -metil-triptofano (3.3) in acido cloridrico (3.13) e portare a volume con acido cloridrico (3.13). Conservare a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  al massimo per quattro settimane.
- 3.17. Soluzione madre di taratura di triptofano e di standard interno:  
prelevare 2,00 ml di soluzione concentrata di triptofano (3.15) e 2,00 ml di soluzione concentrata di standard interno ( $\alpha$ -metil-triptofano) (3.16). Diluire con acqua (3.1) e metanolo (3.8) a circa lo stesso volume e a circa la stessa concentrazione di metanolo (10-30 %) dell'idrolizzato finito.  
  
Questa soluzione deve essere preparata al momento, prima dell'uso.  
  
Proteggere dalla luce solare diretta durante la preparazione.
- 3.18. Acido acetico
- 3.19. 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanolo.
- 3.20. Etanolammina p (p/p) > 98 %.
- 3.21. Soluzione di 1 g di 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanolo (3.19) in 100 ml di metanolo (3.8).
- 3.22. Fase mobile per HPLC: 3,00 g di acido acetico (3.18) + 900 ml di acqua (3.1) +50,0 ml di soluzione (3.21) di 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanolo (3.19) in metanolo (3.8) (1 g/100 ml); regolare il pH a 5,00 utilizzando etanolammina (3.20); portare a 1 000 ml con acqua (3.1).
4. **Apparecchiatura**
- 4.1. Apparecchiatura HPLC con rilevatore spettrofluorimetrico.
- 4.2. Colonna per cromatografia liquida, 125 mm  $\times$  4 mm,  $C_{18}$ , particelle di riempimento 3  $\mu\text{m}$ , o equivalente.
- 4.3. pH-metro.
- 4.4. Matraccio di polipropilene, capacit  125 ml, a collo largo e coperchio a vite.

**▼B**

- 4.5. Filtro a membrana, da 0,45 µm.
- 4.6. Autoclave, 110 (± 2) °C, 1,4 (±0,1) bar.
- 4.7. Agitatore meccanico o mescolatore magnetico.
- 4.8. Miscelatore Vortex.

**5. Procedimento****5.1. Preparazione dei campioni**

Il campione viene tritato in modo che possa passare attraverso un vaglio da 0,5 mm. I campioni molto umidi devono essere essiccati all'aria a una temperatura non superiore a 50 °C o liofilizzati prima di essere tritati. I campioni ad alto tenore di grassi sono estratti con etere di petrolio (3.9) prima di essere tritati.

**5.2. Determinazione del triptofano libero (estratto)**

In una beuta pesare (con l'approssimazione di 1 mg) una quantità adeguata (1-5 g) del campione preparato (5.1); aggiungere 100,0 ml di acido cloridrico (3.13) e 5,00 ml di soluzione concentrata di standard interno (3.16). Agitare o miscelare per 60 minuti con un agitatore meccanico o magnetico (4.7). Lasciare che si depositi il sedimento e pipettare 10,0 ml della soluzione surnatante in un becher. Aggiungere 5 ml di acido orto-fosforico (3.14). Portare il pH al valore 3 utilizzando idrossido di sodio (3.10). Aggiungere sufficiente metanolo (3.8) per ottenere una concentrazione compresa tra il 10 e il 30 % di metanolo nel volume finale. Trasferire in un matraccio tarato di volume adeguato e diluire con acqua sino al volume necessario per la cromatografia [approssimativamente lo stesso volume della soluzione madre di taratura (3.17)].

Filtrare alcuni ml della soluzione con un filtro a membrana da 0,45 µm (4.5) prima dell'iniezione nella colonna HPLC. Procedere alla fase della cromatografia secondo quanto indicato al punto 5.4.

Proteggere la soluzione madre e gli estratti dalla luce solare diretta. Se non è possibile analizzare gli estratti nello stesso giorno, questi devono essere conservati a 5 °C al massimo per 3 giorni.

**5.3. Determinazione del triptofano totale (idrolizzato).**

Pesare (con l'approssimazione di 0,2 mg) da 0,1 a 1 g del campione preparato (5.1) nel matraccio di polipropilene (4.4). La porzione di campione pesata ha un contenuto di azoto di circa 10 mg. Aggiungere 8,4 g di idrossido di bario (ottaidrato) (3.4) e 10 ml di acqua. Miscelare con un miscelatore Vortex (4.8) o con agitatore magnetico (4.7). Lasciare il magnete rivestito di teflon nella miscela. Sciacquare le pareti del recipiente con 4 ml di acqua. Porre il coperchio a vite e chiudere il matraccio senza stringere. Trasferire in una autoclave (4.6) con acqua bollente e vapore per 30-60 minuti. Chiudere l'autoclave e metterla in funzione a 110 (± 2) °C per 20 ore.

Prima di aprire l'autoclave, ridurre la temperatura poco al di sotto di 100 °C. Per evitare la cristallizzazione del Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O, aggiungere alla miscela calda 30 ml di acqua a temperatura ambiente. Scuotere o agitare non violentemente. Aggiungere 2,00 ml di soluzione concentrata di standard interno (*α*-metil-triptofano) (3.16). Lasciare raffreddare i recipienti in un bagno di acqua e ghiaccio per 15 minuti.

Aggiungere quindi 5 ml di acido orto-fosforico (3.14). Tenere il recipiente nel bagno di refrigerazione e neutralizzare con HCl (3.11) sempre agitando; regolare quindi il pH a 3,0 utilizzando HCl (3.12). Aggiungere una quantità sufficiente di metanolo per ottenere una concentrazione compresa tra 10 e 30 % di metanolo nel volume finale. Trasferire in un matraccio tarato di volume adeguato e diluire con acqua sino al volume necessario per la cromatografia (ad esempio, 100 ml). L'aggiunta di metanolo non provoca precipitazione.

**▼B**

Filtrare alcuni ml della soluzione con un filtro a membrana da 0,45 µm (4.5) prima dell'iniezione nella colonna HPLC. Procedere alla fase della cromatografia secondo quanto indicato al punto 5.4.

Proteggere la soluzione madre e gli idrolizzati dalla luce solare diretta. Se non è possibile analizzare gli idrolizzati il giorno stesso, questi devono essere conservati a 5 °C al massimo per 3 giorni.

5.4. *Determinazione HPLC*

Le seguenti condizioni di eluizione isocratica sono proposte a titolo indicativo; è possibile operare in condizioni diverse, purché si ottengano risultati equivalenti (cfr. anche osservazioni 9.1 e 9.2):

Colonna per cromatografia liquida (4.2):	125 mm × 4 mm, C <sub>18</sub> , particelle di riempimento 3 µm o equivalente.
Temperatura della colonna:	temperatura ambiente
Fase mobile (3.22):	3,00 g di acido acetico (3.18) + 900 ml di acqua (3.1) + 50,0 ml di soluzione (3.21) di 1,1,1-trichloro-2-metil-2-propanolo (3.19) in metanolo (3.8) (1 g/100 ml); regolare il pH a 5,00 per mezzo di etanolamina (3.20); portare a 1 000 ml con acqua (3.1)
Velocità di efflusso:	1 ml/min
Durata totale dell'eluizione:	circa 34 min
Lunghezza d'onda di rivelazione:	eccitazione: 280 nm, emissione: 356 nm
Volume di iniezione:	20 µl

6. **Calcolo dei risultati**

Calcolare la quantità di triptofano (X), espressa in g, per 100 g di campione secondo la seguente formula:

$$X = \frac{A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M}{C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m}$$

A = area del picco dello standard interno, soluzione madre di taratura (3.17)

B = area del picco del triptofano, estratto (5.2) o idrolizzato (5.3)

V<sub>1</sub> = volume in ml (2 ml) di soluzione concentrata di triptofano (3.15) aggiunta alla soluzione di taratura (3.17)

c = concentrazione in µmol/ml (= 2,50) di soluzione concentrata di triptofano (3.15) aggiunta alla soluzione di taratura (3.17)

V<sub>2</sub> = volume in ml della soluzione concentrata di standard interno (3.16) aggiunta all'estrazione (5.2) (= 5,00 ml) o all'idrolizzato (5.3) (= 2,00 ml)

C = area del picco dello standard interno, dell'estratto (5.2) o dell'idrolizzato (5.3)

D = area del picco del triptofano, soluzione madre di taratura (3.17)

V<sub>3</sub> = volume in ml (= 2,00 ml) della soluzione concentrata dello standard interno (3.16) aggiunto alla soluzione madre di taratura (3.17)

m = peso del campione in g (corretto al peso iniziale se essiccato e/o sgrassato)

M = peso molecolare del triptofano (= 204,23 g/mol)

7. **Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni, effettuate in parallelo sullo stesso campione, non deve superare il 10 % del valore ottenuto più elevato.

▼ **B****8. Risultati di uno studio collaborativo**

È stato organizzato uno studio collaborativo a livello comunitario (quarta intercomparazione) nel corso del quale dodici laboratori hanno analizzato tre campioni al fine di convalidare il metodo di idrolisi. Ogni campione è stato analizzato cinque volte. I risultati sono stati i seguenti:

	Campione 1 Alimento per suini	Campione 2 Alimento per suini con aggiunta di L-triptofano	Campione 3 Alimento concentrato per suini
L	12	12	12
n	50	55	50
Media [g/kg]	2,42	3,40	4,22
$s_r$ [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
$CV_r$ [%]	1,9	1,6	1,9
$S_R$ [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
$CV_R$ [%]	6,3	6,0	2,2

L = numero di laboratori che hanno trasmesso risultati

n = numero di risultati individuali considerati una volta eliminati gli outlier (valori aberranti identificati in base al test di Cochran-Dixon)

$s_r$  = deviazione standard della ripetibilità

$S_R$  = deviazione standard della riproducibilità

r = ripetibilità

R = riproducibilità

$CV_r$  = coefficiente di variazione della ripetibilità, in %

$CV_R$  = coefficiente di variazione della riproducibilità, in %.

È stato organizzato un altro studio collaborativo a livello comunitario (terza intercomparazione), in cui tredici laboratori hanno analizzato due campioni al fine di convalidare il metodo di estrazione del triptofano libero. Ogni campione è stato analizzato cinque volte. I risultati sono stati i seguenti:

	Campione 4 Miscela di frumento e soia	Campione 5 Miscela di frumento e soia (= campione 4) con aggiunta di triptofano (0,457g/kg)
L	12	12
n	55	60
Media [g/kg]	0,391	0,931
$s_r$ [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
$CV_r$ [%]	1,34	1,34
$S_R$ [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
$CV_R$ [%]	4,71	5,11

L = numero di laboratori che hanno trasmesso risultati

n = numero di risultati individuali considerati una volta eliminati gli outlier (valori aberranti identificati in base al test di Cochran-Dixon)

$s_r$  = deviazione standard della ripetibilità

$S_R$  = deviazione standard della riproducibilità

r = ripetibilità

R = riproducibilità

$CV_r$  = coefficiente di variazione della ripetibilità, in %

$CV_R$  = coefficiente di variazione della riproducibilità, in %.

**▼B**

È stato effettuato un altro studio di intercomparazione comunitario in cui sono stati analizzati quattro campioni da 7 laboratori ai fini della certificazione del triptofano per idrolisi. Ogni campione è stato analizzato cinque volte. I risultati sono stati i seguenti:

	Campione 1 Alimento composto per suini (CRM 117)	Campione 2 Farina di pesce a basso tenore di grassi (CRM 118)	Campione 3 Farina di soia (CRM 119)	Campione 4 Latte scremato in polvere (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Media [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s <sub>r</sub> [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV <sub>r</sub> [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S <sub>R</sub> [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV <sub>R</sub> [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

- L = numero di laboratori che hanno trasmesso risultati  
n = numero di risultati individuali considerati una volta eliminati gli outlier (valori aberranti identificati in base al test di Cochran-Dixon)  
s<sub>r</sub> = deviazione standard della ripetibilità  
S<sub>R</sub> = deviazione standard della riproducibilità  
r = ripetibilità  
R = riproducibilità  
CV<sub>r</sub> = coefficiente di variazione della ripetibilità, in %  
CV<sub>R</sub> = coefficiente di variazione della riproducibilità, in %.

## 9. Osservazioni

- 9.1. Speciali condizioni cromatografiche consentono una migliore separazione tra triptofano e  $\alpha$ -metil-triptofano.

Eluizione isocratica seguita da pulitura della colonna a gradiente:

Colonna per cromatografia liquida:	125 mm × 4 mm, C <sub>18</sub> , particelle di riempimento 5 µm, o equivalente		
Temperatura della colonna:	32 °C		
Fase mobile:	A: 0,01 mol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /metanolo, 95 + 5 (V + V). B: metanolo		
Programma del gradiente:	0 min	100 % A	0 % B
	15 min	100 % A	0 % B
	17 min	60 % A	40 % B
	19 min	60 % A	40 % B
	21 min	100 % A	0 % B
	33 min	100 % A	0 % B
Velocità di efflusso:	1,2 ml/min		
Durata totale dell'eluizione:	circa 33 min.		

- 9.2. La cromatografia varierà a seconda del tipo di HPLC e di materiale di riempimento utilizzati. Il sistema scelto deve permettere una completa separazione dei picchi del triptofano e dello standard interno. Inoltre è importante che i prodotti di degradazione siano nettamente separati dal

**▼B**

triptofano e dallo standard interno. Vanno fatti passare idrolizzati senza standard interno in modo da verificare l'assenza di impurità sulla linea di base sotto lo standard interno. È importante che il tempo di eluizione sia sufficientemente lungo per consentire l'eluizione di tutti i prodotti di degradazione; altrimenti gli ultimi picchi di eluizione possono interferire con le operazioni cromatografiche successive.

Nell'intervallo operativo, il sistema cromatografico dà una risposta lineare. Tale risposta è misurata a una concentrazione costante (concentrazione normale) dello standard interno e a concentrazioni variabili di triptofano. È importante che le altezze dei picchi del triptofano e dello standard interno si situino nell'intervallo lineare del sistema HPLC/fluorescenza. Se il picco o i picchi del triptofano e/o dello standard interno sono troppo bassi o troppo alti, l'analisi viene ripetuta con altre dimensioni del campione e/o un volume finale modificato.

### 9.3. *Idrossido di bario*

Con il tempo, l'idrossido di bario si scioglie con maggiore difficoltà. Ciò causa una soluzione torbida per la determinazione HPLC, che può produrre bassi valori per il triptofano.

## H. DETERMINAZIONE DEGLI OLI E GRASSI GREGGI

### 1. **Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di oli e grassi greggi negli alimenti per gli animali, ma non riguarda l'analisi dei semi e frutti oleaginosi.

L'applicazione dei due procedimenti sotto descritti dipende dalla natura e dalla composizione dell'alimento, nonché dalla ragione per cui si esegue l'analisi.

#### 1.1. *Procedimento A — Oli e grassi greggi estraibili direttamente*

Il metodo è applicabile alle materie prime per alimenti per animali di origine vegetale, fatta eccezione per quelle alle quali si applica il procedimento B.

#### 1.2. *Procedimento B — Oli e grassi greggi totali*

Il metodo è applicabile alle materie prime per alimenti per animali di origine animale e a tutti gli alimenti composti. Esso deve essere usato per tutte le materie prime dai quali gli oli e i grassi non possono essere completamente estratti senza idrolisi preliminare, ad esempio i glutini, i lieviti, le proteine di patata e i prodotti che sono stati sottoposti a procedimenti quali l'estrusione, la fiocatura ed il riscaldamento.

#### 1.3. *Interpretazione dei risultati*

Se il valore ottenuto con il procedimento B è più elevato di quello ottenuto con il procedimento A, si considera valore reale il risultato ottenuto con il procedimento B.

## 2. **Principio**

### 2.1. *Procedimento A*

Il campione è estratto con etere di petrolio. Il solvente è eliminato per distillazione e il residuo è essiccato e pesato.

### 2.2. *Procedimento B*

Il campione è trattato a caldo con acido cloridrico. La miscela è raffreddata e filtrata. Dopo essere stato lavato ed essiccato, il residuo è sottoposto all'analisi secondo il procedimento A.

**▼ B****3. Reattivi**

- 3.1. Etere di petrolio, intervallo di ebollizione: 40-60 °C. L'indice di bromo deve essere inferiore a 1 e il residuo all'evaporazione inferiore a 2 mg/100 ml.
- 3.2. Solfato di sodio, anidro.
- 3.3. Acido cloridrico,  $c = 3 \text{ mol/l}$ .
- 3.4. Coadiuvante di filtrazione, ad esempio farina fossile, Hyflo-supercel.

**4. Apparecchiatura**

- 4.1. Estrattore. Se l'apparecchio è munito di un sifone (apparecchio di Soxhlet), la portata del riflusso è regolata in modo da ottenere almeno 10 cicli l'ora; se si tratta di un apparecchio senza sifone, il liquido rifluisce in quantità pari a circa 10 ml al minuto.
- 4.2. Ditali da estrazione, esenti da sostanze solubili nell'etere di petrolio, la cui porosità sia compatibile con le esigenze di cui al punto 4.1.
- 4.3. Stufa per essiccazione sia a vuoto a  $75 \pm 3 \text{ °C}$  o a pressione atmosferica a  $100 \pm 3 \text{ °C}$ .

**5. Procedimento****5.1. Procedimento A (cfr. punto 8.1)**

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 5 g del campione; introdurli in un ditale da estrazione (4.2) e coprire con un tampone di cotone sgrassato.

Porre il ditale in un estrattore (4.1) ed estrarre per 6 ore con etere di petrolio (3.1). Raccogliere l'estratto in un pallone asciutto e tarato, contenente frammenti di pietra pomice<sup>(1)</sup>.

Eliminare il solvente per distillazione. Essiccare il residuo introducendo il pallone in una stufa per essiccazione (4.3), lasciandovelo per un'ora e mezza. Lasciar raffreddare in essiccatore e pesare. Essiccare una seconda volta per 30 minuti, onde assicurarsi che il peso della sostanza oleosa o grassa rimanga costante (la perdita di peso tra due pesate consecutive deve essere pari o inferiore a 1 mg).

**5.2. Procedimento B**

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 2,5 g del campione (cfr. punto 8.2); introdurli in un becher da 400 ml o in una beuta da 300 ml e aggiungere 100 ml di acido cloridrico (3.3) e qualche granulo di pietra pomice. Ricoprire il becher con un vetro da orologio o applicare sulla beuta un refrigerante a ricadere. Portare la miscela a lenta ebollizione su piccola fiamma o su piastra riscaldante e lasciarvela per un'ora. Evitare che la sostanza aderisca alle pareti del recipiente.

Raffreddare e aggiungere una quantità sufficiente di un coadiuvante di filtrazione (3.4) per evitare qualsiasi perdita di sostanza grassa durante la filtrazione stessa. Filtrare su un doppio filtro di carta bagnato, esente da materie grasse. Lavare il residuo con acqua fredda fino a reazione neutra del filtrato. Verificare che il filtrato non contenga sostanza grasse. La presenza di queste nel filtrato indica che, prima dell'idrolisi, deve essere effettuata un'estrazione del campione con etere di petrolio, secondo il procedimento A.

Porre il doppio filtro con il residuo su un vetro da orologio ed essiccare per un'ora e mezza nella stufa a pressione atmosferica (4.3) a  $100 \pm 3 \text{ °C}$ .

<sup>(1)</sup> Sostituire i frammenti di pietra con alcune palline di vetro, quando si debbano eseguire ulteriori esami qualitativi sulla sostanza oleosa o grassa.

**▼B**

Introdurre il doppio filtro contenente il residuo secco in un ditale da estrazione (4.2) e coprire con un tampone di cotone sgrassato. Porre il ditale in un estrattore (4.1) e operare come indicato al punto 5.1, secondo e terzo capoverso.

**6. Espressione del risultato**

Esprimere il risultato della pesata del residuo in percentuale del campione.

**7. Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione dallo stesso analista non supera:

- lo 0,2 %, in valore assoluto, per contenuti di materie oleose e grasse gregge inferiori al 5 %,
- il 4,0 % del valore ottenuto più elevato, per contenuti compresi fra 5 e 10 %,
- lo 0,4 %, in valore assoluto, per contenuti superiori al 10 %.

**8. Osservazioni**

- 8.1. Per i prodotti a elevato tenore di sostanze oleose e grasse, difficili da macinare o non appropriati per il prelevamento di una piccola quantità omogenea, procedere nel modo che segue.

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 20 g di campione e mescolarli con 10 g o più di solfato di sodio anidro (3.2). Procedere all'estrazione con etere di petrolio (3.1) come indicato al punto 5.1. Portare l'estratto ottenuto al volume di 500 ml con etere di petrolio (3.1) e mescolare. Introdurre 50 ml della soluzione in un palloncino asciutto, contenente qualche granulo di pietra pomice, e tarato. Eliminare il solvente per distillazione, essiccare e proseguire come indicato al punto 5.1, ultimo capoverso.

Eliminare il solvente dal residuo d'estrazione che si trova nel ditale, macinare il residuo alla finezza di 1 mm, porlo nuovamente nel ditale (non aggiungere solfato di sodio) e proseguire come indicato al punto 5.1, secondo e terzo capoverso.

Il contenuto di materie oleose e grasse gregge, espresso in percentuale del campione, è dato dalla seguente formula:

$$(10m_1 + m_2) \times 5$$

dove

$m_1$  = peso, in grammi, del residuo della prima estrazione (parte aliquota dell'estratto),

$m_2$  = peso, in grammi, del residuo della seconda estrazione.

- 8.2. La quantità di sostanza sottoposta all'analisi nel caso di prodotti poveri di materie oleose e grasse può essere portata a 5 g.
- 8.3. Gli alimenti per animali da compagnia, contenenti un elevato tenore d'acqua, possono rendere necessaria l'aggiunta di solfato di sodio anidro prima dell'idrolisi e dell'estrazione secondo il procedimento B.
- 8.4. Nel procedimento descritto al punto 5.2 potrebbe rivelarsi più efficace usare acqua calda, invece che fredda, per lavare il residuo dopo la filtrazione.
- 8.5. Per alcuni alimenti per animali il tempo di essiccazione (1 h 30) deve essere prolungato; tuttavia è evitato un tempo di essiccazione eccessivo, che potrebbe dare scarsi risultati. È possibile usare altresì un forno a microonde.

**▼ B**

- 8.6. Se il tenore di sostanza oleosa o grassa è superiore al 15 %, nel procedimento A si raccomanda di effettuare una estrazione preliminare prima dell'idrolisi e nel procedimento B una seconda estrazione. Ciò può dipendere in parte dalla natura degli alimenti per animali e da quella della sostanza oleosa o grassa contenuta in tali alimenti.

**I. DETERMINAZIONE DELLA CELLULOSA GREZZA****1. Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare negli alimenti per animali le materie organiche esenti da grasso, insolubili in ambiente acido e in ambiente alcalino, convenzionalmente designate con il nome di cellulosa grezza.

**2. Principio**

Il campione, eventualmente sgrassato, è trattato successivamente con soluzioni bollenti di acido solforico e di idrossido di potassio di determinate concentrazioni. Il residuo è separato per filtrazione su vetro sinterizzato, lavato, essiccato, pesato e incenerito a 475-500 °C. La perdita di peso conseguente all'incenerimento corrisponde alla cellulosa grezza della quantità di prodotto sottoposta all'analisi.

**3. Reattivi**

- 3.1. Acido solforico,  $c = 0,13 \text{ mol/l}$ .
- 3.2. Agente antischiuma (ad esempio, n-ottanolo).
- 3.3. Coadiuvante della filtrazione (Celite 545 o equivalente), riscaldato a 500 °C per quattro ore (8.6).
- 3.4. Acetone.
- 3.5. Etere di petrolio, con punto di ebollizione compreso fra 40 °C e 60 °C.
- 3.6. Acido cloridrico,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$ .
- 3.7. Soluzione di idrossido di potassio,  $c = 0,23 \text{ mol/l}$ .

**4. Apparecchiatura**

- 4.1. L'unità riscaldante per la mineralizzazione con soluzioni di acido solforico e di idrossido di potassio, dotata di supporto per crogiolo filtrante (4.2) e di un tubo di uscita con valvola di svuotamento e a vuoto, eventualmente con aria compressa. Prima dell'uso quotidiano preriscaldare per cinque minuti l'unità con acqua bollente.
- 4.2. Crogiolo filtrante in vetro con filtro in vetro sinterizzato, dimensione dei pori: 40-90 µm. Prima della messa in uso, riscaldare a 500 °C per alcuni minuti e raffreddare (8.6).
- 4.3. Cilindro da almeno 270 ml con refrigerante a ricadere, adatto all'ebollizione.
- 4.4. Stufa per essiccazione con termostato.
- 4.5. Forno a muffola con termostato.
- 4.6. Unità per estrazione consistente in una piastra di supporto per il crogiolo filtrante (4.2) e in un tubo di scarico con valvola di svuotamento e a vuoto.
- 4.7. Anelli di giunzione per assemblare l'unità riscaldante (4.1), il crogiolo (4.2) e il cilindro (4.3) e per collegare l'unità di estrazione a freddo (4.6) e il crogiolo.

**5. Procedimento**

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 1 g del campione preparato e introdurlo nel crogiolo (4.2) (cfr. osservazioni ai punti 8.1, 8.2 e 8.3) e aggiungere 1 g di coadiuvante di filtrazione (3.3).

**▼ B**

Assemblare l'unità riscaldante (4.1) e il crogiolo filtrante (4.2), quindi applicare il cilindro (4.3) al crogiolo. Versare 150 ml di acido solforico bollente (3.1) nel cilindro e crogiolo assemblati e, se necessario, aggiungere qualche goccia di agente antischiuma (3.2).

Portare il liquido all'ebollizione in  $5 \pm 2$  minuti e lasciar bollire vivacemente per esattamente 30 minuti.

Posizionare la valvola verso il tubo di scarico (4.1) e, sotto vuoto, filtrare l'acido solforico attraverso il crogiolo filtrante e sciacquare il residuo tre volte con 30 ml di acqua bollente ciascuna, controllando che il residuo sia filtrato a secco dopo ogni risciacquo.

Richiudere la valvola di svuotamento e versare 150 ml di soluzione di idrossido di potassio bollente (3.7) nel cilindro e nel crogiolo assemblati e aggiungere qualche goccia di antischiuma (3.2). Portare il liquido all'ebollizione entro  $5 \pm 2$  minuti e lasciar bollire vivacemente per esattamente 30 minuti. Filtrare e ripetere la procedura di risciacquo applicata all'acido solforico.

Dopo il risciacquo finale e l'essiccazione, staccare il crogiolo e il suo contenuto e ricollegarlo all'unità di estrazione a freddo (4.6). Applicare il tubo vuoto e risciacquare il residuo nel crogiolo tre volte con porzioni di 25 ml di acetone ciascuna (3.4) assicurandosi che il residuo sia filtrato a secco dopo ogni lavaggio.

Essiccare il crogiolo nel forno a  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$  fino a cessazione della diminuzione di massa. Dopo ogni essiccazione lasciar raffreddare nell'essiccatore e pesare rapidamente. Introdurre quindi il crogiolo nel forno a muffola e incenerire fino a peso costante (la perdita di peso tra due pesate consecutive deve essere pari o inferiore a 2 mg) ad una temperatura compresa tra  $450$  e  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$  per almeno 30 minuti.

Dopo ciascun riscaldamento, lasciar raffreddare in un primo momento nel forno, poi nell'essiccatore e pesare.

Procedere ad una prova in bianco in assenza del campione. La perdita di peso conseguente all'incenerimento non deve essere superiore a 4 mg.

**6. Calcolo dei risultati**

Il contenuto di cellulosa grezza, in percentuale del campione, è dato dalla seguente formula:

$$X = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m}$$

dove

$m$  = peso del campione, in grammi;

$m_0$  = perdita di peso conseguente all'incenerimento nel corso della determinazione, in grammi;

$m_1$  = perdita di peso conseguente all'incenerimento, durante la prova in bianco, in grammi.

**7. Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare:

— lo 0,6 % in valore assoluto, per i contenuti di cellulosa grezza inferiori al 10 %,

— il 6 % rispetto al valore più elevato, per i contenuti di cellulosa grezza uguali o superiori al 10 %.

**8. Osservazioni**

- 8.1. Gli alimenti per animali che contengono più del 10 % di sostanze grasse gregge debbono essere sgrassati prima dell'analisi con etere di petrolio (3.5). Collegare il crogiolo filtrante (4.2) e il suo contenuto all'unità di

**▼ B**

estrazione a freddo (4.6), applicare il vuoto e sciacquare il residuo tre volte con volumi di 30 ml di etere di petrolio ciascuna, assicurandosi che il residuo sia secco. Collegare il crogiolo e il suo contenuto all'unità riscaldante (4.1) e proseguire come indicato al punto 5.

- 8.2. Gli alimenti per animali contenenti materie grasse che non possono essere estratte direttamente con etere di petrolio (3.5) vanno sgrassate una prima volta come descritto al punto 8.1 e una seconda volta dopo ebollizione con l'acido. Dopo l'ebollizione con acido e successivi lavaggi, collegare il crogiolo e il suo contenuto all'unità di estrazione a freddo (4.6), lavare tre volte con 30 ml di acetone e rilavare altre tre volte con 30 ml di etere di petrolio. Filtrare sotto vuoto fino a completa essiccazione e continuare l'analisi secondo le indicazioni fornite al punto 5, iniziando con il trattamento con idrossido di potassio.
- 8.3. Se l'alimento contiene più del 5 % di carbonati, espressi in carbonato di calcio, collegare il crogiolo (4.2) con il campione pesato all'unità riscaldante (4.1). Lavare il campione tre volte con 30 ml di acido cloridrico (3.6). Dopo ogni aggiunta lasciare riposare il campione per circa un minuto prima di filtrarlo. Risciacquare una volta con 30 ml di acqua e proseguire come descritto al punto 5.
- 8.4. Se l'apparecchio utilizzato è composto da più crogioli collegati alla stessa unità riscaldante, non eseguire due prove sullo stesso campione nella stessa serie.
- 8.5. Se, dopo la bollitura, il filtraggio delle soluzioni acida e basica risulta difficile, iniettare aria compressa nel tubo di scarico dell'unità riscaldante e continuare a filtrare.
- 8.6. La temperatura d'incenerimento non supera i 500 °C in modo da prolungare la durata dei crogioli filtranti in vetro. Vanno evitati possibili effetti da choc termico eccessivo durante i cicli di riscaldamento e di raffreddamento.

**J. DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI****1. Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto in zuccheri riduttori ed in zuccheri totali dopo inversione, espressi in glucosio e, se del caso, in saccarosio, per conversione mediante fattore 0,95. Il metodo è applicabile agli alimenti composti. Particolari modalità sono previste per altri alimenti. All'occorrenza si doserà separatamente il lattosio e se ne terrà conto nel calcolo dei risultati.

**2. Principio**

Gli zuccheri presenti sono sciolti nell'etanolo diluito; la soluzione è chiarificata con reattivi di Carrez I e II. Dopo l'eliminazione dell'etanolo, le determinazioni sono effettuate, prima e dopo l'inversione, secondo il metodo di Luff-Schoorl.

**3. Reattivi**

- 3.1. Soluzione di etanolo al 40 % (v/v), densità: 0,948 g/ml a 20 °C, neutralizzato alla fenoltaleina.
- 3.2. Soluzione di Carrez I: sciogliere in acqua 21,9 g di acetato di zinco  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  e 3 g di acido acetico glaciale. Portare a 100 ml con acqua.
- 3.3. Soluzione di Carrez II: sciogliere nell'acqua 10,6 g di ferrocianuro di potassio  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ . Portare a 100 ml con acqua.
- 3.4. Soluzione allo 0,1 % (p/v) di metilarancio.
- 3.5. Acido cloridrico, 4 mol/l.
- 3.6. Acido cloridrico, 0,1 mol/l.

**▼ B**

- 3.7. Soluzione di idrossido di sodio, 0,1 mol/l.
- 3.8. Reattivo di Luff-Schoorl:  
aggiungere, agitando prudentemente, la soluzione d'acido citrico (3.8.2) alla soluzione di carbonato di sodio (3.8.3). Aggiungere quindi la soluzione di solfato di rame (3.8.1) e portare al volume di 1 litro con acqua. Lasciar riposare una notte e filtrare.  
  
Controllare la concentrazione del reattivo così ottenuto (Cu 0,05 mol/l; Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> 1 mol/l), cfr. punto 5.4, ultimo capoverso. Il pH della soluzione è circa 9,4.
- 3.8.1. Soluzione di solfato di rame: sciogliere 25 g di solfato di rame, Cu SO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, esente da ferro, in 100 ml d'acqua.
- 3.8.2. Soluzione di acido citrico: sciogliere 50 g di acido citrico, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> H<sub>2</sub>O, in 50 ml d'acqua.
- 3.8.3. Soluzione di carbonato di sodio: sciogliere 143,8 g di carbonato di sodio anidro in circa 300 ml d'acqua calda. Lasciar raffreddare.
- 3.9. Soluzione di tiosolfato di sodio, 0,1 mol/l.
- 3.10. Soluzione d'amido: aggiungere una miscela di 5 g di amido solubile in 30 ml d'acqua a 1 litro d'acqua bollente. Far bollire per 3 minuti, lasciar raffreddare, aggiungere eventualmente, come conservante, 10 mg di ioduro di mercurio.
- 3.11. Acido solforico 3 mol/l.
- 3.12. Soluzione al 30 % (p/v) di ioduro di potassio.
- 3.13. Granuli di pietra pomice bolliti nell'acido cloridrico, lavati in acqua ed essiccati.
- 3.14. 3-metilbutano-1-olo.
4. **Apparecchiatura**  
Agitatore rotativo a capovolgimento: circa 35-40 giri al minuto.
5. **Procedimento**
- 5.1. *Estrazione del campione*  
Introdurre 2,5 g di sostanza, pesata con l'approssimazione di 1 mg, in un pallone tarato da 250 ml. Aggiungere 200 ml di etanolo (3.1) e far girare il pallone per un'ora nell'apparecchio rotativo. Aggiungere 5 ml di soluzione di Carrez I (3.2) e agitare per circa 30 secondi. Aggiungere quindi 5 ml di soluzione di Carrez II (3.3) e agitare nuovamente per un minuto. Portare a volume con etanolo (3.1), omogeneizzare e filtrare. Prelevare 200 ml del filtrato ed evaporare circa la metà del volume allo scopo di eliminare la maggior parte di etanolo. Trasferire quantitativamente il residuo d'evaporazione mediante acqua calda in un pallone tarato da 200 ml, raffreddare, portare a volume con acqua, omogeneizzare e filtrare, se necessario. Questa soluzione sarà utilizzata per la determinazione degli zuccheri riduttori e, dopo inversione, per la determinazione degli zuccheri totali.
- 5.2. *Determinazione degli zuccheri riduttori*  
Con una pipetta prelevare un volume di soluzione non superiore a 25 ml e contenente meno di 60 mg di zuccheri riduttori, espressi in glucosio. Se necessario, portare a 25 ml con acqua distillata e determinare il contenuto in zuccheri riduttori secondo il metodo di Luff-Schoorl. Il risultato è espresso in percentuale di glucosio presente nel campione.
- 5.3. *Determinazione degli zuccheri totali dopo inversione*  
Con una pipetta prelevare 50 ml della soluzione e introdurli in un pallone tarato da 100 ml. Aggiungere qualche goccia di soluzione di metilarancio (3.4), poi, con molta attenzione, e sempre agitando, aggiungere acido cloridrico (3.5) fino a ottenere un viraggio nettamente al rosso. Aggiungere 15 ml di acido cloridrico (3.6), immergere il pallone

**▼ B**

per 30 minuti in bagnomaria a forte ebollizione e lasciarvelo per 30 minuti. Raffreddare rapidamente alla temperatura di circa 20 °C e aggiungere 15 ml di soluzione di idrossido di sodio (3.7). Portare al volume di 100 ml con acqua ed omogeneizzare. Prelevare un volume non superiore a 25 ml e contenente meno di 60 mg di zuccheri riduttori, espressi in glucosio. Se necessario, portare a 25 ml con acqua distillata e determinare il contenuto in zuccheri riduttori secondo il metodo di Luff-Schoorl. Esprimere il risultato in percentuale di glucosio, o se del caso, di saccarosio moltiplicando per il fattore 0,95.

**5.4. Titolazione secondo il metodo di Luff-Schoorl**

Con una pipetta prelevare 25 ml del reattivo di Luff-Schoorl (3.8) e introdurlo in un erlenmeyer da 300 ml; aggiungere 25 ml esatti della soluzione zuccherina chiarificata. Dopo aver aggiunto due granuli di pietra pomice (3.13) riscaldare, agitando a mano, su fiamma libera di altezza media e portare il liquido a ebollizione in circa 2 minuti. Collocare immediatamente l'erlenmeyer su una tela metallica, provvista di uno schermo d'amianto munito di un foro del diametro di circa 6 cm, sulla quale è stata preventivamente accesa una fiamma. Questa è regolata in modo tale che venga riscaldato soltanto il fondo dell'erlenmeyer. Adattare sull'erlenmeyer un refrigerante a riflusso. A decorrere da questo momento far bollire per 10 minuti esatti. Raffreddare immediatamente in acqua fredda e dopo circa 5 minuti titolare nel seguente modo:

Aggiungere 10 ml di soluzione di ioduro di potassio (3.12) e, subito dopo, con molta attenzione (a causa del rischio di formazione di abbondante schiuma), 25 ml di acido solforico (3.11). Titolare quindi con la soluzione di tiosolfato di sodio (3.9) sino all'apparire di una colorazione giallo opaco, aggiungere l'indicatore all'amido (3.10) e terminare la titolazione.

Effettuare la stessa titolazione su di una miscela, esattamente misurata, di 25 ml di reattivo di Luff-Schoorl (3.8) e 25 ml d'acqua, dopo aver aggiunto 10 ml di soluzione di ioduro di potassio (3.12) e 25 ml di acido solforico (3.11) senza portare a ebollizione.

**6. Calcolo dei risultati**

Stabilire, a mezzo della tabella, la quantità (in mg) di glucosio corrispondente alla differenza tra i risultati delle due titolazioni, espresse in mg di tiosolfato di sodio 0,1 mol/l. Esprimere il risultato in percentuale del campione.

**7. Procedimenti speciali**

- 7.1. Per gli alimenti molto ricchi di melasso e altri alimenti poco omogenei, pesare 20 g e introdurli con 500 ml d'acqua in un pallone tarato da 1 litro. Far girare nell'apparecchio rotativo per un'ora. Chiarificare con i reattivi di Carrez I (3.2) e Carrez II (3.3) come descritto al punto 5.1 utilizzando, tuttavia, una quantità quattro volte più elevata di ciascun reattivo. Portare a volume con etanolo all'80 % (v/v).

Omogeneizzare e filtrare. Eliminare l'etanolo come descritto al punto 5.1. In assenza di amido destrinizzato, portare a volume con acqua distillata.

- 7.2. Per i melassi e le materie prime per alimenti, ricchi in zuccheri e praticamente esenti da amido (carrube, fettucce essiccate di barbabietole, ecc.), pesare 5 g, introdurli in un pallone tarato da 250 ml, aggiungere 200 ml di acqua distillata e far girare nell'apparecchio rotativo, per un'ora o più, se necessario. Chiarificare con i reattivi di Carrez I (3.2) e Carrez II (3.3), come descritto al punto 5.1. Portare a volume con acqua, omogeneizzare e filtrare. Per la determinazione degli zuccheri totali, procedere come descritto al punto 5.3.

**8. Osservazioni**

- 8.1. È consigliabile aggiungere circa 1 ml di 3-metilbutan-1-olo (3.14) (senza tener conto del volume), prima dell'ebollizione con il reattivo di Luff-Schoorl, onde evitare la formazione di schiuma.

**▼B**

- 8.2. La differenza tra il contenuto di zuccheri totali dopo l'inversione, espressi in glucosio, e il contenuto di zuccheri riduttori, sempre espressi in glucosio, moltiplicata per il fattore 0,95, dà il contenuto in percentuale di saccarosio.
- 8.3. La determinazione del contenuto di zuccheri riduttori, a esclusione del lattosio, può avvenire in due modi.
- 8.3.1. Per un calcolo approssimativo si moltiplica per 0,675 il contenuto di lattosio stabilito con un metodo d'analisi diverso e si detrae il risultato ottenuto dal contenuto di zuccheri riduttori.
- 8.3.2. Per un calcolo esatto degli zuccheri riduttori, fatta eccezione del lattosio, è necessario partire dallo stesso campione per le due determinazioni finali. Una delle analisi è effettuata su una parte della soluzione ottenuta conformemente al procedimento di cui al punto 5.1, l'altra su una parte della soluzione ottenuta durante la determinazione del lattosio, secondo il metodo previsto a tal fine (dopo la fermentazione degli altri tipi di zuccheri e la chiarificazione).

In entrambi i casi, la quantità di zucchero presente è determinata secondo il metodo di Luff-Schoorl e calcolata in mg di glucosio. Uno dei valori è detratto dall'altro e la differenza è espressa in percentuale del campione.

*Esempio*

Le due quantità prelevate corrispondono, per ciascuna analisi, a un campione di 250 mg.

Nel primo caso si consumano 17 ml di una soluzione di tiosolfato di sodio di 0,1 mol/l, corrispondenti a 44,2 mg di glucosio, nel secondo 11 ml, corrispondenti a 27,6 mg di glucosio.

La differenza è di 16,6 mg di glucosio.

Il contenuto in zuccheri riduttori (eccettuato il lattosio), calcolato in glucosio, è pertanto di:

$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64 \%$$

**Tabella dei valori per 25 ml di reattivo di Luff-Schoorl**

ml di Na<sub>2</sub> S<sub>2</sub> O<sub>3</sub> 0,1 mol/l, 2 minuti di riscaldamento, 10 minuti di ebollizione

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/l	Glucosio, fruttosio, zuccheri invertiti C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		Lattosio C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Maltosio C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 mol/l
	ml	mg	differenza	mg	differenza	mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

**▼B****K. DETERMINAZIONE DEL LATTOSIO****1. Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di lattosio negli alimenti per animali che ne contengono più dello 0,5 %.

**2. Principio**

Gli zuccheri sono disciolti nell'acqua. La soluzione è sottoposta a fermentazione col lievito *Saccharomyces cerevisiae* che lascia intatto il lattosio. Dopo chiarificazione e filtrazione il contenuto in lattosio del filtrato è determinato con il metodo di Luff-Schoorl.

**3. Reattivi**

3.1. Sospensione di *Saccharomyces cerevisiae*: porre in sospensione 25 g di lievito fresco in 100 ml di acqua. La sospensione si conserva in frigorifero al massimo per una settimana.

3.2. Soluzione di Carrez I: sciogliere in acqua 21,9 g di acetato di zinco,  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  e 3 g di acido acetico glaciale. Portare a 100 ml con acqua.

3.3. Soluzione di Carrez II: sciogliere in acqua 10,6 g di ferrocianuro di potassio,  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ . Portare a 100 ml con acqua.

3.4. Reattivo di Luff-Schoorl:

versare, agitando sempre lentamente, la soluzione di acido citrico (3.4.2) nella soluzione di carbonato di sodio (3.4.3). Aggiungere la soluzione di solfato di rame (3.4.1) e portare al volume di 1 litro con acqua. Lasciar riposare una notte e filtrare. Controllare la concentrazione del reattivo così ottenuto ( $Cu$  0,05 mol/l;  $Na_2CO_3$  1 mol/l). Il pH della soluzione è circa 9,4.

3.4.1. Soluzione di solfato di rame: sciogliere 25 g di solfato di rame,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , esente da ferro, in 100 ml d'acqua.

3.4.2. Soluzione di acido citrico: sciogliere 50 g di acido citrico,  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , in 50 ml d'acqua.

3.4.3. Soluzione di carbonato di sodio: sciogliere 143,8 g di carbonato di sodio anidro in circa 300 ml d'acqua calda. Lasciar raffreddare.

3.5. Granuli di pietra pomice bolliti nell'acido cloridrico, lavati in acqua ed essiccati.

3.6. Soluzione al 30 % (p/v) di ioduro di potassio.

3.7. Acido solforico (3 mol/l).

3.8. Soluzione di tiosolfato di sodio (0,1 mol/l).

3.9. Soluzione d'amido: aggiungere una miscela di 5 g d'amido solubile in 30 ml d'acqua a 1 litro d'acqua bollente. Far bollire per 3 minuti, lasciar raffreddare e aggiungere eventualmente, come conservante, 10 mg di ioduro di mercurio.

**4. Apparecchiatura**

Bagnomaria con termostato regolato a 38-40 °C.

**5. Procedimento**

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 1 g del campione e introdurlo in un pallone tarato da 100 ml. Aggiungere 25-30 ml d'acqua. Porre il pallone per 30 minuti in un bagnomaria bollente e lasciarlo poi raffreddare a circa 35 °C. Aggiungere 5 ml di sospensione di lievito (3.1) e mescolare. Lasciar riposare il pallone per 2 ore in un bagnomaria, a una temperatura di 38-40 °C. Raffreddare quindi sino a circa 20 °C.

Aggiungere 2,5 ml di soluzione di Carrez I (3.2) e agitare per 30 secondi; aggiungere poi 2,5 ml di soluzione di Carrez II (3.3) e agitare nuovamente per 30 secondi. Portare a 100 ml con acqua, mescolare e

**▼B**

filtrare. Prelevare con la pipetta un quantitativo di filtrato non eccedente i 25 ml e contenente preferibilmente da 40 a 80 mg di lattosio; porlo quindi in un erlenmeyer da 300 ml. Se necessario portare a 25 ml con acqua.

