



2024/771

15.3.2024

REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2024/771 DELLA COMMISSIONE

del 29 febbraio 2024

recante modifica del regolamento (CE) n. 152/2009 che fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (UE) 2017/625 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 15 marzo 2017, relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari, recante modifica dei regolamenti (CE) n. 999/2001, (CE) n. 396/2005, (CE) n. 1069/2009, (CE) n. 1107/2009, (UE) n. 1151/2012, (UE) n. 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio, dei regolamenti (CE) n. 1/2005 e (CE) n. 1099/2009 del Consiglio e delle direttive 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE del Consiglio, e che abroga i regolamenti (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE del Consiglio e la decisione 92/438/CEE del Consiglio (regolamento sui controlli ufficiali) ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 34, paragrafo 6,

considerando quanto segue:

- (1) Il regolamento (CE) n. 152/2009 della Commissione ⁽²⁾ fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali.
- (2) I metodi di campionamento e d'analisi fissati dal regolamento (CE) n. 152/2009 dovrebbero essere adattati alla luce degli sviluppi delle conoscenze scientifiche e tecnologiche. Il presente regolamento dovrebbe introdurre numerose modifiche minori che tengano conto dell'esperienza acquisita nell'applicazione del metodo di analisi o chiariscano talune disposizioni.
- (3) Il metodo di campionamento descritto nel regolamento (CE) n. 152/2009 non è adeguato per il campionamento ai fini del controllo della contaminazione microbiologica ed è pertanto escluso dall'ambito di applicazione. Tuttavia il fatto che, a seguito della modifica apportata dal regolamento (UE) n. 691/2013 ⁽³⁾, esso non sia più esplicitamente escluso dall'ambito di applicazione ha generato una certa confusione ed è pertanto opportuno escluderlo di nuovo esplicitamente dall'ambito di applicazione.
- (4) È opportuno introdurre disposizioni specifiche per il campionamento dei mangimi commercializzati dagli operatori del settore dei mangimi tramite una tecnica di comunicazione a distanza, dato che la vendita di alimenti per animali mediante tali tecniche è in aumento. In aggiunta alle disposizioni sull'incertezza di misura analitica e sul recupero in caso di analisi di sostanze indesiderabili, è opportuno introdurre disposizioni analoghe anche per l'analisi del contenuto di additivi per mangimi, dato che tali disposizioni sono pertinenti anche in questo caso. Poiché è dimostrato che l'applicazione del metodo di analisi per la determinazione dell'urea al di fuori dell'ambito dell'autorizzazione dell'urea come additivo per mangimi genera risultati analitici errati, è opportuno specificare l'ambito di applicazione di tale metodo e aggiungere informazioni riguardanti la valutazione del metodo e i risultati di uno studio collaborativo.
- (5) Diversi metodi di analisi fissati dal regolamento (CE) n. 152/2009 dovrebbero essere soppressi in quanto non sono più validi per i fini previsti. Il metodo di analisi per la determinazione delle basi azotate volatili e il metodo per la determinazione dei carbonati dovrebbero essere soppressi in quanto nella legislazione dell'Unione in materia di mangimi non vi è più alcun obbligo giuridico di controllare la conformità. L'attuale metodo di analisi per la determinazione del diclazuril contiene errori di natura redazionale e di conseguenza non fornisce risultati analitici affidabili. È pertanto opportuno sostituirlo con un metodo adattato che ha dimostrato di fornire risultati affidabili. I

⁽¹⁾ GUL 95 del 7.4.2017, pag. 1.

⁽²⁾ 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 gli animali (GUL 54 del 26.2.2009, pag. 1).

⁽³⁾ Regolamento (UE) n. 691/2013 della Commissione, del 19 luglio 2013, che modifica il regolamento (CE) n. 152/2009 per quanto riguarda i metodi di campionamento e di analisi (GUL 197 del 20.7.2013, pag. 1).

nuovi metodi di analisi del gossipolo libero e totale hanno dimostrato che il metodo di analisi per la determinazione del gossipolo libero e totale fissato dal regolamento (CE) n. 152/2009 non fornisce risultati affidabili e dovrebbe pertanto essere soppresso e sostituito da un riferimento alle norme europee (norme EN). I metodi di analisi per il controllo della presenza illecita di additivi il cui uso non è più autorizzato negli alimenti per animali dovrebbero essere soppressi in quanto nel frattempo sono stati sviluppati approcci di screening e metodi di analisi più sensibili.

- (6) Oltre ai metodi di analisi descritti negli allegati del presente regolamento, è opportuno fare riferimento alle norme EN da utilizzare nei controlli ufficiali.
- (7) Poiché il regolamento di esecuzione (UE) 2021/2047 della Commissione (*) ha autorizzato l'amprolio come nuovo additivo per mangimi, è opportuno aggiungere un metodo di analisi per la determinazione dell'amprolio nell'allegato IV del regolamento (CE) n. 152/2009.
- (8) Poiché le modifiche del regolamento (CE) n. 152/2009 sono sostanziali e riguardano più disposizioni presenti negli allegati dello stesso, per motivi di chiarezza è opportuno sostituire integralmente tali allegati.
- (9) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del comitato permanente per le piante, gli animali, gli alimenti e i mangimi,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

Modifiche del regolamento (CE) n. 152/2009

Il regolamento (CE) n. 152/2009 è così modificato:

- 1) all'articolo 1, il primo comma è sostituito dal seguente:

«Il campionamento per il controllo ufficiale degli alimenti per animali, in particolare per quanto concerne la determinazione dei costituenti, compresi i materiali che contengono o sono costituiti da o sono prodotti a partire da organismi geneticamente modificati (OGM), gli additivi per mangimi come definiti dal regolamento (CE) n. 1831/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio (*) e le sostanze indesiderabili quali definite dalla direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio (**) è effettuato conformemente ai metodi di cui all'allegato I, ad eccezione del campionamento per il controllo della contaminazione microbiologica.»;

(*) Regolamento (CE) n. 1831/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, sugli additivi destinati all'alimentazione animale (GU L 268 del 18.10.2003, pag. 29).

(**) Direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 7 maggio 2002, relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali (GU L 140 del 30.5.2002, pag. 10).

- 2) l'allegato I è sostituito dal testo che figura nell'allegato I del presente regolamento;
- 3) l'allegato II è sostituito dal testo che figura nell'allegato II del presente regolamento;
- 4) l'allegato III è sostituito dal testo che figura nell'allegato III del presente regolamento;
- 5) l'allegato IV è sostituito dal testo che figura nell'allegato IV del presente regolamento;
- 6) l'allegato V è sostituito dal testo che figura nell'allegato V del presente regolamento;
- 7) l'allegato VII è sostituito dal testo che figura nell'allegato VI del presente regolamento;
- 8) l'allegato VIII è soppresso.

(*) Regolamento di esecuzione (UE) 2021/2047 della Commissione, del 23 novembre 2021, relativo all'autorizzazione del cloridrato di amprolio (COXAM) come additivo per mangimi destinati ai polli da ingrasso e alle pollastre allevate per la produzione di uova (titolare dell'autorizzazione: HuvePharma NV) (GU L 418 del 24.11.2021, pag. 13).

*Articolo 2***Entrata in vigore**

Il presente regolamento entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 29 febbraio 2024

Per la Commissione
La presidente
Ursula VON DER LEYEN

ALLEGATO I

«ALLEGATO I

METODI DI CAMPIONAMENTO

1. FINALITÀ E CAMPO DI APPLICAZIONE

I campioni destinati al controllo ufficiale degli alimenti per animali sono prelevati secondo i metodi sottoindicati. I campioni così ottenuti sono da considerarsi rappresentativi delle partite campionate.

Lo scopo del campionamento rappresentativo è 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, a un controllo visivo o in base ad altre informazioni pertinenti, 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 conforme ai requisiti UE, si presume che i risultati valgano per tutti i mangimi di tale lotto salvo che, a seguito di una valutazione approfondita, risulti infondato ritenere che il resto del lotto non sia conforme ai requisiti UE.