Procedere nello stesso modo a una prova in bianco con 5 ml di sospensione di lievito (3.1). Determinare il contenuto di lattosio secondo il metodo Luff-Schoorl come segue: aggiungere 25 ml esatti del reattivo di Luff-Schoorl (3.4) e due granuli di pietra pomice (3.5). Riscaldare agitando a mano su una fiamma libera di media altezza e portare il liquido all'ebollizione in circa 2 minuti. Trasferire immediatamente l'erlenmeyer su una tela metallica, provvista di uno schermo d'amianto munito di un foro del diametro di circa 6 cm, sulla quale è stata preventivamente accesa una fiamma. Questa è regolata in modo tale che venga riscaldato soltanto il fondo dell'erlenmeyer. Adattare sull'erlenmeyer un refrigerante a riflusso. A decorrere da questo momento far bollire per 10 minuti esatti. Raffreddare immediatamente in acqua fredda e dopo circa 5 minuti titolare nel seguente modo:

aggiungere 10 ml di soluzione di ioduro di potassio (3.6) e, subito dopo, con molta attenzione (a causa del rischio di formazione di abbondante schiuma), 25 ml di acido solforico (3.7). Titolare quindi con la soluzione di tiosolfato di sodio (3.8) sino all'apparire di una colorazione giallo opaco, aggiungere l'indicatore all'amido (3.10) e terminare la titolazione.

Effettuare la stessa titolazione su di una miscela, esattamente misurata, di 25 ml di reattivo di Luff-Schoorl (3.4) e 25 ml d'acqua, dopo aver aggiunto 10 ml di soluzione di ioduro di potassio (3.6) e 25 ml di acido solforico (3.7) senza portare a ebollizione.

**6. Calcolo dei risultati**

Stabilire, a mezzo della tabella allegata, la quantità di lattosio in mg corrispondente alla differenza tra i risultati delle due titolazioni, espressi in ml di tiosolfato di sodio 0,1 mol/l.

Esprimere il risultato in percentuale del lattosio anidro del campione.

**7. Osservazione**

Per i prodotti contenenti più del 40 % di zuccheri fermentescibili, utilizzare più di 5 ml di sospensione di lievito (3.1).

**Tabella dei valori per 25 ml di reattivo di Luff-Schoorl**

ml di  $\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$  0,1 mol/l, 2 minuti di riscaldamento, 10 minuti di ebollizione

$\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/l	Glucosio, fruttosio, zuccheri invertiti $\text{C}_6 \text{H}_{12} \text{O}_6$		Lattosio $\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$		Maltosio $\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$		$\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/l
	ml	mg	differenza	mg	differenza	mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

**▼ B**

## L. DETERMINAZIONE DELL'AMIDO

**METODO POLARIMETRICO**1. **Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto in amido e in prodotti di degradazione dell'amido ad alto peso molecolare negli alimenti per animali, al fine di controllarne la conformità al valore energetico dichiarato (disposizioni di cui all'allegato VII) e alla direttiva 96/25/CE del Consiglio <sup>(1)</sup>.

2. **Principio**

Il metodo prevede una duplice determinazione. Nella prima, il campione è trattato con acido cloridrico diluito. Dopo chiarificazione e filtrazione si misura per polarimetria il potere rotatorio della soluzione.

Nella seconda, il campione viene estratto con etanolo al 40 %. Dopo acidificazione del filtrato con acido cloridrico, chiarificazione e filtrazione, si misura il potere rotatorio come nella prima determinazione.

La differenza tra le due misure, moltiplicata per un fattore noto, dà il contenuto in amido del campione.

3. **Reattivi**

3.1. Acido cloridrico, soluzione al 25 % (p/p), densità: 1,126 g/ml.

3.2. Acido cloridrico, soluzione all'1,13 % (p/v).

La concentrazione deve essere verificata per titolazione mediante una soluzione di idrossido di sodio 0,1 mol/l in presenza di rosso di metile allo 0,1 % (p/v) in etanolo al 94 % (v/v). Per la neutralizzazione di 10 ml, sono necessari 30,94 ml di NaOH 0,1 mol/l.

3.3. Soluzione di Carrez I: sciogliere in acqua 21,9 g di acetato di zinco  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  e 3 g di acido acetico glaciale. Portare a 100 ml con acqua.

3.4. Soluzione di Carrez II: sciogliere nell'acqua 10,6 g di ferrocianuro di potassio,  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ . Portare a 100 ml con acqua.

3.5. Etanolo, soluzione al 40 % (v/v), densità: 0,948 g/ml a 20 °C.

4. **Apparecchiatura**

4.1. Erlenmeyer da 250 ml a cono normalizzato con collo smerigliato, con refrigerante a ricadere.

4.2. Polarimetro o saccarimetro.

5. **Procedimento**5.1. *Preparazione del campione*

Macinare il campione in modo che passi tutto attraverso un setaccio a maglie rotonde di 0,5 mm di diametro.

5.2. *Determinazione del potere rotatorio totale (P o S) (cfr. osservazione 7.1)*

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 2,5 g del campione macinato e introdurli in un pallone tarato da 100 ml. Aggiungere 25 ml di acido cloridrico (3.2), agitare per ottenere una buona ripartizione della sostanza e aggiungere altri 25 ml di acido cloridrico (3.2). Immergere il pallone in bagnomaria bollente, agitando energicamente e regolarmente per i

<sup>(1)</sup> GU L 125 del 23.5.1996, pag. 35.

**▼ B**

primi tre minuti allo scopo di evitare la formazione di grumi. La quantità d'acqua del bagnomaria deve essere sufficiente per mantenere l'ebollizione quando vi è immerso il pallone. Quest'ultimo non può essere tolto dal bagnomaria durante l'agitazione. Dopo 15 minuti esatti togliere il pallone dal bagnomaria, aggiungere 30 ml d'acqua fredda e raffreddare immediatamente sino a 20 °C.

Aggiungere 5 ml di soluzione di Carrez I (3.3) ed agitare per circa 30 secondi. Aggiungere quindi 5 ml di soluzione di Carrez II (3.4) e agitare nuovamente per circa 30 secondi. Portare a volume con acqua, mescolare e filtrare. Se il filtrato non è perfettamente limpido (caso poco frequente), ripetere l'analisi usando una maggiore quantità di soluzione di Carrez I e II, ad esempio 10 ml.

Misurare quindi il potere rotatorio della soluzione, in un tubo da 200 mm, con un polarimetro od un saccarimetro.

5.3. *Determinazione del potere rotatorio (P' o S') delle sostanze solubili in etanolo al 40 %*

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 5 g del campione, introdurli in un pallone tarato da 100 ml e aggiungere circa 80 ml di etanolo (3.5) (cfr. osservazione 7.2). Lasciar riposare il pallone per un'ora a temperatura ambiente; durante questo intervallo agitarlo energicamente sei volte in modo che la sostanza sia ben mescolata con l'etanolo. Portare quindi a volume con etanolo (3.5), mescolare e filtrare.

Pipettare 50 ml del filtrato (corrispondenti a 2,5 g del campione) in una beuta da 250 ml, aggiungere 2,1 ml di acido cloridrico (3.1) e agitare energicamente. Applicare un refrigerante a ricadere sulla beuta e immergerla in bagnomaria bollente. Dopo 15 minuti esatti ritirare la beuta dal bagno, travasare il contenuto in un pallone tarato da 100 ml, sciaccando con un po' di acqua fredda, e raffreddare sino a 20 °C.

Chiarificare quindi con le soluzioni di Carrez I (3.3) e II (3.4), portare a volume con acqua, mescolare, filtrare e misurare il potere rotatorio come indicato al punto 5.2, secondo e terzo capoverso.

6. **Calcolo dei risultati**

Il contenuto di amido (in %) è calcolato come segue:

6.1. *Misurazioni effettuate con il polarimetro*

$$\text{Contenuto di amido (\%)} = \frac{2\,000(P - P')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

P = potere rotatorio totale in gradi d'arco

P' = potere rotatorio in gradi d'arco delle sostanze solubili nell'etanolo al 40 % (v/v)

$[\alpha]_D^{20^\circ}$  = potere rotatorio specifico dell'amido puro. I valori numerici D comunemente accettati per tale fattore sono i seguenti

+185,9°:	amido di riso
+185,7°:	fecola di patate
+184,6°:	amido di mais
+182,7°:	amido di frumento
+181,5°:	amido d'orzo
+181,3°:	amido d'avena
+184,0°:	altri tipi di amido e miscele di amido negli alimenti composti

6.2. *Misurazioni effettuate con il saccarimetro*

$$\text{Contenuto di amido (\%)} = \frac{2\,000}{[\alpha]_D^{20^\circ}} \times \frac{(2N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20^\circ}}$$

**▼B**

- S = potere rotatorio totale in gradi saccarimetrici  
 S' = potere rotatorio in gradi saccarimetrici delle sostanze solubili nell'etanolo al 40 % (v/v)  
 N = peso (in g) del saccarosio in 100 ml di acqua che dà un potere rotatorio di 100 gradi saccarimetrici misurati con un tubo di 200 mm  
 16,29 g per i saccarimetri francesi  
 26,00 g per i saccarimetri tedeschi  
 20,00 g per i saccarimetri misti.  
 $[\alpha]_D^{20}$  = potere rotatorio specifico dell'amido puro (cfr. 6.1)

6.3. *Ripetibilità*

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare lo 0,4 in valore assoluto, per i contenuti di amido inferiori al 40 %, e l'1 % in valore relativo, per i contenuti di amido uguali o superiori al 40 %.

7. **Osservazioni**

7.1. Se il campione contiene più del 6 % di carbonati, espressi in carbonato di calcio, prima di determinare il potere rotatorio totale essi vanno distrutti per trattamento con l'esatta quantità necessaria di acido solforico diluito.

7.2. Nel caso di prodotti ad alto contenuto di lattosio, quali il siero di latte in polvere o il latte scremato in polvere, dopo aver aggiunto 80 ml di etanolo (3.5) procedere come segue. Applicare un refrigerante a ricadere sulla beuta e immergerla per 30 minuti in bagnomaria a 50 °C. Lasciare poi raffreddare e continuare l'analisi come indicato al punto 5.3.

7.3. Quando la determinazione del contenuto di amido viene effettuata col metodo polarimetrico, le materie prime elencate di seguito, se presenti negli alimenti per animali in quantità significative, possono dar luogo a interferenze capaci di condurre a risultati inesatti:

- prodotti della barbabietola (da zucchero), come polpa di barbabietola (da zucchero), melasse di barbabietola (da zucchero), polpa di barbabietola (da zucchero) melassata, borlanda di barbabietola (da zucchero), zucchero di barbabietola,
- pastazzo di agrumi,
- semi di lino; pannello di lino; farina di estrazione di lino,
- semi di colza; pannello di colza; farina di estrazione di colza; corteccia di colza,
- semi di girasole; farina di estrazione di girasole; farina di estrazione di girasole, parzialmente decorticato,
- pannello di copra; farina di estrazione di copra,
- polpa di patate,
- lievito disidratato,
- prodotti ricchi di inulina (ad esempio fettucce e farina di topinambur),
- ciccioli.

## M. DETERMINAZIONE DELLE CENERI GREZZE

1. **Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il tenore di ceneri grezze negli alimenti per gli animali.

**▼ B****2. Principio**

Il campione è incenerito alla temperatura di 550 °C; il residuo viene pesato.

**3. Reattivi**

Nitrato d'ammonio, soluzione al 20 % (p/v).

**4. Apparecchiatura**

4.1. Piastra riscaldante.

4.2. Forno elettrico a muffola, dotato di termostato.

4.3. Crogioli da incenerimento in quarzo, porcellana o platino, rettangolari (60 × 40 × 25 mm) o circolari (diametro di 60-75 mm, altezza da 20 a 40 mm).

**5. Procedimento**

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 5 g circa (o 2,5 g per i prodotti aventi tendenza a rigonfiare) del campione in un crogiolo per incenerimento preventivamente riscaldato a 550 °C, raffreddato e tarato. Porre il crogiolo sopra la piastra riscaldante e scaldare progressivamente fino a carbonizzazione della sostanza. Incenerire conformemente ai punti 5.1 o 5.2.

5.1. Introdurre quindi il crogiolo nel forno a muffola regolato a 550 °C. Mantenere a tale temperatura fino a ottenere ceneri di colore bianco, grigio chiaro o rossastro, apparentemente esenti da particelle carboniose. Porre il crogiolo in un essiccatore, lasciare raffreddare e pesare immediatamente.

5.2. Introdurre il crogiolo nel forno a muffola regolato a 550 °C. Incenerire per 3 ore. Porre il crogiolo in un essiccatore, lasciare raffreddare e pesare immediatamente. Incenerire nuovamente per 30 minuti, onde assicurarsi che il peso delle ceneri rimanga costante (la perdita di peso tra due pesate consecutive deve essere pari o inferiore a 1 mg).

**6. Calcolo dei risultati**

Calcolare il peso del residuo deducendone la tara.

Esprimere il risultato in percentuale del campione.

**7. Osservazioni**

7.1. I *prodotti di difficile incenerimento* vanno sottoposti a un primo incenerimento di almeno 3 ore, lasciati raffreddare e addizionati di alcune gocce di una soluzione al 20 % di nitrato d'ammonio o acqua (con cautela, per evitare la proiezione o l'aggregazione delle ceneri). Proseguire la calcinazione dopo essiccazione nel forno. Ripetere eventualmente l'operazione fino a completo incenerimento.

7.2. Per i *prodotti che resistono al trattamento* di cui al punto 7.1, operare come segue: dopo un incenerimento di 3 ore trasferire le ceneri in acqua calda e filtrare su un piccolo filtro senza ceneri. Incenerire il filtro e il suo contenuto nello stesso crogiolo. Aggiungere il filtrato nel crogiolo raffreddato, portare a secco, incenerire e pesare.

7.3. Nel caso *degli oli e dei grassi*, pesare esattamente una quantità di prodotto di 25 g in un crogiolo di capacità appropriata. Carbonizzare accendendo il prodotto per mezzo di una miccia di carta da filtro senza ceneri. Dopo combustione, umettare con la quantità minima d'acqua. Essiccare e incenerire come indicato al punto 5.

**▼B****N. DETERMINAZIONE DELLE CENERI INSOLUBILI IN ACIDO CLORIDRICO****1. Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di sostanze minerali insolubili nell'acido cloridrico presenti negli alimenti per gli animali. Si può procedere in due modi in funzione della natura del campione.

1.1. *Metodo A*: applicabile alle materie prime di origine organica per alimenti per animali ed alla maggior parte degli alimenti composti.

1.2. *Metodo B*: applicabile ai composti e alle miscele minerali oltre che agli alimenti composti il cui contenuto di sostanze insolubili in acido cloridrico, determinato secondo il metodo A, è superiore all'1 %.

**2. Principio**

2.1. *Metodo A*: il campione è incenerito e le ceneri sono trattate all'ebollizione con acido cloridrico e il residuo insolubile è filtrato e pesato.

2.2. *Metodo B*: il campione è trattato con acido cloridrico. La soluzione è filtrata, il residuo incenerito e le ceneri ottenute vengono trattate come nel metodo A.

**3. Reattivi**

3.1. Acido cloridrico, 3 mol/l.

3.2. Acido tricloroacetico, soluzione al 20 % (p/v).

3.3. Acido tricloroacetico, soluzione all'1 % (p/v).

**4. Apparecchiatura**

4.1. Piastra riscaldante.

4.2. Forno elettrico a muffola, dotato di termostato.

4.3. Crogioli da incenerimento in quarzo, porcellana o platino, rettangolari (60 × 40 × 25 mm) o circolari (diametro di 60-75 mm, altezza da 20 a 40 mm).

**5. Procedimento**

5.1. *Metodo A*

Incenerire la sostanza da analizzare secondo il procedimento previsto per la determinazione delle ceneri grezze. Possono essere utilizzate anche le ceneri ottenute in tale determinazione.

Trasferire le ceneri in un becher da 250-400 ml con 75 ml d'acido cloridrico (3.1). Portare lentamente a ebollizione e lasciare bollire adagio per 15 minuti. Filtrare la soluzione calda su filtro di carta senza ceneri e lavare il residuo con acqua calda sino a scomparsa della reazione acida. Essiccare il filtro contenente il residuo e incenerire in un crogiolo tarato a temperatura non inferiore a 550 °C e non superiore a 700 °C. Raffreddare in un essiccatore e pesare.

5.2. *Metodo B*

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 5 g di campione e introdurli in un becher da 250 a 400 ml. Aggiungere successivamente 25 ml d'acqua e 25 ml d'acido cloridrico (3.1), agitare sino a cessazione dell'effervescenza. Aggiungere altri 50 ml d'acido cloridrico (3.1). Attendere la fine di nuova effervescenza e porre il becher in un bagno di acqua bollente e tenervelo per la durata di 30 minuti o più, se necessario, al fine di

**▼B**

idrolizzare completamente l'amido eventualmente presente. Filtrare a caldo su un filtro senza ceneri e lavare il filtro mediante 50 ml di acqua calda (cfr. osservazione 7). Porre il filtro contenente il residuo in un crogiolo da incenerimento, essiccare e incenerire a temperatura non inferiore a 550 °C e non superiore a 700 °C. Trasferire infine le ceneri in un becher della capacità di 250-400 ml mediante 75 ml di acido cloridrico (3.1) e continuare come descritto al punto 5.1, secondo capoverso.

6. **Calcolo dei risultati**

Calcolare il peso del residuo deducendone la tara. Esprimere il risultato in percentuale del campione.

7. **Osservazione**

Se la filtrazione si rivela difficile, ricominciare la determinazione, sostituendo i 50 ml di acido cloridrico (3.1) con 50 ml di acido tricloroacetico al 20 % (3.2) lavando il filtro mediante una soluzione calda di acido tricloroacetico all'1 % (3.3).

O. DETERMINAZIONE DEI CARBONATI

1. **Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente la determinazione dei carbonati, convenzionalmente espressi in carbonato di calcio, nella maggior parte degli alimenti per animali.

Tuttavia, in alcuni casi (ad esempio con il carbonato di ferro) bisogna impiegare un metodo particolare.

2. **Principio**

I carbonati sono decomposti in acido cloridrico; l'anidride carbonica liberata è raccolta in un tubo tarato e il suo volume è comparato a quello sprigionato, nelle medesime condizioni, da una quantità nota di carbonato di calcio.

3. **Reattivi**

- 3.1. Acido cloridrico, densità 1,10 g/ml.  
 3.2. Carbonato di calcio.  
 3.3. Acido solforico 0,05 mol/litro circa, colorato con rosso di metile.

4. **Apparecchiatura**

Apparecchio di Scheibler-Dietrich (cfr. schema) o apparecchio equivalente.

5. **Procedimento**

Secondo il contenuto di carbonati del campione, pesare una quantità di prodotto come indicato di seguito:

- 0,5 g per i prodotti contenenti da 50 a 100 % di carbonati, espressi in carbonato di calcio,
- 1 g per i prodotti contenenti da 40 a 50 % di carbonati, espressi in carbonato di calcio,
- da 2 a 3 g in tutti gli altri casi.

Introdurre la quantità di sostanza da analizzare nello speciale recipiente (4) dell'apparecchio, provvisto di un piccolo tubo in materiale infrangibile, contenente 10 ml di acido cloridrico (3.1), e collegare il recipiente all'apparecchio. Girare il rubinetto a tre vie (5), in modo che il tubo (1) comunichi con l'esterno. Per mezzo del tubo mobile (2), che è riempito di acido solforico colorato (3.3) ed è collegato al tubo tarato (1), portare il livello del liquido alla gradazione zero. Girare il rubinetto (5) in modo da far comunicare i tubi (1) e (3) e verificare se il livello è a zero.

Versare lentamente l'acido cloridrico (3.1) sulla sostanza inclinando il recipiente (4). Pareggiare la pressione abbassando il tubo (2). Agitare il recipiente (4) fino a cessazione completa dell'emissione di anidride carbonica.

Ristabilire la pressione riportando il liquido allo stesso livello nei tubi (1) e (2). Eseguire la lettura *dopo qualche minuto* quando il volume gassoso è divenuto costante.

Effettuare nelle stesse condizioni una prova comparativa su 0,5 g di carbonato di calcio (3.2).

**▼ B****6. Calcolo dei risultati**

Il contenuto di carbonati, espressi in carbonato di calcio, è dato dalla seguente formula:

$$X = \frac{V \times 100}{V_1 \times 2m}$$

dove

$X$  = % (p/p) di carbonati presenti nel campione, espressi come carbonati di calcio

$V$  = ml di  $\text{CO}_2$  liberati dalla quantità di sostanza sottoposta all'analisi

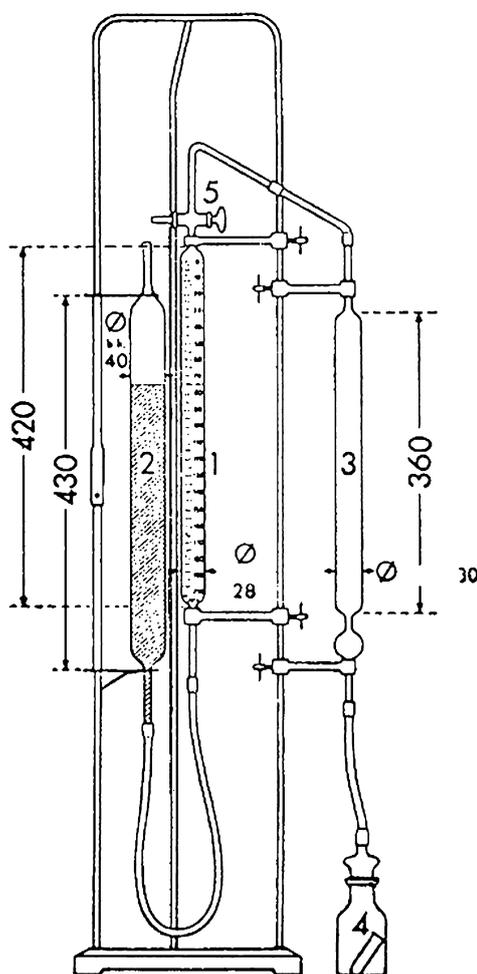
$V_1$  = ml di  $\text{CO}_2$  liberati da 0,5 g di  $\text{CaCO}_3$

$m$  = peso (in g) della sostanza sottoposta ad analisi.

**7. Osservazioni**

- 7.1. Quando la quantità di sostanza sottoposta all'analisi è superiore a 2 g, introdurre innanzitutto 15 ml di acqua distillata nel recipiente (4) e mescolare prima di cominciare la prova. Usare lo stesso volume d'acqua per la prova comparativa.
- 7.2. Quando si utilizza un apparecchio di volume diverso da quello di Scheibler-Dietrich, apportare le conseguenti variazioni alla quantità di sostanza su cui si opera, alla quantità di carbonato di calcio nel saggio-tipo, nonché al calcolo dei risultati.

APPARECCHIO SCHEIBLER-DIETRICH PER LA DETERMINAZIONE DI  $\text{CO}_2$



(in mm)

**▼ B****P. DETERMINAZIONE DEL FOSFORO TOTALE****METODO FOTOMETRICO****1. Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente la determinazione del contenuto di fosforo totale negli alimenti per gli animali. Esso è particolarmente indicato per l'analisi dei prodotti poveri di fosforo. In certi casi (prodotti ricchi di fosforo) può essere applicato un metodo gravimetrico.

**2. Principio**

Il campione viene mineralizzato, per via secca (per gli alimenti organici) o per via umida (per i composti minerali e gli alimenti liquidi) e trasferito in soluzione acida. La soluzione viene trattata con il reattivo vanado-molibdico. La densità ottica della soluzione gialla così formata, viene misurata allo spettrofotometro a 430 nm.

**3. Reattivi**

3.1. Carbonato di calcio.

3.2. Acido cloridico,  $\rho_{20} = 1,10$  g/ml (6 mol/l circa).

3.3. Acido nitrico,  $\rho_{20} = 1,045$  g/ml.

3.4. Acido nitrico,  $\rho_{20} = 1,38-1,42$  g/ml.

3.5. Acido solforico,  $\rho_{20} = 1,84$  g/ml.

3.6. Reattivo vanado-molibdico: mescolare, in un pallone tarato da 1 litro, 200 ml di soluzione di eptamolibdato d'ammonio (3.6.1) con 200 ml di soluzione di monovanadato d'ammonio (3.6.2) e 134 ml di acido nitrico (3.4). Portare a volume con acqua.

3.6.1. Soluzione di eptamolibdato d'ammonio: sciogliere in acqua calda 100 g di eptamolibdato d'ammonio  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Aggiungere 10 ml di ammoniaca (densità 0,91 g/ml) e portare a 1 litro con acqua.

3.6.2. Soluzione di monovanadato di ammonio: sciogliere 2,35 g di monovanadato di ammonio  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  in 400 ml di acqua calda. Aggiungere lentamente sempre agitando 20 ml di acido nitrico diluito [7 ml di  $\text{HNO}_3$  (3.4) + 13 ml di  $\text{H}_2\text{O}$ ] e portare a 1 litro con acqua.

3.7. Soluzione tipo, contenente 1 mg di fosforo per ml: sciogliere in acqua 4,387 g di potassio diidrogeno fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Portare a 1 litro con acqua.

**4. Apparecchiatura**

4.1. Crogioli da incenerimento di quarzo, porcellana o platino.

4.2. Forno elettrico a muffola munito di termostato regolato a 550 °C.

4.3. Matraccio di Kjeldahl da 250 ml.

4.4. Palloni tarati e pipette di precisione.

4.5. Spettrofotometro.

4.6. Tubi da saggio a tappo smerigliato, diametro circa 16 mm, a smerigliatura normalizzata 14,5 mm; capacità: 25-30 ml.

**5. Procedimento****5.1. Preparazione della soluzione**

Secondo la natura del campione preparare una soluzione come indicato al punto 5.1.1 o 5.1.2.

**5.1.1. Procedura abituale**

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 1 g o più del campione. Introdurre la quantità da analizzare in un matraccio di Kjeldahl, aggiungere 20 ml di acido solforico (3.5), agitare per imbibire d'acido tutta la sostanza e per evitare che essa aderisca alle pareti del pallone; riscaldarla e farla bollire per 10 minuti. Lasciar raffreddare leggermente, aggiungere

**▼B**

2 ml di acido nitrico (3.4), riscaldare lentamente, lasciare ancora raffreddare leggermente, aggiungere dell'altro acido nitrico (3.4) e portare il tutto nuovamente a ebollizione. Ripetere le operazioni fino a ottenere una soluzione incolore. Far raffreddare, aggiungere un po' d'acqua, travasare il liquido in un pallone tarato da 500 ml lavando il pallone con acqua calda. Lasciar raffreddare, portare a volume con acqua, mescolare e filtrare.

**5.1.2. Campioni contenenti sostanze organiche ed esenti da diidrogenofosfati di calcio e magnesio**

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 2,5 g circa di campione e introdurli in un crogiolo da incenerimento. Miscelare il campione da analizzare sino ad amalgamarlo con 1 g di carbonato di calcio (3.1). Incenerire nel forno a 550 °C fino a ottenere ceneri bianche o grigie (una piccola quantità di carbone non disturba). Trasferire le ceneri in un becher da 250 ml. Aggiungere 20 ml d'acqua e acido cloridrico (3.2) sino a cessazione dell'effervescenza. Aggiungere altri 10 ml di acido cloridrico (3.2). Porre il becher su un bagno di sabbia e evaporare a secco per insolubilizzare la silice. Riprendere il residuo con 10 ml di acido nitrico (3.3) e far bollire per 5 minuti sul bagno di sabbia o sulla piastra riscaldante senza arrivare a secco. Travasare il liquido in un pallone tarato da 500 ml lavando il becher, a più riprese, con acqua calda. Lasciar raffreddare, portare a volume con acqua, mescolare e filtrare.

**5.2. Sviluppo della colorazione e misura della densità ottica**

Diluire una parte del filtrato ottenuto conformemente a quanto indicato al punto 5.1.1 o 5.1.2 in modo da ottenere una concentrazione di fosforo in quantità non superiore a 40 µg/ml. Introdurre in un tubo da saggio (4.6) 10 ml di questa soluzione ed aggiungervi 10 ml del reattivo vanado-molibdico (3.6). Mescolare e lasciar riposare almeno 10 minuti alla temperatura di 20 °C. Misurare la densità ottica allo spettrofotometro a 430 nm per comparazione con una soluzione ottenuta per aggiunta di 10 ml di reattivo vanado-molibdico (3.6) a 10 ml di acqua.

**5.3. Curva di taratura**

Preparare, a partire dalla soluzione tipo (3.7), soluzioni contenenti rispettivamente 5, 10, 20, 30 e 40 µg di fosforo per ml. Prelevare 10 ml da ciascuna soluzione e aggiungervi 10 ml di reattivo vanado-molibdico. Mescolare e lasciar riposare almeno 10 minuti alla temperatura di 20 °C. Misurarne la densità ottica come indicato al punto 5.2. Tracciare la curva di taratura portando in ordinata i valori di densità ottica ed in ascissa le quantità corrispondenti di fosforo. Per concentrazioni comprese tra 0 e 40 µg/ml, la curva sarà lineare.

**6. Calcolo dei risultati**

Determinare la quantità di fosforo nella sostanza sottoposta all'analisi riferendosi alla curva di taratura.

Esprimere il risultato in percentuale del campione.

**Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non supera:

— il 3 %, rispetto al valore più elevato, per contenuti di fosforo inferiori al 5 %,

— lo 0,15 %, in valore assoluto, per i contenuti in fosforo uguali o superiori al 5 %.

**▼B****Q. DETERMINAZIONE DEL CLORO DEI CLORURI****1. Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il cloro dei cloruri solubili in acqua, convenzionalmente espresso in cloruro di sodio. Esso è applicabile a tutti gli alimenti per gli animali.

**2. Principio**

I cloruri sono disciolti in acqua. Se il prodotto contiene sostanze organiche, si procede ad una chiarificazione. La soluzione è leggermente acidificata con acido nitrico e i cloruri sono precipitati sotto forma di cloruro d'argento a mezzo di una soluzione di nitrato d'argento. L'eccesso di nitrato d'argento è titolato mediante una soluzione di tiocianato di ammonio, secondo il metodo Volhard.

**3. Reattivi**

- 3.1. Soluzione di tiocianato di ammonio 0,1 mol/l.
- 3.2. Soluzione di nitrato d'argento 0,1 mol/l.
- 3.3. Soluzione satura di bis(solfato)di ammonio e ferro  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ .
- 3.4. Acido nitrico, densità: 1,38 g/ml.
- 3.5. Etere dietilico.
- 3.6. Acetone.
- 3.7. Soluzione di Carrez I: sciogliere in acqua 21,9 g di acetato di zinco  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 3 g di acido acetico glaciale. Portare a 100 ml con acqua.
- 3.8. Soluzione di Carrez II: sciogliere in acqua 10,6 g di ferrocianuro di potassio,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Portare a 100 ml con acqua.
- 3.9. Carbone attivo, esente da cloruri e non assorbente cloro.

**4. Apparecchiatura**

Agitatore rotativo a capovolgimento: circa 35-40 giri al minuto.

**5. Procedimento****5.1. Preparazione della soluzione**

Secondo la natura del campione preparare una soluzione come indicato ai punti 5.1.1, 5.1.2 o 5.1.3.

Effettuare in parallelo una *prova in bianco*, senza il campione da analizzare.

**5.1.1. Campioni esenti da sostanze organiche**

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, un campione di peso non superiore a 10 g e contenente al massimo 3 g di cloro sotto forma di cloruri. Introdurlo in un matraccio tarato da 500 ml con 400 ml di acqua a 20 °C circa. Agitare per 30 minuti con l'agitatore rotativo, portare a volume, mescolare e filtrare.

**5.1.2. Campioni contenenti materie organiche, a eccezione dei prodotti indicati al punto 5.1.3**

Pesare con l'approssimazione di 1 mg un quantitativo di campione di circa 5 g e introdurlo con un grammo di carbone attivo in un matraccio tarato da 500 ml. Aggiungere 400 ml di acqua a circa 20 °C e 5 ml di soluzione di Carrez I (3.7), agitare per 30 secondi e aggiungere 5 ml di soluzione di Carrez II (3.8). Miscelare per 30 minuti nell'agitatore rotativo, portare a volume, mescolare e filtrare.

**▼B**

- 5.1.3. Alimenti cotti, panelli e farina di lino, prodotti ricchi di farina di lino e altri prodotti ricchi di mucillaggini o di sostanze colloidali (ad esempio amido destrinizzato)

Preparare la soluzione come indicato al punto 5.1.2 ma senza filtrare. Dopo decantazione (se necessario centrifugare) prelevare 100 ml del liquido supernatante e introdurla in un pallone tarato da 200 ml. Mescolare con acetone (3.6) e portare a volume con tale solvente, miscelare e filtrare.

- 5.2. *Titolazione*

Porre in un erlenmeyer, con la pipetta, da 25 a 100 ml del filtrato (a seconda del contenuto presunto di cloro) ottenuto secondo quanto indicato ai punti 5.1.1, 5.1.2 o 5.1.3. L'aliquota non deve contenere più di 150 mg di cloro (Cl). Diluire, se necessario, con acqua fino a ottenere una soluzione di 50 ml, aggiungere 5 ml di acido nitrico (3.4), 20 ml di soluzione satura di bis(solfato) di ammonio e ferro (3.3) e 2 gocce di soluzione di tiocianato di ammonio (3.1) proveniente dalla buretta riempita a questo scopo fino al tratto zero. Far gocciolare in seguito da una buretta la soluzione di nitrato d'argento (3.2) fino ad averne un eccesso di 5 ml. Aggiungere 5 ml di etere dietilico (3.5) e agitare energicamente per far coagulare il precipitato. Titolare l'eccesso di nitrato d'argento con la soluzione di tiocianato di ammonio (3.1) fino a quando il viraggio al rosso-bruno persiste per 1 minuto.

6. **Calcolo dei risultati**

La quantità di cloro (X), espressa in cloruro di sodio, è data dalla formula seguente:

$$X = \frac{5,845 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

dove

$V_1$  = ml di soluzione di nitrato d'argento 0,1 mol/l aggiunti

$V_2$  = ml di soluzione di tiocianato di ammonio 0,1 mol/l utilizzati per la titolazione

m = peso del campione.

Qualora la prova in bianco indichi un consumo di soluzione di nitrato d'argento di 0,1 mol/l detrarre questo valore dal volume ( $V_1 - V_2$ ).

7. **Osservazioni**

- 7.1. La titolazione può essere realizzata anche con il metodo potenziometrico.
- 7.2. Per i prodotti molto ricchi in sostanze grasse, procedere a uno sgrassaggio preliminare con etere dietilico o etere di petrolio.
- 7.3. Per le farine di pesce, la titolazione può essere effettuata secondo il metodo di Mohr.



ALLEGATO IV

**METODI DI ANALISI PER IL CONTROLLO DEL CONTENUTO DI  
ADDITIVI AUTORIZZATI NEGLI ALIMENTI PER ANIMALI**

A. DETERMINAZIONE DELLA VITAMINA A

1. **Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di vitamina A (retinolo) negli alimenti per animali e nelle premiscele. La vitamina A comprende l'alcole retinilico tutto *trans* e i suoi isomeri *cis* che vengono determinati con tale metodo. Il contenuto di vitamina A è espresso in unità internazionali (UI) per kg. Una UI corrisponde all'attività di 0,300 µg di alcole di vitamina A tutto *trans* oppure 0,344 µg di acetato di vitamina A tutto *trans* oppure 0,550 µg di palmitato di vitamina A tutto *trans*.

Il limite di quantificazione è di 2 000 UI di vitamina A/kg.

2. **Principio**

Il campione viene idrolizzato con una soluzione etanolica di idrossido di potassio e la vitamina A viene estratta in etere di petrolio. Il solvente è rimosso per evaporazione e il residuo sciolto in metanolo e, se necessario, diluito alla concentrazione richiesta. Il contenuto di vitamina A è determinato per cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC) utilizzando un rivelatore UV o a fluorescenza. I parametri cromatografici sono scelti in modo che non vi sia separazione tra l'alcole di vitamina A tutto *trans* e i suoi isomeri *cis*.

3. **Reattivi**

- 3.1. Etanolo,  $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Etere di petrolio, intervallo di ebollizione: 40-60 °C
- 3.3. Metanolo
- 3.4. Soluzione di idrossido di potassio,  $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- 3.5. Soluzione di ascorbato di sodio,  $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$  (cfr. osservazione al punto 7.7)
- 3.6. Solfuro di sodio,  $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$  ( $x = 7-9$ )
- 3.6.1. Soluzione di solfuro di sodio,  $c = 0,5 \text{ mol}/\text{l}$  in glicerolo,  $\beta = 120 \text{ g}/\text{l}$  (per  $x = 9$ ) (cfr. osservazione al punto 7.8)
- 3.7. Soluzione di fenoltaleina,  $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$  in etanolo (3.1)
- 3.8. 2-propanolo
- 3.9. Fase mobile per HPLC: miscela di metanolo (3.3) e acqua, ad esempio 980 + 20 (v + v). Il rapporto esatto sarà determinato dalle caratteristiche della colonna utilizzata.
- 3.10. Azoto, senza ossigeno
- 3.11. Acetato di vitamina A tutto *trans*, purissimo, di attività certificata, ad esempio  $2,80 \times 10^6 \text{ UI/g}$
- 3.11.1. Soluzione madre di acetato di vitamina A tutto *trans*: in un matraccio tarato da 100 ml pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 50 mg di acetato di vitamina A (3.11). Sciogliere in 2-propanolo (3.8) e portare a volume con lo stesso solvente. La concentrazione nominale di questa soluzione è 1 400 UI di vitamina A/ml. Il contenuto esatto deve essere determinato conformemente al punto 5.6.3.1.
- 3.12. Palmitato di vitamina A tutto *trans*, purissimo, di attività certificata, ad esempio  $1,80 \times 10^6 \text{ UI/g}$

**▼B**

3.12.1. Soluzione madre di palmitato di vitamina A tutto *trans*: in un matraccio tarato da 100 ml pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 80 mg di palmitato di vitamina A (3.12). Sciogliere in 2-propanolo (3.8) e portare a volume con lo stesso solvente. La concentrazione nominale di questa soluzione è 1 400 UI di vitamina A/ml. Il contenuto esatto deve essere determinato conformemente al punto 5.6.3.2.

3.13. 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenolo (BHT) (cfr. osservazioni al punto 7.5).

**4. Apparecchiatura**

4.1. Evaporatore rotante sotto vuoto

4.2. Vetreria in vetro ambra

4.2.1. Matracci a fondo piatto o beute, da 500 ml, con base di vetro smerigliato

4.2.2. Matracci tarati con tappi di vetro smerigliato, a collo piccolo, da 10, 25, 100 e 500 ml

4.2.3. Imbuti separatori, conici, da 1 000 ml, con tappi di vetro smerigliato

4.2.4. Matracci a pera, da 250 ml, con base di vetro smerigliato

4.3. Refrigerante Allihn, lunghezza tubo di raffreddamento 300 mm, con giunzione di vetro smerigliato e con adattatore per tubo di alimentazione gas

4.4. Carta filtro pieghettata per separazione di fase; diametro 185 mm (ad esempio Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. Apparecchiatura HPLC, con dispositivo di iniezione

4.5.1. Colonna per cromatografia liquida, 250 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, particelle di riempimento 5 o 10 µm, o equivalente (criterio di prestazione: un unico picco per tutti gli isomeri di retinolo in condizioni HPLC)

4.5.2. Rivelatore UV o a fluorescenza, con regolazione lunghezza d'onda variabile

4.6. Spettrofotometro con celle al quarzo da 10 mm

4.7. Bagnomaria con agitatore magnetico

4.8. Il dispositivo di estrazione (cfr. figura 1) è costituito da:

4.8.1. un cilindro di vetro della capacità di 1 litro, con collo e tappo di vetro smerigliato

4.8.2. un insert di vetro smerigliato con braccio laterale e tubo regolabile che attraversa la parte centrale. Questo tubo ha l'estremità inferiore a U e un beccuccio all'estremità opposta, in modo che lo strato liquido superiore nel cilindro possa essere trasferito in un imbuto separatore.

**5. Procedimento**

*Nota:* La vitamina A è sensibile alla luce ultravioletta e all'ossidazione. Tutte le operazioni sono effettuate in assenza di luce (utilizzando vetreria di vetro ambra o vetreria protetta con foglio di alluminio) e di ossigeno (eliminato con un getto di azoto). Durante l'estrazione, l'aria al di sopra del liquido è sostituita con azoto (evitare una pressione eccessiva alzando ogni tanto il tappo).

**5.1. Preparazione del campione**

Frantumare il campione affinché passi attraverso un vaglio da 1 mm, evitando la produzione di calore. La frantumazione deve essere effettuata **immediatamente** prima della pesatura e della saponificazione, altrimenti si possono verificare perdite di vitamina A.

**▼B**5.2. *Saponificazione*

A seconda del contenuto di vitamina A, pesare, con l'approssimazione di 1 mg, da 2 a 25 g di campione in un matraccio da 500 ml a fondo piatto o conico (4.2.1). Aggiungere, rimestando ogni volta, 130 ml di etanolo (3.1), circa 100 mg di BHT (3.13), 2 ml di soluzione di ascorbato di sodio (3.5) e 2 ml di soluzione di solfuro di sodio (3.6). Adattare un refrigerante (4.3) al matraccio e immergere quest'ultimo in un bagno d'acqua con agitatore magnetico (4.7). Portare a ebollizione e lasciar rifluire per 5 minuti. Aggiungere quindi 25 ml di soluzione di idrossido di potassio (3.4) attraverso il refrigerante (4.3) e lasciar rifluire per altri 25 minuti, sempre agitando sotto una debole corrente di azoto. Risciacquare il refrigerante con circa 20 ml di acqua e lasciare raffreddare il contenuto del matraccio a temperatura ambiente.

5.3. *Estrazione*

Trasferire quantitativamente per decantazione la soluzione di saponificazione risciacquando con un volume totale di 250 ml di acqua in un imbuto separatore da 1 000 ml (4.2.3) o nel dispositivo di estrazione (4.8). Risciacquare successivamente il matraccio di saponificazione con 25 ml di etanolo (3.1) e 100 ml di etere di petrolio (3.2) e trasferire il liquido di lavaggio nell'imbuto separatore o nel dispositivo di estrazione. Il rapporto di acqua ed etanolo nelle soluzioni combinate deve essere di circa 2:1. Agitare energicamente per 2 minuti e lasciare riposare per 2 minuti.

5.3.1. *Estrazione con imbuto separatore (4.2.3)*

Quando gli strati sono separati (cfr. osservazione al punto 7.3) trasferire lo strato di etere di petrolio in un altro separatore (4.2.3). Ripetere questa estrazione due volte con 100 ml di etere di petrolio (3.2), poi ancora due volte con 50 ml di etere di petrolio (3.2).

Lavare due volte gli estratti combinati nell'imbuto separatore rimestando delicatamente (per evitare la formazione di emulsioni) con volumi di 100 ml di acqua e quindi agitando ripetutamente con altri volumi di 100 ml di acqua, finché l'acqua risulti incolore con l'aggiunta di soluzione di fenolfaleina (3.7) (in genere sono sufficienti quattro successivi lavaggi). Filtrare l'estratto lavato attraverso un filtro asciutto per separazione di fase (4.4) per rimuovere eventuale acqua residua e trasferire in un matraccio tarato da 500 ml (4.2.2). Risciacquare l'imbuto separatore ed il filtro con 50 ml di etere di petrolio (3.2), portare a volume con etere di petrolio (3.2) e mescolare bene.

5.3.2. *Estrazione con apparecchiatura per estrazione (4.8)*

Quando gli strati si sono separati (cfr. osservazione al punto 7.3) sostituire il tappo del cilindro di vetro (4.8.1) con l'insert di vetro smerigliato (4.8.2) e disporre l'estremità inferiore a U del tubo regolabile in modo che risulti appena al di sopra del livello dell'interfaccia. Esercitando una pressione con getto d'azoto nel braccio laterale, trasferire lo strato superiore di etere di petrolio in un imbuto separatore da 1 000 ml (4.2.3). Aggiungere 100 ml di etere di petrolio (3.2) nel cilindro di vetro, tappare e scuotere bene. Lasciare che gli strati si separino e trasferire lo strato superiore nell'imbuto separatore come prima. Ripetere la procedura di estrazione con altri 100 ml di etere di petrolio (3.2), e altre due volte con frazioni di 50 ml di etere di petrolio (3.2); aggiungere gli strati di etere di petrolio nell'imbuto separatore.

Lavare gli estratti di etere di petrolio combinati come descritto al punto 5.3.1 e procedere come ivi indicato.

5.4. *Preparazione della soluzione del campione per HPLC*

Pipettare un'aliquota della soluzione di etere di petrolio (risultante dalla procedura di cui ai punti 5.3.1 o 5.3.2) in un matraccio a pera da 250 ml (4.2.4). Far evaporare il solvente quasi interamente nell'evaporatore rotante (4.1), a pressione ridotta, a una temperatura del bagno non superiore a 40 °C. Ripristinare la pressione atmosferica facendovi fluire azoto

**▼ B**

(3.10) e togliere il matraccio dall'evaporatore. Togliere il solvente rimanente con un flusso di azoto (3.10) e disciogliere immediatamente il residuo in un volume noto (10-100 ml) di metanolo (3.3) (la concentrazione di vitamina A deve essere dell'ordine di 5 UI/ml-30 UI/ml).

5.5. *Determinazione HPLC*

La vitamina A è separata su una colonna C<sub>18</sub> a fase inversa (4.5.1) e la concentrazione è misurata mediante rivelatore UV (325 nm) o a fluorescenza (eccitazione: 325 nm, emissione: 475 nm) (4.5.2).

Iniettare un'aliquota (ad esempio 20 µl) della soluzione di metanolo ottenuta conformemente al punto 5.4 ed eluire con la fase mobile (3.9). Calcolare l'altezza (area) media dei picchi di diverse iniezioni della stessa soluzione del campione e le altezze medie (aree) dei picchi di diverse iniezioni di soluzioni di taratura (5.6.2).

**Condizioni HPLC**

Le seguenti condizioni sono proposte a titolo indicativo; è possibile operare in condizioni diverse purché si ottengano risultati equivalenti.

Colonna per cromatografia liquida (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C <sub>18</sub> , particelle di riempimento 5 o 10 µm, o equivalente
Fase mobile (3.9):	miscela di metanolo (3.3) e acqua, ad esempio, 980 + 20 (v + v).
Velocità di efflusso:	1-2 ml/min
Rivelatore (4.5.2):	rivelatore UV (325 nm) o rivelatore a fluorescenza (eccitazione: 325 nm/emissione: 475 nm)

5.6. *Taratura*5.6.1. *Preparazione delle soluzioni madre di lavoro*

Pipettare 20 ml della soluzione madre di acetato di vitamina A (3.11.1) o 20 ml della soluzione madre di palmitato di vitamina A (3.12.1) in un matraccio a fondo piatto o in una beuta da 500 ml (4.2.1) e idrolizzare come indicato al punto 5.2, ma senza aggiunta di BHT. Successivamente, estrarre con etere di petrolio (3.2) secondo le indicazioni di cui al punto 5.3 e portare a 500 ml con etere di petrolio (3.2). Fare evaporare 100 ml di questo estratto nell'evaporatore rotante (cfr. punto 5.4) sin quasi all'essiccazione, togliere il solvente residuo con una corrente di azoto (3.10) e ridisciogliere il residuo in 10,0 ml di metanolo (3.3). La concentrazione nominale di questa soluzione è 560 UI di vitamina A/ml. Il contenuto esatto deve essere determinato conformemente al punto 5.6.3.3. La soluzione madre di lavoro deve essere preparata al momento, poco prima dell'uso.

Pipettare 2,0 ml di questa soluzione madre di lavoro in un matraccio tarato da 20 ml, portare a volume con metanolo (3.3) e mescolare. La concentrazione nominale di questa soluzione madre di lavoro **diluata** è 56 UI di vitamina A/ml.

5.6.2. *Preparazione delle soluzioni di taratura e della curva di taratura*

In una serie di matracci tarati da 20 ml trasferire 1,0 ml, 2,0 ml, 5,0 ml e 10,0 ml di soluzione madre di lavoro **diluata**; portare a volume con metanolo (3.3) e mescolare. Le concentrazioni nominali di queste soluzioni sono 2,8, 5,6, 14,0 e 28,0 UI di vitamina A/ml.

Iniettare più volte 20 µl di ogni soluzione di taratura e determinare le altezze medie dei picchi (aree). Sulla base delle altezze medie (aree) dei picchi tracciare una curva di taratura tenendo presente i risultati del controllo UV (5.6.3.3).

**▼B**

## 5.6.3. Standardizzazione UV delle soluzioni madre

5.6.3.1. *Soluzione madre di acetato di vitamina A*

Pipettare 2,0 ml della soluzione madre di acetato di vitamina A (3.11.1) in un matraccio tarato da 50 ml (4.2.2) e portare a volume con 2-propanolo (3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è di 56 UI di vitamina A/ml. Pipettare 3,0 ml di questa soluzione di acetato di vitamina A diluita in un matraccio tarato da 25 ml e portare a volume con 2-propanolo (3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è di 6,72 UI di vitamina A/ml. Misurare lo spettro UV di questa soluzione su 2-propanolo (3.8) nello spettrofotometro (4.6) tra 300 nm e 400 nm. Il massimo di estinzione deve situarsi tra 325 nm e 327 nm.

Calcolo del contenuto di vitamina A:

$$\text{UI di vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

( $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  per l'acetato di vitamina A = 1 530 a 326 nm in 2-propanolo)

5.6.3.2. *Soluzione madre di palmitato di vitamina A*

Pipettare 2,0 ml della soluzione madre di palmitato di vitamina A (3.12.1) in un matraccio tarato da 50 ml (4.2.2) e portare a volume con 2-propanolo (3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è di 56 UI di vitamina A/ml. Pipettare 3,0 ml di questa soluzione di palmitato di vitamina A diluita in un matraccio tarato da 25 ml e portare a volume con 2-propanolo (3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è di 6,72 UI di vitamina A/ml. Misurare lo spettro UV di questa soluzione su 2-propanolo (3.8) nello spettrofotometro (4.6) tra 300 nm e 400 nm. Il massimo di estinzione deve situarsi tra 325 nm e 327 nm.

Calcolo del contenuto di vitamina A:

$$\text{UI di vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

( $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  per il palmitato di vitamina A = 957 a 326 nm in 2-propanolo)

5.6.3.3. *Soluzione standard di lavoro di vitamina A*

Pipettare 3,0 ml della soluzione standard di lavoro di vitamina A **non diluita**, preparata secondo quanto indicato al punto 5.6.1, in un matraccio tarato da 50 ml (4.2.2) e portare a volume con 2-propanolo (3.8). Pipettare 5,0 ml di questa soluzione in un matraccio tarato da 25 ml e portare a volume con 2-propanolo (3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è di 6,72 UI di vitamina A/ml. Misurare lo spettro UV di questa soluzione su 2-propanolo (3.8) nello spettrofotometro (4.6) tra 300 nm e 400 nm. Il massimo di estinzione deve situarsi tra 325 nm e 327 nm.

Calcolo del contenuto di vitamina A:

$$\text{UI di vitamina A/ml} = E_{325} \times 18,3$$

( $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  per l'alcole di vitamina A = 1 821 a 325 nm in 2-propanolo)

6. **Calcolo dei risultati**

Determinare la concentrazione della soluzione del campione in UI/ml in base all'altezza (area) media dei picchi della vitamina A, per riferimento alla curva di taratura (5.6.2).

**▼ B**

Il contenuto  $w$  di vitamina A (in UI/kg) del campione è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} \text{ [UI/kg]}$$

dove

$c$  = concentrazione di vitamina A nella soluzione del campione (5.4), in UI/ml

$V_1$  = volume della soluzione del campione (5.4), in ml

$V_2$  = volume dell'aliquota prelevata come indicato al punto 5.4, in ml

$m$  = peso della quantità di sostanza da analizzare, in grammi.

## 7. Osservazioni

- 7.1. Per i campioni con scarsa concentrazione di vitamina A può essere utile combinare gli estratti di etere di petrolio delle due saponificazioni (quantità pesata: 25 g) con una soluzione del campione, per la determinazione HPLC.
- 7.2. Il campione prelevato per l'analisi non contiene più di 2 g di sostanze grasse.
- 7.3. Se non ha luogo la separazione di fase, aggiungere circa 10 ml di etanolo (3.1) affinché l'emulsione si rompa.
- 7.4. Con olio di fegato di merluzzo ed altri grassi puri, il tempo di saponificazione è portato a 45-60 minuti.
- 7.5. In sostituzione del BHT si può utilizzare idrochinone.
- 7.6. Utilizzando una colonna a fase normale, è possibile separare gli isomeri del retinolo. In questo caso, tuttavia, a fini di calcolo vanno sommate le altezze (aree) dei picchi degli isomeri tutto *trans* e *cis*.
- 7.7. In sostituzione della soluzione di ascorbato di sodio si possono utilizzare circa 150 mg di acido ascorbico.
- 7.8. La soluzione di solfuro di sodio può essere sostituita da circa 50 mg di EDTA.
- 7.9. In caso di analisi della vitamina A negli alimenti d'allattamento, va prestata particolare attenzione

— alla saponificazione (5.2): a causa della quantità di grasso presente nel campione, potrebbe rivelarsi necessario aumentare la soluzione di idrossido di potassio (3.4),

— all'estrazione (5.3): a causa della presenza di emulsioni, potrebbe essere necessario adeguare il rapporto 2:1 acqua/etanolo.

Per verificare se il metodo di analisi applicato consente di ottenere risultati affidabili relativi a questa matrice specifica (alimenti d'allattamento), è effettuata una prova di recupero su un campione supplementare. Se il tasso di recupero è inferiore all'80 %, il risultato dell'analisi va corretto per il fattore di recupero.

## 8. Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare il 15 % del risultato più elevato.

**▼B**9. **Risultati di uno studio effettuato in cooperazione tra vari laboratori <sup>(1)</sup>**

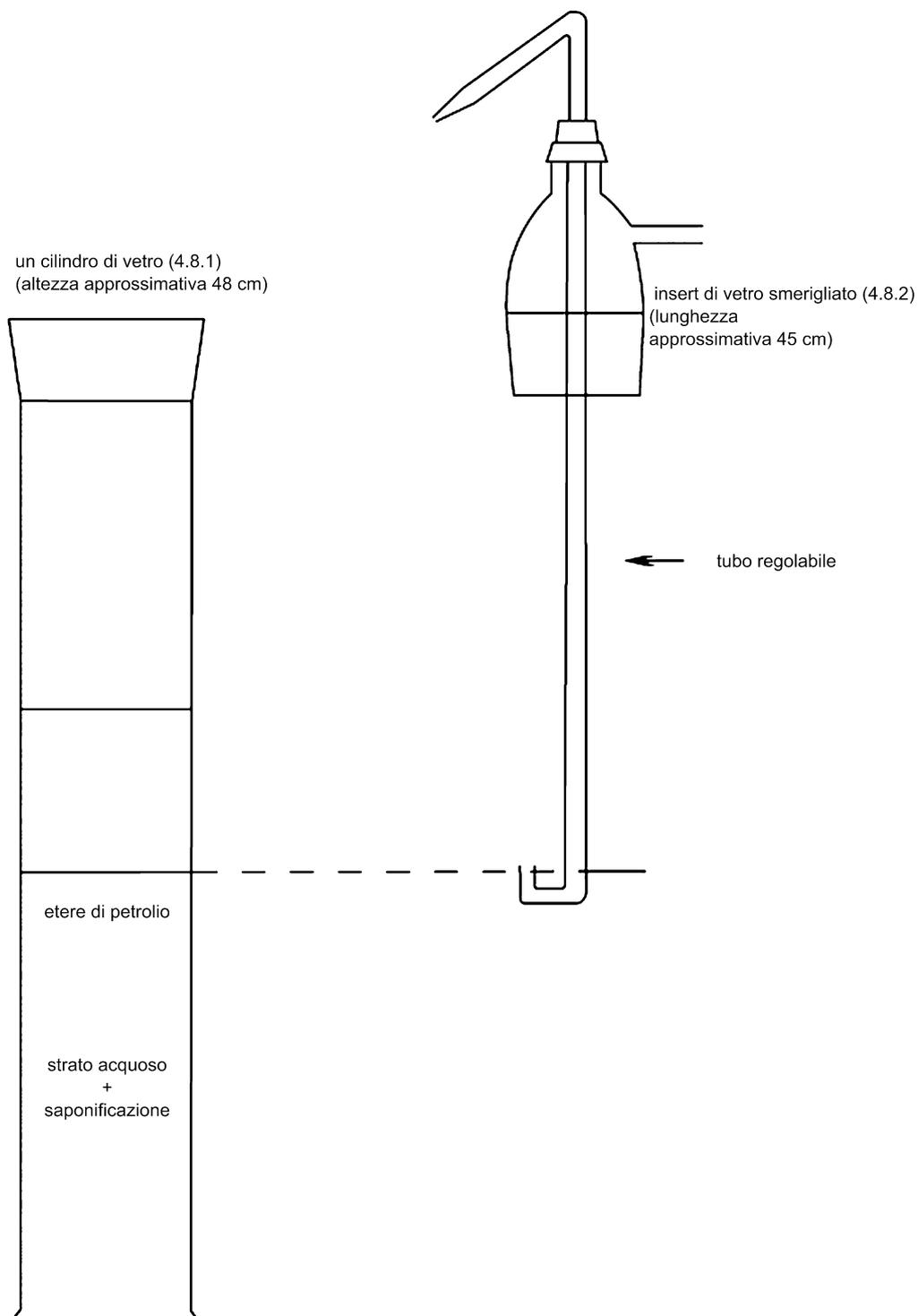
	Premiscela	Alimento premiscelato	Concentrato minerale	Concentrato proteico	Alimento per suinetti
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
media [UI/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
$s_r$ [UI/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [UI/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
$CV_r$ [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
$s_R$ [UI/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [UI/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
$CV_R$ [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L = numero di laboratori  
 n = numero di valori singoli  
 $s_r$  = deviazione standard della ripetibilità  
 $s_R$  = deviazione standard della riproducibilità  
 r = ripetibilità  
 R = riproducibilità  
 $CV_r$  = coefficiente di variazione della ripetibilità  
 $CV_R$  = coefficiente di variazione della riproducibilità

<sup>(1)</sup> Studio effettuato dal gruppo di lavoro Alimenti per animali del Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼B

Figura 1: Dispositivo di estrazione (4.8)



**▼B****B. DETERMINAZIONE DELLA VITAMINA E****1. Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di vitamina E negli alimenti per animali e nelle premiscele. Il contenuto di vitamina E è espresso in mg di acetato di DL- $\alpha$ -tocoferolo per kg. 1 mg di acetato di DL- $\alpha$ -tocoferolo corrisponde a 0,91 mg di DL- $\alpha$ -tocoferolo (vitamina E).

Il limite di quantificazione è di 2 mg di vitamina E/kg. Tale limite è ottenibile unicamente mediante rivelatore a fluorescenza. Utilizzando un rivelatore UV il limite di quantificazione è di 10 mg/kg.

**2. Principio**

Il campione è idrolizzato con una soluzione etanolica di idrossido di potassio e la vitamina E è estratta in etere di petrolio. Il solvente viene rimosso per evaporazione e il residuo è disciolto in metanolo e, se necessario, diluito alla concentrazione richiesta. Il contenuto di vitamina E viene determinato per cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC) utilizzando un rivelatore UV o a fluorescenza.

**3. Reattivi**

- 3.1. Etanolo,  $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Etere di petrolio, intervallo di ebollizione: 40-60 °C
- 3.3. Metanolo
- 3.4. Soluzione di idrossido di potassio,  $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- 3.5. Soluzione di ascorbato di sodio,  $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$  (cfr. osservazione al punto 7.7)
- 3.6. Solfuro di sodio,  $\text{Na}_2\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$  ( $x = 7-9$ )
  - 3.6.1. Soluzione di solfuro di sodio,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$  in glicerolo,  $\beta = 120 \text{ g/l}$  (per  $x = 9$ ) (cfr. osservazione al punto 7.8)
- 3.7. Soluzione di fenoltaleina,  $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$  in etanolo (3.1)
- 3.8. Fase mobile per HPLC: miscela di metanolo (3.3) e acqua, ad esempio 980 + 20 ( $v + v$ ). Il rapporto esatto sarà determinato dalle caratteristiche della colonna utilizzata.
- 3.9. Azoto, senza ossigeno
- 3.10. Acetato di DL- $\alpha$ -tocoferolo, purissimo, di attività certificata
  - 3.10.1. Soluzione madre di acetato di DL- $\alpha$ -tocoferolo: in un matraccio tarato da 100 ml, pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 100 mg di acetato di DL- $\alpha$ -tocoferolo (3.10). Sciogliere in etanolo (3.1) e portare a volume con lo stesso solvente. 1 ml di questa soluzione contiene 1 mg di acetato di DL- $\alpha$ -tocoferolo. (per il controllo UV, cfr. punto 5.6.1.3; per la stabilizzazione cfr. osservazioni al punto 7.4).
- 3.11. DL- $\alpha$ -tocoferolo, purissimo, di attività certificata
  - 3.11.1. Soluzione madre di acetato di DL- $\alpha$ -tocoferolo in un matraccio tarato da 100 ml, pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 100 mg di DL- $\alpha$ -tocoferolo (3.11). Sciogliere in etanolo (3.1) e portare a volume con lo stesso solvente. 1 ml di questa soluzione contiene 1 mg di DL- $\alpha$ -tocoferolo. (per il controllo UV, cfr. punto 5.6.2.3; per la stabilizzazione cfr. osservazioni al punto 7.4).
- 3.12. 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenolo (BHT) (cfr. osservazione al punto 7.5).

**4. Apparecchiatura**

- 4.1. Evaporatore rotante a film

**▼B**

- 4.2. Vetreria in vetro ambra
  - 4.2.1. Matracci a fondo piatto o beute, da 500 ml, con base di vetro smerigliato
  - 4.2.2. Matracci tarati con tappi di vetro smerigliato, a collo piccolo, da 10, 25, 100 e 500 ml
  - 4.2.3. Imbuti separatori, conici, da 1 000 ml, con tappi di vetro smerigliato
  - 4.2.4. Matracci a pera, da 250 ml, con base di vetro smerigliato
- 4.3. Refrigerante Allihn, lunghezza tubo di raffreddamento 300 mm, con giunzione di vetro smerigliato, con adattatore per tubo di alimentazione gas
- 4.4. Carta filtro pieghettata per separazione di fase; diametro 185 mm (ad esempio Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. Apparecchiatura HPLC, con dispositivo di iniezione
  - 4.5.1. Colonna per cromatografia liquida, 250 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, particelle di riempimento 5 o 10 µm, o equivalente
  - 4.5.2. Rivelatore UV o a fluorescenza, con regolazione lunghezza d'onda variabile
- 4.6. Spettrofotometro con celle al quarzo da 10 mm
- 4.7. Bagnomaria con agitatore magnetico
- 4.8. Il dispositivo di estrazione (cfr. figura 1) è costituito da:
  - 4.8.1. un cilindro di vetro della capacità di 1 litro, con collo e tappo di vetro smerigliato
  - 4.8.2. un insert di vetro smerigliato con braccio laterale e tubo regolabile che attraversa la parte centrale. Tale tubo ha l'estremità inferiore a U e un beccuccio all'estremità opposta, in modo che lo strato liquido superiore nel cilindro possa essere trasferito in un imbuto separatore.

**5. Procedimento**

*Nota:* La vitamina E è sensibile alla luce ultravioletta e all'ossidazione. Tutte le operazioni sono effettuate in assenza di luce (utilizzando vetreria di vetro ambra o vetreria protetta con foglio di alluminio) e di ossigeno (eliminato con un getto di azoto). Durante l'estrazione, l'aria al di sopra del liquido è sostituita con azoto (evitare una pressione eccessiva alzando ogni tanto il tappo).

**5.1. Preparazione del campione**

Frantumare il campione affinché passi attraverso un vaglio da 1 mm, evitando la produzione di calore. La frantumazione deve essere effettuata **immediatamente** prima della pesatura e della saponificazione, altrimenti si possono verificare perdite di vitamina E.

**5.2. Saponificazione**

A seconda del contenuto di vitamina E, pesare, con l'approssimazione di 0,01 g, da 2 g a 25 g di campione in un matraccio da 500 ml a fondo piatto o conico (4.2.1). Aggiungere successivamente, sempre rimestando, 130 ml di etanolo (3.1), circa 100 mg di BHT (3.13), 2 ml di soluzione di ascorbato di sodio (3.5) e 2 ml di soluzione di solfuro di sodio (3.6). Adattare un refrigerante (4.3) al matraccio e immergere quest'ultimo in un bagno d'acqua con agitatore magnetico (4.7). Portare a ebollizione e lasciare rifluire per 5 minuti. Aggiungere 25 ml di soluzione di idrossido di potassio (3.4) attraverso il refrigerante (4.3) e lasciare rifluire per altri 25 minuti, sempre agitando sotto una debole corrente di azoto. Risciacquare il refrigerante con circa 20 ml di acqua e lasciare raffreddare il contenuto del matraccio a temperatura ambiente.

**▼ B**5.3. *Estrazione*

Trasferire quantitativamente per decantazione la soluzione di saponificazione risciacquando con un volume totale di 250 ml di acqua in un imbuto separatore da 1 000 ml (4.2.3) o nel dispositivo di estrazione (4.8). Risciacquare successivamente il matraccio di saponificazione con 25 ml di etanolo (3.1) e 100 ml di etere di petrolio (3.2) e trasferire il liquido di lavaggio nell'imbuto separatore o nel dispositivo di estrazione. Il rapporto di acqua ed etanolo nelle soluzioni combinate deve essere di circa 2:1. Agitare energicamente per 2 minuti e lasciare riposare per 2 minuti.

5.3.1. *Estrazione con imbuto separatore (4.2.3)*

Quando gli strati sono separati (cfr. osservazione al punto 7.3) trasferire lo strato di etere di petrolio in un altro separatore (4.2.3). Ripetere questa estrazione due volte con 100 ml di etere di petrolio (3.2), poi ancora due volte con 50 ml di etere di petrolio (3.2).

Lavare due volte gli estratti combinati nell'imbuto separatore rimestando delicatamente (per evitare la formazione di emulsioni) con volumi di 100 ml di acqua e quindi agitando ripetutamente con altri volumi di 100 ml di acqua finché l'acqua risulti incolore con l'aggiunta di soluzione di fenolfaleina (3.7) (in genere sono sufficienti quattro successivi lavaggi). Filtrare l'estratto lavato attraverso un filtro asciutto per separazione di fase (4.4) per rimuovere eventuale acqua residua e trasferire in un matraccio tarato da 500 ml (4.2.2). Risciacquare l'imbuto separatore e il filtro con 50 ml di etere di petrolio (3.2), portare a volume con etere di petrolio (3.2) e mescolare bene.

5.3.2. *Estrazione con apparecchiatura per estrazione (4.8)*

Quando gli strati si sono separati (cfr. osservazione al punto 7.3) sostituire il tappo del cilindro di vetro (4.8.1) con l'insert di vetro smerigliato (4.8.2) e disporre la terminazione inferiore a U del tubo adattabile in modo che risulti appena al di sopra del livello dell'interfaccia. Esercitando una pressione con getto d'azoto nel braccio laterale, trasferire lo strato superiore di etere di petrolio in un imbuto separatore da 1 000 ml (4.2.3). Aggiungere 100 ml di etere di petrolio (3.2) nel cilindro di vetro, tappare e scuotere bene. Lasciare che gli strati si separino e trasferire lo strato superiore nell'imbuto separatore come prima. Ripetere la procedura di estrazione con altri 100 ml di etere di petrolio (3.2), poi ancora due volte con 50 ml di etere di petrolio (3.2); aggiungere gli strati di etere di petrolio nell'imbuto separatore.

Lavare gli estratti di etere di petrolio combinati come descritto al punto 5.3.1 e procedere come ivi indicato.

5.4. *Preparazione della soluzione del campione per HPLC*

Pipettare un'aliquota della soluzione di etere di petrolio (risultante dalla procedura di cui ai punti 5.3.1 o 5.3.2) in un matraccio a pera da 250 ml (4.2.4). Far evaporare il solvente sin quasi all'essiccazione nell'evaporatore rotante (4.1), a pressione ridotta, ad una temperatura del bagno non superiore a 40 °C. Ripristinare la pressione atmosferica facendovi fluire azoto (3.9) e togliere il matraccio dall'evaporatore. Togliere il solvente rimanente con un flusso di azoto (3.9) e disciogliere il residuo immediatamente in un volume noto (10-100 ml) di metanolo (3.3) (la concentrazione di DL- $\alpha$ -tocoferolo deve essere dell'ordine di 5  $\mu$ g/ml a 30  $\mu$ g/ml).

5.5. *Determinazione HPLC*

La vitamina E viene separata su una colonna C<sub>18</sub> a fase inversa (4.5.1) e la concentrazione è misurata mediante rivelatore a fluorescenza (eccitazione: 295 nm, emissione: 330 nm) (4.5.2) o un rivelatore UV (292 nm) (4.5.2).

**▼B**

Iniettare un'aliquota (ad esempio 20 µl) della soluzione di metanolo ottenuta conformemente al punto 5.4 ed eluire con la fase mobile (3.8). Calcolare le altezze medie (aree) dei picchi di diverse iniezioni della stessa soluzione del campione e le altezze medie dei picchi (aree) di diverse iniezioni delle soluzioni di taratura (5.6.2).

**Condizioni HPLC**

Le seguenti condizioni vengono proposte a titolo indicativo; è possibile operare in condizioni diverse purché si ottengano risultati equivalenti.

Colonna per cromatografia liquida (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C <sub>18</sub> , particelle di riempimento 5 µm o 10 µm o equivalente
Fase mobile (3.8):	miscela metanolo (3.3) e acqua, ad esempio, 980 + 20 (v + v).
Velocità di efflusso:	1-2 ml/min
Rivelatore (4.5.2):	rivelatore a fluorescenza (eccitazione: 295 nm/emissione: 330 nm) o rivelatore UV (292 nm)

5.6. *Taratura (acetato di DL-α-tocoferolo o DL-α-tocoferolo)*5.6.1. *Standard di acetato di DL-α-tocoferolo*5.6.1.1. *Preparazione della soluzione standard di lavoro*

Pipettare 25 ml della soluzione madre di acetato di DL-α-tocoferolo (3.10.1) in un matraccio a fondo piatto o in una beuta da 500 ml (4.2.1) e idrolizzare come indicato al punto 5.2. Successivamente, estrarre con etere di petrolio (3.2) secondo quanto indicato al punto 5.3 e portare a 500 ml con etere di petrolio. Far evaporare 25 ml di questo estratto nell'evaporatore (cfr. punto 5.4) sin quasi all'essiccazione, togliere il solvente residuo con una corrente di azoto (3.9) e ridisciogliere il residuo in 25,0 ml di metanolo (3.3). La concentrazione nominale di questa soluzione è di 45,5 µg di DL-α-tocoferolo/ml, equivalente a 50 µg di acetato di DL-α-tocoferolo/ml. La soluzione standard di lavoro deve essere preparata al momento, poco prima dell'uso.

5.6.1.2. *Preparazione delle soluzioni di taratura e della curva di taratura*

In una serie di matracci tarati da 20 ml trasferire 1,0, 2,0, 4,0 e 10,0 ml della soluzione standard di lavoro, portare a volume con metanolo (3.3) e miscelare. Le concentrazioni nominali di queste soluzioni sono 2,5, 5,0, 10,0 e 25,0 µg/ml di acetato di DL-α-tocoferolo e cioè 2,28, 4,55, 9,10 e 22,8 µg/ml di DL-α-tocoferolo.

Iniettare più volte 20 µl di ogni soluzione di taratura e determinare le altezze medie (aree) dei picchi. Sulla base delle altezze medie (aree) dei picchi tracciare una curva di taratura.

5.6.1.3. *Standardizzazione UV della soluzione madre di acetato di DL-α-tocoferolo (3.10.1)*

Diluire 5,0 ml della soluzione madre di acetato di DL-α-tocoferolo (3.10.1) sino a 25,0 ml con etanolo e misurare lo spettro UV di questa soluzione su etanolo (3.1), nello spettrofotometro (4.6), tra 250 e 320 nm.

Il massimo di assorbimento si situa a 284 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ a } 284 \text{ nm in etanolo}$$

A questa diluizione, si deve ottenere un valore di estinzione compreso tra 0,84 e 0,88.

**▼B**5.6.2. Standard di DL- $\alpha$ -tocoferolo5.6.2.1. *Preparazione della soluzione standard di lavoro*

Trasferire con pipetta 2 ml della soluzione madre di DL- $\alpha$ -tocoferolo (3.11.1) in un matraccio tarato da 50 ml, sciogliere in metanolo (3.3) e portare a volume con metanolo. La concentrazione nominale di questa soluzione è di 40  $\mu\text{g}$  di DL- $\alpha$ -tocoferolo/ml, equivalente a 44,0  $\mu\text{g}$  di acetato di DL- $\alpha$ -tocoferolo/ml. La soluzione standard di lavoro deve essere preparata al momento, poco prima dell'uso.

5.6.2.2. *Preparazione delle soluzioni di taratura e della curva di taratura*

In una serie di matracci tarati da 20 ml trasferire 1,0, 2,0, 4,0 e 10,0 ml della soluzione standard di lavoro, portare a volume con metanolo (3.3) e miscelare. Le concentrazioni nominali di queste soluzioni sono 2,0, 4,0, 8,0 e 20,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  di DL- $\alpha$ -tocoferolo e cioè 2,20, 4,40, 8,79 e 22,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  di acetato di DL- $\alpha$ -tocoferolo.

Iniettare più volte 20  $\mu\text{l}$  di ogni soluzione di taratura e determinare le altezze medie dei picchi (aree). Sulla base delle altezze medie (aree) dei picchi tracciare una curva di taratura.

5.6.2.3. *Standardizzazione UV della soluzione madre di DL- $\alpha$ -tocoferolo (3.11.1)*

Diluire 2,0 ml della soluzione madre di DL- $\alpha$ -tocoferolo (3.11.1) sino a 25,0 ml con etanolo e misurare lo spettro UV di questa soluzione su etanolo (3.1) nello spettrofotometro (4.6) tra 250 nm e 320 nm. Il massimo di assorbimento si situa a 292 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ a } 292 \text{ nm in etanolo}$$

A questa diluizione si dovrebbe ottenere un valore di estinzione di 0,6.

6. **Calcolo dei risultati**

Determinare la concentrazione della soluzione del campione in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (calcolata come acetato di  $\alpha$ -tocoferolo) in base all'altezza (area) media dei picchi della vitamina E, per riferimento alla curva di taratura (5.6.1.2 o 5.6.2.2).

Il contenuto  $w$  di vitamina E (in  $\text{mg}/\text{kg}$ ) del campione è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m} \text{ [mg/kg]}$$

dove

$c$  = concentrazione di vitamina E (come  $\alpha$ -tocoferolo) nella soluzione del campione (5.4), in  $\mu\text{g}/\text{ml}$

$V_1$  = volume della soluzione del campione (5.4), in ml

$V_2$  = volume dell'aliquota prelevata come indicato al punto 5.4, in ml

$m$  = peso della quantità di sostanza da analizzare, in g.

7. **Osservazioni**

7.1. Per i campioni con debole concentrazione di vitamina E può essere utile combinare gli estratti di etere di petrolio delle due saponificazioni (quantità pesata: 25 g) con una soluzione del campione, per la determinazione HPLC.

7.2. Il peso del campione prelevato per l'analisi non contiene più di 2 g di sostanze grasse.

7.3. Se non ha luogo la separazione di fase, aggiungere circa 10 ml di etanolo (3.1) affinché l'emulsione si rompa.

**▼B**

- 7.4. Dopo la misurazione spettrofotometrica dell'acetato di DL- $\alpha$ -tocoferolo o della soluzione di DL- $\alpha$ -tocoferolo secondo il punto 5.6.1.3 o, rispettivamente, 5.6.2.3, aggiungere circa 10 mg di BHT (3.12) alla soluzione (3.10.1 o 3.10.2) e conservare questa soluzione in frigorifero (tempo massimo di conservazione: 4 settimane).
- 7.5. In sostituzione del BHT si può utilizzare idrochinone.
- 7.6. Utilizzando una colonna a fase normale, è possibile separare i tocoferoli  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ .
- 7.7. La soluzione di ascorbato di sodio può essere sostituita da circa 150 mg di acido ascorbico.
- 7.8. La soluzione di solfuro di sodio può essere sostituita da circa 50 mg di EDTA.
- 7.9. L'acetato di vitamina E viene idrolizzato molto velocemente in condizioni alcaline ed è pertanto molto sensibile all'ossidazione, in particolare in presenza di oligoelementi quali il ferro e il rame. Nel caso della determinazione della vitamina E nelle premiscele a livelli superiori a 5 000 mg/kg può prodursi una degradazione della vitamina E. Si raccomanda pertanto a titolo di conferma l'applicazione di un metodo HPLC che includa la mineralizzazione enzimatica della formulazione della vitamina E senza la fase della saponificazione alcalina.

**8. Ripetibilità**

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare il 15 % del risultato più elevato.

**9. Risultati di uno studio effettuato in cooperazione tra vari laboratori <sup>(1)</sup>**

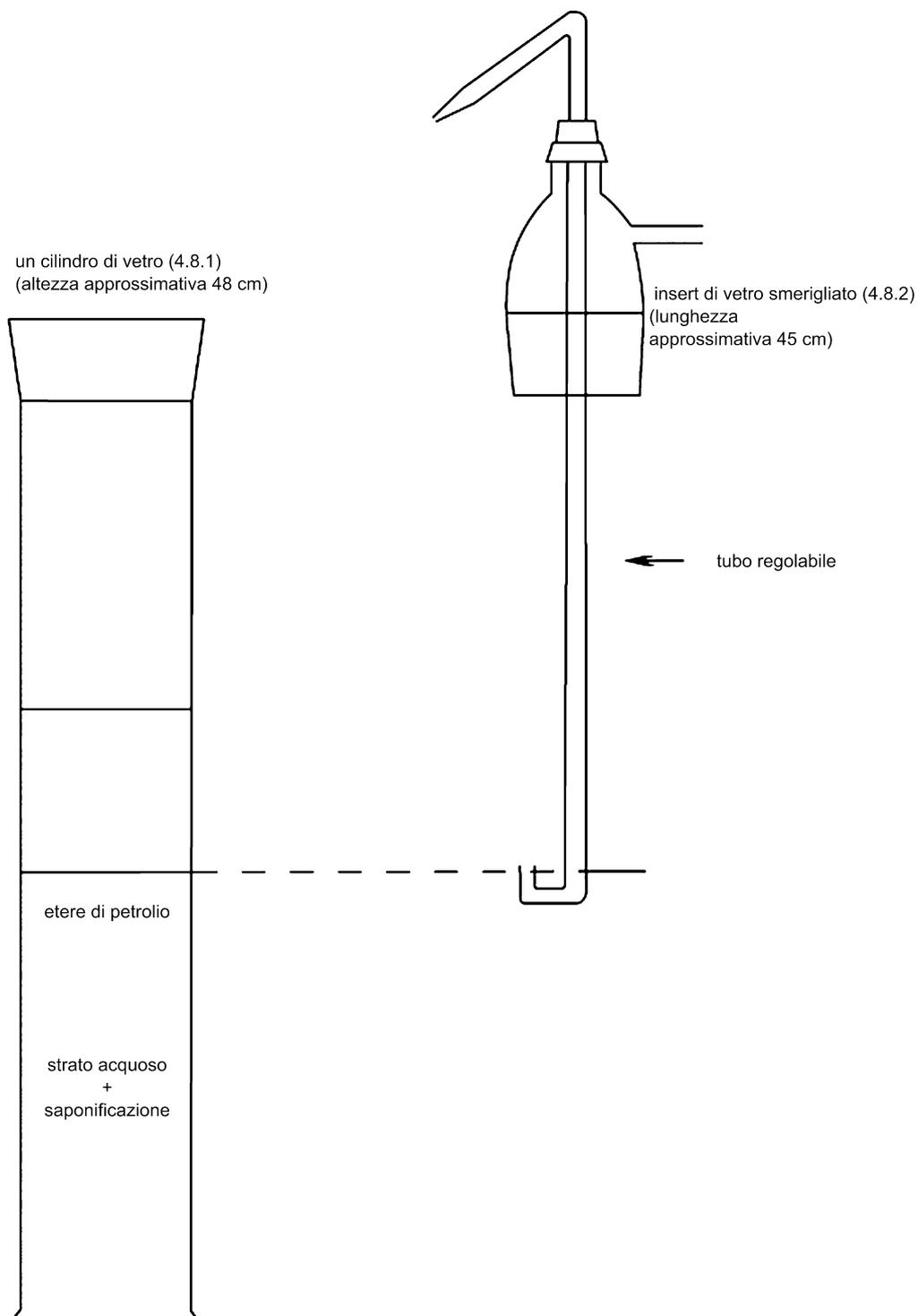
	Premiscela	Alimento premiscelato	Concentrato minerale	Concentrato proteico	Alimento per suinetti
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
media [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
$s_r$ [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
$CV_r$ [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
$s_R$ mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
$CV_R$ [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

- L = numero di laboratori  
n = numero di valori singoli  
 $s_r$  = deviazione standard della ripetibilità  
 $s_R$  = deviazione standard della riproducibilità  
r = ripetibilità  
R = riproducibilità  
 $CV_r$  = coefficiente di variazione della ripetibilità  
 $CV_R$  = coefficiente di variazione della riproducibilità

<sup>(1)</sup> Studio effettuato dal gruppo di lavoro Alimenti per animali del Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼ B

Figura 1: Dispositivo di estrazione (4.8)



**▼B****C. DETERMINAZIONE DEGLI OLIGOELEMENTI FERRO, RAME, MANGANESE E ZINCO****1. Finalità e campo d'applicazione**

Questo metodo consente di determinare gli oligoelementi ferro, rame, manganese e zinco contenuti negli alimenti per animali. Le soglie di quantificazione dei suddetti elementi sono:

- ferro (Fe): 20 mg/kg
- rame (Cu): 10 mg/kg
- manganese (Mn): 20 mg/kg
- zinco (Zn): 20 mg/kg

**2. Principio**

Il campione viene disciolto in acido cloridrico dopo distruzione delle sostanze organiche eventualmente presenti. Gli elementi ferro, rame, manganese e zinco sono determinati, dopo opportuna diluizione, mediante spettrometria di assorbimento atomico.

**3. Reattivi***Osservazioni preliminari*

L'acqua utilizzata per la preparazione dei reattivi e delle soluzioni per l'analisi deve essere esente da cationi da determinare, preparata o per doppia distillazione dell'acqua in un apparecchio in borosilicato o in quarzo o per doppio passaggio su resine a scambio ionico.

I reattivi debbono essere di purezza almeno «analitica». L'assenza dell'elemento da determinare deve essere controllata mediante una prova in bianco. Se necessario, i reattivi dovranno essere ulteriormente purificati.

In luogo delle soluzioni standard appresso elencate è possibile impiegare soluzioni standard commerciali purché fornite di garanzia e controllate prima dell'uso.

- 3.1. Acido cloridrico (d:1,19 g/ml).
- 3.2. Acido cloridrico (6 mol/l).
- 3.3. Acido cloridrico (0,5 mol/l).
- 3.4. Acido fluoridrico al 38-40 % (v/v), con un contenuto di ferro (Fe) inferiore a 1 mg/l e un residuo d'evaporazione (espresso in solfati) inferiore a 10 mg/l.
- 3.5. Acido solforico (d: 1,84 g/ml).
- 3.6. Perossido di idrogeno a 100 volumi circa di ossigeno (30 % in peso).
- 3.7. Soluzione standard di ferro (1 000 µg Fe/ml) preparata come segue o soluzione equivalente in commercio: sciogliere 1 g di fil di ferro in 200 ml di acido cloridrico 6 mol/l (3.2), aggiungere 16 ml di perossido d'idrogeno (3.6) e portare a 1 litro con acqua.
  - 3.7.1. Soluzione standard di ferro (100 µg Fe/ml): diluire un volume della soluzione standard (3.7) con 9 volumi d'acqua.
- 3.8. Soluzione standard di rame (1 000 µg Cu/ml) preparata come segue o soluzione equivalente in commercio:
  - sciogliere 1 g di rame in polvere in 25 ml di acido cloridrico 6 mol/l (3.2), aggiungere 5 ml di perossido d'idrogeno (3.6) e portare a 1 litro con acqua.
- 3.8.1. Soluzione standard di rame (10 µg Cu/ml): diluire un volume della soluzione standard (3.8) con 9 volumi d'acqua, poi ridiluire una parte della soluzione così ottenuta con 9 volumi di acqua.

**▼ B**

- 3.9. Soluzione standard di manganese (1 000 µg Mn/ml) preparata come segue o soluzione equivalente in commercio:
- sciogliere 1 g di manganese in polvere in 25 ml di acido cloridrico 6 mol/l (3.2) e portare a 1 litro con acqua.
- 3.9.1. Soluzione standard di rame (10 µg Mn/ml): diluire un volume della soluzione standard (3.9) con 9 volumi d'acqua, poi ridiluire una parte della soluzione così ottenuta con 9 volumi di acqua.
- 3.10. Soluzione standard di zinco (1 000 µg Zn/ml) preparata come segue o soluzione equivalente in commercio:
- sciogliere 1 g di zinco in lamine o in fogli in 25 ml di acido cloridrico 6 mol/l (3.2) e portare a 1 litro con acqua.
- 3.10.1. Soluzione standard di zinco (10 µg Zn/ml): diluire un volume della soluzione standard (3.10) con 9 volumi d'acqua, poi ridiluire una parte della soluzione così ottenuta con 9 volumi di acqua.
- 3.11. Soluzione di cloruro di lantanio: sciogliere 12 g di ossido di lantanio in 150 ml d'acqua, aggiungere 100 ml di acido cloridrico 6 mol/l (3.2) e portare a 1 litro con acqua.

**4. Apparecchiatura**

- 4.1. Muffola a temperatura regolabile e preferibilmente controllata.
- 4.2. Vetreria resistente in borosilicato; si raccomanda di riservarla esclusivamente alla determinazione degli oligoelementi.
- 4.3. Spettrofotometro di assorbimento atomico, conforme ai requisiti del metodo per quanto riguarda la sensibilità e la precisione nell'intervallo delle misurazioni richieste.

**5. Procedimento <sup>(1)</sup>**

- 5.1. *Campioni contenenti sostanze organiche*
- 5.1.1. Incenerimento e preparazione della soluzione da analizzare <sup>(2)</sup>
- 5.1.1.1. Porre 5-10 g di campione, pesato con l'approssimazione di 0,2 mg, in un crogiolo di quarzo o di platino [cfr. nota b)], essiccare in stufa a 105 °C e introdurre il crogiolo nel forno a muffola freddo (4.1). Chiudere il forno [cfr. nota c)] e innalzare progressivamente la temperatura fino a raggiungere 450-475 °C in 90 minuti circa. Mantenere questa temperatura per 4-16 ore (ad esempio tutta una notte) in modo da eliminare la materia carboniosa; aprire poi il forno e lasciar raffreddare [cfr. nota d)].

<sup>(1)</sup> Possono essere utilizzati altri metodi di mineralizzazione purché abbiano dimostrato di dare risultati simili (ad esempio la mineralizzazione in pressione a microonde).

<sup>(2)</sup> Nel foraggio verde (fresco o essiccato) possono essere presenti notevoli quantità di silice vegetale, che è capace di trattenere gli oligoelementi e che va quindi eliminata. Ai campioni di tali prodotti va pertanto applicato il procedimento seguente. Eseguire le operazioni descritte al punto 5.1.1.1, fino alla filtrazione. Lavare per due volte con acqua bollente la carta da filtro contenente il residuo insolubile e porla in un crogiolo di quarzo o di platino (4.3). Calcinare in muffola (4.1) a temperatura inferiore ai 550 °C, fino a scomparsa completa delle sostanze carboniose. Lasciar raffreddare, aggiungere qualche goccia d'acqua, poi 10-15 ml di acido fluoridrico (3.4), quindi evaporare a secco a 150 °C circa. Se nel residuo rimane ancora della silice, scioglierla in pochi ml di acido fluoridrico (3.4) ed evaporare a secco. Aggiungere 5 gocce di acido solforico (3.5) e riscaldare fino a scomparsa dei fumi bianchi. Aggiungere 5 ml di acido cloridrico 6 mol/l (3.2) e 30 ml circa d'acqua; riscaldare, filtrare la soluzione in un matraccio tarato da 250 ml e portare a volume con acqua (la concentrazione dell'acido cloridrico è di 0,5 mol/l circa). Procedere quindi nella determinazione a partire dal punto 5.1.3.

**▼B**

Umettare le ceneri con acqua e trasferirle in un becher da 250 ml. Lavare bene il crogiolo con complessivi 5 ml circa di acido cloridrico (3.1) e travasare lentamente e accuratamente quest'ultimo nel becher (si può avere una reazione violenta per formazione di CO<sub>2</sub>). Aggiungere goccia a goccia dell'acido cloridrico (3.1), agitando finché l'effervescenza sia terminata. Evaporare a secco agitando ogni tanto con un bacchetta di vetro.

Aggiungere al residuo 15 ml di acido cloridrico 6 mol/l (3.2) e successivamente circa 120 ml d'acqua. Rimescolare con la bacchetta di vetro, che va lasciata nel becher, e coprire quest'ultimo con un vetro di orologio. Portare il liquido a leggera ebollizione e mantenerla finché non si vedono più dissolversi le ceneri. Filtrare su carta filtro senza ceneri e raccogliere il filtrato in un matraccio tarato da 250 ml. Lavare il becher e il filtro prima con 5 ml di acido cloridrico 6 mol/l caldo (3.2), poi, per due volte, con acqua bollente. Portare a volume con acqua (la concentrazione dell'acido cloridrico è 0,5 mol/l).

- 5.1.1.2. Se il residuo nel filtro è nero (presenza di carbone), rimetterlo nel forno a muffola e incenerire di nuovo a 450-475 °C. Questo incenerimento, che richiede solo alcune ore (da 3 a 5 ore), è completo allorché le ceneri appaiono bianche o quasi. Sciogliere di nuovo il residuo con circa 2 ml di acido cloridrico (3.1), evaporare a secco e aggiungere 5 ml di acido cloridrico 6 mol/l (3.2). Riscaldare la soluzione e filtrarla nel matraccio tarato e portare a volume con acqua (la concentrazione dell'acido cloridrico è 0,5 mol/l circa).

*Note:*

- a) Nella determinazione degli oligoelementi è importante vigilare sui rischi di contaminazione, in particolare quella da zinco, rame e ferro. L'apparecchiatura impiegata nella preparazione dei campioni deve quindi essere esente da tali metalli.

Per ridurre i rischi generali di contaminazione, lavorare in ambiente esente da polvere con apparecchiature scrupolosamente pulite e vetreria accuratamente lavata. La determinazione dello zinco è particolarmente sensibile a molti tipi di contaminazione, ad esempio quella dovuta alla vetreria, ai reattivi, alla polvere, ecc.

- b) Calcolare il peso del campione da incenerire in funzione del contenuto approssimativo di oligoelementi dell'alimento per animali in esame e della sensibilità dello spettrofotometro adoperato. Per taluni alimenti per animali a basso tenore di oligoelementi può essere necessario partire da un campione del peso di 10-20 g e limitare a soli 100 ml il volume della soluzione finale.
- c) L'incenerimento deve essere effettuato in forno chiuso, senza insufflazione d'aria o di ossigeno.
- d) La temperatura indicata dal pirometro non deve superare i 475 °C.