Il campionamento può comprendere anche i mangimi commercializzati dagli operatori del settore dei mangimi tramite una tecnica di comunicazione a distanza conformemente all'articolo 11, paragrafo 3, del regolamento (CE) n. 767/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio ⁽¹⁾. Il campionamento dei mangimi commercializzati tramite una tecnica di comunicazione a distanza è soggetto, in linea di principio, ai punti indicati nel presente allegato. Aspetti specifici del campionamento dei campioni di vendite a distanza sono descritti al punto 11.

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 globale (mescolato), del campione ridotto o del campione globale omogeneizzato, a seconda del tipo di controllo (cfr. punto 9.4).
- Campione di laboratorio: campione destinato al laboratorio (come ricevuto dal laboratorio) che può essere il campione finale, il campione ridotto o il campione globale.
- Campione di vendite a distanza: campione di un lotto di mangime commercializzato tramite una tecnica di comunicazione a distanza.

⁽¹⁾ 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 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 (GU L 229 dell'1.9.2009, pag. 1).

3. DISPOSIZIONI GENERALI

- I campioni sono prelevati da personale appositamente autorizzato dall'autorità competente.
- Nel caso dei campioni di vendite a distanza, l'autorità competente richiede una quantità di mangime all'operatore del settore dei mangimi tramite una comunicazione a distanza.
- 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.
- 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 o campione ridotto sono prelevati i seguenti campioni finali: uno come controllo (verifica dell'applicazione della normativa) e uno per l'operatore del settore dei mangimi (campione per la difesa in caso di controversia). Infine può essere prelevato un altro campione finale come riferimento. Nel caso in cui 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.
- A norma dell'articolo 15, paragrafi 1 e 2, del regolamento (UE) 2017/625, se necessario per l'esecuzione del campionamento ufficiale, gli operatori del settore dei mangimi, su richiesta dalle autorità competenti:
 - concedono al personale delle autorità competenti l'accesso alle attrezzature sotto il loro controllo, anche mettendo a disposizione, se necessario, attrezzature per il campionamento e dispositivi di protezione individuale adeguati;
 - forniscono assistenza e collaborano con il personale delle autorità competenti per consentire il campionamento, anche mettendo a disposizione di tale personale gli alimenti per animali.

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. Gli strumenti meccanici sono considerati appropriati quando consentono 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.

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 campionate 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 ai punti 5.1.1, 5.1.3 e 5.1.5; 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 dimensione della partita campionata 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 punto, si adotta la procedura di campionamento indicata al punto 5.3.
- Nel caso dei campioni di vendite a distanza, di norma l'autorità competente non conosce la dimensione del lotto per il quale è richiesto il quantitativo. La procedura di cui ai punti 5.1 e 5.2 non può pertanto essere utilizzata. In tal caso si applica la procedura descritta al punto 11.
- 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 punto 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	$\sqrt{}$ (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.

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 seguente come «unità». Le unità grandi (≥ 500 kg o litri) si campionano in base alle disposizioni previste 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 $\sqrt{\text{(numero di unità che costituiscono la partita campionata) (***)}$, 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 e mattonelle di sali minerali*

Occorre campionare almeno un formellato o una mattonella per partita campionata di 25 unità, fino a 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	$\sqrt{\text{(punto 5 volte il numero di tonnellate che costituiscono la partita campionata) (**)}$, 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; per il campionamento di questo tipo di lotti è stata elaborata una guida, disponibile all'indirizzo https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf.

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

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

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 distribuita in modo non uniforme negli alimenti per animali.

Nel caso in cui l'autorità di controllo sospetti fortemente che una tale distribuzione non uniforme si presenti anche in caso di contaminazione crociata da un costituente 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 distribuiti 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 negli alimenti per animali.

6. REQUISITI QUANTITATIVI RIGUARDANTI IL CAMPIONE GLOBALE

È richiesto un solo campione globale per partita campionata.

	Natura degli alimenti	Dimensione minima del campione globale (*) (**)
6.1.	Alimenti alla rinfusa	4 kg
6.2.	Alimenti in confezioni	4 kg (***)
6.3.	Alimenti liquidi o semiliquidi	4 litri
6.4.	Alimenti minerali 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 formellati o mattonelle originari
6.5.	Foraggio grossolano/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/grani.

(***) 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/foraggio a bassa densità specifica (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 quantitativi che seguono.

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 semi/grani.
(**)	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, dell'11 luglio 2002, che stabilisce metodi comunitari di campionamento ai fini del controllo ufficiale dei residui di antiparassitari sui e nei prodotti alimentari di origine vegetale e animale e che abroga la direttiva 79/700/CEE (GU L 187, 16.7.2002, p. 30).
(****)	In caso di esame mediante ispezione visiva o al microscopio, l'entità del campione finale da esaminare è di 1 kg.

8. METODO DI CAMPIONAMENTO PER LOTTI MOLTO GRANDI O LOTTI 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 punto, 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 spese dell'operatore.

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 a 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. È pertanto consentito il campionamento di una parte (partita campionata) dell'intero 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 tutti i mangimi di tale lotto salvo che, a seguito di una valutazione approfondita, risulti infondato ritenere che il resto del lotto non sia conforme 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.

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 tutti i mangimi di tale lotto salvo che, a seguito di una valutazione approfondita, risulti infondato ritenere che il resto del lotto non sia conforme 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 tutti i mangimi di tale lotto salvo che, a seguito di una valutazione approfondita, risulti infondato ritenere che il resto del lotto non sia conforme 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 tutti i mangimi di tale lotto salvo che, a seguito di una valutazione approfondita, risulti infondato ritenere che il resto del lotto non sia conforme 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 spedizione, 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 tutti i mangimi di tale lotto salvo che, a seguito di una valutazione approfondita, risulti infondato ritenere che il resto del lotto non sia conforme ai requisiti UE.

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. **Indicazioni 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 e in modo uniforme dall'insieme della partita campionata, e devono essere approssimativamente delle stesse dimensioni.

Il campione elementare è pari ad almeno 100 grammi o a 25 grammi in caso di foraggio grossolano/foraggio a bassa densità specifica.

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.

Nel caso dei campioni di vendite a distanza, le dimensioni del campione elementare dipendono dalle dimensioni dell'unità e possono essere anche inferiori a 100 g o 100 ml in singoli casi.

9.2.1. Alimenti alla rinfusa

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

9.2.2. Alimenti in confezioni

Dopo aver selezionato il numero prescritto di unità da campionare secondo quanto indicato al punto 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 al punto 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.

9.2.4. Alimenti liquidi o semiliquidi non omogeneizzabili

Dopo aver selezionato il numero prescritto di unità da campionare secondo quanto indicato al punto 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 e mattonelle di sali minerali

Dopo aver selezionato il numero prescritto di formellati o mattonelle da campionare secondo quanto indicato al punto 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, è possibile prelevare 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

Mescolare i campioni elementari per costituire un unico campione globale.

9.4. Formazione dei campioni finali

Il materiale del campione globale va mescolato con cura ⁽²⁾.

⁽²⁾ Eventuali grumi vanno schiacciati, se necessario togliendoli dalla massa per poi reintegrarli.

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

9.4.1. *Sostanze distribuite in modo uniforme*

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) ⁽³⁾, 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.

Dal campione globale o dai campioni ridotti sono quindi prelevati campioni finali (per controllo, difesa in caso di controversia ed eventualmente riferimento) di entità approssimativamente uguale e rispondenti ai requisiti quantitativi di cui al punto 7.

9.4.2. *Sostanze distribuite in modo non uniforme*

Se si controllano costituenti, incluso il materiale geneticamente modificato, o sostanze presumibilmente distribuiti in modo non uniforme negli alimenti per animali, il campione globale sarà:

- i) interamente omogeneizzato. Dal campione globale omogeneizzato sono quindi prelevati campioni finali (per controllo, difesa in caso di controversia ed eventualmente riferimento) di entità approssimativamente uguale e rispondenti ai requisiti quantitativi di cui al punto 7; o
- ii) ridotto a non meno di 2 kg o 2 litri ⁽⁴⁾ 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 ed eventualmente come riferimento (cfr. nota ^(*) al punto 6 e nota ^(*) al punto 7).