## 5.1.2. Determinazione spettrofotometrica

### 5.1.2.1. Preparazione delle soluzioni di taratura

Per ciascun oligoelemento da dosare, preparare una serie di soluzioni di taratura a partire dalle soluzioni standard di lavoro di cui ai punti 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 e 3.10.1, in modo che la concentrazione dell'acido cloridrico in ciascuna di esse sia all'incirca 0,5 mol/l, e, nel caso del ferro, del manganese e dello zinco, la concentrazione del cloruro di lantanio corrisponda allo 0,1 % di La (p/v).

Le concentrazioni prescelte per gli oligoelementi devono trovarsi nell'intervallo di sensibilità dello spettrofotometro utilizzato. Le tabelle di seguito riportano, a titolo di esempio, alcuni tipi di composizione delle soluzioni di taratura; nondimeno a seconda del tipo e della sensibilità dello spettrofotometro impiegato potrebbe essere necessario scegliere altre concentrazioni.

**▼B****Ferro**

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml di soluzione standard di lavoro (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (3.11); portare a 100 ml con acqua							

**Rame**

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml di soluzione standard di lavoro (3.7.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

**Manganese**

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml di soluzione standard di lavoro (3.7.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (3.11); portare a 100 ml con acqua							

**Zinco**

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml di soluzione standard di lavoro (3.7.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (3.11); portare a 100 ml con acqua							

**5.1.2.2. Preparazione della soluzione da sottoporre ad analisi**

Per la determinazione del rame, la soluzione preparata secondo quanto indicato al punto 5.1.1 può in linea generale essere utilizzata direttamente. Se è necessario portare la sua concentrazione nell'intervallo delle concentrazioni delle soluzioni di taratura, una sua aliquota può essere pipettata in un pallone tarato da 100 ml e portata a volume con acido cloridrico 0,5 mol/l (3.3).

Per la determinazione del ferro, del manganese e dello zinco, pipettare un'aliquota della soluzione preparata secondo quanto indicato al punto 5.1.1 in un pallone tarato da 100 ml; aggiungere 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (3.11) e portare a volume con acido cloridrico 0,5 mol/l (3.3) (cfr. anche punto 8, «Osservazione»).

**5.1.2.3. Prova in bianco**

Effettuare una prova in bianco comprendente tutte le operazioni prescritte nel procedimento, escludendo la presenza del campione. La soluzione di taratura «0» non deve essere utilizzata come «bianco».

**5.1.2.4. Misurazione dell'assorbimento atomico**

Misurare l'assorbimento delle soluzioni di taratura e della soluzione da analizzare, impiegando una fiamma ossidante aria-acetilene, alle lunghezze d'onda seguenti:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

**▼ B**

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Ripetere ogni misurazione quattro volte.

5.2. *Alimenti a base di minerali*

In assenza di materiali organici, l'incenerimento preliminare è superfluo. Operare come descritto al punto 5.1.1.1, a partire dal secondo capoverso. L'evaporazione in presenza di acido fluoridrico può essere tralasciata.

6. **Calcolo dei risultati**

Tramite la curva di taratura calcolare la concentrazione degli oligoelementi nella soluzione in esame ed esprimere il risultato in mg d'oligoelemento per kg di campione (ppm).

7. **Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione dallo stesso analista non supera:

- 5 mg/kg, in valore assoluto, per i tenori di oligoelementi fino a 50 mg/kg,
- il 10 % del risultato più elevato per i tenori superiori a 50 e fino a 100 mg/kg,
- 10 mg/kg, in valore assoluto, per i tenori superiori a 100 e fino a 200 mg/kg,
- il 5 % del risultato più elevato per i tenori superiori a 200 mg/kg.

8. **Osservazione**

La presenza di notevoli quantità di fosfati può interferire nella determinazione del ferro, del manganese e dello zinco. Questa interferenza deve essere corretta aggiungendo soluzione di cloruro di lantanio (3.11). Tuttavia, se nel campione il rapporto di peso Ca + Mg/P risulta > 2, non è necessario aggiungere soluzione di cloruro di lantanio (3.11) alla soluzione da analizzare e alle soluzioni di taratura.

D. DETERMINAZIONE DELL'ALOFUGINONE

*DL-trans-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-idrossi-2-piperidil)acetoni]chinazolin-4(3H)-one bromidrato*

1. **Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di alofuginone negli alimenti per animali. Il limite di quantificazione è di 1 mg/kg.

2. **Principio**

Dopo essere stato trattato con acqua calda, l'alofuginone è estratto come base libera in acetato di etile e successivamente ripartito come cloridrato in soluzione acquosa acida. L'estratto è purificato mediante cromatografia a scambio ionico. Il tenore di alofuginone è determinato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a fase inversa, usando un rivelatore UV.

3. **Reattivi**

- 3.1. Acetonitrile, di qualità HPLC.
- 3.2. Resina amberlite XAD-2
- 3.3. Acetato di ammonio
- 3.4. Acetato di etile
- 3.5. Acido acetico glaciale

**▼B**

- 3.6. Alofuginone standard (DL-trans-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-idrossi-2-piperidil)acetoni]chinazolin-4-(3H)-one bromidrato, E 764)
- 3.6.1. Soluzione madre di alofuginone, 100 µg/ml
- In un matraccio tarato da 500 ml pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 50 mg di alofuginone (3.6), sciogliere in una soluzione tampone di acetato ammonico (3.18), portare a volume con la soluzione tampone e mescolare. Questa soluzione è stabile per tre settimane a 5 °C se conservata al buio.
- 3.6.2. Soluzioni di taratura
- In una serie di palloni graduati da 100 ml trasferire 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 6,0 ml della soluzione madre standard (3.6.1). Portare a volume con la fase mobile (3.21) e agitare. Queste soluzioni hanno concentrazioni rispettivamente di 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 6,0 µg/ml di alofuginone. Devono essere preparate al momento, poco prima dell'uso.
- 3.7. Acido cloridico, ( $\rho_{20}$  circa 1,16 g/ml).
- 3.8. Metanolo
- 3.9. Nitrato di argento
- 3.10. Ascorbato di sodio
- 3.11. Carbonato di sodio
- 3.12. Cloruro di sodio
- 3.13. EDTA (acido etilendiamminotetracetico, sale bisodico)
- 3.14. Acqua, di qualità HPLC
- 3.15. Soluzione di carbonato di sodio,  $c = 10$  g/100 ml
- 3.16. Soluzione di carbonato di sodio saturata con cloruro di sodio,  $c = 5$  g/100 ml
- Sciogliere 50 g di carbonato di sodio (3.11) in acqua, portare a 1 litro e aggiungere cloruro di sodio (3.12) fino a saturazione.
- 3.17. Acido cloridrico circa 0,1 mol/l.
- Diluire 10 ml di HCl (3.7) con acqua e portare a 1 litro.
- 3.18. Soluzione tampone di acetato di ammonio, circa 0,25 mol/l
- Sciogliere 19,3 g di acetato di ammonio (3.3) e 30 ml di acido acetico (3.5) in acqua (3.14) e portare a 1 litro.
- 3.19. Preparazione della resina amberlite XAD-2
- Sciacquare un quantitativo adatto di amberlite (3.2) con acqua fino a eliminazione completa di tutti gli ioni cloruro, eliminazione che viene verificata eseguendo una prova al nitrato di argento (3.20) sulla fase acquosa che è stata messa da parte. Sciacquare quindi la resina con 50 ml di metanolo (3.8), eliminare il metanolo e conservare la resina in metanolo fresco.
- 3.20. Soluzione di nitrato di argento, circa 0,1 mol/l
- Sciogliere 0,17 g di nitrato di argento (3.9) in 10 ml di acqua.
- 3.21. Fase mobile per HPLC
- Mescolare 500 ml di acetone nitrile (3.1), 300 ml di soluzione tampone di acetato ammonico (3.18) e 1 200 ml di acqua (3.14). Regolare il pH a 4,3 con acido acetico (3.5). Filtrare la soluzione attraverso un filtro di 0,22 µm (4.8) e degassarla (ad esempio sottoponendola per 10 minuti a trattamento con ultrasuoni). Questa soluzione è stabile per un mese se conservata al buio in un contenitore chiuso.

**▼ B****4. Apparecchiatura**

- 4.1. Bagno ultrasonico
- 4.2. Evaporatore rotante
- 4.3. Centrifuga
- 4.4. Apparecchiatura HPLC a rivelatore UV, a lunghezza d'onda variabile, oppure rivelatore a serie di diodi.
- 4.4.1. Colonna per cromatografia liquida, 300 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, con riempimento 10 µm, o colonna equivalente
- 4.5. Colonna di vetro (300 mm × 10 mm) con filtro in vetro sinterizzato e di rubinetto di arresto
- 4.6. Filtri in fibra di vetro, diametro 150 mm
- 4.7. Filtri a membrana, da 0,45 µm.
- 4.8. Filtri a membrana, da 0,22 µm.

**5. Procedimento**

*Nota:* L'alofuginone in quanto base libera è instabile in soluzioni alcaline e di acetato di etile. Non resta in acetato di etile per oltre 30 minuti.

5.1. *Indicazioni generali*

- 5.1.1. Analizzare un alimento di riferimento (bianco), per accertare l'assenza di alofuginone o di altre sostanze che possono interferire.
- 5.1.2. Eseguire una prova di recupero analizzando il bianco addizionato di una quantità di alofuginone analoga a quella presente nel campione. Per ottenere una concentrazione di 3 mg/kg, aggiungere 300 µl della soluzione madre standard (3.6.1) a 10 g del bianco, mescolare e attendere 10 minuti prima di procedere all'estrazione (5.2).

*Nota:* Ai fini del presente metodo, il bianco ha una composizione simile a quella del campione e all'analisi l'alofuginone non risulta presente.

5.2. *Estrazione*

Pesare, con l'approssimazione di 0,1 g, 10 g del campione preparato in una provetta da centrifuga da 200 ml, aggiungere 0,5 g di ascorbato sodico (3.10), 0,5 g di EDTA (3.13) e 20 ml di acqua e agitare. Immergere la provetta in bagnomaria (80 °C) per 5 minuti. Dopo aver fatto raffreddare a temperatura ambiente, aggiungere 20 ml di soluzione di carbonato di sodio (3.15) e agitare. Aggiungere immediatamente 100 ml di acetato di etile (3.4) e agitare vigorosamente a mano per 15 secondi. Introdurre quindi la provetta nel bagno ultrasonico (4.1) per 3 minuti e allentare il tappo. Centrifugare per 2 minuti e decantare la fase di acetato etilico attraverso un filtro in fibra di vetro (4.6) in un imbuto separatore da 500 ml. Ripetere l'estrazione del campione con un secondo volume di 100 ml di acetato di etile. Lavare gli estratti combinati, per un minuto, con 50 ml di soluzione di carbonato di sodio saturata con cloruro di sodio (3.16) ed eliminare lo strato acquoso.

Estrarre lo strato organico, per un minuto, con 50 ml di acido cloridrico (3.17). Raccogliere lo strato acido inferiore in un imbuto separatore da 250 ml. Riestrarre lo strato organico per 1,5 minuti con altri 50 ml di acido cloridrico e aggiungere al primo estratto. Lavare gli estratti acidi combinati agitando per 10 secondi con 10 ml di acetato di etile (3.4).

**▼ B**

Trasferire quantitativamente lo strato acquoso in un pallone a fondo arrotondato da 250 ml ed eliminare la fase organica. Far evaporare dalla soluzione acida tutto l'acetato di etile restante mediante un evaporatore rotante (4.2). La temperatura del bagnomaria non deve superare i 40 °C. Con un vuoto di circa 25 mbar tutto l'acetato di etile residuo sarà rimosso entro 5 minuti a 38 °C.

### 5.3. *Purificazione*

#### 5.3.1. Preparazione della colonna di amberlite

Per ciascun estratto di campione viene preparata una colonna XAD-2. Mediante metanolo (3.8) trasferire in una colonna di vetro (4.5) 10 g di amberlite preparata (3.19). Aggiungere un piccolo tampone di lana di vetro alla sommità del letto della resina. Lasciar colare il metanolo dalla colonna e lavare la resina con 100 ml d'acqua, fermando il flusso quando il liquido raggiunge la sommità del letto della resina. Attendere che la colonna si stabilizzi per 10 minuti prima di utilizzarla. Evitare comunque che la colonna si essicchi.

#### 5.3.2. Purificazione del campione

Trasferire quantitativamente l'estratto (5.2) sulla sommità della colonna di amberlite preparata (5.3.1) ed eluire, scartando l'eluato. La velocità di eluizione non deve superare 20 ml/min. Risciacquare il pallone con 20 ml di acido cloridrico (3.17) e usare quest'ultimo liquido per lavare la colonna di resina. Eliminare eventuali residui di soluzione acida insufflando aria. Eliminare i liquidi di lavaggio. Aggiungere 100 ml di metanolo (3.8) alla colonna e lasciar eluire per 5-10 minuti, raccogliendo l'eluato in un pallone da 250 ml. Attendere che il metanolo residuo si stabilizzi per 10 minuti con la resina e continuare l'eluizione con un flusso non superiore a 20 ml/min, raccogliendo l'eluato nello stesso pallone. Evaporare il metanolo sull'evaporatore rotante (4.2); la temperatura del bagnomaria non deve superare i 40 °C. Trasferire quantitativamente il residuo in un pallone tarato da 10 ml applicando la fase mobile (3.21). Portare a volume con la fase mobile e agitare. Filtrare una parte attraverso un filtro a membrana (4.7). Riservare questa soluzione per la determinazione mediante HPLC (5.4).

### 5.4. *Determinazione HPLC*

#### 5.4.1. Parametri

I parametri qui riportati sono di riferimento. È possibile operare in condizioni diverse, purché si ottengano risultati equivalenti.

Colonna per cromatografia liquida (4.4.1)

Fase mobile per HPLC (3.21)

Velocità di efflusso: 1,5-2 ml/min

Lunghezza d'onda di rivelazione: 243 nm

Volume iniettato: 40-100 µl.

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando più volte la soluzione di taratura (3.6.2) contenente 3,0 µg/ml fino a ottenimento di altezze (aree) del picco e tempi di ritenzione costanti.

#### 5.4.2. Curva di taratura

Iniettare più volte ciascuna soluzione di taratura (3.6.2) e misurare le altezze (aree) dei picchi per ciascuna concentrazione. Tracciare la curva di taratura riportando in ordinate le altezze medie o le aree medie dei picchi delle soluzioni di taratura e in ascisse le corrispondenti concentrazioni in µg/ml.

**▼B****5.4.3. Soluzione del campione**

Iniettare più volte l'estratto di campione (5.3.2) utilizzando lo stesso volume usato per le soluzioni di taratura e determinare l'altezza (area) media dei picchi dell'alofuginone.

**6. Calcolo dei risultati**

Determinare la concentrazione della soluzione del campione in µg/ml in base all'altezza (area) media dei picchi dell'alofuginone, per riferimento alla curva di taratura (5.4.2).

Il contenuto di alofuginone  $w$  (mg/kg) del campione è dato dalla formula seguente:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

dove

$c$  = concentrazione di alofuginone nella soluzione del campione, in µg/ml

$m$  = peso della quantità di sostanza da analizzare, in grammi.

**7. Convalida dei risultati****7.1. Identità**

L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia oppure usando un rivelatore a serie di diodi in cui vengono confrontati gli spettri dell'estratto di campione e della soluzione di taratura (3.6.2) contenente 6,0 µg/ml.

**7.1.1. Co-cromatografia**

Un estratto di campione viene «rinforzato» mediante aggiunta di un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (3.6.2). Il quantitativo di alofuginone addizionato deve essere analogo a quello stimato di alofuginone rilevato nell'estratto di campione.

Deve aumentare soltanto l'altezza del picco dell'alofuginone, tenuto conto sia della quantità addizionata che della diluizione dell'estratto. L'ampiezza del picco, a metà della sua altezza massima, deve corrispondere, con uno scostamento massimo del 10 %, all'ampiezza originale.

**7.1.2. Rivelazione a serie di diodi**

I risultati sono valutati in base ai seguenti criteri:

- a) la lunghezza d'onda di assorbimento massimo degli spettri del campione e dello standard, registrata all'apice del picco sul cromatogramma, deve essere la stessa entro un margine determinato dal potere di risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione a serie di diodi, tale margine è in genere di circa 2 nm;
- b) tra 225 e 300 nm, gli spettri del campione e dello standard registrati all'apice del picco sul cromatogramma non debbono essere diversi per le parti dello spettro situate fra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è rispettato quando sono presenti gli stessi valori massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto tra i due spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dell'analita standard;
- c) tra 225 e 300 nm, gli spettri relativi all'estratto del campione, registrati nel tratto ascendente, all'apice e nel tratto discendente del picco cromatografico, non devono differire tra loro per le parti dello spettro situate fra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi valori massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto tra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dello spettro all'apice del picco.

**▼ B**

Se uno di questi criteri non è soddisfatto, la presenza dell'analita non è confermata.

7.2. *Ripetibilità*

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve superare 0,5 mg/kg per contenuti di alofuginone sino a un massimo di 3 mg/kg.

7.3. *Recupero*

Per quanto riguarda il campione in bianco addizionato il recupero non è inferiore all'80 %.

8. **Risultati di uno studio collaborativo**

È stato organizzato uno studio collaborativo <sup>(1)</sup> nel corso del quale otto laboratori hanno analizzato tre campioni.

**Risultati**

	Per il campione A (bianco) Al ricevimento	Per il campione B (farina)		Per il campione C (granulare)	
		Al ricevimento	Dopo due mesi	Al ricevimento	Dopo due mesi
media [mg/kg]	NR	2,80	2,42	2,89	2,45
S <sub>R</sub> [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV <sub>R</sub> [%]	—	16	18	14	17
Rec. [%]		86	74	88	75

NR = non riscontrata

S<sub>R</sub> = deviazione standard della riproducibilità

CV<sub>R</sub> = coefficiente di variazione della riproducibilità (%)

Rec. [%] = recupero (%).

## E. DETERMINAZIONE DELLA ROBENIDINA

*Cloridrato di 1,3-bis[(4-clorobenzilidene) amino]guanidina*

1. **Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di robenidina negli alimenti per animali. Il limite di quantificazione è di 5 mg/kg.

2. **Principio**

Il campione è estratto con metanolo acidificato. L'estratto è essiccato e una parte aliquota è purificata in una colonna di ossido di alluminio. La robenidina, eluita dalla colonna con metanolo, è concentrata e portata volume adeguato con la fase mobile. Il tenore di robenidina è determinato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a fase inversa, utilizzando un rivelatore UV.

3. **Reattivi**

## 3.1. Metanolo

## 3.2. Metanolo acidificato

Travasare 4,0 ml di acido cloridrico ( $\rho_{20} = 1,18$  g/ml) in un pallone tarato da 500 ml, portare a volume con metanolo (3.1) e agitare. Questa soluzione è preparata al momento, poco prima dell'uso.

<sup>(1)</sup> The Analyst 108, 1983: pagg. 1252-1256.

**▼ B**

- 3.3. Acetonitrile, di qualità HPLC.
- 3.4. Setacci molecolari
- Sferette di tipo 3A, 8-12 *mesh* (1,6-2,5 mm, alluminosilicato cristallino, diametro dei pori 0,3 mm).
- 3.5. Allumina acida, grado di attività I per cromatografia su colonna
- Trasferire 100 g di allumina acida in un contenitore adatto e aggiungere 2,0 ml di acqua. Tappare e agitare per circa 20 minuti. Conservare in un contenitore ben chiuso.
- 3.6. Soluzione di potassio diidrogeno fosfato,  $c = 0,025$  mol/l
- Sciogliere 3,40 g di potassio diidrogeno fosfato in acqua (qualità HPLC) in un matraccio tarato da 1 000 ml, portare a volume e agitare.
- 3.7. Soluzione di fosfato di sodio bibasico,  $c = 0,025$  mol/l
- Sciogliere 3,55 g di fosfato di sodio bibasico anidro (o 4,45 g di diidrato, o 8,95 g di dodecaidrato) in acqua (di qualità HPLC), in un matraccio tarato da 1 litro, portare a volume e agitare.
- 3.8. Fase mobile per HPLC
- Miscelare i seguenti reattivi:
- 650 ml di acetonitrile (3.3),
- 250 ml di acqua (di qualità HPLC),
- 50 ml di soluzione di potassio diidrogeno fosfato (3.6),
- 50 ml di soluzione di fosfato di sodio bibasico (3.7).
- Filtrare la soluzione attraverso un filtro di 0,22  $\mu\text{m}$  (4.6) e degassarla (ad esempio, sottoponendola per 10 minuti a trattamento con ultrasuoni).
- 3.9. Sostanza di riferimento (standard)
- Robenidina pura: 1,3-bis [(4-clorobenziliden) amino] guanidina cloridrato.
- 3.9.1. Robenidina, soluzione madre standard: 300  $\mu\text{g/ml}$
- Pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 30 mg di robenidina standard (3.9). Sciogliere con metanolo acidificato (3.2) in un matraccio tarato da 100 ml, portare a volume con lo stesso solvente e agitare. Avvolgere il matraccio in un foglio di alluminio e conservarlo al buio.
- 3.9.2. Soluzione standard intermedia di robenidina: 12  $\mu\text{g/ml}$
- Travasare 10,0 ml della soluzione madre standard (3.9.1) in un matraccio tarato da 250 ml, portare a volume con la fase mobile (3.8) e agitare. Avvolgere il matraccio in un foglio di alluminio e conservarlo al buio.
- 3.9.3. Soluzioni di taratura
- In una serie di matracci tarati da 50 ml travasare 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 e 25,0 ml della soluzione standard intermedia (3.9.2). Portare a volume con la fase mobile (3.8) e agitare. Queste soluzioni corrispondono rispettivamente a 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 e 6,0  $\mu\text{g/ml}$  di robenidina. Devono essere preparate al momento, poco prima dell'uso.
- 3.10. Acqua di qualità HPLC

**▼ B****4. Apparecchiatura**

## 4.1. Colonna di vetro

Colonna realizzata in vetro ambra, dotata di rubinetto e serbatoio di circa 150 ml di capacità, diametro interno 10-15 mm, lunghezza 250 mm.

## 4.2. Agitatore meccanico o magnetico

## 4.3. Evaporatore rotante a film

## 4.4. Apparecchiatura per HPLC con rivelatore a ultravioletti, a lunghezza d'onda variabile, oppure con rivelatore a serie di diodi, funzionante nell'intervallo di 250-400 nm.

4.4.1. Colonna per cromatografia liquida: 300 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, particelle di riempimento 10 µm, o equivalente

## 4.5. Carta da filtro in fibra di vetro (Whatman GF/A o equivalente)

## 4.6. Filtri a membrana, da 0,22 µm.

## 4.7. Filtri a membrana, da 0,45 µm.

**5. Procedimento**

*Nota:* La robenidina è sensibile alla luce. Si usa vetreria ambrata in tutte le operazioni.

5.1. *Indicazioni generali*

## 5.1.1. Analizzare un alimento di riferimento (bianco) per accertare l'assenza di robenidina o di altre sostanze che possono interferire.

## 5.1.2. Procedere a una prova di recupero, analizzando un campione dell'alimento bianco (5.1.1) addizionato di una quantità di robenidina simile a quella presente nel campione. Per ottenere una concentrazione di 60 mg/kg, trasferire 3,0 ml della soluzione madre standard (3.9.1) in una beuta da 250 ml. Far evaporare la soluzione fino a circa 0,5 ml in corrente d'azoto. Aggiungere 15 g dell'alimento bianco, mescolare per 10 minuti prima di procedere all'estrazione (5.2).

*Nota:* Ai fini del presente metodo, l'alimento bianco ha una composizione simile a quella del campione e all'analisi la robenidina non deve risultare presente.

5.2. *Estrazione*

Pesare, con l'approssimazione di 0,01 g, 15 g circa del campione preparato, trasferirli in una beuta da 250 ml, aggiungere 100,0 ml di metanolo acidificato (3.2), tappare e agitare per un'ora con l'agitatore (4.2). Filtrare la soluzione attraverso un filtro in fibra di vetro (4.5) e raccogliere tutto il filtrato in una beuta da 150 ml. Aggiungere 7,5 g di setacci molecolari (3.4), tappare e agitare per cinque minuti. Filtrare immediatamente attraverso un filtro in fibra di vetro. Conservare questa soluzione per la fase di purificazione (5.3).

5.3. *Purificazione*

## 5.3.1. Preparazione della colonna di ossido di alluminio

Introdurre un piccolo tampone di lana di vetro all'estremità inferiore della colonna (4.1) e comprimerlo con un'asticella di vetro. Pesare e trasferire nella colonna 11,0 g di allumina preparata (3.5). Nel corso di questa operazione far sì che l'esposizione all'atmosfera sia ridotta al minimo. Battere delicatamente l'estremità inferiore della colonna per lasciar depositare l'allumina.

**▼B****5.3.2. Purificazione del campione**

Trasferire nella colonna con una pipetta 5,0 ml dell'estratto del campione preparato secondo quanto indicato al punto 5.2. Posizionare la punta della pipetta contro la parete della colonna e lasciando che l'allumina assorba la soluzione. Eluire la robenidina con 100 ml di metanolo (3.1) alla velocità di 2-3 ml/minuto e raccogliere l'eluato in un pallone a fondo arrotondato da 250 ml. Evaporare a secco la soluzione di metanolo, a pressione ridotta, e a 40 °C mediante evaporatore rotante (4.3). Ridi sciogliere il residuo in 3-4 ml di fase mobile (3.8) e travasarlo quantitativamente in un pallone tarato da 10 ml. Lavare il pallone con più volumi di 1-2 ml di fase mobile e travasare questi liquidi di lavaggio nel pallone tarato. Portare a volume con lo stesso solvente e agitare. Filtrare un'aliquota attraverso un filtro a membrana di 0,45 µm (4.7). Conservare questa soluzione per la determinazione HPLC (5.4).

**5.4. Determinazione HPLC****5.4.1. Parametri**

I parametri qui riportati sono di riferimento; è possibile tuttavia operare in condizioni diverse, purché si ottengano risultati equivalenti:

Colonna per cromatografia liquida (4.4.1.)

Fase mobile per HPLC (3.8),

Velocità di efflusso: 1,5-2 ml/minuto

Lunghezza d'onda di rivelazione: 317 nm

Volume di iniezione: 20-50 µl.

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando più volte la soluzione di taratura (3.9.3) contenente 3,6 µg/ml sino ad ottenimento di altezze (aree) del picco e tempi di ritenzione costanti.

**5.4.2. Curva di taratura**

Iniettare più volte ciascuna soluzione di taratura (3.9.3) e misurare le altezze (aree) dei picchi per ciascuna concentrazione. Tracciare una curva di taratura riportando le altezze medie dei picchi o le aree medie delle soluzioni di taratura sulle ordinate e le corrispondenti concentrazioni in µg/ml sulle ascisse.

**5.4.3. Soluzione del campione**

Iniettare più volte l'estratto del campione (5.3.2) utilizzando lo stesso volume usato per le soluzioni di taratura e determinare l'altezza (area) media dei picchi della robenidina.

**6. Calcolo dei risultati**

Determinare la concentrazione della soluzione del campione in µg/ml in base all'altezza (area) media dei picchi della robenidina, per riferimento alla curva di taratura (5.4.2).

Il contenuto di robenidina, *w* (mg/kg) del campione è dato dalla seguente formula:

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

dove

*c* = concentrazione di robenidina nella soluzione del campione, in µg/ml,

*m* = peso della quantità di sostanza da analizzare, in grammi.

**▼B****7. Convalida dei risultati****7.1. Identità**

L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia oppure mediante un rivelatore a serie di diodi che permetta di confrontare gli spettri dell'estratto del campione e della soluzione di taratura (3.9.3) contenente 6 µg/ml.

**7.1.1. Co-cromatografia**

Un estratto del campione viene «rinforzato» mediante aggiunta di un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (3.9.3). Il quantitativo di robenidina addizionato deve essere analogo a quello stimato di robenidina rilevato nell'estratto del campione.

Deve aumentare soltanto l'altezza del picco della robenidina, tenuto conto sia della quantità di robenidina addizionata che della diluizione dell'estratto. L'ampiezza del picco, a metà della sua altezza massima, deve corrispondere, con uno scostamento massimo del 10 %, all'ampiezza originale.

**7.1.2. Rivelazione a serie di diodi**

I risultati sono valutati in base ai seguenti criteri:

- a) la lunghezza d'onda di assorbimento massimo degli spettri del campione e dello standard, registrata all'apice del picco sul cromatogramma, deve essere la stessa entro un margine determinato dal potere di risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione a serie di diodi, tale margine è in generale di 2 nm circa;
- b) tra 225 e 300 nm, gli spettri del campione e dello standard registrati all'apice del picco sul cromatogramma non devono essere diversi per le parti dello spettro situate fra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi valori massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto tra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dell'analita standard;
- c) tra 250 e 400 nm, gli spettri relativi all'estratto del campione, registrati nel tratto ascendente, all'apice e nel tratto discendente del picco cromatografico, non devono differire tra loro per le parti dello spettro situate fra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi valori massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto tra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dello spettro all'apice del picco.

Se uno di questi criteri non è soddisfatto, la presenza dell'analita non è confermata.

**7.2. Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare il 10 % del risultato più elevato per contenuti di robenidina superiori a 15 mg/kg.

**7.3. Recupero**

Per il campione in bianco addizionato il recupero non è inferiore all'85 %.

**8. Risultati di uno studio collaborativo**

La Comunità europea ha organizzato uno studio collaborativo nel corso del quale dodici laboratori hanno analizzato quattro campioni di alimenti per volatili da cortile e per conigli, in forma di farina o di granulato. Ogni campione è stato analizzato due volte. I risultati dello studio figurano nella seguente tabella:

**▼ B**

	Volatili		Conigli	
	Farina	Granulare	Farina	Granulare
media [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s <sub>r</sub> [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
CV <sub>r</sub> [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S <sub>R</sub> [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV <sub>R</sub> [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Recupero [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s<sub>r</sub> = deviazione standard della ripetibilità

CV<sub>r</sub> = coefficiente di variazione della ripetibilità, %

S<sub>R</sub> = deviazione standard della riproducibilità

CV<sub>R</sub> = coefficiente di variazione della riproducibilità, %

#### F. DETERMINAZIONE DEL DICLAZURIL

*(+)-4-clorofenil[2,6-dicloro-4-(2,3,4,5-tetraidro-3,5-diosso-1,2,4-triazina-2-il)fenil]acetone nitrile*

##### 1. Finalità e campo d'applicazione

Il metodo consente di determinare il contenuto di diclazuril negli alimenti per animali e nelle premiscele. Il limite di rilevazione è di 0,1 mg/kg; il limite di quantificazione è di 0,5 mg/kg.

##### 2. Principio

Dopo aggiunta di uno standard interno, il campione viene estratto con metanolo acidificato. Nel caso degli alimenti per animali, una parte aliquota dell'estratto viene purificata su una cartuccia C<sub>18</sub> per estrazione in fase solida. Il diclazuril viene eluito dalla cartuccia con una miscela di metanolo acidificato e acqua. Dopo evaporazione, il residuo è disciolto in una miscela DMF/acqua. Nelle premiscele, l'estratto viene evaporato e il residuo disciolto in una miscela DMF/acqua. Il contenuto di diclazuril è determinato per cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), a gradiente ternario e in fase inversa, utilizzando un rivelatore UV.

##### 3. Reattivi

3.1. Acqua, di qualità HPLC.

3.2. Acetato di ammonio

3.3. Solfidrato di tetrabuttilammonio (TBHS)

3.4. Acetonitrile, di qualità HPLC

3.5. Metanolo, di qualità HPLC

3.6. N, N-dimetilformammide (DMF)

3.7. Acido cloridrico, ρ<sub>20</sub> = 1,19 g/ml

3.8. Sostanza di riferimento (standard): diclazuril II-24: (+)-4-clorofenil[2,6-dicloro-4-(2,3,4,5-tetraidro-3,5-diosso-1,2,4-triazina-2-il)fenil]acetone nitrile, di purezza garantita, E771.

3.8.1. Soluzione madre standard di diclazuril, 500 µg/ml

In un matraccio tarato da 50 ml, pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 25 mg di diclazuril standard (3.8). Sciogliere in DMF (3.6), portare a volume con DMF (3.6) e mescolare. Avvolgere il matraccio in un foglio d'alluminio (o impiegare un matraccio in vetro scuro) e conservare in frigorifero. A temperatura non superiore a 4 °C la soluzione si mantiene stabile per un mese.

**▼B**

## 3.8.2. Soluzione madre standard di diclazuril, 50 µg/ml

Trasferire 5,00 ml della soluzione madre (3.8.1) in un matraccio tarato da 50 ml, portare a volume con DMF (3.6) e mescolare. Avvolgere il matraccio in un foglio d'alluminio (o utilizzare un matraccio in vetro scuro) e conservare in frigorifero. A temperatura non superiore a 4 °C la soluzione si mantiene stabile per un mese.

3.9. Standard interno: 2,6 dicloro- $\alpha$ -(4-clorofenil)-4-[4,5-diidro-3,5-diossol,2,4-triazina-2(3H)-il]  $\alpha$ -metilbenzenebenzene-acetonitrile

## 3.9.1. Soluzione madre dello standard interno di diclazuril, 500 µg/ml

In un matraccio tarato da 50 ml, pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 25 mg dello standard interno (3.9). Sciogliere in DMF (3.6), portare a volume con DMF (3.6) e mescolare. Avvolgere il matraccio in un foglio d'alluminio (o utilizzare un matraccio in vetro scuro) e conservare in frigorifero. A temperatura non superiore a 4 °C la soluzione si mantiene stabile per un mese.

## 3.9.2. Soluzione dello standard interno di diclazuril, 50 µg/ml

Trasferire 5,00 ml della soluzione madre dello standard interno (3.9.1) in un matraccio tarato da 50 ml, portare a volume con DMF (3.6) e mescolare. Avvolgere il matraccio in un foglio d'alluminio (o utilizzare un matraccio in vetro scuro) e conservare in frigorifero. A temperatura non superiore a 4 °C la soluzione si mantiene stabile per un mese.

## 3.9.3. Soluzione dello standard interno per le premiscele, p/1000 mg/ml

(p = contenuto nominale di diclazuril nella premiscela, in mg/kg)

In un matraccio tarato da 100 ml, pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, p/10 mg dello standard interno, sciogliere in DMF (3.6) in bagno ultrasonico (4.6), portare a volume con DMF e mescolare. Avvolgere il matraccio in un foglio d'alluminio (o utilizzare un matraccio in vetro scuro) e conservare in frigorifero. A temperatura non superiore a 4 °C la soluzione si mantiene stabile per un mese.

## 3.10. Soluzione di taratura, 2 µg/ml.

In un matraccio tarato da 50 ml, pipettare 2,00 ml di soluzione standard di diclazuril (3.8.2) e 2,00 ml di soluzione dello standard interno (3.9.2). Aggiungere 16 ml di DMF (3.6), portare a volume con acqua e mescolare. Questa soluzione deve essere preparata al momento, prima dell'uso.

3.11. Cartuccia C<sub>18</sub> per estrazione in fase solida, ad esempio Bond Elut, misura: 1 cm., peso sorbente: 100 mg.

## 3.12. Solvente di estrazione: metanolo acidificato.

Pipettare 5,0 ml di acido cloridrico (3.7) in 1 000 ml di metanolo (3.5) e mescolare.

## 3.13. Fase mobile per HPLC

## 3.13.1. Eluente A: soluzione di acetato di ammonio — solfidrato di tetrabuttilammonio.

Sciogliere 5 g di acetato d'ammonio (3.2) e 3,4 g di TBHS (3.3) in 1 000 ml d'acqua (3.1) e mescolare.

## 3.13.2. Eluente B: acetonitrile (3.4).

## 3.13.3. Eluente C: metanolo (3.5).

**▼ B****4. Apparecchiatura**

- 4.1. Agitatore meccanico
- 4.2. Apparecchiatura per HPLC a gradiente ternario
  - 4.2.1. Colonna per cromatografia liquida, 100 mm × 4,6 mm, con riempimento in Hypersil ODS da 3 µm, o equivalente
  - 4.2.2. Rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile o rivelatore a serie di diodi
- 4.3. Evaporatore rotante a film
- 4.4. Filtro a membrana, da 0,45 µm
- 4.5. Collettore a vuoto
- 4.6. Bagno ultrasonico

**5. Procedimento****5.1. Indicazioni generali****5.1.1. Alimento bianco**

Analizzare un alimento di riferimento (bianco), per accertare l'assenza di diclazuril o di altre sostanze che possono interferire. Il bianco ha una composizione simile a quella del campione e all'analisi il diclazuril o sostanze capaci di interferire non risultano presenti.

**5.1.2. Prova di recupero**

Effettuare una prova di recupero analizzando il bianco addizionato di una quantità di diclazuril analoga a quella presente nel campione. Per ottenere una concentrazione di 1 mg/kg, aggiungere 0,1 ml della soluzione madre (3.8.1) a 50 g di bianco, mescolare accuratamente e lasciar riposare per 10 minuti, agitando nuovamente varie volte prima di procedere all'estrazione (5.2).

Se non fosse disponibile un bianco di tipo simile a quello del campione (cfr. punto 5.1.1), la prova di recupero può essere eseguita col metodo di addizione della sostanza di riferimento. In questo caso, un'aliquota del campione da analizzare viene addizionata di una quantità nota di diclazuril, analoga a quella già presente. Quest'aliquota viene analizzata insieme a una del campione non addizionato e il recupero può essere calcolato per differenza.

**5.2. Estrazione****5.2.1. Alimenti per animali**

Pesare, con l'approssimazione di 0,01 g, 50 g circa del campione. Trasferire in una beuta da 500 ml, aggiungere 1,00 ml di soluzione dello standard interno (3.9.2) e 200 ml di solvente di estrazione (3.12), poi tappare la beuta. Mantenere sotto agitazione la miscela per una notte, nell'agitatore (4.1). Lasciare depositare per 10 minuti. Trasferire una parte aliquota da 20 ml del surnatante in un contenitore adatto in vetro e diluire con 20 ml d'acqua. Trasferire questa soluzione in una cartuccia di estrazione (3.11) e filtrare sotto vuoto (4.5). Lavare la cartuccia con 25 ml di una miscela di solvente di estrazione (3.12) e d'acqua, 65 + 35 (V + V). Eliminare le frazioni raccolte ed eluire i composti con 25 ml di una miscela di solvente di estrazione (3.12) e d'acqua, 80 + 20 (V + V). Evaporare questa frazione a 60 °C nell'evaporatore rotante (4.3) fino a quando comincia a seccare. Sciogliere il residuo con 1,0 ml di DMF (3.6), aggiungere 1,5 ml d'acqua (3.1) e mescolare. Filtrare con filtro a membrana (4.4). Procedere alla determinazione HPLC (5.3).

**5.2.2. Premiscela**

Pesare, con l'approssimazione di 0,001 g, 1 g circa del campione. Trasferire in una beuta da 500 ml, aggiungere 1,00 ml di soluzione dello standard interno (3.9.3) e 200 ml di solvente di estrazione (3.12), poi tappare la beuta. Agitare per una notte sull'agitatore (4.1). Lasciare depositare per 10 minuti. Trasferire un'aliquota da 10 000/p ml (p = contenuto nominale di diclazuril nella premiscela, espresso in mg/kg) del

**▼B**

surnatante in un matraccio a fondo arrotondato di dimensioni adatte. Evaporare nell'evaporatore rotante (4.3), sotto pressione ridotta e a 60 °C, fino a quando il composto comincia a seccare. Sciogliere il residuo con 10,0 ml DMF (3.6), aggiungere 15,0 ml d'acqua (3.1) e mescolare. Procedere alla determinazione HPLC (5.3).

5.3. *Determinazione HPLC*5.3.1. *Parametri*

Le seguenti condizioni vengono proposte a titolo indicativo; è possibile operare in condizioni diverse, purché si ottengano risultati equivalenti.

Colonna per cromatografia liquida(4.2.1):	100 mm × 4,6 mm, con riempimento in Hypersil ODS da 3 µm, o equivalente
Fase mobile:	Eluente A (3.13.1): soluzione acquosa di acetato di ammonio e di solfidrato di tetrabuttilammonio Eluente B (3.13.2): acetonitrile Eluente C (3.13.3): metanolo
Metodo di eluzione:	— gradiente lineare — condizioni iniziali: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — dopo 10 minuti, eluizione a gradiente per 30 minuti fino a: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V). Risciacquare con B per 10 minuti.
Velocità di efflusso:	1,5-2 ml/min
Volume di iniezione:	20 µl
Lunghezza d'onda di rivelazione:	280 nm

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando più volte la soluzione di taratura (3.10), contenente 2 µg/ml, fino a ottenimento di altezze (aree) del picco e tempi di ritenzione costanti.

5.3.2. *Soluzione di taratura*

Iniettare più volte 20 µl della soluzione di taratura (3.10) e determinare l'altezza (area) media dei picchi del diclazuril e dello standard interno.

5.3.3. *Soluzione del campione*

Iniettare più volte 20 µl della soluzione del campione (5.2.1 o 5.2.2) e determinare l'altezza (area) media dei picchi del diclazuril e dello standard interno.

6. **Calcolo dei risultati**6.1. *Alimenti per animali*

Il contenuto *w* di diclazuril nel campione, espresso in mg/kg, è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10}{m} \text{ [mg/kg]}$$

**▼ B**

dove

$h_{d,s}$  = altezza (area) del picco del diclazuril nella soluzione del campione (5.2.1)

$h_{i,s}$  = altezza (area) del picco dello standard interno nella soluzione del campione (5.2.1)

$h_{d,c}$  = altezza (area) del picco del diclazuril nella soluzione di taratura (3.10)

$h_{i,c}$  = altezza (area) del picco dello standard interno nella soluzione di taratura (3.10)

$c_{d,c}$  = concentrazione di diclazuril nella soluzione di taratura, in  $\mu\text{g/ml}$  (3.10)

$m$  = peso della quantità di sostanza da analizzare, in grammi

$V$  = volume dell'estratto del campione conformemente al punto 5.2.1 (ossia 2,5 ml)

## 6.2. Premiscela

Il contenuto  $w$  di diclazuril nel campione, espresso in  $\text{mg/kg}$ , è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02 V \times p}{m} \text{ [mg/kg]}$$

dove

$h_{d,c}$  = altezza (area) del picco del diclazuril nella soluzione di taratura (3.10)

$h_{i,c}$  = altezza (area) del picco dello standard interno nella soluzione di taratura (3.10)

$h_{d,s}$  = altezza (area) del picco del diclazuril nella soluzione del campione (5.2.2)

$h_{i,s}$  = altezza (area) del picco dello standard interno nella soluzione del campione (5.2.2)

$c_{d,c}$  = concentrazione di diclazuril nella soluzione di taratura, in  $\mu\text{g/ml}$  (3.10)

$m$  = peso della quantità di sostanza da analizzare, in grammi

$V$  = volume dell'estratto del campione conformemente al punto 5.2.2 (ossia 25 ml)

$p$  = contenuto nominale di diclazuril nella premiscela, in  $\text{mg/kg}$

## 7. Convalida dei risultati

### 7.1. Identità

L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia oppure mediante un rivelatore a serie di diodi che permetta di confrontare gli spettri dell'estratto del campione (5.2.1 o 5.2.2) e della soluzione di taratura (3.10).

#### 7.1.1. Co-cromatografia

A un estratto del campione (5.2.1 o 5.2.2) viene addizionato un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (3.10). Il quantitativo di diclazuril addizionato deve essere analogo a quello di diclazuril rilevato nell'estratto del campione.

Devono aumentare soltanto le altezze del picco del diclazuril e dello standard interno, tenuto conto dei quantitativi aggiunti e della diluizione dell'estratto. L'ampiezza del picco, a metà altezza, deve corrispondere, con uno scostamento massimo del 10 %, all'ampiezza originale del picco del diclazuril o dello standard interno del campione non addizionato.

#### 7.1.2. Rivelazione a serie di diodi

I risultati sono valutati in base ai seguenti criteri:

- a) la lunghezza d'onda dell'assorbimento massimo degli spettri del campione e dello standard, registrata al vertice del picco sul cromatogramma, deve essere la stessa entro un margine determinato dal potere di risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione a serie di diodi essa è in genere di 2 nm circa;

**▼B**

- b) fra 210 e 320 nm, gli spettri del campione e dello standard registrati al vertice del picco sul cromatogramma non devono essere diversi per le parti dello spettro situate fra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto fra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dello standard dell'analita;
- c) fra 230 e 320 nm, gli spettri della curva ascendente, dell'apice e della curva discendente del picco prodotta dall'estratto del campione non devono essere diversi gli uni dagli altri per le parti dello spettro situate fra il 10 % e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi valori massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto fra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dello spettro all'apice del picco.

Se uno di questi criteri non è soddisfatto, la presenza dell'analita non è confermata.

7.2. *Ripetibilità*

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare:

- il 30 % rispetto al valore più elevato, per i contenuti di diclazuril compresi fra 0,5 e 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg, per i contenuti di diclazuril compresi fra 2,5 e 5 mg/kg,
- il 15 % del valore più elevato, per i contenuti di diclazuril superiori a 5 mg/kg.

7.3. *Recupero*

Per un campione addizionato (bianco), il recupero non è inferiore all'80 %.

8. **Risultati di uno studio collaborativo**

È stato organizzato uno studio collaborativo nel corso del quale undici laboratori hanno analizzato cinque campioni costituiti da due premiscele: una mescolata con una matrice organica (O 100) e l'altra con una matrice inorganica (A 100). Il contenuto teorico era di 100 mg di diclazuril/kg. I tre alimenti misti per volatili da cortile sono stati preparati da tre diversi produttori (NL) (L1/Z1/K1). Il contenuto teorico era di 1 mg di diclazuril/kg. Ai laboratori è stato chiesto di analizzare ciascun campione uno sola volta o in duplicato. (Per ulteriori informazioni consultare il *Journal of AOAC International*, Volume 77, n. 6, 1994, pagg. 1359-1361). I risultati dello studio figurano nella seguente tabella:

	Campione 1 A 100	Campione 2 O 100	Campione 3 L1	Campione 4 Z1	Campione 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Media	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S <sub>r</sub> (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV <sub>r</sub> (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S <sub>R</sub> (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV <sub>R</sub> (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
contenuto nominale (mg/kg]	100	100	1	1	1

L = numero di laboratori

n = numero di valori singoli

S<sub>r</sub> = deviazione standard della ripetibilità

CV<sub>r</sub> = coefficiente di variazione della ripetibilità

**▼ B**

$S_R$  = deviazione standard della riproducibilità  
 $CV_R$  = coefficiente di variazione della riproducibilità

9. **Osservazioni**

Deve essere dimostrato preliminarmente che il diclazuril dà una risposta lineare per l'insieme delle concentrazioni misurate.

## G. DETERMINAZIONE DEL LASALOCID SODICO

*Sale sodico di un acido monocarbossilico polietere prodotto da Streptomyces lasaliensis*

1. **Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di lasalocid sodico negli alimenti per animali e nelle premiscele. Il limite di rilevazione è di 5 mg/kg, il limite di quantificazione è di 10 mg/kg.

2. **Principio**

Il lasalocid sodico viene estratto dal campione in metanolo acidificato e viene determinato per cromatografia in fase liquida ad alta prestazione (HPLC) a fase inversa, utilizzando un rivelatore spettrofluorimetrico.

3. **Reattivi**3.1. Potassio diidrogeno fosfato ( $KH_2PO_4$ )

3.2. Acido ortofosforico, p (p/p) = 85 %

3.3. Soluzione di acido ortofosforico, c = 20 %

Diluire con acqua 23,5 ml di acido ortofosforico (3.2) e portare a 100 ml.

3.4. 6-metil-2-epitilammina (1,5-dimetilesilammina), p (p/p) = 99 %

3.5. Metanolo, di qualità HPLC

3.6. Acido cloridrico, densità: 1,19 g/ml.

3.7. Soluzione tampone fosfato, c = 0,01 mol/l

In 500 ml di acqua (3.11) sciogliere 1,36 g di  $KH_2PO_4$  (3.1), aggiungere 3,5 ml di acido ortofosforico (3.2) e 10,0 ml di 6-metil-2-epitilammina (3.4). Portare il pH a 4,0 con soluzione di acido ortofosforico (3.3) e portare a 1 000 ml con acqua (3.11).

3.8. Metanolo acidificato

Travasare 5,0 ml di acido cloridrico (3.6) in un matraccio tarato da 1 000 ml, portare a volume con metanolo (3.5) e mescolare. Questa soluzione deve essere preparata al momento, prima dell'uso.

3.9. Fase mobile per HPLC, soluzione tampone fosfato e metanolo 5 + 95 (V + V)

Mescolare 5 ml di soluzione tampone fosfato (3.7) con 95 ml di metanolo (3.5)

3.10. Sostanza standard lasalocid sodico, di purezza garantita,  $C_{34}H_{53}O_8Na$  (sale sodico di un acido monocarbossilico polietere prodotto da *Streptomyces lasaliensis*), E7633.10.1. Soluzione madre standard di lasalocid sodico, 500  $\mu g/ml$ 

In un matraccio tarato da 100 ml, pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 50 mg di lasalocid sodico (3.10), sciogliere in metanolo acidificato (3.8), portare a volume con lo stesso solvente e mescolare. Questa soluzione deve essere preparata al momento, poco prima dell'uso.

**▼ B****3.10.2. Soluzione standard intermedia di lasalocid sodico, 50 µg/ml**

In un matraccio tarato da 100 ml, pipettare 10,0 ml di soluzione madre standard (3.10.1), portare a volume con metanolo acidificato (3.8) e mescolare. Questa soluzione deve essere preparata al momento, prima dell'uso.

**3.10.3. Soluzioni di taratura**

In una serie di matracci tarati da 50 ml trasferire 1,0 ml, 2,0 ml, 4,0 ml, 5,0 ml e 10,0 ml di soluzione madre intermedia (3.10.2). Portare a volume con metanolo acidificato (3.8) e mescolare. Queste soluzioni corrispondono rispettivamente a 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 e 10,0 g di lasalocid sodico per ml e vanno preparate al momento, prima dell'uso.

**3.11. Acqua, di qualità HPLC****4. Apparecchiatura**

4.1. Bagno ultrasonico (o bagnomaria con agitatore), con sistema di termoregolazione

4.2. Filtri a membrana, 0,45 µm.

4.3. Apparecchiatura HPLC con sistema di iniezione adeguato per volumi da 20 µl.

4.3.1. Colonna per cromatografia liquida, 125 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, particelle di riempimento 5 µm, o equivalente

4.3.2. Spettrofluorimetro con regolazione a lunghezza d'onda variabile (eccitazione e emissione)

**5. Procedimento****5.1. Indicazioni generali****5.1.1. Alimento «bianco»**

Per eseguire la prova di recupero (5.1.2), analizzare un alimento di riferimento (bianco), per accertare l'assenza di lasalocid sodico o di altre sostanze che possono interferire. Il campione bianco ha una composizione simile a quella del campione e all'analisi il lasalocid sodico o sostanze capaci di interferire non risultano presenti.

**5.1.2. Prova di recupero**

Effettuare una prova di recupero analizzando il bianco addizionato di una quantità di lasalocid sodico analoga a quella presente nel campione. Per ottenere una concentrazione di 100 mg/kg, trasferire 10,0 ml della soluzione madre di riserva (3.10.1) in una beuta da 250 ml e far evaporare la soluzione a circa 0,5 ml. Aggiungere 50 g del bianco, mescolare il tutto e attendere per 10 minuti, agitando più volte, prima di procedere all'estrazione (5.2).

Se non fosse disponibile un bianco di tipo simile a quello del campione (cfr. punto 5.1.1), la prova di recupero può essere eseguita col metodo di addizione della sostanza di riferimento. In questo caso, un'aliquota del campione da analizzare viene addizionata di una quantità nota di lasalocid sodico, analoga a quella già presente. Quest'aliquota viene analizzata insieme a una del campione non addizionato, e il recupero può essere calcolato per differenza.

**5.2. Estrazione****5.2.1. Alimenti per animali**

In una beuta da 250 ml con tappo, pesare, con l'approssimazione di 0,01 g, da 5 a 10 g del campione. Aggiungere con pipetta 100,0 ml di metanolo acidificato (3.8). Chiudere senza stringere e scuotere per disperdere. Collocare la beuta in un bagno ultrasonico (4.1) a circa

**▼ B**

40 °C per 20 minuti; quindi toglierla e lasciarla raffreddare a temperatura ambiente. Lasciare riposare per circa un'ora finché la sostanza in sospensione si sia depositata; filtrare quindi un'aliquota con filtro a membrana da 0,45 µm (4.2) in un recipiente adeguato. Procedere alla determinazione HPLC (5.3).

5.2.2. **Premiscela**

In un matraccio tarato pesare, con l'approssimazione di 0,001 g, circa 2 g di premiscela non macinata. Aggiungere 100,0 ml di metanolo acidificato (3.8) e scuotere per disperdere. Collocare la beuta e il suo contenuto in un bagno ultrasonico (4.1) a circa 40 °C per 20 minuti; quindi toglierla e lasciarla raffreddare a temperatura ambiente. Diluire e portare a volume con metanolo acidificato (3.8) e mescolare accuratamente. Lasciare riposare per un'ora finché la sostanza in sospensione si sia depositata; filtrare quindi un'aliquota con filtro a membrana da 0,45 µm (4.2). Diluire un volume adeguato di filtrato chiaro con metanolo acidificato (3.8) ottenendo così una soluzione di prova finale contenente circa 4 µg/ml di lasalocid sodico. Procedere alla determinazione HPLC (5.3).

5.3. **Determinazione HPLC**5.3.1. **Parametri**

Le seguenti condizioni vengono proposte a titolo indicativo; è possibile operare in condizioni diverse, purché si ottengano risultati equivalenti.

Colonna per cromatografia liquida:	125 mm × 4 mm, colonna a fase inversa (4.3.1) C <sub>18</sub> , particelle di riempimento 5 µm, o equivalente
Fase mobile (3.9):	miscela di soluzione tampone fosfato (3.7) e metanolo (3.5), 5 + 95 (V + V)
Velocità di efflusso:	1,2 ml/min
Lunghezze d'onda di rivelazione:	
eccitazione:	310 nm
emissione:	419 nm
Volume da iniezione:	20 µl

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando più volte la soluzione di taratura (3.10.3) contenente 4,0 µg/ml, fino a ottenimento di altezze (aree) del picco e tempi di ritenzione costanti.

5.3.2. **Curva di taratura**

Iniettare più volte ciascuna soluzione di taratura (3.10.3) e determinare le altezze (aree) medie dei picchi per ciascuna concentrazione. Tracciare la curva di taratura, riportando in ordinata le altezze (aree) medie dei picchi e in ascissa le corrispondenti concentrazioni, espresse in µg/ml.

5.3.3. **Soluzione del campione**

Iniettare più volte gli estratti dei campioni di cui ai punti 5.2.1 o 5.2.2, utilizzando lo stesso volume di quello prelevato per le soluzioni di taratura e determinare le altezze (aree) medie dei picchi del lasalocid sodico.

6. **Calcolo dei risultati**

Determinare la concentrazione della soluzione del campione in µg/ml in base all'altezza (area) media dei picchi del lasalocid sodico ottenuta per iniezione (5.3.3), per riferimento alla curva di taratura.

**▼ B**6.1. *Alimenti per animali*

Il contenuto *w* di lasalocid sodico nel campione, espresso in mg/kg, è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

dove

*c* = concentrazione di lasalocid sodico nella soluzione del campione (5.2.1), in µg/ml

*V*<sub>1</sub> = volume dell'estratto del campione, espresso in ml, conformemente al punto 5.2.1 (ossia 100 ml)

*m* = peso della quantità di sostanza da analizzare, in grammi.

6.2. *Premiscele*

Il contenuto *w* di lasalocid sodico nel campione, espresso in mg/kg, è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

dove

*c* = concentrazione di lasalocid sodico nella soluzione del campione (5.2.2), in µg/ml

*V*<sub>2</sub> = volume dell'estratto del campione, espresso in ml, conformemente al punto 5.2.2 (ossia 250 ml)

*f* = fattore di diluizione conformemente al punto 5.2.2

*m* = peso della quantità di sostanza da analizzare, in grammi.

7. **Convalida dei risultati**7.1. *Identità*

I metodi basati sulla spettrofluorimetria sono meno soggetti a interferenza di quelli in cui si fa ricorso alla rivelazione UV. L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia.

7.1.1. *C o - c r o m a t o g r a f i a*

Un estratto del campione (5.2.1 o 5.2.2) viene «rinforzato» mediante aggiunta di un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (3.10.3). Il quantitativo di lasalocid sodico aggiunto deve essere analogo a quello di lasalocid sodico rilevato nell'estratto del campione. Deve aumentare soltanto l'altezza del picco del lasalocid sodico, tenuto conto della quantità di lasalocid aggiunto e della diluizione dell'estratto. L'ampiezza del picco, a metà altezza, deve corrispondere, con uno scartamento massimo del 10 %, all'ampiezza originale prodotta dall'estratto del campione non addizionato.

7.2. *Ripetibilità*

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare:

- il 15 % del valore più elevato, per i contenuti di lasalocid sodico compresi fra 30 e 100 mg/kg,
- 15 mg/kg per contenuti di lasalocid sodico compresi fra 100 e 200 mg/kg,
- il 7,5 % del valore più elevato per i contenuti di lasalocid sodico superiori a 200 mg/kg.

7.3. *Recupero*

Per il campione addizionato (bianco) di alimento, il recupero non è inferiore all'80 %. Per i campioni addizionati di premiscela, il recupero non è inferiore al 90 %.

**▼B****8. Risultati di uno studio collaborativo**

È stato organizzato uno studio collaborativo (\*) nel corso del quale dodici laboratori hanno analizzato due 2 premiscele (campioni 1 e 2) e cinque alimenti per animali (campioni 3-7). Ciascun campione è stato analizzato due volte. I risultati figurano nella tabella seguente:

	Cam- pione 1 Premiscela per polli	Cam- pione 2 Premiscela per tacchini	Cam- pione 3 Granulare per tacchini	Cam- pione 4 Bricio- lame per polli	Cam- pione 5 Mangime per tacchini	Cam- pione 6 Mangime per polli A	Cam- pione 7 Mangime per polli B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
media [mg/ kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s <sub>r</sub> [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV <sub>r</sub> [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s <sub>R</sub> [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV <sub>R</sub> [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Contenuto nominale [mg/kg]	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(\*) contenuto dichiarato dal produttore

(\*\*) alimento preparato in laboratorio

L = numero di laboratori

n = numero di valori singoli

s<sub>r</sub> = deviazione standard della ripetibilità

s<sub>R</sub> = deviazione standard della riproducibilità

CV<sub>r</sub> = coefficiente di variazione della ripetibilità, %

CV<sub>R</sub> = coefficiente di variazione della riproducibilità, %



## ALLEGATO V

METODI DI ANALISI PER IL CONTROLLO DELLA PRESENZA DI  
SOSTANZE INDESIDERABILI NEGLI ALIMENTI PER ANIMALI

## A. DETERMINAZIONE DEL GOSSIPOLLO LIBERO E TOTALE

## 1. Finalità e campo d'applicazione

Il metodo consente di determinare i livelli di gossipolo libero, di gossipolo totale e di sostanze chimicamente affini nei semi, nelle farine e nei pannelli di cotone, nonché negli alimenti composti che contengono tali materie prime. Il limite inferiore di determinabilità del metodo è di 20 mg/kg.

## 2. Principio

Il gossipolo viene estratto, in presenza di 3-amino-1-propanolo, con una miscela di isopropanolo-esano nel caso della determinazione del gossipolo libero e con la dimetilformamide nel caso della determinazione del gossipolo totale. Il gossipolo è trasformato mediante anilina in gossipolo-dianilina, la cui densità ottica è misurata a 440 nm.

## 3. Reattivi

3.1. Miscela di isopropanolo-esano: mescolare 60 parti in volume di isopropanolo con 40 parti in volume di esano normale.

3.2. Solvente A: porre in un pallone tarato da 1 litro, 500 ml circa della miscela isopropanolo-esano (3.1), 2 ml di 3-amino-1-propanolo, 8 ml di acido acetico glaciale e 50 ml d'acqua. Portare a volume con miscela di isopropanolo-esano (3.1). Questo reattivo è stabile per una settimana.

3.3. Solvente B: pipettare in un pallone tarato da 100 ml, 2 ml di 3-amino-1-propanolo e 10 ml di acido acetico glaciale. Raffreddare a temperatura ambiente e portare a volume con N,N-dimetilformamide. Questo reattivo è stabile per una settimana.

3.4. Anilina: se la densità ottica della prova in bianco supera il valore 0,022, l'anilina deve essere distillata su polvere di zinco eliminando la prima e l'ultima frazione pari al 10 % del distillato. Posta in bottiglia chiusa di vetro bruno ed in frigorifero questo reattivo si conserva per parecchi mesi.

3.5. Soluzione tipo A di gossipolo: porre in un pallone tarato da 250 ml, 27,9 mg d'acetato di gossipolo. Sciogliere e portare a volume con il solvente A (3.2). Pipettare 5,0 ml di questa soluzione in un matraccio tarato da 250 ml e portare a volume con il solvente A. La concentrazione di gossipolo in questa soluzione è 0,02 mg/ml. Lasciar riposare per un'ora a temperatura ambiente prima dell'uso.

3.6. Soluzione tipo B di gossipolo: porre in un pallone tarato da 50 ml, 27,9 mg d'acetato di gossipolo, sciogliere e portare a volume con il solvente B (3.3). La concentrazione di gossipolo in questa soluzione è di 0,5 mg/ml.

Le soluzioni tipo A e B di gossipolo restano stabili per 24 ore se sono conservate al buio.

## 4. Apparecchiatura

4.1. Agitatore rotativo a capovolgimento: circa 35 giri al minuto.

**▼B**

4.2. Spettrofotometro.

5. **Procedimento**

5.1. *Quantità di sostanza da sottoporre all'analisi*

La quantità di sostanza da sottoporre all'analisi è proporzionale al presunto contenuto di gossipolo nel campione. È preferibile operare su una piccola quantità di sostanza e su una parte aliquota del filtrato relativamente importante, in modo da ottenere una quantità di gossipolo sufficiente per effettuare una misura spettrofotometrica precisa. *Per la determinazione del gossipolo libero* nei semi, nelle farine e nei pannelli di cotone, la quantità di sostanza da sottoporre all'analisi non supera 1 g; per gli alimenti composti potrà arrivare sino a 5 g. Una parte aliquota di 10 ml di filtrato è sufficiente nella maggioranza dei casi; essa conterrà da 50 a 100 µg di gossipolo. *Per la determinazione del gossipolo totale*, la quantità di sostanza da sottoporre ad analisi varierà da 0,5 a 5 g in modo che una parte aliquota di 2 ml di filtrato contenga da 40 a 200 µg di gossipolo.

*Effettuare l'analisi a una temperatura ambiente di circa 20 °C.*

5.2. *Determinazione del gossipolo libero*

Porre la quantità di sostanza da sottoporre all'analisi in un pallone da 250 ml a collo smerigliato il cui fondo è ricoperto di polvere di vetro. Aggiungere, con una pipetta, 50 ml del solvente A (3.2), tappare il pallone e porlo per un'ora nel mescolatore rotativo a capovolgimento. Filtrare su un filtro asciutto e raccogliere il filtrato in un palloncino a collo smerigliato. Nel corso della filtrazione ricoprire l'imbuto con un vetro da orologio.

Introdurre con una pipetta in due palloni tarati da 25 ml (A e B), parti aliquote identiche di filtrato contenenti da 50 a 100 µg di gossipolo. Completare eventualmente a 10 ml con il solvente A (3.2). Portare quindi a volume il contenuto del pallone (A) con la miscela di isopropanolo-esano (3.1). Questa soluzione sarà utilizzata come soluzione di riferimento per la misura della soluzione del campione.

Pipettare 10 ml del solvente A (3.2) in altri due palloni tarati da 25 ml (C e D). Portare quindi a volume il contenuto del pallone (C) con la miscela di isopropanolo-esano (3.1). Questa soluzione sarà utilizzata come soluzione di riferimento per la misura della soluzione della prova in bianco.

Aggiungere 2 ml d'anilina (3.4) nei palloni (D) e (B). Riscaldare per 30 minuti su bagno d'acqua bollente per far sviluppare la colorazione. Raffreddare a temperatura ambiente, portare a volume con la miscela di isopropanolo-esano (3.1), mescolare e lasciar riposare per un'ora.

Determinare allo spettrofotometro a 440 nm, in vaschette di vetro da 1 cm, la densità ottica della soluzione della prova in bianco (D) confrontandola con la soluzione di riferimento (C) e la densità ottica della soluzione del campione (B) confrontandola con la soluzione di riferimento (A).

Sottrarre la densità ottica della soluzione della prova in bianco da quella della soluzione del campione (= densità ottica corretta). Calcolare a partire da questo valore il contenuto in gossipolo libero come indicato al punto 6.

5.3. *Determinazione del gossipolo totale*

Introdurre la quantità di sostanza da sottoporre all'analisi, contenente da 1 a 5 mg di gossipolo, in un pallone tarato da 50 ml e aggiungere 10 ml di solvente B (3.3). Preparare simultaneamente una prova in bianco, introducendo 10 ml di solvente B (3.3) in un altro pallone tarato da

**▼ B**

50 ml. Riscaldare i due palloni per 30 minuti su un bagno d'acqua bollente. Raffreddare a temperatura ambiente e portare a volume il contenuto di ciascun pallone con la miscela di isopropanolo-esano (3.1). Mescolare e lasciar depositare per 10-15 minuti, quindi filtrare e raccogliere i filtrati in palloni a tappo smerigliato.

Pipettare 2 ml del filtrato del campione in due palloni tarati da 25 ml e 2 ml del filtrato della prova in bianco in due altri palloni da 25 ml. Prendere un pallone di ciascuna serie e completare i rispettivi contenuti a 25 ml con la miscela di isopropanolo-esano (3.1). Queste soluzioni saranno utilizzate come soluzione di riferimento.

Aggiungere 2 ml d'anilina (3.4) negli altri due palloni. Riscaldare per 30 minuti su bagno d'acqua bollente per far sviluppare la colorazione. Raffreddare a temperatura ambiente, portare a 25 ml con miscela di isopropanolo-esano (3.1), mescolare e lasciar riposare per un'ora.

Determinare la densità ottica come indicato al punto 5.2 per il gossipolo libero. Calcolare a partire da questo valore il contenuto in gossipolo totale come indicato al punto 6.

## 6. Calcolo dei risultati

Il calcolo dei risultati può essere fatto sia in base alla densità ottica specifica (6.1), sia per riferimento a una curva di taratura (6.2).

### 6.1. *In base alla densità ottica specifica*

Nelle condizioni descritte le densità ottiche specifiche sono le seguenti:

$$\text{Gossipolo libero} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 625$$

$$\text{Gossipolo totale} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 600$$

Il contenuto di gossipolo libero o totale nel campione è dato dalla formula seguente:

$$\% \text{ gossipolo} : \frac{E \times 1\,250}{E_1 \frac{1\%}{\text{cm}} \times p \times a}$$

dove

E = densità ottica corretta, determinata come indicato al punto 5.2  
 p = quantità in g di sostanza analizzata;  
 a = parte aliquota del filtrato espressa in ml.

### 6.2. *In base a una curva di taratura*

#### 6.2.1. Gossipolo libero

Predisporre 2 serie di 5 palloni tarati da 25 ml. In ogni serie pipettare rispettivamente 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 ml della soluzione tipo A di gossipolo (3.5). Completare i volumi a 10 ml con il solvente A (3.2). Completare ogni serie con un pallone tarato da 25 ml contenente soltanto 10 ml del solvente A (3.2) (prova in bianco).

Portare a 25 ml il volume dei palloni della prima serie (compreso quello per la prova in bianco) con la miscela isopropanolo-esano (3.1) (serie di riferimento).

**▼B**

Aggiungere 2 ml d'anilina (3.4) in ciascuno dei palloni della seconda serie (compreso quello per la prova in bianco). Riscaldare per 30 minuti su bagno d'acqua bollente per far sviluppare la colorazione. Raffreddare a temperatura ambiente, portare a volume con la miscela isopropanolo-esano (3.1), mescolare e lasciar riposare per un'ora (serie tipo).

Determinare la densità ottica di ogni soluzione della serie tipo confrontandola con la soluzione corrispondente della serie di riferimento, alle condizioni indicate al punto 5.2. Tracciare la curva di taratura portando in ordinata i valori di densità ottica e in ascissa le quantità corrispondenti di gossipolo (in µg).

**6.2.2. Gossipolo totale**

Predisporre 6 palloni tarati da 50 ml. Porre nel primo 10 ml del solvente B (3.3) e negli altri rispettivamente 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 ml della soluzione tipo B di gossipolo (3.6). Completare il contenuto di ogni pallone a 10 ml con il solvente B (3.3). Riscaldare per 30 minuti su bagno d'acqua bollente. Raffreddare a temperatura ambiente, portare a volume con la miscela isopropanolo-esano (3.1) e mescolare.

Introdurre 2,0 ml di queste soluzioni in due serie di 6 palloni tarati da 25 ml. Completare a 25 ml il contenuto dei palloni della prima serie con la miscela isopropanolo-esano (3.1) (serie di riferimento).

Aggiungere 2 ml d'anilina (3.4) in ciascuno dei palloni della seconda serie. Riscaldare per 30 minuti su bagno d'acqua bollente. Raffreddare a temperatura ambiente, portare a volume con la miscela isopropanolo-esano (3.1), mescolare e lasciar riposare per un'ora (serie tipo).

Determinare la densità ottica di ogni soluzione della serie tipo confrontandola con la soluzione corrispondente della serie di riferimento, alle condizioni indicate al punto 5.2. Tracciare la curva di taratura portando in ordinata i valori di densità ottica e in ascissa le quantità corrispondenti di gossipolo (in µg).

**6.3. Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare:

— il 15 % in valore relativo rispetto al valore più elevato per i contenuti di gossipolo inferiori a 500 ppm,

— 75 ppm in valore assoluto per i contenuti compresi tra 500 e 750 ppm,

— il 10 % in valore relativo rispetto al valore più elevato per i contenuti superiori a 750 ppm.

▼ **M6****B. DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI DIOSSINE (PCDD/PCDF)  
E PCB***CAPO I**Metodi di campionamento e interpretazione dei risultati analitici***1. Campo d'applicazione e definizioni**

I campioni destinati al controllo ufficiale dei livelli di policlorodibenzo-p-diossine (PCDD), policlorodibenzofurani (PCDF), policlorobifenili (PCB) diossina-simili<sup>(1)</sup> e PCB non diossina-simili negli alimenti per animali sono prelevati secondo le disposizioni dell'allegato I. Si applicano le prescrizioni quantitative relative al controllo delle sostanze o dei prodotti ripartiti in modo uniforme negli alimenti per animali di cui all'allegato I, punto 5.1. I campioni globali così ottenuti sono considerati rappresentativi delle partite o sottopartite da cui sono prelevati. Il rispetto dei livelli massimi fissati dalla direttiva 2002/32/CE è accertato in base ai livelli determinati nei campioni di laboratorio.

Ai fini della presente parte B si applicano le definizioni di cui all'allegato I della decisione 2002/657/CE della Commissione<sup>(2)</sup>.

<sup>(1)</sup> Tabella dei fattori di equivalenza tossica (TEF) per i PCDD, i PCDF e i PCB diossina-simili: TEF dell'OMS per la valutazione dei rischi per l'uomo basati sulle conclusioni della riunione di esperti del Programma internazionale sulla sicurezza delle sostanze chimiche dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) svoltasi a Ginevra nel giugno 2005 [Martin Van den Berg et al. «The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds». *Toxicological Sciences* 93(2), 223–241 (2006)].

Congenero	Valore TEF	Congenero	Valore TEF
Dibenzo-p-diossine (PCDD) e dibenzo-p-furani (PCDF)		PCB «diossina-simili» PCB non-orto + PCB mono-orto	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB non-orto	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	PCB mono-orto	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Abbreviazioni: «T» = tetra; «Pe» = penta; «Hx» = esa; «Hp» = epta; «O» = octa; «CDD» = clorodibenzodiossina; «CDF» = clorodibenzofurano; «CB» = clorobifenile.

<sup>(2)</sup> Decisione 2002/657/CE della Commissione, del 14 agosto 2002, che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (GU L 221 del 17.8.2002, pag. 8).

▼ **M6**

In aggiunta a tali definizioni, ai fini della presente parte B si applicano inoltre le seguenti definizioni:

«Metodi di screening»: i metodi impiegati per la selezione di campioni con livelli di PCDD/PCDF e di PCB diossina-simili superiori ai livelli massimi o alle soglie di intervento. Essi consentono un alto throughput di campioni a costi commisurati all'efficacia, in modo da aumentare la possibilità di scoprire nuovi incidenti caratterizzati da alta esposizione e rischi per la salute dei consumatori. I metodi di screening si basano su metodi bioanalitici o GC-MS. I risultati derivanti da campioni che superano il valore di cut-off utilizzato per controllare la conformità con il livello massimo sono verificati mediante una nuova analisi completa del campione originale avvalendosi di un metodo di conferma.

«Metodi di conferma»: metodi che forniscono informazioni complete o complementari che permettono di identificare e di quantificare in modo inequivoco i PCDD/PCDF e i PCB diossina-simili al livello massimo o, se del caso, alla soglia di intervento. Tali metodi utilizzano la gascromatografia/spettrometria di massa ad alta risoluzione (GC-HRMS) o la gascromatografia/spettrometria di massa tandem (GC-MS/MS).

## 2. Conformità della partita o sottopartita al livello massimo

### 2.1. PCB non diossina-simili

La partita o sottopartita è conforme al livello massimo se il risultato analitico della somma di PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 e PCB 180 (nel seguito «PCB non diossina-simili») non supera il livello massimo fissato dalla direttiva 2002/32/CE, tenendo conto dell'incertezza di misura estesa<sup>(1)</sup>. La partita o sottopartita non è conforme al livello massimo fissato dalla direttiva 2002/32/CE se la media di due risultati analitici upperbound<sup>(2)</sup> ottenuti attraverso una doppia analisi<sup>(3)</sup>, tenendo conto dell'incertezza di misura estesa, supera il livello massimo oltre ogni ragionevole dubbio; ciò vale a dire che al fine di valutare la conformità si utilizza la concentrazione risultante dall'analisi dopo aver dedotto l'incertezza di misura estesa.

L'incertezza di misura estesa è calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 corrispondente a un livello di fiducia del 95 % circa. Una partita o sottopartita non è conforme se la media dei valori misurati meno l'incertezza estesa della media supera il livello massimo.

<sup>(1)</sup> Ove applicabili sono seguiti i principi descritti nel documento «Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry» ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)).

<sup>(2)</sup> «Upperbound»: valore calcolato considerando pari al limite di quantificazione il contributo di ogni congenere non quantificato. «Lowerbound»: valore calcolato considerando pari a zero il contributo di ogni congenere non quantificato. «Mediumbound»: valore calcolato considerando pari alla metà del limite di quantificazione il contributo di ogni congenere non quantificato.

<sup>(3)</sup> Doppia analisi: analisi separata degli analiti di interesse utilizzando una seconda aliquota del medesimo campione omogeneizzato. Di norma si applicano le prescrizioni relative alla doppia analisi di cui all'allegato II, capitolo C, punto 3. Si rende tuttavia necessaria la doppia analisi solo qualora il risultato della prima determinazione, eseguita applicando metodi che utilizzano lo standard interno marcato con <sup>13</sup>C per gli analiti di interesse, non sia conforme. La doppia analisi è necessaria per escludere la possibilità di una contaminazione incrociata interna o di una mescolanza accidentale dei campioni. Se l'analisi è effettuata nel corso di un incidente di contaminazione, la conferma mediante doppia analisi può essere omessa nel caso in cui la tracciabilità permetta di stabilire il legame tra i campioni selezionati per l'analisi e tale incidente, e quando il livello rilevato è notevolmente superiore al livello massimo.

▼ **M6**

Le norme di cui ai paragrafi precedenti del presente punto si applicano al risultato analitico ottenuto sul campione utilizzato per il controllo ufficiale. Per le analisi effettuate nel quadro di procedure di ricorso o di arbitrato si applicano le norme nazionali.

2.2. *PCDD/PCDF e PCB diossina-simili*

La partita o sottopartita è conforme al livello massimo se il risultato di una singola analisi,

- eseguita con un metodo di screening il cui tasso di falsi conformi è inferiore al 5 %, indica che il livello non supera i livelli massimi fissati dalla direttiva 2002/32/CE rispettivamente per PCDD/PCDF e per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili,
- eseguita con un metodo di conferma, non supera i livelli massimi fissati dalla direttiva 2002/32/CE rispettivamente per PCDD/PCDF e per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili tenendo conto dell'incertezza di misura estesa.

Per i dosaggi di screening è stabilito un valore di cut-off per le decisioni sulla conformità del campione ai livelli massimi stabiliti rispettivamente per PCDD/PCDF o per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.

La partita o sottopartita non è conforme al livello massimo fissato dalla direttiva 2002/32/CE se la media di due risultati analitici upperbound <sup>(1)</sup> ottenuti attraverso una doppia analisi <sup>(2)</sup> eseguita con un metodo di conferma, tenendo conto dell'incertezza di misura estesa, supera il livello massimo oltre ogni ragionevole dubbio; ciò vale a dire che al fine di valutare la conformità si utilizza la concentrazione risultante dall'analisi dopo aver dedotto l'incertezza di misura estesa.

L'incertezza di misura estesa è calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 corrispondente a un livello di fiducia del 95 % circa. Una partita o sottopartita non è conforme se la media dei valori misurati meno l'incertezza estesa della media supera il livello massimo.

Per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili è utilizzata la somma delle incertezze estese stimate dei risultati analitici separati di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.

Le norme di cui ai paragrafi precedenti del presente punto si applicano al risultato analitico ottenuto sul campione utilizzato per il controllo ufficiale. Per le analisi effettuate nel quadro di procedure di ricorso o di arbitrato si applicano le norme nazionali.

<sup>(1)</sup> «Upperbound»: valore calcolato considerando pari al limite di quantificazione il contributo di ogni congenere non quantificato all'equivalente tossico (TEQ). «Lowerbound»: valore calcolato considerando pari a zero il contributo di ogni congenere non quantificato al TEQ. «Mediumbound»: valore calcolato considerando pari alla metà del limite di quantificazione il contributo di ogni congenere non quantificato al TEQ.

<sup>(2)</sup> Di norma si applicano le prescrizioni relative alla doppia analisi di cui all'allegato II, capitolo C, punto 2. Si rende tuttavia necessaria la doppia analisi solo qualora il risultato della prima determinazione, eseguita applicando metodi di conferma che utilizzano lo standard interno marcato con <sup>13</sup>C per gli analiti di interesse, non sia conforme. La doppia analisi è necessaria per escludere la possibilità di una contaminazione incrociata interna o di una mescolanza accidentale dei campioni. Se l'analisi è effettuata nel corso di un incidente di contaminazione, la conferma mediante doppia analisi può essere omessa nel caso in cui la tracciabilità permetta di stabilire il legame tra i campioni selezionati per l'analisi e tale incidente, e quando il livello rilevato è notevolmente superiore al livello massimo.

▼ **M6****3. Risultati eccedenti le soglie di intervento di cui all'allegato II della direttiva 2002/32/CE**

Le soglie di intervento fungono da strumento per la selezione dei campioni nei casi in cui è necessario identificare una fonte di contaminazione e prendere provvedimenti per la sua riduzione o eliminazione. I metodi di screening stabiliscono appropriati valori di cut-off per la selezione di tali campioni. Qualora siano necessarie azioni significative per identificare una fonte e ridurre o eliminare la contaminazione è opportuno confermare il superamento delle soglie di intervento mediante una doppia analisi eseguita con un metodo di conferma e tenendo conto dell'incertezza di misura estesa<sup>(1)</sup>.

*CAPO II****Preparazione dei campioni e prescrizioni per i metodi di analisi impiegati nel controllo ufficiale dei livelli di diossine (PCDD/PCDF) e di PCB diossina-simili negli alimenti per animali*****1. Campo d'applicazione**

Le prescrizioni di cui al presente capo si applicano alle analisi degli alimenti per animali effettuate ai fini del controllo ufficiale dei livelli di PCDD/PCDF 2,3,7,8-sostituiti e di PCB diossina-simili e per quanto riguarda la preparazione dei campioni e le prescrizioni analitiche per altre finalità di legge, che comprendono i controlli effettuati dagli operatori del settore dei mangimi per garantire la conformità con le disposizioni del regolamento (CE) n. 183/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio<sup>(2)</sup>.

Il monitoraggio della presenza di PCDD/PCDF e di PCB diossina-simili negli alimenti per animali può essere effettuato con due differenti tipologie di metodi analitici:

*a) Metodi di screening*

L'obiettivo dei metodi di screening è selezionare i campioni con livelli di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili superiori ai livelli massimi o alle soglie di intervento. I metodi di screening consentono un alto throughput di campioni a costi commisurati all'efficacia, in modo da accrescere la possibilità di scoprire nuovi incidenti con alta esposizione e rischi per la salute dei consumatori. La loro applicazione ha lo scopo di evitare i risultati falsi conformi. I metodi di screening possono comprendere metodi bioanalitici e metodi GC-MS.

I metodi di screening confrontano il risultato analitico con un valore di cut-off e danno una decisione sì/no indicativa del possibile superamento del livello massimo o della soglia di intervento. La concentrazione di PCDD/PCDF e la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili nei campioni che si sospetta non siano conformi al livello massimo è determinata o confermata mediante un metodo di conferma.

I metodi di screening possono inoltre fornire un'indicazione dei livelli di PCDD/PCDF e di PCB diossina-simili presenti nel campione. In caso di applicazione di metodi di screening bioanalitici il risultato è espresso in equivalenti bioanalitici (BEQ), mentre in caso di applicazione di metodi fisico-chimici GC-MS tale risultato è espresso in equivalenti tossici (TEQ). I risultati numerici dei metodi di screening

<sup>(1)</sup> Le precisazioni e le prescrizioni relative alla doppia analisi per il controllo delle soglie di intervento sono identiche a quelle indicate sopra alla nota 2 per i livelli massimi.

<sup>(2)</sup> Regolamento (CE) n. 183/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 12 gennaio 2005, che stabilisce requisiti per l'igiene dei mangimi (GU L 35 dell'8.2.2005, pag. 1).

**▼ M6**

sono atti a dimostrare la conformità o la sospetta non conformità delle soglie di intervento nonché il loro superamento; forniscono inoltre un'indicazione del range dei livelli in caso di follow-up con metodi di conferma. Non sono idonei per attività quali la valutazione dei livelli di background, la stima dell'assunzione, il monitoraggio delle tendenze nel tempo dei livelli o la ri-valutazione delle soglie di intervento e dei livelli massimi.

**b) Metodi di conferma**

I metodi di conferma consentono di identificare e di quantificare in modo inequivoco i PCDD/PCDF e i PCB diossina-simili presenti in un campione e forniscono informazioni complete a livello di congeneri. Questi metodi permettono pertanto di controllare i livelli massimi e le soglie di intervento, compresa la conferma dei risultati ottenuti con i metodi di screening. I risultati possono inoltre essere utilizzati per altri scopi quali la determinazione dei livelli di background bassi nel controllo degli alimenti per animali, il monitoraggio delle tendenze nel tempo, la valutazione dell'esposizione e la creazione di una base di dati per l'eventuale ri-valutazione delle soglie di intervento e dei livelli massimi. Essi sono importanti anche per stabilire pattern di congeneri al fine di identificare la fonte di un'eventuale contaminazione. Tali metodi impiegano la GC-HRMS. Al fine di confermare la conformità o la non conformità con il livello massimo può essere impiegata anche la GC-MS/MS.

**2. Premessa**

Per il calcolo delle concentrazioni di TEQ, le concentrazioni delle singole sostanze in un dato campione sono moltiplicate per il rispettivo fattore di equivalenza tossica (TEF) (cfr. nota 1 al capo I) e quindi sommate per ottenere la concentrazione totale di composti diossina-simili espressa in TEQ.

Ai fini della presente parte B, il limite di quantificazione specifico accettato di un singolo congenero è il tenore più basso dell'analita che può essere misurato con ragionevole certezza statistica nel rispetto dei criteri di identificazione definiti in norme riconosciute a livello internazionale come, ad esempio, la norma EN 16215:2012 (Alimenti per animali — Determinazione di diossine e PCB diossina-simili mediante GC-HRMS e di PCB indicatori mediante GC-HRMS) e/o nei metodi EPA 1613 e 1688 riveduti.

Il limite di quantificazione di un singolo congenero può essere identificato come:

- a) la concentrazione di un analita nell'estratto di un campione che produce una risposta strumentale a due diversi ioni da monitorare con un rapporto S/R (segnale/rumore) di 3:1 per il segnale meno intenso dei dati grezzi; o
- b) il punto di concentrazione più basso su una curva di calibrazione che produce una deviazione accettabile ( $\leq 30\%$ ) e coerente (misurata almeno all'inizio e alla fine della serie analitica di campioni) rispetto al fattore di risposta relativo medio calcolato per tutti i punti sulla curva di calibrazione per ciascuna serie di campioni se per motivi tecnici il calcolo del rapporto segnale/rumore non fornisce risultati affidabili. Il limite di quantificazione (LOQ) è calcolato a partire dal punto di concentrazione più basso, tenendo conto del recupero degli standard interni e delle grandezze dei campioni.

**▼ M6**

I metodi di screening bioanalitici non danno risultati al livello del congenero, ma solo un'indicazione <sup>(1)</sup> del livello di TEQ espresso in BEQ, in considerazione del fatto che non tutti i composti presenti in un estratto di campione che producono una risposta nel test possono soddisfare tutte le prescrizioni del principio di TEQ.

I metodi di screening e di conferma possono essere applicati per il controllo di una determinata matrice solo se sono sufficientemente sensibili per rilevare i livelli in modo attendibile alla soglia d'intervento o al livello massimo.

**3. Prescrizioni di garanzia della qualità**

- 3.1. Sono adottate misure per evitare contaminazioni incrociate durante ogni fase del campionamento e dell'analisi.
- 3.2. I campioni sono conservati e trasportati in contenitori di vetro, alluminio, polipropilene o polietilene, che ne permettano la conservazione senza influenzare i livelli di PCDD/PCDF e di PCB diossina-simili. Le tracce di polvere di carta sono rimosse dal contenitore.
- 3.3. La conservazione e il trasporto avvengono in modo da preservare l'integrità del campione di alimenti per animali.
- 3.4. Se del caso, macinare finemente e mescolare accuratamente ogni campione di laboratorio utilizzando un metodo che garantisca una completa omogeneizzazione (ad esempio, macinazione che consenta il passaggio attraverso un setaccio a maglie di 1 mm); prima della macinazione, qualora il tenore di umidità sia troppo elevato, i campioni sono asciugati.
- 3.5. I reagenti, la vetreria e le apparecchiature sono sottoposti a controlli per evitare che influenzino i risultati espressi in TEQ o BEQ.
- 3.6. È effettuata un'analisi in bianco, eseguendo l'intera procedura di analisi senza il campione.
- 3.7. Per i metodi bioanalitici occorre verificare che la vetreria e i solventi utilizzati nell'analisi siano esenti da composti che interferiscono con la rilevazione dei composti bersaglio nel working range. La vetreria è risciacquata con solventi o riscaldata a temperature che consentano di eliminare dalla superficie le tracce di PCDD/PCDF, composti diossina-simili e composti interferenti.
- 3.8. La quantità del campione utilizzato per l'estrazione è sufficiente a permettere la conformità alle prescrizioni in relazione ad un working range sufficientemente basso comprendente le concentrazioni di livelli massimi o della soglia di intervento.
- 3.9. Le procedure specifiche di preparazione dei campioni utilizzate per i prodotti considerati sono conformi a linee guida accettate a livello internazionale.

<sup>(1)</sup> I metodi bioanalitici non sono specifici ai congeneri inclusi nel sistema TEF. Nell'estratto del campione possono essere presenti altri composti strutturalmente affini AhR-attivi che contribuiscono alla risposta globale. I risultati bioanalitici non sono pertanto una stima ma piuttosto un'indicazione del livello di TEQ nel campione.

▼ **M6****4. Prescrizioni per i laboratori**

- 4.1. Come prescritto dal regolamento (CE) n. 882/2004, i laboratori sono accreditati da un organismo riconosciuto operante in conformità alla Guida ISO 58, per garantire che alle loro analisi sia applicata l'assicurazione qualità. I laboratori sono accreditati in base alla norma EN ISO/IEC 17025. Ove applicabili, sono seguiti i principi descritti negli orientamenti tecnici per la stima dell'incertezza di misura e dei limiti di quantificazione per l'analisi dei PCDD/PCDF e dei PCB <sup>(1)</sup>.
- 4.2. La competenza del laboratorio è dimostrata dalla partecipazione regolare ed efficace a studi condotti in collaborazione con altri laboratori per la determinazione di PCDD/PCDF e di PCB diossina-simili nelle matrici di alimenti per animali e nei range di concentrazioni corrispondenti.
- 4.3. I laboratori che applicano metodi di screening per il controllo di routine dei campioni instaurano una stretta cooperazione con i laboratori che applicano il metodo di conferma per il controllo della qualità e per la conferma del risultato analitico di campioni sospetti.

**5. Prescrizioni di base per la procedura di analisi per le diossine (PCDD/PCDF) e i PCB diossina-simili****5.1. Working range e limiti di quantificazione bassi**

Per i PCDD/PCDF le quantità rilevabili si situano nel range superiore del femtogrammo ( $10^{-15}$  g), data l'estrema tossicità di alcuni di questi composti. Per la maggior parte dei congeneri dei PCB è già sufficiente un limite di quantificazione dell'ordine del nanogrammo ( $10^{-9}$  g). Per la misura dei congeneri più tossici dei PCB diossina-simili (in particolare i congeneri non orto-sostituiti) il limite inferiore del working range raggiunge i livelli bassi del picogrammo ( $10^{-12}$  g). Per tutti gli altri congeneri dei PCB è sufficiente un limite di quantificazione dell'ordine del nanogrammo ( $10^{-9}$  g).

**5.2. Alta selettività (specificità)**

- 5.2.1. Occorre distinguere tra PCDD/PCDF e PCB diossina-simili e una moltitudine di altri composti coestratti che possono generare un'interferenza, presenti anche in concentrazioni superiori di vari ordini di grandezza rispetto a quelle degli analiti di interesse. Per i metodi GC-MS è necessaria una differenziazione tra i vari congeneri, in particolare tra quelli tossici (ad esempio, i diciassette PCDD/PCDF 2,3,7,8-sostituiti e i dodici PCB diossina-simili) e gli altri congeneri.

- 5.2.2. I metodi bioanalitici permettono di rilevare i composti bersaglio come somma di PCDD/PCDF e/o PCB diossina-simili. Il clean-up del campione ha lo scopo di eliminare i composti che causano risultati falsi non conformi o che possono diminuire la risposta, causando risultati falsi conformi.

**5.3. Alta accuratezza (esattezza e precisione, recupero apparente del biosaggio)**

- 5.3.1. Per i metodi GC-MS la determinazione fornisce una stima valida dell'esatta concentrazione in un campione. È necessaria un'alta accuratezza per evitare che il risultato dell'analisi di un campione sia respinto a causa della scarsa affidabilità del livello di TEQ determinato. L'accuratezza è

<sup>(1)</sup> «Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry» ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)) e «Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food» ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)).

**▼ M6**

espressa come *esattezza* (differenza tra il valore medio misurato per un analita in un materiale certificato e il suo valore certificato, espressa in percentuale di tale valore) e *precisione* (deviazione standard relativa  $RSD_R$  calcolata in base a risultati ottenuti in condizioni di riproducibilità).