Dal campione ridotto sono quindi prelevati campioni finali di entità approssimativamente uguale e rispondenti ai requisiti quantitativi di cui al punto 7.

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. 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.

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 DI 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.

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

⁽³⁾ Ad eccezione del foraggio grossolano/foraggio a bassa densità specifica.

⁽⁴⁾ Ad eccezione del foraggio grossolano/foraggio a bassa densità specifica.

11. CAMPIONE DI VENDITE A DISTANZA

- Nel caso dei campioni di vendite a distanza, l'alimento per animali è richiesto all'operatore del settore dei mangimi tramite tecniche di comunicazione a distanza. In tal caso, quando richiede l'alimento per animali l'autorità competente non è tenuta a identificarsi con un'identità ufficiale dinanzi all'operatore del settore dei mangimi e può utilizzare un'identità di copertura.
- Il campione globale e i campioni finali del campione di vendite a distanza devono essere prelevati da personale appositamente autorizzato immediatamente dopo il ricevimento della spedizione. Per generare il campione globale occorre prelevare a caso e in modo uniforme un numero adeguato di campioni elementari dalla quantità totale ottenuta e miscelarli/omogeneizzarli con attenzione, conformemente, per quanto possibile, ai principi di cui al punto 5 e ai punti 9.2 e 9.3. Se l'alimento per animali è confezionato in singole unità, si devono ottenere almeno 4 unità dalle quali deve essere prelevato almeno un campione elementare. Qualora sia dimostrato, caso per caso, che le unità ottenute provengono da lotti diversi, il numero di unità da campionare deve essere ridotto e limitato alle unità provenienti dallo stesso lotto. In caso di analisi del campione di vendite a distanza per costituenti o sostanze distribuiti in modo non uniforme nell'alimento per animali, il numero di campioni elementari deve essere almeno 2,5 volte superiore rispetto al numero dei campioni analizzati per sostanze distribuite in modo uniforme in tutto l'alimento per animali.

Dal campione globale sono dunque prelevati i corrispondenti campioni finali (per controllo, difesa in caso di controversia ed eventualmente riferimento) conformemente, per quanto possibile, ai principi di cui al punto 9.4 e il verbale di campionamento indica che si tratta di un campione di vendite a distanza. L'autorità competente informa quindi immediatamente del campionamento l'operatore del settore dei mangimi. L'operatore del settore dei mangimi è inoltre informato che un campione (per difesa in caso di controversia) è tenuto, ove possibile, a sua disposizione dall'autorità competente in un determinato luogo a fini di difesa in caso di controversia o inviato all'operatore del settore dei mangimi o inviato al laboratorio designato dall'operatore del settore dei mangimi conformemente alle norme nazionali in vigore.

Se il campione è inviato direttamente al laboratorio ufficiale, il campione finale deve essere preparato e sigillato in laboratorio da personale appositamente autorizzato o in presenza di personale appositamente autorizzato. Il verbale di campionamento del campione di vendite a distanza deve essere inviato immediatamente dopo la formazione dei campioni finali all'autorità competente, che informa del campionamento l'operatore del settore dei mangimi.

Si ritiene che la quantità fornita dall'operatore del settore dei mangimi all'autorità competente rappresenti una parte di un lotto di alimenti per animali della stessa classe o con la medesima descrizione. Conformemente all'articolo 15 del regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo o del Consiglio ⁽³⁾, se tale parte del lotto è risultata non conforme ai requisiti UE, si presume, anche nel caso di un campione di vendite a distanza, che i risultati valgano per tutti i mangimi di tale lotto salvo che, a seguito di una valutazione approfondita (se del caso nel corso di un'ispezione in loco), risulti infondato ritenere che il resto del lotto non sia conforme ai requisiti UE.».

⁽³⁾ Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare (GU L 31 dell'1.2.2002, pag. 1).

ALLEGATO II

«ALLEGATO II

DISPOSIZIONI GENERALI RELATIVE AI METODI DI ANALISI DEGLI ALIMENTI PER ANIMALI

A. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LE ANALISI

1. **Finalità**

Le procedure descritte nel presente allegato 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.

Oltre alle procedure descritte nel presente allegato, devono essere seguite le linee guida per la preparazione del campione di cui alla norma EN ISO 6498.

2. **Precauzioni**

La procedura da seguire per la preparazione dei campioni dipende dai metodi di analisi impiegati e dai costituenti o dalle sostanze da controllare. È pertanto di fondamentale importanza che la procedura prescelta sia adeguata 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 che potrebbero riscaldare eccessivamente il campione.

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

L'omogeneizzazione del campione ottenuta preparando una sospensione mediante miscelazione ad alto taglio con acqua ha dimostrato di fornire in alcuni casi sottocampioni più omogenei rispetto alla macinazione/omogeneizzazione a secco, in particolare nel caso di sostanze chimiche distribuite in modo eterogeneo. Tuttavia anche con l'omogeneizzazione mediante una sufficiente macinazione a secco potrebbero essere ottenuti sottocampioni omogenei.

In alcuni casi, ad esempio per la determinazione della segale cornuta, di impurità botaniche nocive ecc., l'omogeneizzazione del campione non può essere effettuata mediante macinazione, ma richiede una miscelazione sufficiente del campione.

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*

L'aliquota è prelevata dal campione finale omogeneizzato. Il metodo del cono e della quartatura è sconsigliato, in quanto può dar luogo ad aliquote con un elevato errore di ripartizione.

3.1.1. *Alimenti che possono essere macinati direttamente*

— Mescolare il campione finale 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 (aliquota).

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 a un livello compreso tra l'8 e il 12 %, applicando la procedura di preessiccazione indicata 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.

3.1.3. Alimenti liquidi o semiliquidi

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

3.1.4. Altri alimenti

- Se i campioni finali non possono essere preparati secondo una delle procedure di cui sopra, applicare qualsiasi altra procedura di preparazione che consenta di ottenere quantità da analizzare (aliquote) omogenee e rappresentative 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 globale o campione finale.
- 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 ed eventualmente 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.
- Per la determinazione della segale cornuta e di impurità botaniche nocive, il campione finale deve essere suddiviso in 2 sottocampioni di peso uguale pari a circa 500 grammi. Si procede all'esame di un sottocampione. Se il risultato relativo al sottocampione è pari o inferiore al 50 % (soglia analitica) del livello massimo, il campione è conforme al livello massimo. Se il risultato è superiore al 50 % del livello massimo, occorre esaminare un altro sottocampione e la media dei risultati dei 2 sottocampioni è utilizzata per verificare la conformità al livello massimo.

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 nei metodi 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 procedure specifiche 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.

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 (> 50 %) inferiore 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 doppia analisi (seconda determinazione) per escludere la possibilità di una contaminazione crociata interna o di uno scambio accidentale dei campioni. La media delle due determinazioni è utilizzata per un'ulteriore valutazione.

Nel caso del controllo dei livelli minimi o massimi degli additivi per mangimi, se i risultati della prima determinazione sono al di sopra del livello minimo o al di sotto del livello massimo, 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 doppia analisi (seconda determinazione) per escludere la possibilità di una contaminazione crociata interna o di uno scambio accidentale dei campioni. La media delle due determinazioni è utilizzata per un'ulteriore valutazione.

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 procedere a ulteriori determinazioni, a condizione che si applichino le procedure appropriate in materia di qualità. In altri casi, è necessaria una doppia analisi (seconda determinazione) per escludere la possibilità di una contaminazione crociata interna o di uno scambio accidentale dei campioni. La media delle due determinazioni è utilizzata per un'ulteriore valutazione (lo scarto tra il risultato dell'analisi e il contenuto dichiarato rientra o no in un margine di variazione accettabile).