5.3.2. Per i metodi bioanalitici è determinato il recupero apparente del biosaggio. Il recupero apparente del biosaggio è il livello di BEQ calcolato a partire dalla curva di calibrazione della TCDD o del PCB 126 corretto del bianco e poi diviso per il livello di TEQ determinato dal metodo di conferma. Mira a correggere fattori quali la perdita di PCDD/PCDF e composti diossina-simili durante le fasi di estrazione e clean-up, composti coestratti che aumentano o diminuiscono la risposta (effetti agonistici e antagonistici), la qualità del fit della curva o le differenze tra i valori TEF e REP (potenzialità relativa). Il recupero apparente del biosaggio è calcolato a partire da idonei campioni di riferimento con pattern di congeneri rappresentativi attorno al livello di interesse.

5.4. *Validazione nel range del livello massimo e misure generali di controllo della qualità*

5.4.1. I laboratori dimostrano la performance di un metodo nel range del livello massimo, ad esempio 0,5x, 1x e 2x il livello massimo con un coefficiente di variazione accettabile per le analisi ripetute, durante la procedura di validazione e durante le analisi di routine.

5.4.2. Controlli regolari in bianco ed esperimenti spiking o analisi di campioni di controllo (di preferenza, se disponibile, materiale di riferimento certificato) sono effettuati come misure interne di controllo della qualità. Per i controlli in bianco, gli esperimenti spiking o le analisi dei campioni di controllo, sono registrati e verificati diagrammi di controllo qualità per assicurare che la performance analitica sia conforme alle prescrizioni.

5.5. *Limite di quantificazione*

5.5.1. Per un metodo di screening bioanalitico non è indispensabile fissare il limite di quantificazione, ma il metodo deve dimostrare di poter differenziare tra il valore bianco e il valore di cut-off. Quando è fornito un livello BEQ, è fissato un livello di reporting per trattare i campioni che presentano una risposta al di sotto di tale livello. Il livello di reporting è dimostrato diverso dai campioni bianchi di procedura almeno di un fattore tre, con una risposta al di sotto del working range. È quindi calcolato a partire da campioni contenenti i composti bersaglio attorno al livello minimo richiesto, e non da un rapporto S/R o un dosaggio bianco.

5.5.2. Il limite di quantificazione per un metodo di conferma è dell'ordine di circa un quinto del livello massimo.

5.6. *Criteri analitici*

Affinché i metodi di conferma o di screening diano risultati affidabili, devono essere soddisfatti i seguenti criteri nel range del livello massimo rispettivamente per il valore TEQ o BEQ, determinati come TEQ o BEQ totali (somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili) o separatamente per PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.

▼ **M6**

	Screening con metodi bioanalitici o fisico-chimici	Metodi di conferma
Tasso di falsi conformi <sup>(1)</sup>	< 5 %	
Esattezza		da - 20 % a + 20 %
Ripetibilità (RSD <sub>r</sub> )	< 20 %	
Precisione intermedia (RSD <sub>R</sub> )	< 25 %	< 15 %

<sup>(1)</sup> rispetto ai livelli massimi.

5.7. *Prescrizioni specifiche per i metodi di screening*

5.7.1. Per lo screening possono essere utilizzati metodi GC-MS e metodi bioanalitici. Per i metodi GC-MS valgono le prescrizioni indicate al punto 6. Per i metodi bioanalitici cellulari valgono le prescrizioni specifiche indicate al punto 7.

5.7.2. I laboratori che applicano metodi di screening per il controllo di routine dei campioni instaurano una stretta cooperazione con i laboratori che applicano il metodo di conferma.

5.7.3. Durante l'analisi di routine la performance del metodo di screening deve essere verificata mediante un controllo della qualità analitica e una validazione del metodo on-going. È necessario un programma continuo per il controllo dei risultati conformi.

5.7.4. Controllo dell'eventuale soppressione della risposta cellulare e della citotossicità:

il 20 % degli estratti del campione è misurato in screening di routine senza e con aggiunta di 2,3,7,8-TCDD corrispondente al livello massimo o alla soglia di intervento, per verificare se la risposta è soppressa da sostanze interferenti presenti nell'estratto del campione. La concentrazione misurata del campione spiked è comparata con la somma della concentrazione dell'estratto unspiked e della concentrazione dello spiking. Se la concentrazione misurata è inferiore di più del 25 % alla concentrazione (somma) calcolata, questo indica una potenziale soppressione del segnale e il rispettivo campione deve essere sottoposto ad analisi di conferma GC-HRMS. I risultati sono monitorati in diagrammi di controllo qualità.

5.7.5. Controllo di qualità sui campioni conformi:

sono confermati mediante GC/HRMS dal 2 al 10 % circa dei campioni conformi, secondo la matrice del campione e l'esperienza di laboratorio.

5.7.6. Determinazione dei tassi di falsi conformi a partire dai dati di controllo di qualità:

è determinato il tasso dei risultati falsi conformi dello screening di campioni al di sotto e al di sopra del livello massimo o della soglia di intervento. I tassi reali di falsi conformi sono inferiori al 5 %. Se si dispone di un minimo di 20 risultati confermati per matrice/gruppo di matrici dal controllo di qualità dei campioni conformi, da questa base di dati sono tratte conclusioni sul tasso di falsi conformi. Anche i risultati

▼ **M6**

dei campioni analizzati in ring trial o durante incidenti di contaminazione, che coprono un range di concentrazione fino a per esempio 2x il livello massimo (LM), possono essere inclusi nel minimo dei 20 risultati richiesti per la valutazione del tasso di falsi conformi. I campioni coprono i pattern di congeneri più frequenti, rappresentanti varie fonti.

Anche se i dosaggi di screening sono diretti principalmente a individuare campioni che superano la soglia di intervento, il criterio per la determinazione dei tassi di falsi conformi è il livello massimo, tenendo conto dell'incertezza di misura estesa del metodo di conferma.

- 5.7.7. I campioni dello screening potenzialmente non conformi sono sempre verificati con una nuova analisi completa del campione originale mediante un metodo analitico di conferma. Questi campioni possono anche essere utilizzati per valutare il tasso di risultati falsi non conformi. Per i metodi di screening, il tasso di risultati falsi non conformi è la frazione dei risultati confermati conformi dall'analisi di conferma, quando nello screening precedente il campione è stato dichiarato potenzialmente non conforme. La valutazione dei vantaggi del metodo di screening si basa sul confronto dei campioni falsi non conformi con il numero totale di campioni controllati. Tale tasso deve essere sufficientemente basso da rendere vantaggioso l'uso di uno strumento di screening.
- 5.7.8. In condizioni di validazione i metodi bioanalitici forniscono una valida indicazione del livello di TEQ, calcolato ed espresso in BEQ.

Anche per i metodi bioanalitici applicati in condizioni di ripetibilità, la RSD, intralaboratorio è di norma inferiore rispetto al risultato ottenuto in condizioni di riproducibilità (RSD<sub>R</sub>).

**6. Prescrizioni specifiche per i metodi GC-MS da rispettare a fini di screening o di conferma**

**6.1. Differenze accettabili tra i risultati OMS-TEQ upperbound e lowerbound**

La differenza tra il livello upperbound e il livello lowerbound non è superiore al 20 % per la conferma del superamento dei livelli massimi o, ove opportuno, delle soglie di intervento.

**6.2. Controllo dei recuperi**

- 6.2.1. All'inizio del metodo di analisi, ad esempio prima dell'estrazione, sono aggiunti standard interni di PCDD/PCDF 2,3,7,8-clorosostituiti e marcati con <sup>13</sup>C e standard interni di PCB diossina-simili marcati con <sup>13</sup>C per validare la procedura di analisi. È aggiunto almeno un congenere per ciascuno dei gruppi omologhi da tetra a octaclorati di PCDD/PCDF e almeno un congenere per ciascuno dei gruppi omologhi di PCB diossina-simili (in alternativa, almeno un congenere per ciascuna funzione di registrazione di ioni selezionati tramite spettrometria di massa utilizzata per il monitoraggio di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili). Nel caso dei metodi di conferma, sono utilizzati tutti i 17 standard interni di PCDD/PCDF 2,3,7,8-sostituiti marcati con <sup>13</sup>C e tutti i 12 standard interni di PCB diossina-simili marcati con <sup>13</sup>C.

▼ **M6**

- 6.2.2. Sono inoltre determinati i fattori di risposta relativa per i congeneri ai quali non è aggiunto alcun analogo marcato con  $^{13}\text{C}$ , utilizzando appropriate soluzioni di calibrazione.
- 6.2.3. Per gli alimenti per animali di origine vegetale e per gli alimenti per animali di origine animale con tenore di grassi inferiore al 10 %, l'aggiunta di standard interni prima dell'estrazione è obbligatoria. Per gli alimenti per animali di origine animale con tenore di grassi superiore al 10 %, gli standard interni possono essere aggiunti prima o dopo l'estrazione dei grassi. È effettuata un'appropriata validazione dell'efficienza dell'estrazione, a seconda della fase in cui sono introdotti gli standard interni.
- 6.2.4. Prima dell'analisi GC-MS sono aggiunti 1 o 2 standard di recupero (surrogato/i).
- 6.2.5. È necessario il controllo del recupero. Per i metodi di conferma, i recuperi dei singoli standard interni sono compresi tra il 60 % e il 120 %. Recuperi inferiori o superiori per singoli congeneri, in particolare per alcune dibenzo-p-diossine e alcuni dibenzofurani epta e octaclorati, sono accettabili, purché il loro contributo al valore di TEQ non superi il 10 % del valore totale di TEQ (in base alla somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili). Per i metodi di screening GC-MS i recuperi sono compresi tra il 30 % e il 140 %.
- 6.3. *Rimozione delle sostanze interferenti*
- La separazione di PCDD/PCDF dai composti clorurati interferenti, quali i PCB non diossina-simili e gli eteri clorurati di difenile, è effettuata mediante appropriate tecniche cromatografiche (di preferenza con una colonna di florisil, di allumina e/o di carbone).
  - La separazione gascromatografica degli isomeri è < 25 % da picco a picco tra 1,2,3,4,7,8-HxCDF e 1,2,3,6,7,8-HxCDF.
- 6.4. *Calibrazione con curva standard*
- Il range della curva di calibrazione copre il corrispondente range del livello massimo o delle soglie di intervento.
- 6.5. *Criteri specifici per i metodi di conferma*
- Per la GC-HRMS:
 

nella HRMS la risoluzione dovrà essere generalmente superiore o pari a 10 000 per tutto il range di massa al 10 % della valle.

Rispetto di ulteriori criteri di identificazione e di conferma quali definiti in norme riconosciute a livello internazionale come, ad esempio, la norma EN 16215:2012 (Alimenti per animali — Determinazione di diossine e PCB diossina-simili mediante GC-HRMS e di PCB indicatori mediante GC-HRMS) e/o nei metodi EPA 1613 e 1688 riveduti.
  - Per la GC-MS/MS:
 

monitoraggio di almeno 2 ioni precursori specifici, ciascuno con un corrispondente ione, prodotto dalla transizione per tutti gli analiti marcati e non marcati nel campo di applicazione dell'analisi.

Tolleranza massima consentita per intensità di ioni relative del  $\pm 15$  % per gli ioni prodotti dalla transizione selezionati rispetto a valori calcolati o misurati (media delle calibrazioni standard), applicando condizioni di MS/MS identiche, in particolare l'energia di collisione e la pressione del gas di collisione, per ciascuna transizione di un dato analita.

**▼ M6**

La risoluzione per ciascun quadrupolo è pari o migliore rispetto alla risoluzione di massa unitaria (risoluzione di massa unitaria: risoluzione sufficiente a distinguere due picchi di una unità di massa) al fine di minimizzare eventuali interferenze sull'analita di interesse.

Rispetto di ulteriori criteri quali definiti in norme riconosciute a livello internazionale come, ad esempio, la norma EN 16215:2012 (Alimenti per animali — Determinazione di diossine e PCB diossina-simili mediante GC-HRMS e di PCB indicatori mediante GC-HRMS) e/o nei metodi EPA 1613 e 1688 riveduti, fatto salvo l'obbligo di impiegare la GC-HRMS.

**7. Prescrizioni specifiche per i metodi bioanalitici**

I metodi bioanalitici sono metodi basati su principi biologici come i dosaggi cellulari, i dosaggi di recettori o gli immunodosaggi. Le prescrizioni figuranti in questo punto 7 si riferiscono ai metodi bioanalitici in generale.

Un metodo di screening classifica in via di principio un campione come conforme o sospetto non conforme. Per questo, il livello di BEQ calcolato è comparato al valore di cut-off (cfr. punto 7.3). I campioni al di sotto del valore di cut-off sono dichiarati conformi, i campioni uguali o superiori al valore di cut-off sono dichiarati sospetti non conformi e devono essere analizzati con un metodo di conferma. In pratica, un livello di BEQ corrispondente a due terzi del livello massimo può servire come valore di cut-off purché si garantisca un tasso di falsi conformi inferiore al 5 % e un tasso accettabile di risultati falsi non conformi. Con livelli massimi distinti per PCDD/PCDF e per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili, il controllo della conformità dei campioni senza frazionamento richiede appropriati valori di cut-off dei biosaggi per i PCDD/PCDF. Per il controllo dei campioni che superano le soglie di intervento una percentuale appropriata della rispettiva soglia di intervento funge da valore di cut-off.

Se un livello indicativo è espresso in BEQ, i risultati dei campioni sono compresi nel working range e superano il limite di reporting (cfr. 7.1.1 e 7.1.6).

**7.1. Valutazione della risposta al test****7.1.1. Prescrizioni generali**

— Nel calcolo delle concentrazioni a partire da una curva di calibrazione della TCDD, i valori all'estremo superiore della curva presenteranno una forte variazione [coefficiente di variazione (CV) elevato]. Il working range è costituito dalla zona in cui il CV è inferiore al 15 %. L'estremo inferiore del working range (limite di reporting) è inoltre fissato al di sopra dei bianchi di procedura almeno di un fattore tre. L'estremo superiore del working range è di norma rappresentato dal valore EC<sub>70</sub> (70 % della concentrazione effettiva massima), ma è più basso se il CV è superiore al 15 % in questo range. Il working range è stabilito durante la validazione. I valori di cut-off (cfr. punto 7.3) si situano entro il working range.

— Le soluzioni standard e gli estratti dei campioni sono testati in triplo o almeno in doppio. Nel caso di uso di doppi, una soluzione standard o un estratto di controllo testati in quattro-sei pozzetti distribuiti sulla piastra producono una risposta o una concentrazione (possibile solo nel working range) in base a un CV < 15 %.

▼ **M6**

## 7.1.2. Calibrazione

## 7.1.2.1. Calibrazione con curva standard

- I livelli nei campioni sono stimati comparando la risposta al test a una curva di calibrazione della TCDD (o del PCB 126 o di una miscela standard PCDD/PCDF/PCB diossina-simili) per calcolare il livello BEQ nell'estratto e poi nel campione.
- Le curve di calibrazione contengono da 8 a 12 concentrazioni (almeno in doppio) con concentrazioni sufficienti nella parte inferiore della curva (working range). Particolare attenzione è prestata alla qualità del fit della curva nel working range. Il valore  $R^2$ , come tale, è di scarsa o nessuna utilità nella stima della bontà del fit in regressione non lineare. Un migliore fit è ottenuto minimizzando la differenza tra i livelli calcolati e osservati nel working range della curva, ad esempio diminuendo la somma dei quadrati residui.
- Il livello stimato nell'estratto del campione è quindi corretto del livello BEQ calcolato per un campione bianco di matrice o solvente (per tener conto delle impurità provenienti dai solventi e dalle sostanze chimiche utilizzate) e del recupero apparente (calcolato a partire dal livello BEQ di idonei campioni di riferimento con pattern di congeneri rappresentativi attorno al livello massimo o alla soglia di intervento). Per effettuare una correzione del recupero, il recupero apparente deve situarsi entro il range richiesto (cfr. punto 7.1.4). I campioni di riferimento utilizzati per la correzione del recupero sono conformi alle prescrizioni di cui al punto 7.2.

## 7.1.2.2. Calibrazione con campioni di riferimento

In alternativa, può essere utilizzata una curva di calibrazione preparata a partire da almeno quattro campioni di riferimento (cfr. punto 7.2.4): un bianco matrice, più tre campioni di riferimento a 0,5x, 1,0x e 2,0x il livello massimo o la soglia di intervento, il che rende superflua la correzione del bianco e del recupero se le proprietà della matrice dei campioni di riferimento corrispondono a quelle dei campioni incogniti. In tal caso, la risposta al test corrispondente a due terzi del livello massimo (cfr. punto 7.3) può essere calcolata direttamente a partire da questi campioni e utilizzata come valore di cut-off. Per il controllo dei campioni che superano le soglie di intervento il valore di cut-off è costituito da una percentuale appropriata di queste soglie di intervento.

## 7.1.3. Determinazione separata di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili

Gli estratti possono essere suddivisi in frazioni contenenti PCDD/PCDF e PCB diossina-simili, il che permette un'identificazione separata dei livelli di TEQ (in BEQ) di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili. Per valutare i risultati per la frazione contenente PCB diossina-simili è da utilizzarsi di preferenza una curva di calibrazione standard del PCB 126.

## 7.1.4. Recuperi apparenti del biosaggio

Il «recupero apparente del biosaggio» è calcolato a partire da idonei campioni di riferimento con pattern di congeneri rappresentativi attorno al livello massimo o alla soglia di intervento ed espresso in percentuale del livello BEQ rispetto al livello di TEQ. A seconda del tipo di dosaggio e di TEF<sup>(1)</sup> utilizzati, le differenze tra fattori TEF e REP per i PCB diossina-simili possono causare per i PCB diossina-simili recuperi apparenti bassi rispetto ai PCDD/PCDF. Pertanto, se è eseguita una determinazione separata di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili, i recuperi apparenti del biosaggio sono: per i PCB diossina-simili dal 20 % al

<sup>(1)</sup> Le attuali prescrizioni si basano sui TEF pubblicati in: M. Van den Berg et al., Toxicol. Sci. 93 (2), 223-241 (2006).

**▼ M6**

60 %, per i PCDD/PCDF dal 50 % al 130 % (i range valgono per la curva di calibrazione della TCDD). Poiché il contributo dei PCB diossina-simili alla somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili può variare secondo le matrici e i campioni, i recuperi apparenti del biodo-saggio per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili riflettono questi range e sono compresi tra il 30 % e il 130 %. Ogni modifica sostanziale dei valori TEF per PCDD/PCDF e PCB diossina-simili nella legislazione dell'Unione richiede la revisione di questi range.

**7.1.5. Controllo dei recuperi per il clean-up**

La perdita di composti durante il clean-up è verificata durante la validazione. Un campione bianco spiked con una miscela dei diversi congeneri è sottoposto a clean-up (almeno  $n = 3$ ) e il recupero e la variabilità sono verificati mediante un metodo di conferma. Il recupero è compreso tra 60 % e 120 %, in particolare per i congeneri che contribuiscono per più del 10 % al livello di TEQ presente in varie miscele.

**7.1.6. Limite di reporting**

Per i livelli BEQ un limite di reporting è determinato a partire dai corrispondenti campioni matrice implicanti pattern di congeneri tipici, ma non dalla curva di calibrazione degli standard, data la scarsa precisione nel range inferiore della curva. Occorre tenere conto degli effetti dell'estrazione e del clean-up. Il limite di reporting è fissato al di sopra dei bianchi di procedura di almeno un fattore tre.

**7.2. *Uso di campioni di riferimento***

7.2.1. I campioni di riferimento rappresentano la matrice campione, i pattern di congeneri e i range di concentrazione per PCDD/PCDF e PCB diossina-simili attorno al livello massimo o alla soglia di intervento.

7.2.2. Un bianco matrice e, se questo non è possibile, un bianco di procedura e un campione di riferimento al livello massimo o alla soglia di intervento sono inclusi in ciascuna serie di test. Questi campioni sono estratti e testati nello stesso momento in condizioni identiche. Il campione di riferimento presenta una risposta notevolmente più elevata del campione in bianco, in modo da garantire l'idoneità del test. Questi campioni possono essere utilizzati per le correzioni del bianco e del recupero.

7.2.3. I campioni di riferimento scelti per effettuare una correzione del recupero sono rappresentativi dei campioni da analizzare, il che significa che i pattern di congeneri non possono portare a una sottostima dei livelli.

7.2.4. Campioni di riferimento supplementari, per esempio a 0,5x e 2x il livello massimo o la soglia di intervento possono essere inclusi per dimostrare la performance adeguata del test nel range di interesse per il controllo del livello massimo o della soglia di intervento. Combinati, questi campioni possono essere utilizzati per calcolare i livelli BEQ nei campioni da analizzare (cfr. punto 7.1.2.2).

▼ **M6**7.3. *Determinazione dei valori di cut-off*

È stabilito il rapporto tra i risultati bioanalitici in BEQ e i risultati del metodo di conferma in TEQ, ad esempio mediante esperimenti di calibrazione matrix-matched, con campioni di riferimento spiked a 0, 0,5x, 1x e 2x l'LM, con 6 ripetizioni ad ogni livello (n = 24). I fattori di correzione (bianco e recupero) possono essere stimati in base a questo rapporto, ma sono controllati come stabilito al punto 7.2.2.

Sono stabiliti valori di cut-off per le decisioni sulla conformità del campione ai livelli massimi o per il controllo delle soglie di intervento, se pertinente, con i rispettivi livelli massimi o le rispettive soglie di intervento fissati singolarmente per PCDD/PCDF e PCB diossina-simili o per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili. Essi sono rappresentati dall'endpoint *inferiore* della distribuzione dei risultati bioanalitici (corretti del bianco e del recupero) corrispondente al limite di decisione del metodo di conferma in base ad un livello di fiducia del 95 %, implicante un tasso di falsi conformi < 5 % e a una RSD<sub>R</sub> < 25 %. Il limite di decisione del metodo di conferma è il livello massimo, tenendo conto dell'incertezza di misura estesa.

Il valore di cut-off (in BEQ) può essere calcolato in uno dei modi indicati ai punti 7.3.1, 7.3.2 e 7.3.3. (cfr. figura 1).

7.3.1. Uso della banda *inferiore* dell'intervallo di predizione del 95 % al limite di decisione del metodo di conferma

$$\text{Valore di cut-off} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

dove:

BEQ<sub>DL</sub> BEQ corrispondente al limite di decisione del metodo di conferma, ossia al livello massimo, tenendo conto dell'incertezza di misura estesa

s<sub>y,x</sub> deviazione standard residua

t<sub>α, f = m - 2</sub> fattore di Student (α = 5 %, f = gradi di libertà, un lato)

m numero totale dei punti di calibrazione (indice j)

n numero di ripetizioni ad ogni livello

x<sub>i</sub> concentrazione del campione (in TEQ) del punto di calibrazione i determinato con un metodo di conferma

$\bar{x}$  media delle concentrazioni (in TEQ) di tutti i campioni di calibrazione

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2 \text{ parametro somma dei quadrati, } i = \text{indice per il punto di calibrazione } i$$

7.3.2. Calcolo a partire dai risultati bioanalitici (corretti del bianco e del recupero) di analisi multiple di campioni (n ≥ 6) contaminati al limite di decisione del metodo di conferma, come endpoint *inferiore* della distribuzione dei dati al corrispondente valore BEQ medio:

$$\text{valore di cut-off} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_{\text{R}}$$

dove:

SD<sub>R</sub> deviazione standard dei risultati del biosaggio a BEQ<sub>DL</sub>, misurata in condizioni di riproducibilità in laboratorio

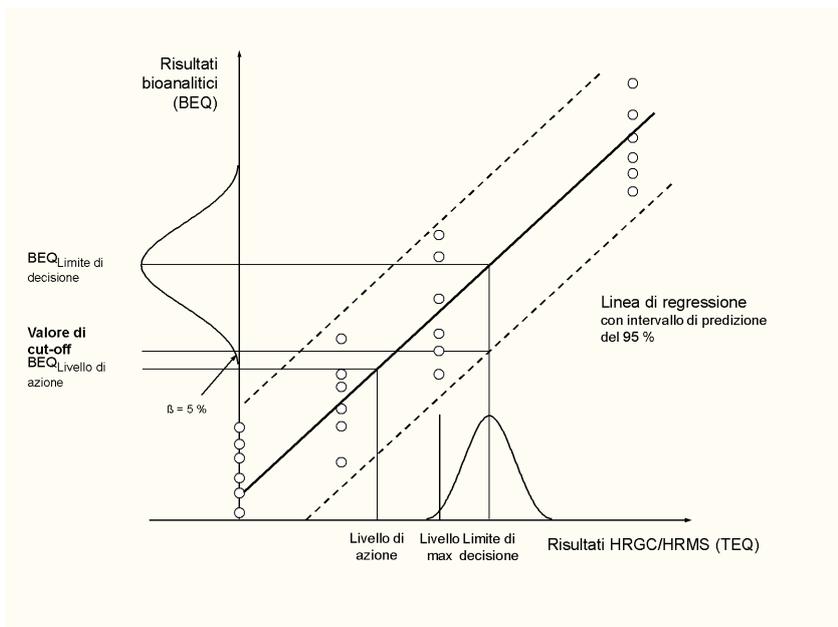
▼ **M6**

- 7.3.3. Calcolo come valore medio dei risultati bioanalitici (in BEQ, corretto del bianco e del recupero) a partire dall'analisi multipla di campioni ( $n \geq 6$ ) contaminati a due terzi del livello massimo o della soglia di intervento, sulla base dell'osservazione che questo livello sarà prossimo al valore di cut-off determinato come indicato ai punti 7.3.1 o 7.3.2.

Calcolo dei valori di cut-off in base a un livello di fiducia del 95 % implicante un tasso di falsi conformi  $< 5 \%$ , e una  $RSD_R < 25 \%$ :

- 1) a partire dalla banda *inferiore* dell'intervallo di predizione del 95 % al limite di decisione del metodo di conferma,
- 2) da analisi multiple di campioni ( $n \geq 6$ ) contaminati al limite di decisione del metodo di conferma, come endpoint *inferiore* della distribuzione dei dati (rappresentata nella figura da una curva a campana) al corrispondente valore BEQ medio.

Figura 1



- 7.3.4. Restrizioni dei valori di cut-off

I valori di cut-off espressi in BEQ calcolati a partire dalla  $RSD_R$  ottenuta durante la validazione utilizzando un numero limitato di campioni con differenti matrici/pattern di congeneri possono essere superiori ai livelli massimi o alle soglie di intervento espressi in TEQ in quanto la precisione è maggiore di quella raggiungibile in routine quando deve essere controllato uno spettro sconosciuto di possibili pattern di congeneri. In tali casi, i valori di cut-off sono calcolati a partire da una  $RSD_R = 25 \%$ , o sono preferiti i due terzi del livello massimo o della soglia di intervento.

- 7.4. *Caratteristiche di performance*

- 7.4.1. Poiché nei metodi bioanalitici non possono essere utilizzati standard interni, sono eseguiti test di ripetibilità dei metodi bioanalitici per ottenere informazioni sulla deviazione standard nelle e tra le serie di test. La ripetibilità è inferiore al 20 % e la riproducibilità in laboratorio inferiore al 25 %, in base ai livelli calcolati in BEQ dopo correzione del bianco e del recupero.

**▼ M6**

- 7.4.2. Nel processo di validazione il test permette di distinguere tra un campione in bianco e un livello al valore di cut-off, consentendo l'identificazione dei campioni al di sopra del corrispondente valore di cut-off (cfr. punto 7.1.2).
- 7.4.3. Sono definiti i composti bersaglio, le possibili interferenze e i livelli massimi tollerabili di bianco.
- 7.4.4. La deviazione standard percentuale nella risposta o nella concentrazione calcolata a partire dalla risposta (possibile solo nel working range) di una determinazione triplice di un estratto del campione non può essere superiore al 15 %.
- 7.4.5. I risultati non corretti dei campioni di riferimento, espressi in BEQ (bianco e al livello massimo o alla soglia di intervento), sono utilizzati per valutare la performance del metodo bioanalitico su un periodo di tempo costante.
- 7.4.6. I diagrammi di controllo qualità per i bianchi di procedura e ciascun tipo di campione di riferimento sono registrati e controllati per assicurare che la performance analitica sia conforme alle prescrizioni, in particolare per i bianchi di procedura per quanto concerne la differenza minima richiesta rispetto all'estremo inferiore del working range e per i campioni di riferimento per quanto riguarda la riproducibilità in laboratorio. I bianchi di procedura sono controllati in modo da evitare risultati falsi conformi quando sono sottratti.
- 7.4.7. I risultati dei metodi di conferma dei campioni sospetti e del 2-10 % dei campioni conformi (almeno 20 campioni per matrice) sono raccolti e utilizzati per valutare la performance del metodo di screening e il rapporto tra BEQ e TEQ. Questa base di dati può essere utilizzata per la rivalutazione dei valori di cut-off applicabili ai campioni di routine per le matrici validate.
- 7.4.8. La buona performance del metodo può essere dimostrata anche con la partecipazione a ring trial. Anche i risultati dei campioni analizzati in ring trial, che coprono un range di concentrazione fino a, per esempio, due volte il limite massimo, possono essere inclusi nella valutazione del tasso di falsi conformi, se il laboratorio è in grado di dimostrare la sua buona performance. I campioni coprono i pattern di congeneri più frequenti, rappresentanti varie fonti.
- 7.4.9. Durante gli incidenti i valori di cut-off possono essere rivalutati, tenendo conto della matrice e dei pattern di congeneri specifici del singolo incidente.

**8. Reporting dei risultati****8.1. Metodi di conferma**

- 8.1.1. I risultati dell'analisi contengono i livelli dei singoli congeneri di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili e i valori di TEQ sono espressi come lowerbound, upperbound e mediumbound, per includere un massimo di informazione nel reporting dei risultati e permettere così l'interpretazione dei risultati secondo prescrizioni specifiche.
- 8.1.2. Il rapporto indica il metodo utilizzato per l'estrazione di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.

**▼ M6**

- 8.1.3. I recuperi dei singoli standard interni sono indicati se si situano al di fuori del range menzionato al punto 6.2.5, se il livello massimo è superato (in questo caso, i recuperi per una delle due doppie analisi) e in altri casi su richiesta.
- 8.1.4. Poiché nel decidere in merito alla conformità di un campione occorre tener conto dell'incertezza di misura estesa, è indicato anche questo parametro. I risultati analitici sono pertanto espressi come  $x \pm U$ , dove  $x$  è il risultato analitico e  $U$  l'incertezza di misura estesa, calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 corrispondente a un livello di fiducia del 95 % circa. Nel caso di una determinazione separata di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili, la somma dell'incertezza estesa stimata dei risultati analitici separati di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili è utilizzata per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.
- 8.1.5. I risultati sono espressi nelle stesse unità e con almeno lo stesso numero di cifre significative dei livelli massimi stabiliti dalla direttiva 2002/32/CE.
- 8.2. *Metodi di screening bioanalitici*
- 8.2.1. Il risultato dello screening è espresso come «conforme» o «sospetto non conforme» («sospetto»).
- 8.2.2. Inoltre, per PCDD/PCDF e/o PCB diossina-simili può essere dato un risultato indicativo espresso in BEQ e non in TEQ.
- 8.2.3. I campioni con una risposta al di sotto del limite di reporting sono espressi come «inferiori al limite di reporting». I campioni con una risposta al di sopra del working range sono indicati come «superiori al working range» e il livello corrispondente all'estremo superiore del working range è espresso in BEQ.
- 8.2.4. Per ciascun tipo di matrice del campione il rapporto menziona il livello massimo o la soglia di intervento su cui si basa la valutazione.
- 8.2.5. Il rapporto menziona il tipo di test applicato, il principio base del test e il tipo di calibrazione.
- 8.2.6. Il rapporto indica il metodo utilizzato per l'estrazione di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.
- 8.2.7. In caso di campioni sospetti non conformi, il rapporto deve includere una nota sulle azioni da intraprendere. La concentrazione di PCDD/PCDF e la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili nei campioni con livelli elevati deve essere determinata/confermata mediante un metodo di conferma.
- 8.2.8. I risultati non conformi sono espressi solo sulla base di un'analisi di conferma
- 8.3. *Metodi di screening fisico-chimici*
- 8.3.1. Il risultato dello screening è espresso come «conforme» o «sospetto non conforme» («sospetto»).
- 8.3.2. Per ciascun tipo di matrice del campione il rapporto menziona il livello massimo o la soglia di intervento su cui si basa la valutazione.

**▼ M6**

- 8.3.3. Possono inoltre essere indicati i livelli dei singoli congeneri di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili e i valori di TEQ espressi come lowerbound, upperbound e mediumbound. I risultati sono espressi nelle stesse unità e con almeno lo stesso numero di cifre significative dei livelli massimi stabiliti dalla direttiva 2002/32/CE.
- 8.3.4. I recuperi dei singoli standard interni sono indicati se si situano al di fuori del range menzionato al punto 6.2.5, se il livello massimo è superato (in questo caso, i recuperi per una delle due doppie analisi) e in altri casi su richiesta.
- 8.3.5. Il rapporto menziona il metodo GC-MS applicato.
- 8.3.6. Il rapporto indica il metodo utilizzato per l'estrazione di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.
- 8.3.7. In caso di campioni sospetti non conformi, il rapporto deve includere una nota sulle azioni da intraprendere. La concentrazione di PCDD/PCDF e la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili nei campioni con livelli elevati deve essere determinata/confermata mediante un metodo di conferma.
- 8.3.8. La non conformità può essere decisa solo a seguito di un'analisi di conferma.

*CAPO III****Preparazione dei campioni e prescrizioni per i metodi di analisi impiegati nel controllo ufficiale dei livelli di pcb non diossina-simili negli alimenti per animali*****1. Campo d'applicazione**

Le prescrizioni di cui al presente capo si applicano alle analisi degli alimenti per animali effettuate ai fini del controllo ufficiale dei livelli di PCB non diossina-simili e per quanto riguarda la preparazione dei campioni e le prescrizioni analitiche per altre finalità di legge, che comprendono i controlli effettuati dagli operatori del settore alimentare per garantire la conformità con le disposizioni del regolamento (CE) n. 183/2005.

**2. Metodi di rilevazione applicabili**

Gasromatografia con rilevazione a cattura di elettroni (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS o metodi equivalenti.

**3. Identificazione e conferma degli analiti di interesse**

- 3.1. Tempo di ritenzione relativo rispetto agli standard interni o agli standard di riferimento (deviazione accettabile di +/- 0,25 %).
- 3.2. Separazione gasromatografica dei PCB non diossina-simili dalle sostanze interferenti, specie PCB coeluenti, in particolare se i livelli dei campioni si situano entro i limiti legali e la non conformità deve essere confermata <sup>(1)</sup>.
- 3.3. Prescrizioni per le tecniche GC-MS

Monitoraggio di almeno il seguente numero di ioni molecolari o ioni caratteristici del gruppo molecolare:

- a) due ioni specifici per HRMS;

<sup>(1)</sup> I congeneri che spesso coeluiscono sono per esempio PCB 28/31, PCB 52/69 e PCB 138/163/164. Per la GC-MS sono considerate anche le possibili interferenze di frammenti di congeneri più altamente clorurati.

**▼ M6**

- b) tre ioni specifici per LRMS;
- c) due ioni precursori specifici, ciascuno con un corrispondente ione specifico prodotto dalla transizione per la MS-MS.

Tolleranze massime ammesse per i rapporti di abbondanza per i frammenti di massa selezionati:

deviazione relativa del rapporto di abbondanza dei frammenti di massa selezionati rispetto all'abbondanza teorica o standard di calibrazione per lo ione bersaglio (lo ione monitorato più abbondante) e gli ioni qualificatori:  $\pm 15 \%$

#### 3.4. Prescrizioni per le tecniche di GC-ECD

Conferma dei risultati che oltrepassano il livello massimo con due colonne GC con fasi stazionarie di diversa polarità.

#### 4. Dimostrazione della performance del metodo

La performance del metodo è validata nel range del livello massimo (da 0,5 a 2 volte il livello massimo) con un coefficiente di variazione accettabile per le analisi ripetute (cfr. prescrizioni per la precisione intermedia al punto 9).

#### 5. Limite di quantificazione

La somma degli LOQ <sup>(1)</sup> dei PCB non diossina-simili non è superiore a un terzo del livello massimo <sup>(2)</sup>.

#### 6. Controllo di qualità

Controlli in bianco regolari, analisi di campioni spiked, campioni di controllo di qualità, partecipazione a studi interlaboratorio su matrici rilevanti.

#### 7. Controllo dei recuperi

7.1. Sono utilizzati idonei standard interni con proprietà fisico-chimiche comparabili agli analiti di interesse.

7.2. Aggiunta di standard interni:

aggiunta ai prodotti (prima dell'estrazione e del processo di clean-up).

7.3. Prescrizioni per i metodi che utilizzano tutti i sei congeneri di PCB non diossina-simili marcati con isotopi:

a) correzione dei risultati in funzione dei recuperi degli standard interni;

b) recuperi degli standard interni marcati con isotopi compresi tra il 60 % e 120 %;

c) recuperi inferiori o superiori per i singoli congeneri con un contributo alla somma dei PCB non diossina-simili inferiore al 10 % sono accettabili.

7.4. Prescrizioni per i metodi che non utilizzano tutti i sei standard interni marcati con isotopi o utilizzano altri standard interni:

a) controllo del recupero degli standard interni per ogni campione;

<sup>(1)</sup> Ove applicabili, sono seguiti i principi descritti nel documento «Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food» ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)).

<sup>(2)</sup> È altamente raccomandato un contributo del livello del bianco reagente inferiore al livello di un contaminante in un campione. È compito del laboratorio controllare la variazione dei livelli del bianco, in particolare se sono sottratti.

**▼ M6**

- b) recuperi degli standard interni compresi tra il 60 % e il 120 %;
- c) correzione dei risultati in funzione dei recuperi degli standard interni.

7.5. I recuperi dei congeneri non marcati sono controllati per mezzo di campioni spiked o campioni di controllo qualità con concentrazioni nel range del livello massimo. I recuperi per questi congeneri sono considerati accettabili se sono compresi tra il 60 % e il 120 %.

#### 8. Prescrizioni per i laboratori

Come prescritto dal regolamento (CE) n. 882/2004, i laboratori sono accreditati da un organismo riconosciuto operante in conformità alla Guida ISO 58, per garantire che alle loro analisi sia applicata l'assicurazione qualità. I laboratori sono accreditati in base alla norma EN ISO/IEC 17025. Ove applicabili, sono inoltre seguiti i principi descritti negli orientamenti tecnici per la stima dell'incertezza di misura e dei limiti di quantificazione per l'analisi dei PCB <sup>(1)</sup>.

#### 9. Caratteristiche di performance: criteri per la somma dei PCB non diossina-simili al livello massimo

	Spettrometria di massa con diluizione isotopica <sup>(1)</sup>	Altre tecniche
Esattezza	da - 20 a + 20 %	da - 30 a + 30 %
Precisione intermedia (RSD%)	≤ 15 %	≤ 20 %
Differenza tra calcolo upper-bound e lowerbound	≤ 20 %	≤ 20 %

<sup>(1)</sup> È richiesto l'uso di tutti e sei gli analoghi marcati con <sup>13</sup>C come standard interni.

#### 10. Reporting dei risultati

- 10.1. I risultati dell'analisi contengono i livelli dei singoli PCB non diossina-simili e la somma di tali congeneri di PCB espressa come lowerbound, upperbound e mediumbound, per includere un massimo di informazione nel reporting dei risultati e permettere così l'interpretazione dei risultati secondo prescrizioni specifiche.
- 10.2. Il rapporto indica il metodo utilizzato per l'estrazione dei PCB.
- 10.3. I recuperi dei singoli standard interni sono indicati se si situano al di fuori del range menzionato al punto 7, se il livello massimo è superato e in altri casi su richiesta.
- 10.4. Poiché nel decidere in merito alla conformità di un campione occorre tener conto dell'incertezza di misura estesa, è indicato anche tale parametro. I risultati analitici sono pertanto espressi come  $x \pm U$ , dove  $x$  è il risultato analitico e  $U$  l'incertezza di misura estesa, calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 corrispondente a un livello di fiducia del 95 % circa.
- 10.5. I risultati sono espressi nelle stesse unità e con almeno lo stesso numero di cifre significative dei livelli massimi stabiliti dalla direttiva 2002/32/CE.

<sup>(1)</sup> Le attuali prescrizioni si basano sui TEF pubblicati in: M. Van den Berg et al., Toxicol. Sci. 93 (2), 223-241 (2006).

▼ **M2**

## ALLEGATO VI

**METODI D'ANALISI PER LA DETERMINAZIONE DEI COSTITUENTI DI ORIGINE ANIMALE NELL'AMBITO DEL CONTROLLO UFFICIALE DEGLI ALIMENTI PER ANIMALI**▼ **M8**

## 1. FINALITÀ E CAMPO DI APPLICAZIONE

La determinazione dei costituenti di origine animale negli alimenti per animali deve essere eseguita mediante microscopia ottica o mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) in conformità alle disposizioni del presente allegato.

Questi due metodi permettono di individuare la presenza di costituenti di origine animale nelle premiscele, nelle materie prime per mangimi e nei mangimi composti, ma non di calcolarne la quantità. Entrambi i metodi presentano un limite di rilevazione inferiore a 0,1 % (p/p).

Il metodo PCR consente di identificare il gruppo tassonomico dei costituenti di origine animale presenti nelle premiscele, nelle materie prime per mangimi e nei mangimi composti.

Questi metodi si applicano per il controllo dell'applicazione dei divieti di cui all'articolo 7, paragrafo 1, del regolamento (CE) n. 999/2001 del Parlamento europeo e del Consiglio <sup>(1)</sup>, all'allegato IV di tale regolamento e all'articolo 11, paragrafo 1, del regolamento (CE) n. 1069/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio <sup>(2)</sup>.

In funzione del tipo di alimento per animali analizzato, questi metodi possono essere utilizzati, entro un unico protocollo operativo, singolarmente o in combinazione, secondo le procedure operative standard («POS») stabilite dal laboratorio di riferimento dell'UE per le proteine animali nei mangimi (EURL-AP) e pubblicate sul suo sito web <sup>(3)</sup>.

▼ **M2**

## 2. METODI

▼ **M8**2.1. **Microscopia ottica**2.1.1. *Principio*

I costituenti di origine animale che possono essere presenti nelle premiscele, nelle materie prime per mangimi e nei mangimi composti sottoposti ad analisi sono individuati sulla base di caratteristiche tipiche e identificabili al microscopio, come fibre muscolari o altre particelle di carne, cartilagini, ossa, corna, peli, setole, frammenti cuticolari di invertebrati, strutture tracheali di insetti, prodotti sanguigni, globuli di latte, cristalli di lattosio, piume, gusci d'uovo, lische e scaglie.

<sup>(1)</sup> Regolamento (CE) n. 999/2001 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 maggio 2001, recante disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili (GU L 147 del 31.5.2001, pag. 1).

<sup>(2)</sup> Regolamento (CE) n. 1069/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 ottobre 2009, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano e che abroga il regolamento (CE) n. 1774/2002 (regolamento sui sottoprodotti di origine animale) (GU L 300 del 14.11.2009, pag. 1).

<sup>(3)</sup> <https://www.eurl.craw.eu/legal-sources-and-sops/method-of-reference-and-sops/>

**▼M8**

Effettuare gli esami al microscopio dopo la preparazione di campioni mediante sedimentazione.

Sottoporre i campioni a una fase di sedimentazione come segue:

- a) ai fini dell'individuazione dei costituenti di origine animale diversi dagli invertebrati terrestri, una fase di sedimentazione singola in tetracloroetilene (TCE) come precisato al punto 2.1.3.4.3;
- b) ai fini dell'individuazione dei costituenti di invertebrati terrestri, una fase di sedimentazione doppia in etere di petrolio/tetracloroetilene (PE/TCE) come precisato al punto 2.1.3.4.4.

2.1.2. *Reagenti e attrezzature*

2.1.2.1. Reagenti

2.1.2.1.1. Agente concentratore

- Tetracloroetilene (peso specifico 1,62).
- Etere di petrolio (PE), con punto di ebollizione compreso tra 40 °C e 60 °C (peso specifico 0,65).

2.1.2.1.2. Reagente colorante

- Soluzione di rosso di alizarina (diluire 2,5 ml di acido cloridrico 1M in 100 ml di acqua, aggiungere 200 mg di rosso di alizarina alla soluzione).

2.1.2.1.3. Mezzi di montaggio

- Liscivia (NaOH a 2,5 % in p/v o KOH a 2,5 % in p/v).
- Glicerolo (non diluito, viscosità: 1 490 cP) o un mezzo di montaggio con proprietà equivalenti per la preparazione dei vetrini non permanenti.
- Norland ® Optical Adhesive 65 (viscosità: 1 200 cP) o resina con proprietà equivalenti per la preparazione dei vetrini permanenti.

2.1.2.1.4. Mezzi di montaggio con proprietà coloranti

- Soluzione di Lugol (sciogliere 2 g di ioduro di potassio in 100 ml di acqua e aggiungere 1 g di iodio agitando ripetutamente).
- Reagente cistina (2 g di acetato di piombo, 10 g di NaOH/100 ml di acqua).
- Reagente di Fehling (preparato prima dell'uso da parti eguali (1/1) di due soluzioni madre A e B: soluzione A (sciogliere 6,9 g di solfato di rame (II) pentaidrato in 100 ml di acqua); soluzione B (sciogliere 34,6 g di tartrato di potassio e di sodio tetraidrato e 12 g di NaOH in 100 ml di acqua).
- Tetrametilbenzidina/perossido di idrogeno (sciogliere 1 g di 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB) in 100 ml di acido acetico glaciale e 150 ml di acqua. Prima dell'uso, mescolare 4 parti di questa soluzione di TMB con 1 parte di perossido di idrogeno al 3 %).