In alcuni casi questo margine di variazione accettabile è definito in atti legislativi quali il regolamento (CE) n. 767/2009 e il regolamento (UE) 2019/4 del Parlamento europeo e del Consiglio. ⁽¹⁾

4. Comunicazione del metodo di analisi applicato

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

5. Comunicazione del risultato 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.

La maggior parte dei livelli regolamentari (ad esempio livello massimo, livello minimo) nella legislazione dell'UE in materia di alimenti per animali è stabilita in relazione a un mangime con un contenuto di umidità del 12 %. Pertanto in questi casi, al fine di valutare il risultato dell'analisi misurato sul campione rispetto al livello regolamentare, occorre innanzitutto dividere il risultato dell'analisi per il contenuto di materia secca del campione (in %) moltiplicato per 88, come indicato nella formula che segue:

$$R_{12\%} = \frac{88 \times R_{ana}}{100 - Mc}$$

dove:

- Mc: contenuto di umidità del campione (in %). 100 – Mc rappresenta quindi il contenuto di materia secca del campione (in %);
- R_{ana} : risultato dell'analisi misurato sul campione;
- $R_{12\%}$: risultato per un mangime con un contenuto di umidità del 12 %; da valutare rispetto al livello regolamentare.

⁽¹⁾ Regolamento (UE) 2019/4 del Parlamento europeo e del Consiglio, dell'11 dicembre 2018, relativo alla fabbricazione, all'immissione sul mercato e all'utilizzo di mangimi medicati, che modifica il regolamento (CE) n. 183/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio e che abroga la direttiva 90/167/CEE del Consiglio (GU L 4 del 7.1.2019, pag. 1).

Inoltre, se sono soddisfatte le condizioni seguenti:

- il risultato dell'analisi è significativamente ($> 50\%$) inferiore o superiore alle specifiche/informazioni sull'etichettatura da controllare (a seconda che le specifiche/informazioni sull'etichettatura riguardino un livello massimo o minimo);
- il contenuto di umidità dell'alimento campionato è noto e si può stabilire che la correzione del contenuto di umidità non modificherà la valutazione,

allora, a condizione che si applichino le procedure appropriate in materia di qualità e l'analisi serva unicamente a verificare la conformità alle norme giuridiche pertinenti, la correzione del contenuto di umidità può essere omessa (ad esempio nei casi in cui non esistono specifiche o livelli regolamentari), a meno che non sia necessaria per l'interpretazione.

Se il risultato dell'analisi è corretto in funzione del contenuto di umidità, anche l'incertezza di misura corrispondente deve essere corretta nell'ambito della stessa procedura.

In caso di determinazione della segale cornuta o di impurità botaniche nocive mediante esame visivo/al microscopio, non è necessario correggere il contenuto di umidità.

6. **Incertezza di misura analitica 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 contenuto massimo fissato quando il risultato dell'analisi come media di due determinazioni indipendenti, relativo a un alimento con un contenuto di umidità del 12 %, è giudicato superiore al contenuto massimo, tenuto conto dell'incertezza di misura analitica estesa, calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 corrispondente a un livello di fiducia del 95 % circa, e della correzione per il recupero. Ciò significa che, 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 analitica estesa. Questa procedura è applicabile solo nei casi in cui il metodo di analisi consente di stimare l'incertezza di misura analitica estesa e la correzione per il recupero (ad esempio non è richiesta in caso di esame visivo/al microscopio).

Se il risultato dell'analisi del campione prelevato per la difesa in caso di controversia è superiore al contenuto massimo (senza tener conto dell'incertezza di misura analitica estesa), ciò conferma la non conformità accertata con il campione di controllo, in assenza di norme nazionali specifiche in materia.

Il risultato dell'analisi è riportato come segue (quando il metodo di analisi consente di stimare l'incertezza di misura analitica estesa):

- a) con correzione per il recupero, ove opportuno e pertinente, che qualora sia applicata deve essere indicata. Il tasso di recupero deve essere indicato a meno che la correzione intrinseca per distorsione faccia parte della procedura, ove la distorsione è la differenza tra il valore misurato e la concentrazione di riferimento. 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 analitica estesa, calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 ⁽²⁾ corrispondente a un livello di fiducia del 95 % circa.

Tuttavia, qualora il risultato dell'analisi risulti significativamente ($> 50\%$) inferiore al valore della specifica oggetto di controllo, e a condizione che si applichino le procedure appropriate in materia di qualità e l'analisi serva unicamente a verificare la conformità alle norme giuridiche pertinenti, il tasso di recupero e l'incertezza di misura analitica estesa possono essere omessi (ad esempio nei casi in cui non esistono specifiche o livelli regolamentari), a meno che l'incertezza di misura non sia necessaria per l'interpretazione.

7. **Incertezza di misura analitica e tasso di recupero in caso di analisi del contenuto di additivi per mangimi**

Al fine di verificare la conformità ai contenuti minimi e massimi autorizzati degli additivi per mangimi, la presenza di un additivo per mangimi deve essere considerata non conforme ai contenuti minimi e massimi stabiliti se si ritiene che il risultato dell'analisi come media di due determinazioni indipendenti, relativo a un mangime con un contenuto di umidità del 12 %:

⁽²⁾ L'intervallo di confidenza del 95 % può essere raggiunto utilizzando un altro fattore come il fattore t .

- sia superiore al contenuto massimo, tenuto conto dell'incertezza di misura analitica estesa e della correzione per il recupero. Ciò significa che, al fine di valutare la conformità, si utilizza la concentrazione risultante dall'analisi (ossia la media di due determinazioni), corretta per il fattore di recupero e dopo aver dedotto l'incertezza di misura analitica estesa;
- sia inferiore al contenuto minimo, tenuto conto dell'incertezza di misura analitica estesa e della correzione per il recupero. Ciò significa che, al fine di valutare la conformità, si utilizza la concentrazione risultante dall'analisi (ossia la media di due determinazioni), corretta per il fattore di recupero e dopo aver sommato l'incertezza di misura analitica estesa.

Se il risultato dell'analisi del campione prelevato per la difesa in caso di controversia è superiore al contenuto massimo (senza tener conto dell'incertezza di misura analitica estesa), ciò conferma la non conformità accertata con il campione di controllo, in assenza di norme nazionali specifiche in materia.

Il risultato dell'analisi è riportato come segue (quando il metodo di analisi consente di stimare l'incertezza di misura analitica estesa):

- a) con correzione per il recupero, ove opportuno e pertinente, che qualora sia applicata deve essere indicata. Il tasso di recupero deve essere indicato a meno che la correzione intrinseca per distorsione faccia parte della procedura, ove la distorsione è la differenza tra il valore misurato e la concentrazione di riferimento. 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 (media di due determinazioni) e U l'incertezza di misura analitica estesa, calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 ⁽³⁾ corrispondente a un livello di fiducia del 95 % circa.»

—

⁽³⁾ L'intervallo di confidenza del 95 % può essere raggiunto utilizzando un altro fattore come il fattore t .

ALLEGATO III

«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 di 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 numero importante di sostanze volatili.

Il metodo non riguarda l'analisi dei prodotti lattieri in quanto materie prime per alimenti per animali e dei mangimi composti costituiti principalmente da prodotti lattieri, l'analisi dei grassi e degli oli animali e vegetali, né quella dei semi e dei frutti oleaginosi.

La determinazione del contenuto di umidità nei semi oleaginosi deve essere effettuata secondo il metodo previsto dalla norma EN ISO 665 Semi e frutti oleaginosi - Determinazione del contenuto di umidità e di materia volatile, fermo restando che la soia deve essere macinata prima della determinazione del contenuto di umidità.

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/cm².
- 3.4. Stufa isoterma (± 2 °C) a riscaldamento elettrico, adeguatamente ventilata, capace di assicurare una regolazione rapida della temperatura ⁽¹⁾.
- 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. Procedura

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

⁽¹⁾ Per l'essiccazione dei cereali nonché delle farine, delle semole e dei 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.

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 oli e grassi

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

4.2. *Essiccazione*

Asciugare un recipiente (punto 3.3) provvisto di coperchio nella stufa regolata a 103 °C per 30 min +/- 1 min. Rimuovere dalla stufa e lasciar raffreddare a temperatura ambiente nell'essiccatore (punto 3.6).

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 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. Aprire la stufa, coprire immediatamente il recipiente con il coperchio, estrarlo dalla stufa, lasciarlo raffreddare per 30-45 minuti nell'essiccatore (punti 3.6) e pesare con l'approssimazione di 1 mg.

Nel caso di alimenti costituiti principalmente (> 50 %) da oli e grassi di origine animale e vegetale, lasciare essiccare per altri 30 minuti nella stufa a 103 °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 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. Aprire la stufa, coprire immediatamente il recipiente con il coperchio, estrarlo dalla stufa, lasciarlo raffreddare per 30-45 minuti nell'essiccatore (punti 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 barbabetola, «solubili» di pesce e zuccheri.

Tarare, con la precisione di 0,5 mg, un recipiente 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 (punto 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 (punto 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 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 (punto 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 (essiccazione parziale)*

È necessario essiccare parzialmente gli alimenti «umidi» con una frazione di massa inferiore all'85 % di materia secca (ad esempio foraggi, unifed (piatto unico), alimenti (non) liquidi) prima della macinazione fine, al fine di analizzarne le sostanze stabili; per le sostanze instabili, l'essiccazione parziale non è possibile.

L'essiccazione parziale può essere effettuata utilizzando una stufa a ventilazione forzata o un forno a microonde oppure mediante liofilizzazione. Salvo nel caso dell'essiccazione parziale mediante liofilizzazione, l'obiettivo è essiccare l'alimento per animali mantenendo la temperatura del campione al di sotto di 60 °C, in modo da avere un effetto minimo sulla composizione chimica. L'essiccazione a temperature superiori a 60 °C provoca cambiamenti chimici negli alimenti per animali (ad esempio la degradazione delle proteine). Gli alimenti essiccati devono essere riportati a temperatura ambiente per circa 15 minuti prima di misurare la materia secca parziale, in modo da ridurre al minimo il potenziale cambiamento di umidità che può verificarsi durante la macinazione e lo stoccaggio. L'essiccazione a temperature inferiori a 60 °C non elimina tutta l'acqua dall'alimento; pertanto l'essiccazione parziale (iniziale) non consente di determinare la materia secca totale dell'alimento. Dopo l'essiccazione il sottocampione è macinato e analizzato per determinare la materia secca (finale) del campione parzialmente essiccato (umidità rimanente dal 3 % al 15 %) quando vengono determinati altri costituenti chimici.

Si raccomanda pertanto una procedura in due fasi per la determinazione della materia secca. Va anzitutto determinato il contenuto di materia secca parziale (se inferiore all'85 % di materia secca), poi va determinato il contenuto di materia secca rimanente su un campione macinato e la materia secca parziale va moltiplicata per la materia secca rimanente per determinare il contenuto totale di materia secca.

5. **Calcolo dei risultati**

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

5.1. *Essiccazione senza preessiccazione*

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

dove:

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

m₀ = peso, in grammi, del campione essiccato.

5.2. *Essiccazione con preessiccazione* ⁽²⁾

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

dove:

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

m₁ = peso, in grammi, della quantità di prodotto sottoposta all'analisi, dopo la preessiccazione;

m₂ = peso, in grammi, della quantità di prodotto sottoposta all'analisi, dopo la macinazione o frantumazione;

m₀ = peso, in grammi, del campione essiccato.

⁽²⁾ Per maggiori dettagli sul calcolo si rimanda alla norma EN ISO 6498 – Mangimi per animali - Linee guida per la preparazione del campione.

5.3. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare lo 0,2 % di umidità (valore assoluto), fatta eccezione per gli alimenti umidi per animali da compagnia e gli articoli masticabili per cani, per i quali la differenza non deve superare lo 0,5 % 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 di applicazione

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

2. Principio

Il campione viene sottoposto a 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. Procedura

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 20 g circa del campione omogeneizzato nel recipiente (punto 3.1), asciutto e tarato, contenente il termometro (punto 3.2). Riscaldare sul bagno di sabbia o sulla piastra riscaldante (punto 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 riscaldamenti successivi. Lasciare quindi raffreddare nell'essiccatore (punto 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 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 (X), espresso in percentuale del campione, è dato dalla seguente formula:

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

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 effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare lo 0,1 % di umidità (valore assoluto).

C. DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI AZOTO E CALCOLO DEL CONTENUTO DI PROTEINE GREGGE

1. Finalità e campo di applicazione

Il metodo consente di determinare il contenuto di proteine gregge degli alimenti per animali a partire dal contenuto di azoto, dosato secondo il metodo di Kjeldahl ⁽³⁾.

2. Principio

Il campione viene mineralizzato in acido solforico in presenza di un catalizzatore. La soluzione acida è alcalinizzata con una soluzione di 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 di idrossido di sodio.

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

3. Reattivi

- 3.1. Solfato di potassio.
- 3.2. Catalizzatore: ossido rameico CuO o solfato di rame (II) pentaidrato CuSO₄ 5H₂O.
- 3.3. Zinco in granuli.
- 3.4. Acido solforico, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.
- 3.5. Acido solforico, soluzione volumetrica standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25$ mol/l.
- 3.6. Acido solforico, soluzione volumetrica standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10$ mol/l.
- 3.7. Acido solforico, soluzione volumetrica standard, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$ mol/l.
- 3.8. Indicatore rosso di metile: sciogliere 300 mg di rosso di metile in 100 ml di etanolo, $\sigma = 95-96$ % (v/v).
- 3.9. Soluzione di idrossido di sodio (è possibile usare quello di purezza tecnica), $\beta = 40$ g/100 ml (m/v 40 %).
- 3.10. Idrossido di sodio, soluzione volumetrica standard, $c(\text{NaOH}) = 0,25$ mol/l.
- 3.11. Idrossido di sodio, soluzione volumetrica standard, $c(\text{NaOH}) = 0,10$ mol/l.
- 3.12. Pietra pomice in granuli, lavata con acido cloridrico e calcinata.
- 3.13. Acetanilide (p.f. = 114 °C, contenuto N = 10,36 %).
- 3.14. Saccarosio (esente da azoto).
- 3.15. Acido bórico (H₃BO₃).

⁽³⁾ Il contenuto di N può essere determinato in tutti gli alimenti per animali, ma il fattore di conversione di 6,25 per il calcolo del contenuto di proteine gregge potrebbe non essere applicabile alle materie prime per mangimi a base di insetti (fattore di conversione inferiore) e a determinati alimenti per animali da compagnia e proteine del plasma sanguigno (fattore di conversione superiore).

- 3.16. Soluzione di indicatore rosso di metile: sciogliere 100 mg di rosso di metile in 100 ml di etanolo o metanolo.
- 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 di indicatore rosso di metile (punto 3.16) e 10 ml di soluzione di verde di bromocresolo (punto 3.17).

A seconda dell'acqua utilizzata, il pH della soluzione di acido borico può variare da una partita all'altra. Il pH della soluzione di acido borico deve essere compreso tra 4,3 e 4,7. 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 (punto 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 (punto 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. **Procedura**

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 (punto 3.1), una quantità appropriata di catalizzatore (punto 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 (punto 3.4) e, se necessario, alcuni granuli di pietra pomice (punto 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 (punto 3.3). Procedere come indicato al 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 (punti 3.5 o 3.7, a seconda del presunto contenuto di azoto) e qualche goccia di indicatore rosso di metile (punto 3.8).

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 (punto 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 bórico

Quando la titolazione del contenuto di ammoniaca del distillato è realizzata manualmente, si applica la procedura indicata di seguito. Quando l'unità di distillazione è interamente automatizzata, anche per quanto riguarda la titolazione del contenuto 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 bórico (punto 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 bórico. Regolare l'unità di distillazione per ottenere 50 ml di soluzione di idrossido di sodio (punto 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 bórico. 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 come indicato 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 di idrossido di sodio (punti 3.10 o 3.11) secondo la concentrazione dell'acido solforico usato, sino a raggiungere il punto finale.