2.1.2.1.5. Agenti di risciacquo

- Etanolo  $\geq$  96 % (per analisi).
- Acetone (per analisi).

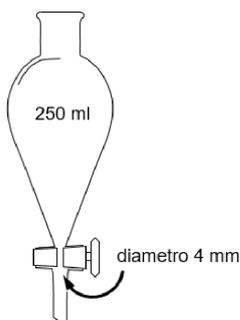
2.1.2.1.6. Reagente sbiancante

- Soluzione di ipoclorito di sodio in commercio (9-14 % di cloro attivo).

▼ **M8**

## 2.1.2.2. Attrezzature

- Bilancia analitica con precisione di 0,001 g.
- Apparecchiatura per macinazione: mulino a lame o a rotore. Se si utilizza un mulino a rotore, sono proibiti setacci a maglie  $\leq 0,5$  mm.
- Setacci a maglie quadrate di 0,25 mm e 1 mm di larghezza. Fatta eccezione per la presetacciatura del campione, il diametro dei setacci non deve superare i 10 cm per evitare la perdita di materiali. La taratura dei setacci non è necessaria.
- Imbuto separatore conico di vetro con capacità di 250 ml munito di rubinetto in teflon o vetro smerigliato alla base del cono. Il diametro dell'apertura del rubinetto deve essere di almeno  $\geq 4$  mm. In alternativa, unicamente per la sedimentazione singola in TCE, può essere utilizzato un decantatore a fondo conico, a condizione che il laboratorio abbia dimostrato che i livelli di rilevamento sono equivalenti a quelli ottenuti utilizzando l'imbuto separatore conico di vetro.

*Imbuto separatore*

- Stereomicroscopio con gamma di ingrandimenti finali almeno da 6,5x a 40x.
- Microscopio composto in campo chiaro a luce trasmessa con gamma di ingrandimenti finali almeno da 100x a 400x. Possono inoltre essere utilizzati la luce polarizzata e il contrasto interferenziale differenziale.
- Vetreria da laboratorio standard.
- Attrezzatura per la preparazione dei vetrini: vetrini per microscopio classici, vetrini concavi, vetrini coprioggetti (20x20 mm), pinzette, spatole
- Forno da laboratorio.
- Centrifuga.
- Carta da filtro: filtro in cellulosa per analisi qualitativa (dimensione dei pori: 4-11  $\mu\text{m}$ ).

2.1.3. *Campionamento e preparazione del campione*

## 2.1.3.1. Campionamento

Deve essere utilizzato un campione rappresentativo, prelevato secondo le prescrizioni di cui all'allegato I.

**▼ M8**

- 2.1.3.1.1. Essiccazione del campione
- I campioni con tenore di umidità > 14 % devono essere essiccati prima del trattamento conformemente all'allegato III.
- 2.1.3.1.2. Presetacciatura del campione
- Al fine di raccogliere informazioni su un'eventuale contaminazione ambientale del mangime, si raccomanda di presetacciare a 1 mm i mangimi pellettati e le granaglie e successivamente di preparare, analizzare ed esprimere separatamente le due frazioni risultanti, che devono essere considerate come campioni distinti.
- 2.1.3.2. Precauzioni
- Per evitare rischi di contaminazione crociata in laboratorio, tutte le attrezzature riutilizzabili devono essere accuratamente pulite prima dell'uso. Prima di essere pulito l'imbuto separatore deve essere smontato. I pezzi che compongono l'imbuto separatore e la vetreria devono essere prima lavati a mano e poi in lavastoviglie. I setacci devono essere puliti usando una spazzola a setole sintetiche rigide. Dopo la setacciatura di materie grasse, come le farine di pesce, è raccomandata una pulitura finale dei setacci con acetone e aria compressa.
- 2.1.3.3. Preparazione di campioni costituiti da grassi o oli
- Per la preparazione di campioni costituiti da grassi, seguire il seguente protocollo:
- se il grasso si presenta in forma solida, scaldarlo in un forno fino a liquefarlo.
  - Utilizzando una pipetta, trasferire 40 ml di grasso dal fondo del campione in un tubo di centrifugazione.
  - Centrifugare il campione per 10 min a 4 000 giri/minuto.
  - Se il grasso si presenta in forma solida dopo la centrifugazione, riscaldarlo in un forno fino a liquefarlo.
  - Ripetere la centrifugazione per 5 min a 4 000 giri/minuto.
  - Utilizzando un cucchiaino o una spatola, trasferire metà delle impurità decantate su vetrini per microscopio per l'esame. Si raccomanda il glicerolo come mezzo di montaggio.
  - Utilizzare le impurità restanti per preparare il sedimento come indicato al punto 2.1.3.4.3, primo trattino.
- Applicare lo stesso protocollo, ad eccezione del primo e del quarto trattino, per la preparazione di campioni costituiti da oli.
- 2.1.3.4. Preparazione dei campioni diversi da grassi o oli
- 2.1.3.4.1. Sottocampionamento e macinatura: prelevare dal campione e macinare un sottocampione di almeno 50 g da analizzare.
- 2.1.3.4.2. Preparazione del campione tal quale: preparare un'aliquota di almeno 5 g di sottocampione macinato. Setacciarlo a 0,25 mm e procedere all'esame delle due frazioni risultanti.

**▼M8**

## 2.1.3.4.3. Sedimentazione singola in TCE ai fini dell'individuazione dei costituenti di origine animale diversi dagli invertebrati terrestri.

## — Estrazione e preparazione del sedimento:

trasferire un'aliquota di 10 g (precisione 0,01 g) del sottocampione macinato nell'imbuto separatore o nel decantatore a fondo conico e aggiungere 50 ml di TCE. L'aliquota trasferita nell'imbuto deve essere limitata a 3 g nel caso delle farine di pesce o di altri prodotti di origine esclusivamente animale, di ingredienti minerali o di premiscele che generano più del 10 % di sedimento. Agitare vigorosamente la miscela per almeno 30 secondi e versare con cautela altri 50 ml di TCE sulla superficie interna dell'imbuto per rimuovere le particelle ad esso aderenti. Lasciare riposare la miscela così ottenuta per almeno 5 minuti prima di separare il sedimento aprendo il rubinetto.

Se è utilizzato un decantatore a fondo conico, agitare vigorosamente la miscela per almeno 15 secondi e lavare accuratamente la superficie interna del decantatore con almeno 10 ml di TCE pulito per rimuovere le particelle aderenti alle pareti. Lasciare riposare la miscela per 3 minuti, quindi agitare nuovamente per 15 secondi e lavare accuratamente la superficie interna del decantatore con almeno 10 ml di TCE pulito per rimuovere le particelle aderenti alle pareti. Lasciare riposare la miscela così ottenuta per almeno 5 minuti, quindi rimuovere ed eliminare la frazione liquida travasandola accuratamente, facendo attenzione a non perdere nulla del sedimento.

Il sedimento deve essere raccolto su una carta da filtro posizionata in un imbuto per consentire la separazione del TCE rimanente, evitando al contempo la deposizione di grasso nel sedimento. Il sedimento deve essere lasciato essiccare. Si raccomanda di pesare successivamente il sedimento (con una precisione di 0,001 g) per controllare la fase di sedimentazione. Infine setacciare il sedimento a 0,25 mm e procedere all'esame delle due frazioni risultanti, a meno che la setacciatura non sia ritenuta necessaria.

## — Estrazione e preparazione del flottato:

dopo il recupero del sedimento con il metodo sopra descritto, devono rimanere nell'imbuto separatore due fasi: una fase liquida costituita dal TCE e una fase solida costituita dal materiale flottante. Recuperare la fase solida (flottato) facendo defluire completamente dall'imbuto il TCE aprendo il rubinetto. Rovesciando l'imbuto separatore, trasferire il flottato in una grande piastra Petri e farlo essiccare ad aria in una cappa aspirante. Setacciarlo a 0,25 mm e procedere all'esame delle due frazioni risultanti.

## — Uso di reagenti coloranti

Per facilitare la corretta identificazione dei costituenti di origine animale, l'operatore può utilizzare reagenti di colorazione durante la preparazione dei campioni, seguendo le linee guida emesse dall'EURL-AP e pubblicate sul suo sito web.

▼ **M8**

Il sedimento può essere sottoposto a colorazione utilizzando una soluzione di rosso di alizarina, applicando il seguente protocollo:

- trasferire il sedimento secco in una provetta di vetro e risciacquare due volte con circa 5 ml di etanolo (utilizzare ogni volta un agitatore Vortex per 30 secondi, lasciare decantare il solvente per circa 1 minuto e 30 secondi ed eliminarlo).
- Sbiancare il sedimento aggiungendo almeno 1 ml di soluzione di ipoclorito di sodio. Lasciare reagire per 10 minuti. Riempire d'acqua la provetta, lasciare decantare il sedimento per 2-3 minuti ed eliminare con cautela l'acqua e le particelle in sospensione.
- Risciacquare altre due volte il sedimento con circa 10 ml di acqua (utilizzare un agitatore Vortex per 30 secondi, lasciare decantare ed eliminare l'acqua ogni volta).
- Aggiungere da 2 a 10 gocce di soluzione di rosso di alizarina e agitare nel Vortex la miscela. Lasciare reagire per 30 secondi e risciacquare due volte il sedimento colorato con circa 5 ml di etanolo e poi una volta con acetone (utilizzare ogni volta un agitatore Vortex per 30 secondi, lasciare decantare il solvente per circa 1 minuto ed eliminarlo).
- Essiccare il sedimento colorato.

#### 2.1.3.4.4. Sedimentazione doppia in PE/TCE ai fini dell'individuazione dei costituenti di invertebrati terrestri.

Tutte le fasi devono essere effettuate in un imbuto separatore conico di vetro da 250 ml, come descritto al punto 2.1.2.2, quarto trattino.

- Trasferire un'aliquota di 10 g (precisione 0,01 g) del sottocampione macinato nell'imbuto separatore e sottoporla dapprima a una sedimentazione singola in TCE, come descritto al punto 2.1.3.4.3, compreso il recupero del sedimento su una carta da filtro posizionata su un imbuto. Questo sedimento può essere utilizzato come quello ottenuto come descritto al punto 2.1.3.4.3.
- Trasferire in un cilindro graduato il piccolo volume di TCE fatto colare con il sedimento. Il cilindro graduato deve essere ulteriormente riempito, aprendo il rubinetto dell'imbuto separatore, fino a ottenere 30 ml di TCE. Una volta raggiunto questo volume, chiudere il rubinetto.
- Sostituire il volume raccolto di TCE aggiungendo nell'imbuto separatore un volume di 30 ml di etere di petrolio, con punto di ebollizione compreso tra 40 °C e 60 °C. Mescolare accuratamente il contenuto dell'imbuto separatore per ottenere una miscela costituita da 30 % PE/70 % TCE (con una densità di circa 1,26 g/cm<sup>3</sup>). Lasciare riposare il materiale per 10 minuti. Si separeranno due nuove frazioni: un secondo sedimento e un flottato finale (< 1,26 g/cm<sup>3</sup>). Recuperare il secondo sedimento in una piastra Petri (o su una carta da filtro posizionata su un imbuto) aprendo il rubinetto fino a quando nell'imbuto di separazione restano solo una piccola quantità di miscela solvente e il flottato finale. Raccogliere separatamente su una carta da filtro posizionata su un imbuto il liquido residuo e il flottato finale. Risciacquare la parete dell'imbuto di separazione con un getto di PE per raccogliere tutto il materiale dal flottato finale. Lasciare essiccare il flottato finale. Setacciare il flottato finale a 0,25 mm, a meno che la setacciatura non sia ritenuta necessaria, e procedere all'esame delle due frazioni risultanti ai fini dell'individuazione dei costituenti di invertebrati terrestri.

**▼ M8**2.1.4. *Esame al microscopio*

## 2.1.4.1. Preparazione dei vetrini

Preparare i vetrini per microscopio a partire dal sedimento e, a scelta dell'operatore, dal flottato o dal campione tal quale. Se del caso, unicamente ai fini dell'individuazione dei costituenti di invertebrati terrestri, preparare i vetrini anche a partire dal flottato finale ottenuto come descritto al punto 2.1.3.4.4. Preparare le due frazioni risultanti (fine e grossolana). Le aliquote sottoposte ad analisi delle frazioni distribuite sui vetrini devono essere rappresentative dell'intera frazione.

Preparare un numero di vetrini sufficiente affinché possa essere realizzato un protocollo d'esame completo, come previsto al punto 2.1.4.2.

Montare i vetrini per microscopio con il mezzo di montaggio adeguato secondo le procedure operative standard (POS) stabilite dall'EURL-AP e pubblicate sul suo sito web. Posizionare sui vetrini portaoggetti i vetrini coprioggetti.

## 2.1.4.2. Diagramma di flusso per l'osservazione ai fini dell'individuazione di particelle animali nei mangimi composti, nelle materie prime per mangimi e nelle premiscele

Per l'osservazione dei vetrini per microscopio preparati procedere conformemente ai diagrammi di flusso di cui ai diagrammi 1 e 2.

Le osservazioni microscopiche devono essere effettuate utilizzando il microscopio composto sul sedimento e, a scelta dell'operatore, sul flottato o sul campione tal quale. Inoltre, ai fini dell'individuazione dei costituenti di invertebrati terrestri, deve essere sottoposto a osservazione anche il flottato finale ottenuto come descritto al punto 2.1.3.4.4 conformemente al diagramma 3. Lo stereomicroscopio può essere utilizzato in aggiunta al microscopio composto per l'osservazione delle frazioni grossolane. Ogni vetrino deve essere esaminato interamente a vari ingrandimenti. Precisazioni in merito all'utilizzo dei diagrammi di flusso sono fornite mediante una POS stabilita dall'EURL-AP e pubblicata sul suo sito web.

Il numero minimo di vetrini da osservare in ogni fase dei diagrammi di flusso per l'osservazione deve essere rigorosamente rispettato, a meno che sia impossibile, pur utilizzando tutto il materiale della frazione, raggiungere il numero di vetrini stabilito, ad esempio se non si ottiene alcun sedimento. Al fine di registrare il numero di particelle, per ogni determinazione devono essere osservati non più di 6 vetrini.

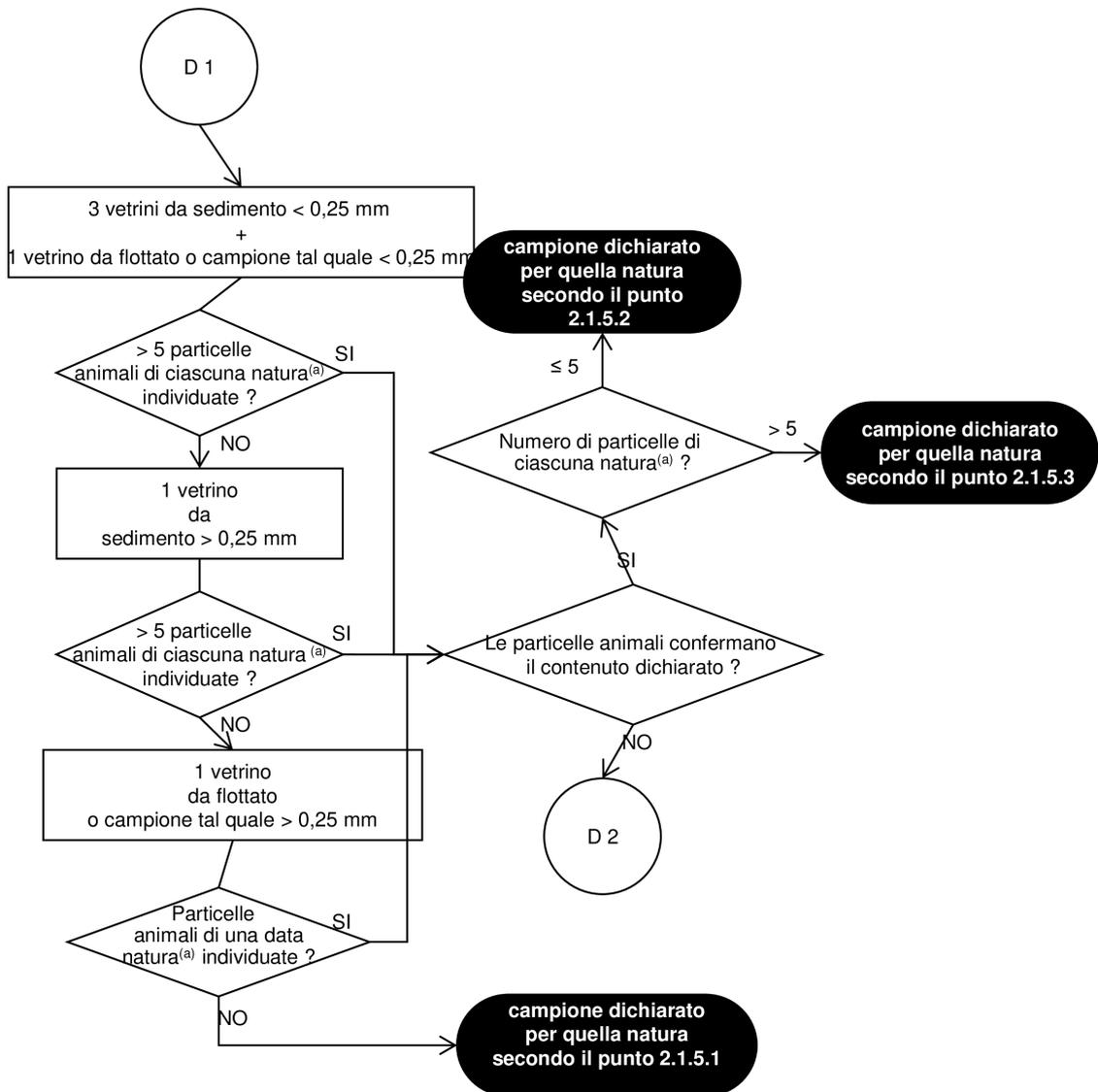
Se si preparano vetrini aggiuntivi a partire dal flottato o dal campione tal quale utilizzando un mezzo di montaggio più specifico con proprietà coloranti, come indicato al punto 2.1.2.1.4, per caratterizzare ulteriormente le strutture (ad esempio piume, peli, muscolo o particelle di sangue) individuate sui vetrini preparati con altri mezzi di montaggio, come indicato al punto 2.1.2.1.3, il numero di particelle deve essere conteggiato in base a un numero di vetrini per determinazione non superiore a 6, compresi i vetrini aggiuntivi per i quali è stato utilizzato un mezzo di montaggio più specifico. I vetrini aggiuntivi, preparati a partire dal flottato finale ottenuto come descritto al punto 2.1.3.4.4, ai fini dell'individuazione dei costituenti di invertebrati terrestri non devono essere presi in considerazione per l'individuazione di elementi di nature diverse (vertebrati terrestri e pesci).

Per facilitare l'identificazione della natura e dell'origine delle particelle, l'operatore può utilizzare ausili quali sistemi di aiuto alle decisioni, gallerie di immagini e campioni di riferimento.

▼ **M8**

Diagramma 1

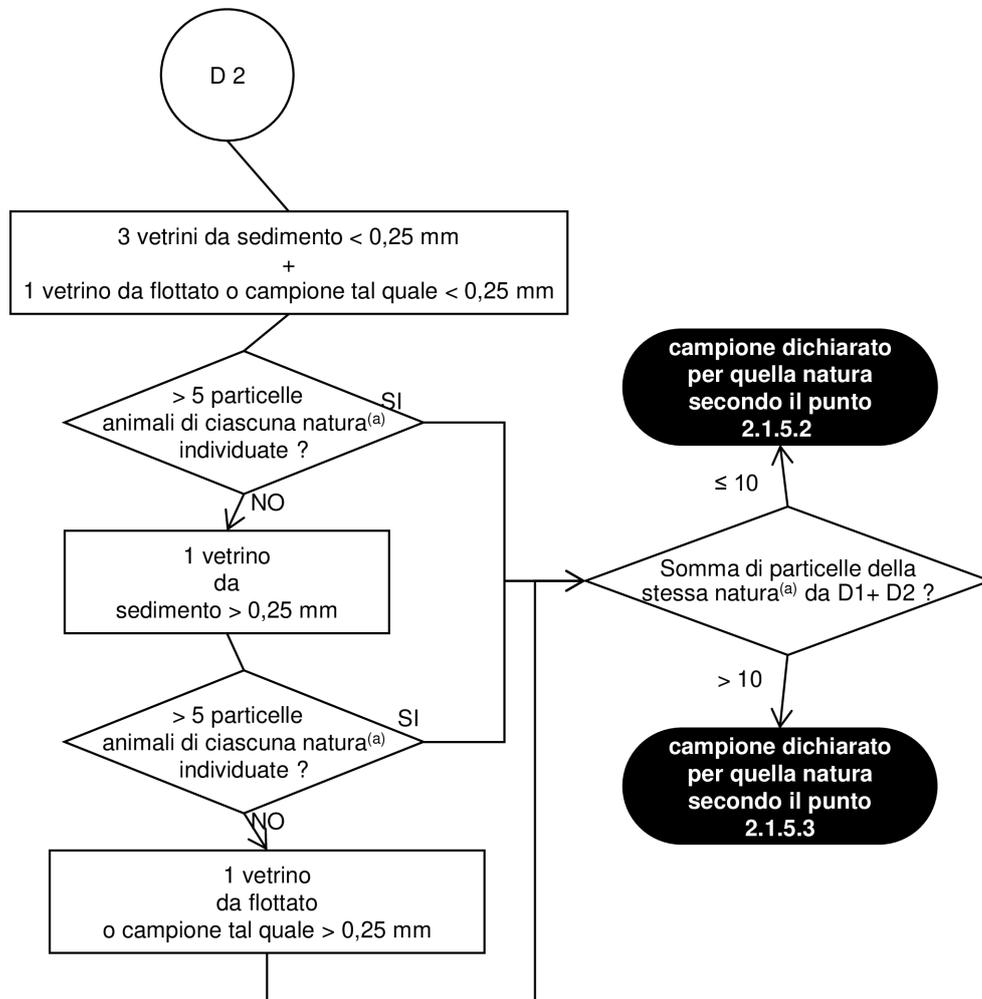
Diagramma di flusso per l'osservazione dopo la sedimentazione singola in TCE ai fini dell'individuazione di particelle animali diverse dagli invertebrati terrestri nei mangimi composti, nelle materie prime per mangimi e nelle premisce per la prima determinazione



▼ **M8**

Diagramma 2

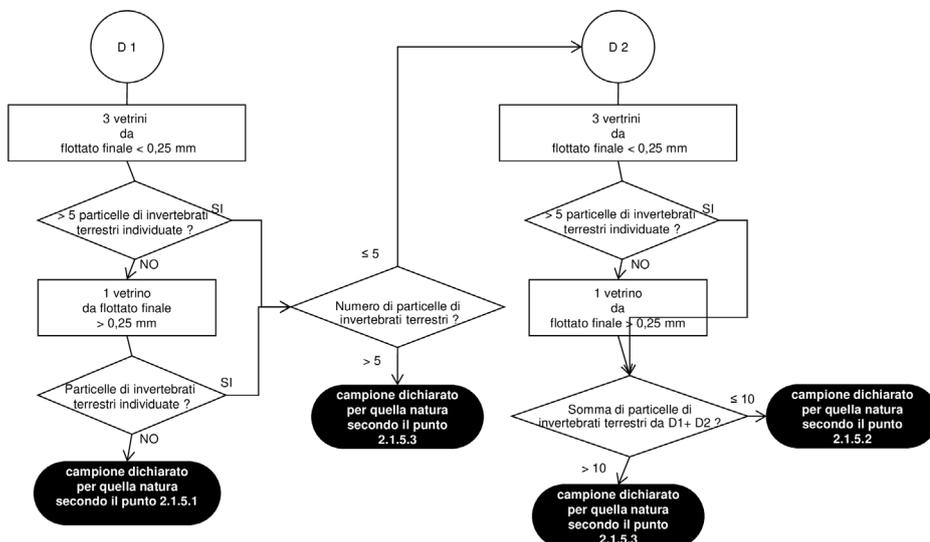
Diagramma di flusso per l'osservazione dopo la sedimentazione singola in TCE ai fini dell'individuazione di particelle animali diverse dagli invertebrati terrestri nei mangimi composti, nelle materie prime per mangimi e nelle premiscele per la seconda determinazione



▼ **M8**

Diagramma 3

**Diagramma di flusso per l'osservazione dopo la sedimentazione doppia in PE/TCE ai fini dell'individuazione dei costituenti di invertebrati terrestri nei mangimi composti, nelle materie prime per mangimi e nelle premiscele**



## 2.1.4.3. Numero di determinazioni

Le determinazioni devono essere effettuate su sottocampioni diversi, ognuno di 50 g.

Se, a seguito della prima determinazione effettuata secondo il diagramma di flusso per l'osservazione figurante nel diagramma 1, o se del caso nel diagramma 3, non sono individuate particelle animali, non è necessaria una determinazione aggiuntiva e il risultato dell'analisi è espresso utilizzando la frase di cui al punto 2.1.5.1.

Se, a seguito della prima determinazione effettuata secondo il diagramma di flusso per l'osservazione figurante nel diagramma 1, sono individuate una o più particelle animali di una data natura (ossia vertebrati terrestri o pesci) e la natura delle particelle individuate conferma il contenuto dichiarato del campione, non è necessaria una seconda determinazione. Se il numero delle particelle animali di una data natura individuate durante tale prima determinazione è superiore a 5, il risultato dell'analisi deve essere espresso in base alla natura animale utilizzando la frase di cui al punto 2.1.5.3. In caso contrario, il risultato dell'analisi deve essere espresso in base alla natura animale utilizzando la frase di cui al punto 2.1.5.2.

Se, a seguito della prima determinazione effettuata secondo il diagramma di flusso per l'osservazione figurante nel diagramma 3, sono individuate più di 5 particelle di invertebrati terrestri, non è necessaria una seconda determinazione e il risultato dell'analisi deve essere espresso utilizzando la frase di cui al punto 2.1.5.3 per tale natura.

▼ **M8**

In tutti gli altri casi, compreso il caso in cui non è stata fornita al laboratorio alcuna dichiarazione del contenuto, effettuare una seconda determinazione a partire da un nuovo sottocampione. Se, a seguito della seconda determinazione effettuata secondo il diagramma di flusso per l'osservazione figurante nel diagramma 2, o se del caso nel diagramma 3, la somma delle particelle animali di una data natura individuate nelle due determinazioni è superiore a 10, il risultato dell'analisi deve essere espresso in base alla natura animale utilizzando la frase di cui al punto 2.1.5.3. In caso contrario, il risultato dell'analisi deve essere espresso in base alla natura animale utilizzando la frase di cui al punto 2.1.5.2.

2.1.5. *Espressione dei risultati*

Quando comunica i risultati, il laboratorio deve indicare il tipo di materiale su cui è stata effettuata l'analisi (sedimento, flottato, flottato finale o campione tal quale). Il rapporto deve indicare chiaramente quante determinazioni sono state effettuate e se non è stata eseguita la setacciatura delle frazioni prima della preparazione dei vetrini, in conformità al punto 2.1.3.4.3, primo trattino, terzo capoverso, o al punto 2.1.3.4.4, terzo trattino.

Il rapporto del laboratorio deve contenere almeno informazioni sulla presenza di costituenti derivati da vertebrati terrestri e da pesci.

Le diverse situazioni devono essere riportate nei modi sottoindicati.

## 2.1.5.1. Non sono state individuate particelle animali di una data natura:

— «Nel campione esaminato al microscopio ottico non sono state individuate particelle derivate da vertebrati terrestri.»

— «Nel campione esaminato al microscopio ottico non sono state individuate particelle derivate da pesci.»

— «Nel campione esaminato al microscopio ottico non sono state individuate particelle derivate da invertebrati terrestri.»

## 2.1.5.2. Se sono individuate tra 1 e 5 particelle animali di una data natura, nel caso in cui sia stata effettuata una sola determinazione, oppure se sono state individuate tra 1 e 10 particelle di una data natura, nel caso in cui siano state effettuate due determinazioni (il numero di particelle individuate è inferiore al limite di decisione stabilito nelle POS dell'EURL-AP e pubblicate sul suo sito web):

se è stata effettuata una sola determinazione:

— «Nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate non più di 5 particelle derivate da vertebrati terrestri. Le particelle sono state identificate come ... [ossa, cartilagine, muscolo, peli, corna, altro (specificare a seconda del caso)]. Questo basso numero di particelle è inferiore al limite di decisione stabilito per questo metodo microscopico.»

— «Nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate non più di 5 particelle derivate da pesci. Le particelle sono state identificate come ... [liscia, scaglia, cartilagine, muscolo, otolite, branchia, altro (specificare a seconda del caso)]. Questo basso numero di particelle è inferiore al limite di decisione stabilito per questo metodo microscopico.»

▼ **M8**

Se sono state effettuate due determinazioni:

- «Nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate non più di 10 particelle derivate da vertebrati terrestri nelle due determinazioni. Le particelle sono state identificate come ... [ossa, cartilagine, muscolo, peli, corna, altro (specificare a seconda del caso)]. Questo basso numero di particelle è inferiore al limite di decisione stabilito per questo metodo microscopico.»
- «Nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate non più di 10 particelle derivate da pesci nel corso delle due determinazioni. Le particelle sono state identificate come ... [lisca, scaglia, cartilagine, muscolo, otolite, branchia, altro (specificare a seconda del caso)]. Questo basso numero di particelle è inferiore al limite di decisione stabilito per questo metodo microscopico.»
- «Nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate non più di 10 particelle derivate da invertebrati terrestri nel corso delle due determinazioni. Le particelle sono state identificate come ... [frammenti di cuticole, parti di bocca, muscoli, strutture tracheali, altro (specificare se del caso)]. Questo basso numero di particelle è inferiore al limite di decisione stabilito per questo metodo microscopico.»

Inoltre:

- se il campione è stato sottoposto a presetacciatura, il rapporto del laboratorio deve indicare in quale frazione (frazione setacciata, frazione pellettata o granuli) sono state individuate le particelle animali, in quanto l'individuazione di particelle animali soltanto nella frazione setacciata può essere il segno di una contaminazione ambientale.
- Se sono individuate solo particelle animali che non possono essere classificate come vertebrati terrestri o pesci (ad esempio fibre muscolari), il rapporto deve indicare che sono state individuate solo tali particelle animali e che non si può escludere la loro provenienza da vertebrati terrestri.

2.1.5.3. Se sono individuate più di 5 particelle animali di una data natura, nel caso in cui sia stata effettuata una sola determinazione, o più di 10 particelle di una data natura, nel caso di due determinazioni:

se è stata effettuata una sola determinazione:

- «Nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate più di 5 particelle derivate da vertebrati terrestri. Le particelle sono state identificate come ... [ossa, cartilagine, muscolo, peli, corna, altro (specificare a seconda del caso)].»
- «Nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate più di 5 particelle derivate da pesci. Le particelle sono state identificate come ... [lisca, scaglia, cartilagine, muscolo, otolite, branchia, altro (specificare a seconda del caso)].»
- «Nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate più di 5 particelle derivate da invertebrati terrestri. Le particelle sono state identificate come ... [frammenti di cuticole, parti di bocca, muscoli, strutture tracheali, altro (specificare a seconda del caso)].»

**▼ M8**

Se sono state effettuate due determinazioni:

- «Nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate più di 10 particelle derivate da vertebrati terrestri nel corso delle due determinazioni. Le particelle sono state identificate come ... [ossa, cartilagine, muscolo, peli, corna, altro (specificare a seconda del caso)].»
- «Nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate più di 10 particelle derivate da pesci nel corso delle due determinazioni. Le particelle sono state identificate come ... [liscia, scaglia, cartilagine, muscolo, otolite, branchia, altro (specificare a seconda del caso)].»
- «Nel campione esaminato al microscopio ottico sono state individuate più di 10 particelle derivate da invertebrati terrestri nel corso delle due determinazioni. Le particelle sono state identificate come ... [frammenti di cuticole, parti di bocca, muscoli, strutture tracheali, altro (specificare a seconda del caso)].»

Inoltre:

- se il campione è stato sottoposto a presetacciatura, il rapporto del laboratorio deve indicare in quale frazione (frazione setacciata, frazione pellettata o granuli) sono state individuate le particelle animali, in quanto l'individuazione di particelle animali soltanto nella frazione setacciata può essere il segno di una contaminazione ambientale.
- Se sono individuate solo particelle animali che non possono essere classificate come vertebrati terrestri o pesci (ad esempio fibre muscolari), il rapporto deve indicare che sono state individuate solo tali particelle animali e che non si può escludere la loro provenienza da vertebrati terrestri.

**▼ M2**

2.2. **Reazione a catena della polimerasi (PCR)**

2.2.1. *Principio*

I frammenti di acido desossiribonucleico (DNA) di origine animale che possono essere presenti nelle materie prime per mangimi e nei mangimi composti sono individuati con una tecnica di amplificazione genica mediante la PCR, mirata a sequenze di DNA specifiche delle specie.

Il metodo PCR richiede dapprima una fase di estrazione del DNA. All'estratto di DNA così ottenuto è quindi applicata la fase di amplificazione per individuare la specie animale bersaglio.

2.2.2. *Reagenti e attrezzature*

2.2.2.1. Reagenti

2.2.2.1.1. Reagenti per l'estrazione del DNA

Utilizzare solo i reagenti approvati dall'EURL-AP e pubblicati sul suo sito web.

2.2.2.1.2. Reagenti per l'amplificazione genica

▼ **M2**

- 2.2.2.1.2.1. Primer e sonde  
Utilizzare solo primer e sonde con sequenze oligonucleotidiche validate dall'EURL-AP <sup>(1)</sup>.
- 2.2.2.1.2.2. Master Mix  
Utilizzare solo soluzioni Master Mix che non contengono reagenti che possono portare a risultati falsi a causa della presenza di DNA animale <sup>(2)</sup>.
- 2.2.2.1.2.3. Reagenti di decontaminazione
- 2.2.2.1.2.3.1. Soluzione di acido cloridrico (0,1N)
- 2.2.2.1.2.3.2. Candeggina (soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,15 % di cloro attivo)
- 2.2.2.1.2.3.3. Reagenti non corrosivi per la decontaminazione di dispositivi costosi come le bilance analitiche (ad esempio DNA Erase<sup>TM</sup> di MP Biomedicals)
- 2.2.2.2. Attrezzature
- 2.2.2.2.1. Bilancia analitica con precisione di 0,001 g
- 2.2.2.2.2. Apparecchiatura di macinazione
- 2.2.2.2.3. Termociclatore per PCR real-time
- 2.2.2.2.4. Microcentrifuga per microprovette
- 2.2.2.2.5. Set di micropipette per prelievi da 1 µl a 1 000 µl
- 2.2.2.2.6. Plastiche standard per biologia molecolare: microprovette per microcentrifuga, puntali con filtro per micropipette, piastre adatte al termociclatore
- 2.2.2.2.7. Congelatori per la conservazione dei campioni e dei reagenti
- 2.2.3. *Campionamento e preparazione del campione*
- 2.2.3.1. Campionamento  
Deve essere utilizzato un campione rappresentativo, prelevato secondo le prescrizioni dell'allegato I.
- 2.2.3.2. Preparazione del campione  
La preparazione dei campioni di laboratorio fino all'estrazione del DNA deve avvenire secondo le prescrizioni dell'allegato II. Dal campione è prelevato e successivamente macinato un sottocampione di almeno 50 g da analizzare.  
  
La preparazione del campione deve essere effettuata in un locale diverso da quelli utilizzati per l'estrazione del DNA e per le reazioni di amplificazione genica, come descritto dalla norma ISO 24276.  
  
Preparare due aliquote del campione in analisi, ciascuna di peso non inferiore a 100 mg.
- 2.2.4. *Estrazione del DNA*  
L'estrazione del DNA è effettuata su ogni aliquota da saggio preparata utilizzando le POS stabilite dall'EURL-AP e pubblicate sul suo sito web.  
  
Per ciascuna serie di estrazioni sono preparati due controlli di estrazione, come descritto dalla norma ISO 24276:  
  
— un controllo di estrazione in bianco,  
  
— un controllo di estrazione del DNA positivo.

<sup>(1)</sup> L'elenco dei primer e delle sonde per ciascuna specie animale bersaglio è disponibile sul sito web dell'EURL-AP.

<sup>(2)</sup> Esempi di Master Mix funzionali sono disponibili sul sito web dell'EURL-AP.

**▼ M2**2.2.5. *Amplificazione genica*

L'amplificazione genica è effettuata utilizzando i metodi convalidati per ciascuna specie da identificare, indicati nelle POS stabilite dall'EURL-AP e pubblicate sul suo sito web. Ogni estratto di DNA è analizzato almeno a due diverse diluizioni per valutare l'inibizione.

Per ogni specie bersaglio sono preparati due controlli di amplificazione, come descritto dalla norma ISO 24276:

- per ciascuna piastra o serie di saggi PCR è utilizzato un controllo positivo del DNA bersaglio,
- per ciascuna piastra o serie di saggi PCR è utilizzato un controllo di amplificazione dei soli reagenti (controllo «no template»).

2.2.6. *Interpretazione ed espressione dei risultati*

Quando comunica i risultati, il laboratorio indica almeno il peso delle aliquote sottoposte ad analisi, la tecnica di estrazione utilizzata, il numero delle determinazioni eseguite e il limite di rilevazione del metodo.

I risultati non devono essere interpretati e comunicati se il controllo positivo dell'estrazione del DNA e i controlli positivi del DNA bersaglio non forniscono risultati positivi per il bersaglio analizzato, mentre il controllo di amplificazione dei soli reagenti è negativo.

Se i risultati delle due aliquote del campione analizzato non sono coerenti, è ripetuto almeno lo step dell'amplificazione genica. Se il laboratorio sospetta che gli estratti di DNA possano essere la causa dell'incoerenza, sono effettuate una nuova estrazione del DNA e una successiva amplificazione genica prima di interpretare i risultati.

L'espressione finale dei risultati si basa sull'integrazione e sull'interpretazione dei risultati delle due aliquote analizzate secondo le POS stabilite dall'EURL-AP e pubblicate sul suo sito web.

## 2.2.6.1. Risultato negativo

Un risultato negativo è espresso come segue:

Nel campione esaminato non è stato individuato DNA di X (X è la specie animale o il gruppo di specie animali bersaglio).

## 2.2.6.2. Risultato positivo

Un risultato positivo è espresso come segue:

Nel campione esaminato è stato individuato DNA di X (X è la specie animale o il gruppo di specie animali bersaglio).

*ALLEGATO VII***METODO DI CALCOLO DEL VALORE ENERGETICO DEGLI ALIMENTI DESTINATI AL POLLAME****1. Metodo di calcolo ed espressione del valore energetico**

Il valore energetico degli alimenti composti destinati ai volatili da cortile è calcolato secondo la formula che segue, in base alle percentuali di alcuni componenti analitici degli alimenti; il valore è espresso in megajoule (MJ) di energia metabolizzabile (ME), corretta in azoto, per chilogrammo di alimento composto:

$\text{MJ/kg di ME} = 0,1551 \times \% \text{ proteina greggia} + 0,3431 \times \% \text{ sostanze grasse gregge} + 0,1669 \times \% \text{ amido} + 0,1301 \times \% \text{ zuccheri totali (espressi in saccarosio)}$ .

**2. Tolleranze applicabili ai valori dichiarati**

Se, a seguito dei controlli ufficiali si constata una differenza (in più o in meno) fra il risultato del controllo del valore energetico dell'alimento e il valore energetico dichiarato, è applicata una tolleranza minima di 0,4 MJ/kg di EM.

**3. Espressione dei risultati**

Previa applicazione della formula suindicata, il risultato ottenuto è approssimato al primo decimale.

**4. Modalità di prelievo dei campioni e metodi di analisi**

Il prelievo del campione dell'alimento composto e la determinazione dei tenori dei componenti analitici impiegati nel metodo di calcolo devono essere effettuati rispettivamente secondo i modi di campionamento e i metodi di analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per animali.

Vanno applicati:

- per la determinazione delle sostanze grasse gregge: la procedura B del metodo per la determinazione delle sostanze grasse gregge, di cui all'allegato III, parte H,
- per la determinazione dell'amido: il metodo polarimetrico, di cui all'allegato III, parte L.



## ALLEGATO VIII

## METODI DI ANALISI PER IL CONTROLLO DELLA PRESENZA ILLECITA NEGLI ALIMENTI PER ANIMALI DI ADDITIVI NON PIÙ AUTORIZZATI

*Osservazioni importanti:*

Possono essere applicati metodi di analisi più sensibili di quelli citati nel presente allegato per individuare la presenza illecita di additivi il cui uso negli alimenti per animali non è più autorizzato.

I metodi di analisi citati nel presente allegato sono utilizzati a fini di conferma.

## A. DETERMINAZIONE DEL METILBENZOQUATO

(7-benzilossi-6-butil-3-metossicarbonil-4-chinolone)

## 1. Finalità e campo d'applicazione

Il metodo consente di determinare il contenuto di metilbenzoquato negli alimenti per animali. Il limite di quantificazione è di 1 mg/kg.

## 2. Principio

Il metilbenzoquato viene estratto dal campione con una soluzione metanolica di acido metansolfonico. L'estratto è purificato con diclorometano, mediante cromatografia a scambio ionico e poi nuovamente con diclorometano. Il tenore del metilbenzoquato è determinato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) in fase inversa utilizzando un rivelatore UV.

## 3. Reattivi

## 3.1. Diclorometano

## 3.2. Metanolo, di qualità HPLC

## 3.3. Fase mobile per HPLC

miscela di metanolo (3.2) e acqua (di qualità HPLC) 75 + 25 (v + v).

Filtrare la soluzione attraverso un filtro di 0,22 µm (4.5) e degassarla (ad esempio sottoponendola per 10 minuti a trattamento con ultrasuoni).

## 3.4. Soluzione di acido metansolfonico, c = 2 %

Diluire 20,0 ml di acido metansolfonico e portarlo a 1 000 ml con metanolo (3.2).

## 3.5. Soluzione di acido cloridrico, c = 10 %.

Prelevare 100 ml d'acido cloridrico (ρ<sub>20</sub> 1,18 g/ml) e portare a 1 000 ml con acqua.

## 3.6. Resina scambiatrice di cationi Amberlite CG-120 (Na), 100-200 mesh

La resina viene pretrattata prima dell'uso. Sospendere 100 g di resina con 500 ml di soluzione di acido cloridrico (3.5) e portare ad ebollizione su piastra calda continuando ad agitare. Lasciare raffreddare e decantare l'acido. Filtrare attraverso carta da filtro sotto vuoto. Lavare due volte la resina con 500 ml di acqua e poi con 250 ml di metanolo (3.2). Risciacquare una seconda volta la resina con 250 ml di metanolo ed essiccarla insufflando aria attraverso il pannello del filtro. Conservare la resina essiccata in una bottiglia chiusa con tappo.

## 3.7. Sostanza di riferimento (standard): metilbenzoquato puro (7-benzilossi-6-butil-3-metossicarbonil-4-chinolone).

**▼B****3.7.1. Soluzione madre standard di metilbenzoquato, 500 µg/ml**

Pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 50 mg di sostanza standard (3.7), scioglierli in soluzione di acido metansolfonico (3.4) in un pallone tarato da 100 ml, portare a volume e miscelare.

**3.7.2. Soluzione standard intermedia di metilbenzoquato, 50 µg/ml**

Trasferire 5,0 ml della soluzione madre standard di metilbenzoquato (3.7.1) in un pallone tarato da 50 ml, portare a volume con metanolo (3.2) e miscelare.

**3.7.3. Soluzioni di taratura**

In una serie di palloni tarati da 25 ml, trasferire 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 ml della soluzione standard intermedia di metilbenzoquato (3.7.2). Portare a volume con la fase mobile (3.3) e miscelare. Queste soluzioni presentano rispettivamente concentrazioni di 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 µg/ml di metilbenzoquato. Esse devono essere preparate al momento, poco prima dell'uso.

**4. Apparecchiatura****4.1. Agitatore da laboratorio****4.2. Evaporatore rotante a film****4.3. Colonna di vetro (250 mm × 15 mm) dotata di rubinetto e serbatoio della capacità di circa 200 ml****4.4. Apparecchiatura HPLC a rivelatore UV, a lunghezza d'onda variabile, oppure rivelatore a serie di diodi.****4.4.1. Colonna per cromatografia liquida: 300 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, particelle di riempimento 10 µm, o equivalente****4.5. Filtri a membrana, da 0,22 µm.****4.6. Filtri a membrana, da 0,45 µm.****5. Procedimento****5.1. Indicazioni generali****5.1.1. Analizzare un campione di alimento bianco, per accertare l'assenza del metilbenzoquato o di altre sostanze che possono interferire.****5.1.2. Procedere a una prova di recupero, analizzando un campione in bianco dell'alimento addizionato con una quantità di metilbenzoquato simile a quella presente nel campione. Per ottenere una concentrazione di 15 mg/kg, aggiungere 600 µl della soluzione madre standard (3.6.1) a 20 g dell'alimento bianco, mescolare e attendere 10 minuti prima di procedere all'estrazione (5.2).**

Nota: Ai fini del presente metodo, l'alimento bianco ha una composizione simile a quella del campione e all'analisi il metilbenzoquato non deve risultare presente.

**5.2. Estrazione**

Pesare, con l'approssimazione di 0,01 g, circa 20 g del campione preparato e trasferirli in una beuta da 250 ml. Aggiungere 100,0 ml di soluzione di acido metansolfonico (3.4) e agitare in agitatore meccanico (4.1) per 30 minuti. Filtrare la soluzione attraverso carta da filtro e conservare il filtrato per la fase di separazione liquido-liquido (5.3).