5.3.2. Acido bórico

Titolare il contenuto del matraccio collettore con la soluzione volumetrica standard di acido cloridrico (punti 3.19) o con la soluzione volumetrica standard di acido solforico (punti 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 agitatore magnetico illuminato o 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 bórico all'1 % (punto 3.18), la titolazione inizia subito dopo l'avvio della distillazione.

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 a 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 (punto 3.14).

6. Calcolo dei risultati

I calcoli sono effettuati conformemente al punto 6.1 o 6.2.

6.1. Calcolo per la titolazione conformemente al punto 5.3.1

Calcolare il contenuto 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 (punti 3.10 o 3.11) usato nella prova in bianco;
 V_1 = volume (ml) di NaOH (punti 3.10 o 3.11) usato nella titolazione del campione;
 c = concentrazione (mol/l) dell'idrossido di sodio (punti 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 contenuto 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 (punto 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 contenuto di proteine gregge, espresso in percentuale di peso, con la formula seguente:

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

dove:

- m = peso (g) della quantità di sostanza sottoposta all'analisi;
 c = concentrazione (mol/l) della soluzione volumetrica standard di acido solforico (punto 3.6);
 V_0 = volume (ml) di acido solforico (punto 3.6) usato per la prova in bianco;
 V_1 = volume (ml) di acido solforico (punto 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 0,4 in valore assoluto, per i contenuti di proteine gregge inferiori al 20 %;
- il 2,0 % del valore più elevato, per i contenuti di proteine gregge compresi fra il 20 e il 40 %;
- lo 0,8 % in valore assoluto, per i contenuti di proteine gregge superiori al 40 %.

7.2. Riproducibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate sullo stesso campione in laboratori distinti non deve superare:

- l'1,8 % in valore assoluto, per i contenuti di proteine gregge inferiori al 20 %;
- il 9,0 % del valore più elevato, per i contenuti di proteine gregge compresi fra il 20 e il 40 %;
- il 3,6 % in valore assoluto, per i contenuti di proteine gregge superiori al 40 %.

7.3. Precisione

Eseguire l'analisi (mineralizzazione, distillazione e titolazione) su una quantità appropriata di acetanilide (punto 3.13) (ad esempio da 0,2 a 0,3 g) in presenza di 1 g di saccarosio (punto 3.14); 1 g di acetanilide consuma 14,80 ml di acido solforico (punto 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 di 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 (punto 3.4) superiore a quello indicato al punto 5.1.
- 8.3. Per i prodotti poveri di sostanze azotate, il volume di acido solforico (punto 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 di applicazione

Il metodo consente di determinare il contenuto di urea utilizzata come additivo per mangimi negli alimenti per ruminanti.

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 (punto 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 (ρ_{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, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ 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. 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 al minuto.
- 4.2. Provette: 160 × 16 mm, a tappo smerigliato.
- 4.3. Spettrofotometro.

5. Procedura

5.1. Analisi del campione

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

Prelevare 5 ml di filtrati limpidi e incolori, introdurli nelle provette con tappo smerigliato, aggiungere 5 ml di soluzione di 4-DMAB (punto 3.1) e mescolare. Porre le provette in bagnomaria a 20 °C (+/- 4 °C). Dopo quindici 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 (punto 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 (punto 3.1), omogeneizzare e misurare la densità ottica, come indicato sopra, rispetto a 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 di urea, nella parte di campione sottoposta all'analisi, servendosi della curva di taratura.

Esprimere il risultato in mg di urea per kg di campione.

7. Valutazione del metodo

7.1. Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate sullo stesso campione nel medesimo laboratorio e dal medesimo operatore non deve superare:

— a 420 nm:

— il 50 % del valore più elevato, per i contenuti di urea compresi fra 3 000 mg/kg e meno di 5 000 mg/kg;

— il 25 % del valore più elevato, per i contenuti di urea compresi fra 5 000 mg/kg e meno di 7 000 mg/kg;

— il 20 % del valore più elevato, per i contenuti di urea uguali o superiori a 7 000 mg/kg;

— a 435 nm:

— il 40 % del valore più elevato, per i contenuti di urea compresi fra 3 000 mg/kg e meno di 5 000 mg/kg;

— il 25 % del valore più elevato, per i contenuti di urea compresi fra 5 000 mg/kg e meno di 9 000 mg/kg;

— il 5 % del valore più elevato, per i contenuti di urea uguali o superiori a 9 000 mg/kg.

7.2. Riproducibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate sullo stesso campione in laboratori distinti e/o da operatori diversi non deve superare:

— a 420 nm:

— 3 000 mg/kg in valore assoluto, per i contenuti di urea compresi fra 3 000 mg/kg e meno di 12 000 mg/kg;

— 4 500 mg/kg in valore assoluto, per i contenuti di urea uguali o superiori a 12 000 mg/kg;

— a 435 nm:

— il 50 % del valore più elevato, per i contenuti di urea compresi fra 3 000 mg/kg e meno di 8 000 mg/kg;

— il 25 % del valore più elevato, per i contenuti di urea uguali o superiori a 8 000 mg/kg.

8. Risultati di uno studio collaborativo

È stato organizzato un esercizio di confronto interlaboratorio a livello di UE cui hanno partecipato 18 laboratori. Cinque campioni positivi di mangimi composti per ruminanti («MAT» nelle tabelle 1 e 2) sono stati analizzati (1 analisi) in duplicati ciechi; come bianco è stato analizzato una volta un mangime composto per ruminanti.

I calcoli dei limiti di ripetibilità (r) e riproducibilità (R) quali definiti dalle linee guida internazionali sono stati effettuati dopo aver eliminato gli outlier utilizzando l'analisi della varianza dei valori validi.

I dati sul rendimento del metodo calcolati (ripetibilità, riproducibilità) sono presentati nelle tabelle che seguono. Per tutti i campioni analizzati, compreso il bianco, non sono stati riscontrati falsi positivi o falsi negativi.

Tabella 1

Caratteristiche di rendimento del metodo per l'urea misurata a $\lambda = 420$ nm in tutti i materiali

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovini	Bovini	Ovini	Ovini	Bovini
Frazione di massa bersaglio (mg kg^{-1})	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Frazione di massa media (mg kg^{-1})	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Deviazione standard di riproducibilità s_R (mg kg^{-1})	1 141	1 303	985	994	1 711
Deviazione standard di ripetibilità s_r (mg kg^{-1})	723	601	549	712	737
Deviazione standard relativa di riproducibilità RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Deviazione standard relativa di ripetibilità RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Limite di riproducibilità, R [$R = 2,8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Limite di ripetibilità, r [$r = 2,8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Tabella 2

Caratteristiche di rendimento del metodo per l'urea misurata a $\lambda = 435$ nm in tutti i materiali

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Ovini	Bovini	Ovini	Ovini	Bovini
Frazione di massa bersaglio (mg kg^{-1})	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Frazione di massa media (mg kg^{-1})	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Deviazione standard di riproducibilità s_R (mg kg^{-1})	706	1 194	675	745	1 378
Deviazione standard di ripetibilità s_r (mg kg^{-1})	570	628	613	196	167

Deviazione standard relativa di riproducibilità RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Deviazione standard relativa di ripetibilità RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Limite di riproducibilità, R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Limite di ripetibilità, r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

9. Osservazioni

- 9.1. Per contenuti di urea superiori al 3 %, ridurre la quantità di campione da sottoporre all'analisi a 1 g o diluire la soluzione originale, in modo da non avere più di 50 mg di urea in 500 ml.
- 9.2. Per bassi contenuti di urea, aumentare la quantità di campione da sottoporre all'analisi fino a quando il filtrato resta limpido e incolore.
- 9.3. I risultati degli studi collaborativi di cui sopra non indicano una differenza significativa di precisione tra l'urea misurata a 420 nm o a 435 nm.

E. DETERMINAZIONE DEGLI AMMINOACIDI (TRIPTOFANO ESCLUSO)

I metodi di analisi da utilizzare per la determinazione degli amminoacidi (triptofano escluso) sono:

- EN ISO 13903 Mangimi per animali - Determinazione del contenuto di amminoacidi;
- EN ISO 17180 Mangimi per animali - Determinazione di lisina, metionina e treonina in amminoacidi prodotti commerciali e premiscele (*);
- il metodo di analisi descritto di seguito ai punti da 1 a 10.

1. Finalità e campo di applicazione

Il metodo serve per determinare gli amminoacidi liberi (sia di sintesi che naturali) e totali (legati a peptidi e liberi) nelle materie prime per mangimi, nei mangimi composti e nelle premiscele contenenti meno del 10 % (*) di ciascun amminoacido mediante un analizzatore di amminoacidi. Il metodo è applicabile ai 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 tra i vari sali di amminoacidi 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.

(*) Il metodo di analisi previsto dalla norma EN 17180 è indicato come metodo alternativo da utilizzare a fini di controllo ufficiale per la determinazione degli amminoacidi nei mangimi contenenti più del 10 % di amminoacidi.

(†) Questo metodo non è stato convalidato mediante uno studio collaborativo per le premiscele contenenti più del 10 % di additivi per mangimi. Tuttavia è applicabile anche a tali matrici con le opportune lievi modifiche, a condizione che il metodo sia poi convalidato internamente. Per ulteriori informazioni consultare il sito https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eurl-fa-eurl-feed-additives/eurl-fa-authorisation_en?prefLang=it.

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 metionina sulfone prima dell'idrolisi. La tirosina deve essere determinata in idrolizzati di campioni non ossidati. Tutti gli altri amminoacidi elencati al punto 1 (Finalità e campo di applicazione) 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 (punto 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 (punto 440 nm per la prolina).

3. **Reattivi**

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

- 3.1. Perossido di 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 tra 40 e 60 °C.
- 3.13. Norleucina o altro composto adatto ad essere utilizzato come standard interno.
- 3.14. Azoto gassoso (< 10 ppm di ossigeno).
- 3.15. 1-Ottanolo.
- 3.16. Amminoacidi.
 - 3.16.1. Sostanze standard degli amminoacidi elencati al punto 1 (Finalità e campo di applicazione). Composti puri non contenenti acqua di cristallizzazione. Essiccare sotto vuoto su P₂O₅ o H₂SO₄ per 1 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 (punto 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 (punto 3.5) in acqua e portare a 1 litro.
- 3.19. Soluzione di acido formico-fenolo:
miscelare 889 g di acido formico (punto 3.2) con 111 g d'acqua e aggiungere 4,73 g di fenolo (punto 3.3).

- 3.20. Miscela di idrolisi, $c = \text{HCl } 6 \text{ mol/l}$ contenente 1 g di fenolo/l:
aggiungere 1 g di fenolo (punto 3.3) a 492 ml di HCl (punto 3.7) e portare a 1 litro con acqua.
- 3.21. Miscela di estrazione, $c = \text{HCl } 0,1 \text{ mol/l}$ contenente 2 % di tiodiglicole: introdurre 8,2 ml di HCl (punto 3.7) in circa 900 ml d'acqua e miscelare, aggiungere 20 ml di tiodiglicole (punto 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, $\beta = 6 \%$:
sciogliere 60 g di acido 5-solfosalicilico (punto 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 (punto 3.1) con 4,5 ml di soluzione di acido formico e fenolo (punto 3.19) in un piccolo becher. Tenere in incubazione a 20-30 °C per 1 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, $c = \text{Na}^+ 0,2 \text{ mol/l}$, pH 2,20:
sciogliere 19,61 g di citrato di sodio (punto 3.8), 5 ml di tiodiglicole (punto 3.9), 1 g di fenolo (punto 3.3) e 16,50 ml di HCl (punto 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 (punto 4.9).
- 3.26. Reattivo alla ninidrina preparato conformemente alle prescrizioni relative all'analizzatore (punto 4.9).
- 3.27. Soluzioni standard di amminoacidi. Conservare queste soluzioni a temperatura inferiore a 5 °C.
- 3.27.1. Soluzione madre standard di amminoacidi (punto 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 (punto 3.16.2) e 0,2265 g di metionina sulfone (punto 3.16.3) in tampone citrato (punto 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 (punto 3.27.1) contiene acido cisteico e metionina sulfone.
- 3.27.3. Soluzione madre standard dello standard interno, ad esempio norleucina, $c = 20 \mu\text{mol/ml}$.
Sciogliere 0,6560 g di norleucina (punto 3.13) in tampone citrato (punto 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 (punto 3.10) in un becher da 100 ml con 30 ml di tampone citrato (punto 3.24). Aggiungere 4,00 ml di soluzione madre standard di amminoacidi (punto 3.27.1), 4,00 ml di soluzione madre standard di acido cisteico e metionina sulfone (punto 3.27.2) e, se del caso, 0,50 ml di soluzione madre standard dello standard interno (punto 3.27.3). Portare il pH a 2,20 con idrossido di sodio (punto 3.18).
Trasferire quantitativamente in un matraccio tarato da 50 ml, portare a volume con tampone citrato (punto 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 (punto 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 ± 2 °C.
- 4.4. pH-metro (a tre cifre decimali).
- 4.5. Filtro a membrana, da 0,22 μm .
- 4.6. Centrifuga.
- 4.7. Evaporatore rotante sotto vuoto.
- 4.8. Agitatore meccanico o magnetico.
- 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. **Procedura**

5.1. *Preparazione del campione*

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 (punto 3.12) prima di essere tritati.

5.2. *Determinazione degli amminoacidi liberi*

Pesare con l'approssimazione di 0,2 mg una quantità appropriata (1-5 g) del campione preparato (punto 5.1) in una beuta e aggiungere 100,0 ml di miscela di estrazione (punto 3.21). Agitare la miscela per 60 minuti con un agitatore meccanico o magnetico (punto 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 (punto 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 (punto 3.18), trasferire in un matraccio tarato di volume appropriato utilizzando tampone citrato (punto 3.24) e portare a volume con la soluzione tampone (punto 3.24).

Se si usa uno standard interno, aggiungere 1,00 ml di standard interno (punto 3.27.3) ogni 100 ml di soluzione finale e portare a volume con la soluzione tampone (punto 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 (punto 5.1) in:

- un pallone a fondo arrotondato da 100 ml (punto 4.1) per l'idrolisi in sistema aperto (punto 5.3.2.3); o
- un pallone a fondo arrotondato da 250 ml (punto 4.1) se è richiesta una bassa concentrazione di sodio (punto 5.3.3.1); o
- un flacone da 100 ml dotato di tappo a vite (punto 4.2) (per l'idrolisi in sistema chiuso punto 5.3.2.4).

La porzione di campione pesata deve avere un contenuto di 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 (punti 3.23) e miscelare con una spatola di vetro con un'estremità ricurva. Sigillare il pallone o il 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 metabisolfito di sodio (punto 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 (punto 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 (punto 4.1) o in un flacone da 100 ml con tappo a vite (punto 4.2), con l'approssimazione di 0,2 mg, una quantità da 0,1 a 1 g del campione preparato (punto 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 (punto 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 (punto 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 una stufa (punto 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 nella stufa (punto 4.3) per 23 ore. Al completamento dell'idrolisi, togliere il flacone dalla stufa, 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 (punto 5.3.3), trasferire quantitativamente il contenuto del flacone in un becher da 250 ml o in un pallone a fondo arrotondato da 250 ml utilizzando tampone citrato (punto 3.24).

Procedere come indicato al punto 5.3.3.

5.3.3. Regolazione del pH

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

5.3.3.1. Per sistemi cromatografici (punto 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 dello standard interno (punto 3.27.3).

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

Aggiungere 2 gocce di 1-ottanolo (punto 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 (punto 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 (punto 3.18) e procedere conformemente al punto 5.3.4.