**5.3. Separazione liquido-liquido**

In un imbuto separatore da 500 ml contenente 100 ml di soluzione di acido cloridrico (3.5), trasferire 25,0 ml del filtrato ottenuto come descritto al punto (5.2). Introdurre nell'imbuto 100 ml di diclorometano (3.1) e agitare per 1 minuto. Lasciare separare gli strati e versare lo

**▼B**

strato inferiore (diclorometano) in un pallone da 500 ml. Ripetere l'estrazione della fase acquosa con altri due volumi di 40 ml di diclorometano e riunirli con il primo estratto nel pallone a fondo arrotondato. Evaporare a secchezza nell'evaporatore rotante (4.2) l'estratto di diclorometano a 40 °C a pressione ridotta. Sciogliere il residuo in 20-25 ml di metanolo (3.2), tappare il pallone e conservare tutto l'estratto per la cromatografia a scambio ionico (5.4).

#### 5.4. *Cromatografia a scambio ionico*

##### 5.4.1. Preparazione della colonna a scambio cationico

Inserire un tappo di lana di vetro nell'estremità inferiore di una colonna di vetro (4.3). Preparare una sospensione di 5,0 g della resina a scambio cationico trattata (3.6) con 50 ml di acido cloridrico (3.5), versare nella colonna di vetro e far decantare. Scaricare l'eccesso di acido fino a poco sopra la superficie della resina e lavare la colonna con acqua fino a quando l'effluente è neutro al tornasole. Trasferire 50 ml di metanolo (3.2) nella colonna e drenare fino alla superficie della resina.

##### 5.4.2. Cromatografia su colonna

Mediante una pipetta, trasferire accuratamente l'estratto ottenuto come descritto al punto 5.3 nella colonna. Risciacquare il pallone con due volumi di 5-10 ml di metanolo (3.2) e trasferire questi liquidi di lavaggio nella colonna. Scaricare l'estratto fino alla superficie della resina e lavare la colonna con 50 ml di metanolo facendo attenzione che lei defluiscono ad una velocità pari o inferiore a 5 ml al minuto. Eliminare tutto il filtrato. Eluire il metilbenzoato dalla colonna utilizzando 150 ml di soluzione di acido metansolfonico (3.4) e raccogliere l'eluato della colonna in una beuta da 250 ml.

##### 5.5. *Separazione liquido-liquido*

Trasferire l'eluato ottenuto come descritto al punto 5.4.2 in un imbuto separatore da 1 litro. Risciacquare la beuta con 5-10 ml di metanolo (3.2) e aggiungere il liquido di risciacquo al contenuto dell'imbuto separatore. Aggiungere 300 ml di soluzione di acido cloridrico (3.5) e 130 ml di diclorometano (3.1). Agitare per 1 minuto e lasciar separare le fasi. Versare lo strato inferiore (diclorometano) in un matraccio a fondo arrotondato da 500 ml. Ripetere l'estrazione della fase acquosa con altri due volumi di 70 ml di diclorometano e aggiungere questi estratti al primo nel matraccio.

In evaporatore rotante evaporare a secchezza (4.2) l'estratto di diclorometano a 40 °C a pressione ridotta. Sciogliere il residuo contenuto nel pallone con circa 5 ml di metanolo (3.2) e trasferire quantitativamente questa soluzione in un matraccio tarato da 10 ml. Risciacquare il pallone con altri due volumi di 1-2 ml di metanolo e trasferire anche questi nel matraccio tarato. Portare a volume con il metanolo e miscelare. Un'aliquota viene filtrata attraverso un filtro a membrana (4.6). Conservare questa soluzione per la determinazione mediante HPLC (5.6).

#### 5.6. *Determinazione HPLC*

##### 5.6.1. Parametri

I parametri seguenti sono proposti a titolo indicativo; è possibile operare in condizioni diverse, purché si ottengano risultati equivalenti:

— Colonna per cromatografia liquida (4.4.1.)

— Fase mobile per HPLC: miscela metanolo-acqua (3.3)

— Velocità di efflusso: 1-1,5 ml/minuto

— Lunghezza d'onda di rivelazione: 265 nm

— Volume d'iniezione: 20-50 µl.

**▼B**

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando più volte la soluzione di taratura (3.7.3) contenente 4 µg/ml fino a ottenimento di altezze o aree del picco e tempi di ritenzione costanti.

**5.6.2. Curva di taratura**

Iniettare più volte ciascuna soluzione di taratura (3.7.3) e misurare le altezze (aree) del picco per ciascuna concentrazione. Tracciare una curva di taratura riportando in ordinate l'altezza media o l'area media dei picchi delle soluzioni di taratura e in ascisse le corrispondenti concentrazioni in µg/ml.

**5.6.3. Soluzione del campione**

Iniettare più volte l'estratto del campione (5.5) utilizzando lo stesso volume usato per le soluzioni di taratura e determinare l'altezza (area) media dei picchi del metilbenzoquato.

**6. Calcolo dei risultati**

Determinare la concentrazione della soluzione del campione in g/ml in base all'altezza (area) media dei picchi del metilbenzoquato, per riferimento alla curva di taratura (5.6.2).

Il contenuto di metilbenzoquato  $w$  (mg/kg) del campione è dato dalla formula seguente:

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

dove

$c$  = concentrazione del metilbenzoquato nella soluzione del campione in g/ml

$m$  = peso della quantità di sostanza da analizzare, in grammi.

**7. Convalida dei risultati****7.1. Identità**

L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia oppure mediante un rivelatore a serie di diodi che permetta di confrontare gli spettri dell'estratto del campione e della soluzione di taratura (3.7.3) contenente 10 µg/ml.

**7.1.1. Co-cromatografia**

Un estratto del campione viene «rinforzato» mediante un quantitativo adeguato della soluzione standard intermedia (3.7.2). Il quantitativo di metilbenzoquato addizionato deve essere analogo a quello stimato di metilbenzoquato rilevato nell'estratto del campione.

Deve aumentare soltanto l'altezza del picco del metilbenzoquato, tenuto conto sia della quantità di metilbenzoquato aggiunta che della diluizione dell'estratto. L'ampiezza del picco, a metà della sua altezza massima, deve corrispondere, con uno scostamento massimo del 10 %, all'ampiezza originale.

**7.1.2. Rivelazione a serie di diodi**

I risultati sono valutati in base ai seguenti criteri:

- a) la lunghezza d'onda di assorbimento massimo degli spettri del campione e dello standard, registrata all'apice del picco sul cromatogramma, deve essere la stessa entro un margine determinato dal potere di risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione a serie di diodi, tale margine è in genere di circa 2 nm;

**▼B**

- b) fra 225 e 300 nm, gli spettri del campione e dello standard registrati all'apice del picco sul cromatogramma non devono differire tra loro per le parti dello spettro situate fra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi valori massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto tra i due spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dell'analita standard;
- c) tra 220 e 350 nm, gli spettri relativi all'estratto del campione, registrati nel tratto ascendente, all'apice e nel tratto discendente del picco cromatografico, non devono differire tra loro per le parti dello spettro situate fra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi valori massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto fra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dello spettro al vertice del picco.

Se uno di questi criteri non è soddisfatto, la presenza dell'analita non è confermata.

### 7.2. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare: il 10 % del valore ottenuto più elevato per contenuti di metilbenzoato compresi tra 4 e 20 mg/kg.

### 7.3. Recupero

Per il campione bianco addizionato, il recupero non è inferiore al 90 %.

## 8. Risultati di uno studio collaborativo

Cinque campioni sono stati analizzati da 10 laboratori. Ogni campione è stato analizzato due volte.

	In bianco	Farina 1	Granulare 1	Farina 2	Granulare 2
media [mg/kg]	NR	4,50	4,50	8,90	8,70
$s_r$ [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50
$CV_r$ [ %]	—	6,70	4,40	6,70	5,70
$s_R$ [mg/kg]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
$CV_R$ [ %]	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Recupero [ %]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

NR = non riscontrata

$s_r$  = deviazione standard della ripetibilità

$CV_r$  = coefficiente di variazione della ripetibilità, %

$s_R$  = deviazione standard della riproducibilità

$CV_R$  = coefficiente di variazione della riproducibilità, %

## B. DETERMINAZIONE DELL'OLAQUINDOX

2-[N-2'-(idrossietil) carbamoil]-3-metilchinoxalin- $N^1,N^4$ -biossido

### 1. Finalità e campo d'applicazione

Il metodo consente di determinare il contenuto di olaquindox negli alimenti per animali. Il limite di quantificazione è di 5 mg/kg.

### 2. Principio

Il campione viene estratto con una miscela acqua/metanolo. Il tenore di olaquindox è determinato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a fase inversa, utilizzando un rivelatore UV.

**▼ B****3. Reattivi**

3.1. Metanolo

3.2. Metanolo, di qualità HPLC

3.3. Acqua, di qualità HPLC

3.4. Fase mobile per HPLC

Miscela acqua (3.3)-metanolo (3.2), 900 + + 100 (v + v)

3.5. Sostanza di riferimento (standard): olaquinox puro: 2-[N-2'-(idrossietil)carbamoil]-3-metilchinossalina-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-biossido, E 851.

3.5.1. Soluzione madre standard di olaquinox, 250 µg/ml

Pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 50 mg di olaquinox (3.5) in un matraccio tarato da 200 ml ed aggiungere circa 190 ml di acqua. Immergere quindi il matraccio per 20 minuti in un bagno ultrasonico (4.1). Dopo il trattamento ultrasonico raffreddare la soluzione a temperatura ambiente, portare a volume con acqua e mescolare. Avvolgere il matraccio in un foglio di alluminio e conservare in frigorifero. La soluzione va preparata di fresco ogni mese.

3.5.2. Soluzione standard intermedia di olaquinox, 25 µg/ml.

Travasare 10,0 ml di soluzione madre standard (3.5.1) in un matraccio tarato da 100 ml, portare a volume con la fase mobile (3.4) ed agitare. Avvolgere il matraccio in un foglio di alluminio e conservare in frigorifero. La soluzione va preparata di fresco quotidianamente.

3.5.3. Soluzioni di taratura

In una serie di matracci tarati da 50 ml trasferire 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 ml della soluzione standard intermedia (3.5.2). Portare a volume con la fase mobile (3.4) e miscelare. Avvolgere il pallone in foglio di alluminio. Queste soluzioni corrispondono rispettivamente a 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 µg/ml di olaquinox.

Queste soluzioni vanno preparate di fresco quotidianamente.

**4. Apparecchiatura**

4.1. Bagno ultrasonico

4.2. Agitatore meccanico

4.3. Apparecchiatura HPLC con rivelatore UV, a lunghezza d'onda variabile, oppure con rivelatore a serie diodi

4.3.1. Colonna per cromatografia liquida, da 250 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, particelle di riempimento 10 µm, o equivalente

4.4. Filtri a membrana, da 0,45 µm.

**5. Procedimento**

*Nota:* L'olaquinox è fotosensibile. Effettuare tutte le operazioni in luce soffusa, oppure usare vetreria scura.

5.1. *Indicazioni generali*

5.1.1. Analizzare un alimento di riferimento (bianco), per accertare l'assenza di olaquinox o di altre sostanze che possono interferire.

5.1.2. Effettuare una prova di recupero analizzando il bianco addizionato di una quantità di olaquinox analoga a quella presente nel campione. Per ottenere una concentrazione di 50 mg/kg, trasferire 10,0 ml della

**▼ B**

soluzione madre standard (3.5.1) in una beuta da 250 ml e far evaporare la soluzione a circa 0,5 ml. Aggiungere 50 g del bianco, mescolare il tutto e attendere 10 minuti, agitando più volte, prima di procedere all'estrazione (5.2).

*Nota:* Ai fini del presente metodo, il bianco ha una composizione simile a quella del campione e all'analisi l'olaquinox non deve risultare presente.

### 5.2. Estrazione

Pesare, con l'approssimazione di 0,01 g, 50 g circa del campione. Trasferire in una beuta da 1 000 ml, aggiungere 100 ml di metanolo (3.1) e immergere per 5 minuti la beuta in un bagno ultrasonico (4.1). Aggiungere 410 ml di acqua e lasciare nel bagno ultrasonico per altri 15 minuti. Togliere la beuta dal bagno, agitare per 30 minuti mediante l'agitatore (4.2) e filtrare attraverso un filtro a pieghe. Trasferire 10,0 ml del filtrato in un matraccio tarato da 20 ml, portare a volume con acqua e agitare. Filtrare un'aliquota attraverso un filtro a membrana (4.4). (cfr. osservazione al punto 9). Procedere alla determinazione HPLC (5.3).

### 5.3. Determinazione HPLC

#### 5.3.1. Parametri:

Le seguenti condizioni vengono proposte a titolo indicativo; è possibile operare in condizioni diverse, purché si ottengano risultati equivalenti.

Colonna analitica (4.3.1)

Fase mobile (3.4): miscela acqua (3.3) — metanolo (3.2)  
900 + 100 (v + v)

Velocità di efflusso: 1,5-2 ml/min

Lunghezza d'onda di rivelazione: 380 nm

Volume di iniezione: 20 µl-100 µl

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando più volte la soluzione di taratura (3.5.3) contenente 2,5 µg/ml, fino a ottenimento di altezze del picco e tempi di ritenzione costanti.

#### 5.3.2. Curva di taratura

Iniettare più volte ciascuna soluzione di taratura (3.5.3) e determinare le altezze (le aree) medie dei picchi per ciascuna concentrazione. Tracciare una curva di taratura indicando le altezze (aree) medie dei picchi delle soluzioni di taratura sulle ordinate e le concentrazioni corrispondenti in µg/ml nelle ascisse.

#### 5.3.3. Soluzione del campione

Iniettare più volte l'estratto del campione (5.2) utilizzando lo stesso volume usato per le soluzioni di taratura e determinare l'altezza (area) media dei picchi dell'olaquinox.

## 6. Calcolo dei risultati

Determinare la concentrazione della soluzione del campione in µg/ml in base all'altezza (area) media dei picchi dell'olaquinox, per riferimento alla curva di taratura (5.3.2).

Il tenore *w* di olaquinox, espresso in mg/kg del campione, è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

**▼B**

dove

c = concentrazione di olaquinox nell'estratto del campione (5.2) espressa in µg/ml

m = peso della sostanza da analizzare in g (5.2).

## 7. Convalida dei risultati

### 7.1. Identità

L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia, oppure mediante un rivelatore a serie di diodi che permetta di confrontare gli spettri dell'estratto del campione (5.2) e della soluzione di taratura (3.7.3) contenente 5,0 µg/ml.

#### 7.1.1. Co-cromatografia

Un estratto del campione (5.2) viene «rinforzato» mediante aggiunta di un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (3.5.3). Il quantitativo di olaquinox aggiunto deve essere simile a quello di olaquinox rilevato nell'estratto del campione.

Deve aumentare soltanto l'altezza del picco dell'olaquinox, tenuto conto sia della quantità aggiunta che della diluizione dell'estratto. L'ampiezza del picco, a metà della sua altezza, deve corrispondere, con uno scostamento massimo del 10 %, all'ampiezza originale del picco dell'olaquinox nell'estratto del campione non addizionato.

#### 7.1.2. Rivelazione a serie di diodi

I risultati sono valutati in base ai seguenti criteri:

- a) la lunghezza d'onda di assorbimento massimo degli spettri del campione e dello standard, registrata all'apice del picco sul cromatogramma, deve essere la stessa entro un margine determinato dal potere di risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione a serie di diodi, tale margine è in genere di circa 2 nm;
- b) fra 220 e 400 nm, gli spettri del campione e dello standard registrati all'apice del picco sul cromatogramma non devono essere diversi per le parti dello spettro situate fra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi valori massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto tra i due spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dell'analita standard;
- c) fra 220 e 400 nm, gli spettri relativi all'estratto del campione, registrati nel tratto ascendente, all'apice e nel tratto discendente del picco cromatografico, non devono differire tra loro per le parti dello spettro situate fra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi valori massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto tra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dello spettro al vertice del picco.

Se uno di questi criteri non è soddisfatto, la presenza dell'analita non è confermata.

### 7.2. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare il 15 % del risultato più elevato per contenuti di olaquinox compresi tra 10 e 200 mg/kg.

### 7.3. Recupero

Per il campione bianco addizionato, il recupero non è inferiore al 90 %.

**▼B****8. Risultati di uno studio collaborativo**

È stato organizzato uno studio comunitario in cooperazione tra vari laboratori nel corso del quale tredici laboratori hanno analizzato quattro campioni di alimenti per suinetti, ivi compreso un alimento bianco. I risultati dello studio figurano nella tabella seguente:

	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
media [mg/kg]	—	14,6	48,0	95,4
S <sub>r</sub> [mg/kg]	—	0,82	2,05	6,36
S <sub>R</sub> [mg/kg]	—	1,62	4,28	8,42
CV <sub>r</sub> [ %]	—	5,6	4,3	6,7
CV <sub>R</sub> [ %]	—	11,1	8,9	8,8
Contenuto nominale [mg/kg]	—	15	50	100
recupero %	—	97,3	96,0	95,4

L = numero di laboratori  
n = numero di valori singoli  
S<sub>r</sub> = deviazione standard della ripetibilità  
S<sub>R</sub> = deviazione standard della riproducibilità  
CV<sub>r</sub> = coefficiente di variazione della ripetibilità  
CV<sub>R</sub> = coefficiente di variazione della riproducibilità

**9. Osservazione**

Anche se il metodo non è stato convalidato per alimenti contenenti quantità superiori a 100 mg/kg di olaquinox, è possibile ottenere risultati soddisfacenti pesando una quantità di campione più piccola e/o diluendo l'estratto (5.2) fino a ottenere una concentrazione entro il campo della curva di taratura.

**C. DETERMINAZIONE DELL'AMPROLIUM**

*Cloridrato di cloruro di 1-[(4-ammino-2-propil-5 pirimidinil)metil]-2-picolinio*

**1. Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di amprolium negli alimenti per animali e nelle premiscele. Il limite di rilevazione è di 1 mg/kg, la soglia di quantificazione è di 5 mg/kg.

**2. Principio**

Il campione è estratto con una miscela metanolo/acqua. Dopo diluizione con la fase mobile e filtrazione per membrana, il contenuto di amprolium è determinato per cromatografia in fase liquida ad alta prestazione (HPLC) a scambio cationico, utilizzando un rivelatore UV.

**3. Reattivi**

3.1. Metanolo

3.2. Acetonitrile, di qualità HPLC

3.3. Acqua, di qualità HPLC

3.4. Soluzione di fosfato monosodico, c = 0,1 mol/l

In un matraccio tarato da 1 000 ml, sciogliere 13,80 g di fosfato monosodico monoidrato in acqua (3.3), portare a volume con acqua (3.3) e mescolare.

3.5. Soluzione di perclorato sodico, c = 1,6 mol/l

In un matraccio tarato da 1 000 ml, sciogliere 224,74 g di perclorato sodico monoidrato in acqua (3.3), portare a volume con acqua (3.3) e mescolare.

**▼ B**

- 3.6. Fase mobile per HPLC (cfr. osservazione 9.1)
- Miscela di acetonitrile (3.2), soluzione di fosfato monosodico (3.4) e soluzione di perclorato sodico (3.5), 450+450+100 (v+v+v). Prima dell'impiego, filtrare attraverso filtro a membrana da 0,22 µm (4.3) e degassare la soluzione [ad esempio nel bagno ultrasonico (4.4), per almeno 15 minuti].
- 3.7. Sostanza di riferimento (standard): cloridrato di cloruro di 1-[(4-ammino-2-propilpirimidin5-il)metil]-2-metil-piridinio (amprolium, E 750), di purezza garantita (cfr. punto 9.2).
- 3.7.1. Soluzione madre standard di amprolium, 500 µg/ml
- In un matraccio tarato da 100 ml, pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 50 mg di amprolium (3.7); sciogliere in 80 ml di metanolo (3.1) e immergere per 10 minuti il matraccio in bagno ultrasonico (4.4). Dopo il trattamento a ultrasuoni raffreddare la soluzione a temperatura ambiente, portare a volume con acqua e mescolare. A temperatura non superiore a 4 °C la soluzione si mantiene stabile per un mese.
- 3.7.2. Soluzione standard intermedia di amprolium, 50 µg/ml.
- In un matraccio tarato da 50 ml, pipettare 5,0 ml della soluzione madre standard (3.7.1), portare a volume col solvente di estrazione (3.8) e mescolare. A temperatura non superiore a 4 °C la soluzione si mantiene stabile per un mese.
- 3.7.3. Soluzioni di taratura
- Trasferire 0,5, 1,0 e 2,0 ml della soluzione standard intermedia (3.7.2) in una serie di matracci tarati da 50 ml. Portare a volume con la fase mobile (3.6) e miscelare. Queste soluzioni corrispondono rispettivamente a 0,5, 1,0 e 2,0 µg/ml di amprolium. Esse vanno preparate al momento, prima dell'uso.
- 3.8. Solvente di estrazione
- Miscela metanolo (3.1)-acqua 2+1 (v+v)
- 4. Apparecchiatura**
- 4.1. Apparecchiatura HPLC con sistema di iniezione adeguato per volumi da 100 µl.
- 4.1.1. Colonna per cromatografia liquida, 125 mm x 4 mm, a scambio cationico (riempimento: Nucleosil 10 SA, 5 o 10 µm) o equivalente.
- 4.1.2. Rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile o rivelatore a serie di diodi
- 4.2. Filtro a membrana in PTFE, da 0,45 µm.
- 4.3. Filtro a membrana, da 0,22 µm
- 4.4. Bagno ultrasonico
- 4.5. Agitatore meccanico o magnetico
- 5. Procedimento**
- 5.1. *Indicazioni generali*
- 5.1.1. Alimento «bianco»
- Per poter procedere alla prova di recupero (5.1.2) analizzare un alimento di riferimento (bianco), per accertare l'assenza di amprolium o di altre sostanze che possono interferire. L'alimento bianco ha una composizione simile a quella del campione e all'analisi l'amprolium o sostanze capaci di interferire non devono risultare presenti.

**▼B**

## 5.1.2 Prova di recupero

Effettuare una prova di recupero analizzando il bianco addizionato di una quantità di amprolium simile a quella presente nel campione. Per ottenere una concentrazione di 100 mg/kg, trasferire 10,0 ml della soluzione madre standard (3.7.1) in una beuta da 250 ml e far evaporare la soluzione a circa 0,5 ml. Aggiungere 50 g del bianco, mescolare il tutto e attendere per 10 minuti, agitando più volte, prima di procedere all'estrazione (5.2).

Se non fosse disponibile un bianco di tipo simile a quello del campione (cfr. punto 5.1.1), la prova di recupero può essere eseguita col metodo di addizione della sostanza di riferimento. In questo caso, un'aliquota del campione da analizzare viene addizionata di una quantità nota di amprolium, analoga a quella già presente. Quest'aliquota viene analizzata insieme a una del campione non addizionato e il recupero può essere calcolato per differenza.

## 5.2. Estrazione

## 5.2.1. Premiscele (contenuto &lt; 1 % di amprolium) e alimenti per animali

A seconda del contenuto di amprolium, pesare, con l'approssimazione di 0,01 g, da 5 g a 40 g di campione in una beuta da 500 ml a fondo conico e aggiungere 200 ml di solvente di estrazione (3.8). Collocare la beuta nel bagno ultrasonico (4.4) e mantenervela per 15 minuti. Togliere la beuta dal bagno, agitare per un'ora mediante l'agitatore o col mescolatore magnetico (4.5). Diluire una parte di estratto con la fase mobile (3.6) sino ad ottenere un tenore di amprolium di 0,5-2 µg/ml e mescolare (cfr. osservazione 9.3). Filtrare 5-10 ml di questa soluzione diluita attraverso un filtro a membrana (4.2). Procedere alla determinazione HPLC (5.3).

## 5.2.2. Premiscele (contenuto ≥ 1 % di amprolium)

A seconda del contenuto di amprolium, pesare, con l'approssimazione di 0,001 g, da 1 a 4 g di premiscela in una beuta da 500 ml e aggiungere 200 ml di solvente di estrazione (3.8). Collocare la beuta nel bagno ultrasonico (4.4) e mantenervela per 15 minuti. Togliere la beuta dal bagno, agitare per un'ora mediante l'agitatore o col mescolatore magnetico (4.5). Diluire una parte di estratto con la fase mobile (3.6) sino ad ottenere un contenuto di amprolium di 0,5-2 µg/ml e mescolare. Filtrare 5-10 ml di questa soluzione diluita attraverso un filtro a membrana (4.2). Procedere alla determinazione HPLC (5.3).

## 5.3. Determinazione HPLC

## 5.3.1. Parametri:

Le seguenti condizioni vengono proposte a titolo indicativo; è possibile operare in condizioni diverse, purché si ottengano risultati equivalenti.

Colonna per cromatografia liquida (4.1.1):	125 mm × 4 mm, a scambio cationico (riempimento: Nucleosil 10 SA, 5 o 10 µm, o equivalente)
Fase mobile (3.6):	miscela di acetonitrile (3.2), soluzione di fosfato monosodico (3.4) e soluzione di perclorato sodico (3.5), 450+450+100 (v+v+v).
Velocità di efflusso:	0,7-1 ml/min
Lunghezza d'onda di rivelazione:	264 nm
Volume d'iniezione:	100 µl

**▼B**

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando varie volte la soluzione di taratura (3.7.3) contenente 1,0 µg/ml, fino a ottenimento di altezze del picco e tempi di ritenzione costanti.

5.3.2. **Curva di taratura**

Iniettare più volte ciascuna soluzione di taratura (3.7.3) e determinare le altezze (aree) medie del picco per ciascuna concentrazione. Tracciare una curva di taratura indicando le altezze (aree) medie del picco delle soluzioni di taratura sulle ordinate e le concentrazioni corrispondenti in µg/ml nelle ascisse.

5.3.3. **Soluzione del campione**

Iniettare più volte l'estratto del campione (5.2), utilizzando lo stesso volume di quello prelevato per le soluzioni di taratura e determinare le altezze (aree) medie del picco dell'amprolium.

6. **Calcolo dei risultati**

Determinare la concentrazione della soluzione del campione in µg/ml in base all'altezza (area) media dei picchi dell'amprolium, per riferimento alla curva di taratura (5.3.2).

Il contenuto *w* di amprolium nel campione, espresso in mg/kg, è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

dove

*V* = volume del solvente di estrazione (3.8) espresso in ml conformemente al punto 5.2 (ossia 200 ml)

*c* = concentrazione di amprolium nell'estratto del campione (5.2) espresso in µg/ml

*f* = fattore di diluizione conformemente al punto 5.2.2

*m* = peso della quantità di sostanza da analizzare, in grammi.

7. **Convalida dei risultati**7.1. **Identità**

L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia oppure mediante un rivelatore a serie di diodi che permetta di confrontare gli spettri dell'estratto del campione (5.2) e della soluzione di taratura (3.7.3) contenente 2,0 µg/ml.

7.1.1. **Co-cromatografia**

Un estratto del campione (5.2) viene «rinforzato» mediante aggiunta di un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (3.7.3). Il quantitativo di amprolium aggiunto deve essere simile a quello di amprolium rilevato nell'estratto del campione.

Deve aumentare soltanto l'altezza del picco dell'amprolium, tenuto conto sia del quantitativo aggiunto che della diluizione dell'estratto. L'ampiezza del picco, a metà della sua altezza, deve corrispondere, con uno scostamento massimo del 10 %, all'ampiezza originale del picco dell'amprolium nell'estratto del campione non addizionato.

7.1.2. **Rivelazione a serie di diodi**

I risultati sono valutati in base ai seguenti criteri:

- a) la lunghezza d'onda dell'assorbimento massimo degli spettri del campione e dello standard, registrata al vertice del picco sul cromatogramma, deve essere la stessa entro un margine determinato dal potere di risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione a serie di diodi, tale margine è in genere di circa 2 nm;

**▼B**

- b) fra 210 e 320 nm, gli spettri del campione e dello standard registrati al vertice del picco sul cromatogramma non devono essere diversi per le parti dello spettro situate fra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi valori massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto fra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dell'analita standard;
- c) fra 210 e 320 nm, gli spettri relativi all'estratto del campione, registrati nel tratto ascendente, all'apice e nel tratto discendente del picco cromatografico, non devono differire tra loro per le parti dello spettro situate fra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi valori massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto fra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dello spettro al vertice del picco.

Se uno di questi criteri non è soddisfatto, la presenza dell'analita non è confermata.

7.2. *Ripetibilità*

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare:

- il 15 % del valore più elevato, per i contenuti di amprolium compresi fra 25 mg/kg e 500 mg/kg,
- 75 mg/kg per i contenuti di amprolium compresi fra 500 mg/kg e 1 000 mg/kg,
- il 7,5 % del valore più elevato, per i contenuti di amprolium superiori a 1 000 mg/kg.

7.3. *Recupero*

Per un campione addizionato (bianco), il recupero non è inferiore al 90 %.

8. **Risultati di uno studio collaborativo**

E' stato organizzato uno studio in cooperazione tra vari laboratori nel corso del quale sono stati analizzati tre alimenti per pollame (campioni 1-3), un alimento minerale (campione 4) e una premiscela (campione 5). I risultati dello studio figurano nella seguente tabella:

	Campione 1 (bianco)	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
media [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
$s_r$ [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
$CV_r$ [ %]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
$s_R$ [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
$CV_R$ [ %]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
contenuto nominale [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

- L : numero di laboratori  
n : numero di valori singoli  
 $s_r$  : deviazione standard della ripetibilità  
 $CV_r$  : coefficiente di variazione della ripetibilità  
 $s_R$  : deviazione standard della riproducibilità  
 $CV_R$  : coefficiente di variazione della riproducibilità

**▼B****9. Osservazioni**

- 9.1. Se il campione contiene tiamina, il relativo picco compare nel cromatogramma poco prima di quello dell'amprolium. Secondo questo metodo, l'amprolium e la tiamina debbono essere separati. Se l'amprolium e la tiamina non vengono separati dalla colonna (4.1.1) impiegata con questo metodo, sostituire con metanolo fino al 50 % della porzione di acetone nitrile della fase mobile (3.6).
- 9.2. Secondo la farmacopea britannica, lo spettro di una soluzione di amprolium ( $c = 0,02 \text{ mol/l}$ ) in acido cloridrico ( $c = 0,1 \text{ mol/l}$ ) presenta valori massimi a 246 nm e 262 nm. L'assorbanza è di 0,84 a 246 nm e di 0,80 a 262 nm.
- 9.3. L'estratto deve essere sempre diluito con la fase mobile, poiché altrimenti il tempo di ritenzione del picco dell'amprolium potrebbe spostarsi significativamente per effetto delle variazioni della forza ionica.

**D. DETERMINAZIONE DEL CARBADOX**

*Metil-3-(2-chinossalinilmetilene) carbazato- $N^1, N^4$ -diossido*

**1. Finalità e campo d'applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di carbadox negli alimenti per animali, nelle premiscele e nei preparati. Il limite di rilevazione è di 1 mg/kg, la soglia di quantificazione è di 5 mg/kg.

**2. Principio**

Il campione viene equilibrato con acqua ed estratto con metanolo-acetonitrile. Nel caso degli alimenti per animali, un'aliquota dell'estratto filtrato è sottoposta a purificazione su una colonna di allumina. Per le premiscele e i preparati, un'aliquota dell'estratto filtrato è diluita con acqua, metanolo e aceto nitrile, fino a ottenere una concentrazione adeguata. Il contenuto di carbadox è determinato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) in fase inversa, usando un rivelatore UV.

**3. Reattivi**

- 3.1. Metanolo
- 3.2. Acetonitrile, di qualità HPLC
- 3.3. Acido acetico,  $w = 100 \%$
- 3.4. Ossido d'alluminio: neutro, grado di attività I
- 3.5. Metanolo-acetonitrile 1 + 1 (v + v)
- Miscelare 500 ml di metanolo (3.1) con 500 ml di acetonitrile (3.2).
- 3.6. Acido acetico,  $\sigma = 10 \%$
- Diluire con acqua 10 ml di acido acetico (3.3) e portare a 100 ml.
- 3.7. Acetato di sodio
- 3.8. Acqua, di qualità HPLC
- 3.9. Soluzione tampone di acetato,  $c = 0,01 \text{ mol/l}$ ,  $\text{pH} = 6,0$
- Sciogliere 0,82 g di acetato di sodio (3.7) in 700 ml d'acqua (3.8) e regolare il pH a 6,0 con acido acetico (3.6). Trasferire in un matraccio tarato da 1000 ml, portare a volume con acqua (3.8) e mescolare.
- 3.10. Fase mobile per HPLC
- Miscelare 825 ml di soluzione tampone di acetato (3.9) con 175 ml di acetonitrile (3.2).
- Filtrare la soluzione attraverso un filtro da  $0,22 \mu\text{m}$  (4.5) e degassarla (ad esempio sottoponendola per 10 minuti a trattamento con ultrasuoni).

**▼B**

## 3.11. Sostanza di riferimento (standard):

Carbadox allo stato puro: Metil-3-(2-chinossalinilmetilene) carbazato- $N^1,N^4$ -diossido, E 850

## 3.11.1. Soluzione madre standard di carbadox, 100 µg/ml (cfr. nota 5. Procedimento):

In un matraccio tarato da 250 ml, pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 25 mg di carbadox standard. Sciogliere la sostanza in metanolo-acetonitrile (3.5) sottoponendola a trattamento con ultrasuoni (4.7). Dopo il trattamento con ultrasuoni, raffreddare a temperatura ambiente, portare a volume con metanolo-acetonitrile (3.5) e mescolare. Avvolgere il matraccio in un foglio d'alluminio o usare vetreria scura e conservare in frigorifero. A temperatura non superiore a 4 °C la soluzione si mantiene stabile per un mese.

## 3.11.2. Soluzioni di taratura

Trasferire 2,0, 5,0, 10,0 e 20,0 ml della soluzione madre standard (3.11.1) in una serie di matracci tarati da 100 ml. Aggiungere 30 ml d'acqua, portare a volume con metanolo-acetonitrile (3.5) e mescolare. Avvolgere i matracci in foglio d'alluminio. Queste soluzioni corrispondono rispettivamente a 2,0, 5,0, 10,0 e 20,0 µg/ml di carbadox.

Le soluzioni di taratura devono essere preparate al momento, poco prima dell'uso.

*Nota:* per la determinazione del carbadox negli alimenti per animali contenenti meno di 10 mg/kg si dovranno preparare soluzioni di taratura a concentrazioni inferiori a 2,0 µg/ml.

## 3.12. Miscela acqua -[metanolo-acetonitrile] (3.5), 300 + 700 (v + v).

Mescolare 300 ml d'acqua con 700 ml della miscela di metanolo-acetonitrile (3.5).

**4. Apparecchiatura**

## 4.1. Agitatore da laboratorio o mescolatore magnetico

## 4.2. Carta da filtro in fibra di vetro (Whatman GF/A o equivalente)

## 4.3. Colonna in vetro (lunghezza: 300-400 mm, diametro interno: 10 mm circa), con setto in vetro sinterizzato e valvola di scarico.

*Nota:* Si può anche impiegare una colonna di vetro provvista di rubinetto oppure una colonna di vetro a estremità affusolata. In questo caso, si deve inserire un piccolo tampone di lana di vetro all'estremità inferiore e pressarlo verso il basso con una bacchetta di vetro.

## 4.4. Apparecchiatura HPLC con sistema di iniezione adeguato per volumi da 20 µl.

4.4.1. Colonna per cromatografia liquida: 300 mm × 4 mm,  $C_{18}$ , particelle di riempimento 10 µm, o equivalente

## 4.4.2. Rivelatore UV con regolazione variabile della lunghezza d'onda o rivelatore a serie di diodi, funzionante nell'intervallo di 225-400 nm.

## 4.5. Filtro a membrana, da 0,22 µm.

## 4.6. Filtro a membrana, da 0,45 µm.

## 4.7. Bagno ultrasonico

**▼B****5. Procedimento**

*Nota:* Il carbadox è fotosensibile. Effettuare tutte le operazioni in luce soffusa oppure usare vetreria scura o avvolta in foglio d'alluminio.

**5.1. Indicazioni generali****5.1.1. Alimento «bianco»**

Per poter procedere alla prova di recupero (5.1.2) analizzare un alimento di riferimento (bianco), per accertare l'assenza di carbadox o di altre sostanze che possono interferire. Il bianco ha una composizione simile a quella del campione e all'analisi il carbadox o sostanze capaci di interferire non devono risultare presenti.

**5.1.2. Prova di recupero**

Effettuare una prova di recupero analizzando il bianco (5.1.1) addizionato di una quantità di carbadox simile a quella presente nel campione. Per ottenere una concentrazione di 50 mg/kg, introdurre 5,0 ml della soluzione madre standard (3.11.1) in una beuta da 200 ml. Far evaporare la soluzione a 0,5 ml circa, in corrente di azoto. Aggiungere 10 g dell'alimento bianco, mescolare per 10 minuti prima di procedere all'estrazione (5.2).

Se non fosse disponibile un bianco di tipo simile a quello del campione (cfr. punto 5.1.1), la prova di recupero può essere eseguita col metodo di addizione della sostanza di riferimento. In questo caso, un'aliquota del campione da analizzare viene addizionata di una quantità nota di carbadox, analoga a quella già presente. Quest'aliquota viene analizzata insieme a una del campione non addizionato e il recupero può essere calcolato per differenza.

**5.2. Estrazione****5.2.1. Alimenti per animali**

Pesare, con l'approssimazione di 0,01 g, 10 g del campione e trasferirli in una beuta da 200 ml. Aggiungere 15,0 ml di acqua, mescolare ed equilibrare per 5 minuti. Aggiungere 35,0 ml di metanolo-acetonitrile (3.5), tappare e agitare per 30 minuti sull'agitatore o col mescolatore magnetico (4.1). Filtrare la soluzione attraverso carta da filtro in fibra di vetro (4.2). Conservare questa soluzione per la fase di purificazione (5.3).

**5.2.2. Premiscele (0,1-2,0 %)**

Pesare, con l'approssimazione di 0,001 g, 1 g del campione non macinato e trasferirlo in una beuta da 200 ml. Aggiungere 15,0 ml di acqua, mescolare ed equilibrare per 5 minuti. Aggiungere 35,0 ml di metanolo-acetonitrile (3.5), tappare ed agitare per 30 minuti sull'agitatore o col mescolatore magnetico (4.1). Filtrare la soluzione attraverso carta da filtro in fibra di vetro (4.2).

Pipettare un'aliquota del filtrato in un matraccio tarato da 50 ml. Aggiungere 15,0 ml d'acqua, portare a volume con metanolo-acetonitrile (3.5) e mescolare. La concentrazione di carbadox nella soluzione finale è di circa 10 g/ml. Filtrare un'aliquota attraverso un filtro a membrana da 0,45 µm (4.6).

Procedere alla determinazione HPLC (5.4).

**5.2.3. Preparati (> 2 %)**

Pesare, con l'approssimazione di 0,001 g, 0,2 g del campione non macinato e trasferirli in una beuta da 250 ml. Aggiungere 45,0 ml d'acqua,

**▼ B**

mescolare ed equilibrare per 5 minuti. Aggiungere 105,0 ml di metanolo-acetonitrile (3.5), coprire e omogeneizzare. Sottoporre il campione a ultrasuoni (4.7) per 15 minuti, poi scuotere o agitare per 15 minuti (4.1). Filtrare la soluzione attraverso carta da filtro in fibra di vetro (4.2).

Diluire un'aliquota del filtrato con la miscela acqua-metanolo-acetonitrile (3.12) fino ad ottenere una concentrazione finale di carbadox dell'ordine di 10-15 µg/ml (per un preparato al 10 %, il fattore di diluizione è 10). Filtrare un'aliquota attraverso un filtro da 0,45 µm (4.6).

Procedere alla determinazione HPLC (5.4).

### 5.3. *Purificazione*

#### 5.3.1. Preparazione della colonna di ossido di alluminio

Pesare 4 g di ossido di alluminio (3.4) e trasferire nella colonna di vetro (4.3).

#### 5.3.2. Purificazione del campione

Far passare 15 ml dell'estratto filtrato (5.2.1) per la colonna di ossido di alluminio ed eliminare i primi 2 ml di eluato. Raccogliere i successivi 5 ml e filtrare un'aliquota attraverso un filtro da 0,45 µm (4.6).

Procedere alla determinazione HPLC (5.4).

### 5.4. *Determinazione HPLC*

#### 5.4.1. Parametri

Le seguenti condizioni sono proposte a titolo indicativo; è possibile operare in condizioni diverse purché si ottengano risultati equivalenti.

Colonna per cromatografia liquida (4.4.1):	300 mm × 4 mm, C <sub>18</sub> , particelle di riempimento 10 µm o equivalente
Fase mobile (3.10):	Miscela di soluzione tampone di acetato (3.9) e acetonitrile (3.2), 825 + 175 (v + v)
Velocità di efflusso:	1,5-2 ml/min
Lunghezza d'onda di rivelazione:	365 nm
Volume di iniezione:	20 µl

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando più volte la soluzione di taratura (3.11.2) contenente 5,0 µg/ml, fino a ottenimento di altezze del picco e tempi di ritenzione costanti.

#### 5.4.2. Curva di taratura

Iniettare più volte ciascuna soluzione di taratura (3.11.2) e determinare le altezze (aree) del picco per ciascuna concentrazione. Tracciare una curva di taratura riportando in ordinata le altezze (aree) medie del picco della soluzione di taratura e in ascissa le corrispondenti concentrazioni, espresse in µg/ml.

#### 5.4.3. Soluzione del campione

Iniettare più volte l'estratto del campione [(5.3.2) per gli alimenti, (5.2.2) per le premiscelate e (5.2.3) per i preparati], e determinare l'altezza (area) media dei picchi del carbadox.

**▼B****6. Calcolo dei risultati**

Determinare la concentrazione della soluzione del campione in µg/ml in base all'altezza (area) media dei picchi del carbadox, per riferimento alla curva di taratura (5.4.2).

**6.1. Alimenti per animali**

Il contenuto  $w$  (mg/kg) di carbadox nel campione è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

dove

$c$  = concentrazione di carbadox nell'estratto del campione (5.2) espresso in µg/ml

$V_1$  = volume dell'estratto espresso in ml (ossia 50 ml)

$m$  = peso della quantità di sostanza da analizzare, in grammi.

**6.2. Premiscele e preparati**

Il contenuto  $w$  (mg/kg) di carbadox nel campione è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

dove

$c$  = concentrazione di carbadox nell'estratto del campione (5.2.2 o 5.2.3) espresso in µg/ml

$V_2$  = volume dell'estratto espresso in ml (ossia 50 ml per le premiscele; 150 ml per i preparati)

$f$  = fattore di diluizione conformemente ai punti 5.2.2 (premiscele) e 5.2.3 (preparati)

$m$  = peso della quantità di sostanza da analizzare, in grammi.

**7. Convalida dei risultati****7.1. Identità**

L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia oppure mediante un rivelatore a serie di diodi che permetta di confrontare gli spettri dell'estratto del campione e della soluzione di taratura (3.11.2) contenente 10,0 µg/ml.

**7.1.1. Co-cromatografia**

Un estratto del campione viene «rinforzato» mediante aggiunta di un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (3.11.2). Il quantitativo di carbadox aggiunto deve essere simile a quello stimato rilevato nell'estratto del campione.

Deve aumentare soltanto l'altezza del picco del carbadox tenuto conto sia del quantitativo di carbadox aggiunto che della diluizione dell'estratto. L'ampiezza del picco, a metà della sua altezza massima, deve corrispondere, con uno scostamento massimo del 10 %, dall'ampiezza originale.

**7.1.2. Rivelazione a serie di diodi**

I risultati sono valutati in base ai seguenti criteri:

- a) la lunghezza d'onda dell'assorbimento massimo degli spettri del campione e dello standard, registrata al vertice del picco sul cromatogramma, deve essere la stessa entro un margine determinato dal potere di risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione a serie di diodi, tale margine è in genere di circa 2 nm;

**▼ B**

- b) fra 225 e 400 nm, gli spettri del campione e dello standard registrati all'apice del picco cromatografico non devono differire tra loro per le parti dello spettro situate fra il 10 % e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi valori massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto tra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dell'analita standard;
- c) fra 225 e 400 nm, gli spettri relativi all'estratto del campione, registrati nel tratto ascendente, all'apice e nel tratto discendente del picco cromatografico, non devono differire tra loro per quelle parti dello spettro situate tra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi valori massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto tra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dello spettro all'apice del picco.

Se uno di questi criteri non è soddisfatto, la presenza dell'analita non è confermata.

7.2. *Ripetibilità*

Per contenuti di 10 mg/kg e superiori, la differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare il 15 % rispetto al risultato più elevato.

7.3. *Recupero*

Per un campione addizionato (bianco), il recupero non è inferiore al 90 %.

8. **Risultati di uno studio collaborativo**

È stato organizzato uno studio in cooperazione tra vari laboratori nel corso del quale otto laboratori hanno analizzato sei alimenti per animali, quattro premiscele e tre preparati. Ogni campione è stato analizzato due volte. (Per maggiori informazioni consultare: *Journal of the AOAC, Volume 71, 1998, pag. 484-490*). I risultati (ad esclusione di quelli fuori campo) sono mostrati di seguito:

Tabella 1.

**Risultati dello studio collaborativo sugli alimenti per animali**

	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
media (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S <sub>r</sub> (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV <sub>r</sub> (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S <sub>R</sub> (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV <sub>R</sub> (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
contenuto nominale (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabella 2.

**Risultati dello studio collaborativo sulle premiscele e sui preparati**

	Premiscele				Preparati		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
media (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S <sub>r</sub> (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV <sub>r</sub> (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S <sub>R</sub> (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7

**▼B**

	Premiscele				Preparati		
	A	B	C	D	A	B	C
CV <sub>R</sub> (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
contenuto nominale (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L : numero di laboratori

n : numero di valori singoli

S<sub>r</sub> : deviazione standard della ripetibilità

CV<sub>r</sub> : coefficiente di variazione della ripetibilità

S<sub>R</sub> : deviazione standard della riproducibilità

CV<sub>R</sub> : coefficiente di variazione della riproducibilità