5.3.3.2. Per tutti gli altri analizzatori di amminoacidi (punto 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 (punto 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 (punti 5.3.3.1 o 5.3.3.2) con tampone citrato (punto 3.24) in un matraccio tarato da 200 ml e portare a volume con tampone (punto 3.24).

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

Procedere alla fase della cromatografia (punto 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 (punto 5.2) o l'idrolizzato (punto 5.3.4) a temperatura ambiente. Agitare la miscela e filtrarne una quantità appropriata attraverso un filtro a membrana da 0,22 µm (punto 4.5). La soluzione limpida risultante viene sottoposta a cromatografia a scambio ionico utilizzando un analizzatore di amminoacidi (punto 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 nelle soluzioni standard e del campione devono essere il più possibile simili.

In generale, la frequenza delle iniezioni della soluzione di taratura dipende dalla stabilità del reattivo alla ninidrina e del sistema analitico. La soluzione standard o del campione è diluita con tampone citrato (punto 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 (punto 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:

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1000}$$

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 = massa molare 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 (punto 5.3.4) o ml del volume di diluizione totale calcolati dell'estratto (punto 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 una massa molare (M) 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 l'M della metionina (149,21 g/mol).

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 (punto 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 uno studio di intercomparazione internazionale sulla base di quattro diversi alimenti per animali (alimento composto per suini, alimento composto per polli da ingrasso, concentrato proteico, premiscela).

Nota: Il metodo è stato testato nel corso di un secondo studio di intercomparazione internazionale nel 2003 utilizzando coppie di duplicati ciechi di mangimi di finissaggio per polli da ingrasso, mangimi starter per polli da ingrasso, mais, farine di pesce e farine di pollame. Per ulteriori informazioni, cfr. la norma EN ISO 13903.

I risultati dello studio di intercomparazione del 1990 in termini di medie e deviazioni standard, dopo l'eliminazione degli outlier, figurano nelle tabelle del presente punto.

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») dello studio di intercomparazione della tabella di cui sopra è presentata nelle tabelle che seguono.

Coefficiente di variabilità (%) per la ripetibilità (CV_r)

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 dello studio di intercomparazione di cui sopra figurano nella tabella che segue.

Coefficiente di variabilità (%) per la riproducibilità (CV_R)

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 da ingrasso	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.

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 amminoacidi.

9. Osservazioni

9.1. A causa delle differenze tra gli analizzatori di amminoacidi, le concentrazioni finali delle soluzioni di taratura degli amminoacidi 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 amminoacidi 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 ai mangimi composti o alle premiscele contenenti cloruro in misura superiore all'1 % (concentrato, alimenti a base di minerali, mangimi complementari) potrebbe comportare una sottostima della metionina; va previsto pertanto un trattamento speciale.

10. Criteri di rendimento

La compilazione dei risultati (tranne per la tirosina) provenienti dai 2 studi collaborativi (del 1990, di cui al punto 7, e del 2005, di cui alla norma EN ISO 13903) fornisce i seguenti criteri per la ripetibilità e la riproducibilità. I valori tratti da queste 2 prove interlaboratorio potrebbero non essere applicabili a intervalli di concentrazioni e a matrici diversi da quelli dati.

10.1. Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate sullo stesso campione nel medesimo laboratorio e dal medesimo operatore non deve superare:

- il 6 % del valore più elevato, per gli amminoacidi totali nel caso di glicina, alanina, lisina, prolina, acido glutammico, isoleucina e istidina;
- l'8 % del valore più elevato, per gli amminoacidi totali nel caso di treonina, fenilalanina, metionina, acido aspartico e leucina;
- il 10 % del valore più elevato, per gli amminoacidi totali nel caso di arginina e valina;
- il 12 % del valore più elevato, per l'amminoacido totale serina;
- il 15 % del valore più elevato, per l'amminoacido totale cist(e)ina.

10.2. Riproducibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate sullo stesso campione in laboratori distinti e/o da operatori diversi non deve superare:

- il 15 % del valore più elevato, per gli amminoacidi totali nel caso di glicina, alanina e treonina;
- il 20 % del valore più elevato, per gli amminoacidi totali nel caso di lisina, prolina, fenilalanina, metionina e acido aspartico;
- il 22 % del valore più elevato, per gli amminoacidi totali nel caso di acido glutammico e leucina;
- il 27 % del valore più elevato, per l'amminoacido totale arginina;
- il 32 % del valore più elevato, per l'amminoacido totale isoleucina;

- il 35 % del valore più elevato, per gli amminoacidi totali nel caso di valina e serina;
- il 40 % del valore più elevato, per l'amminoacido totale istidina;
- il 50 % del valore più elevato, per l'amminoacido totale cist(e)ina.

F. DETERMINAZIONE DEL TRIPTOFANO

I metodi di analisi da utilizzare per la determinazione del triptofano sono:

- EN ISO 13904 Mangimi per animali - Determinazione del contenuto di triptofano;
- il metodo di analisi descritto di seguito ai punti da 1 a 9.

1. Finalità e campo di 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 o 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)₂·8 H₂O all'aria, per evitare la formazione di BaCO₃, 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 cloridrico, ρ₂₀ 1,19 g/ml.
- 3.8. Metanolo, di qualità HPLC.
- 3.9. Etere di petrolio, intervallo di ebollizione tra 40 e 60 °C.
- 3.10. Soluzione di idrossido di sodio, c = 1 mol/l:
sciogliere 40,0 g di NaOH (punto 3.5) in acqua e portare a 1 litro con acqua (punto 3.1).
- 3.11. Acido cloridrico, c = 6 mol/l:
prelevare 492 ml di HCl (punto 3.7) e portare a 1 litro con acqua.
- 3.12. Acido cloridrico, c = 1 mol/l:
prelevare 82 ml di HCl (punto 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 (punto 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 (punto 3.6) e portare a 1 litro con acqua (punto 3.1).
- 3.15. Soluzione concentrata di triptofano (punto 3.2), $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
in un matraccio tarato da 500 ml sciogliere 0,2553 g di triptofano (punto 3.2) in acido cloridrico (punto 3.13) e portare a volume con acido cloridrico (punto 3.13). Conservare a $-18 \text{ } ^\circ\text{C}$ al massimo per 4 settimane.
- 3.16. Soluzione concentrata dello standard interno, $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
in un matraccio tarato da 500 ml sciogliere 0,2728 g di α -metil-triptofano (punto 3.3) in acido cloridrico (punto 3.13) e portare a volume con acido cloridrico (punto 3.13). Conservare a $-18 \text{ } ^\circ\text{C}$ al massimo per 4 settimane.
- 3.17. Soluzione standard di taratura di triptofano e di standard interno:
prelevare 2,00 ml di soluzione concentrata di triptofano (punto 3.15) e 2,00 ml di soluzione concentrata dello standard interno (α -metil-triptofano) (punto 3.16). Diluire con acqua (punto 3.1) e metanolo (punto 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. Etanolamina p (p/p) > 98 %.
- 3.21. Soluzione di 1 g di 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanolo (punto 3.19) in 100 ml di metanolo (punto 3.8).
- 3.22. Fase mobile per HPLC: 3,00 g di acido acetico (punto 3.18) + 900 ml di acqua (punto 3.1) + 50,0 ml di soluzione (punto 3.21) di 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanolo (punto 3.19) in metanolo (punto 3.8) (1 g/100 ml); regolare il pH a 5,00 utilizzando etanolamina (punto 3.20); portare a 1 000 ml con acqua (punto 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 μm , o equivalente.
- 4.3. pH-metro.
- 4.4. Matraccio di polipropilene, capacit  125 ml, a collo largo e coperchio a vite.
- 4.5. Filtro a membrana, da 0,45 μm .
- 4.6. Autoclave, 110 (\pm 2) $^\circ\text{C}$, 1,4 (\pm 0,1) bar.
- 4.7. Agitatore meccanico o magnetico.
- 4.8. Miscelatore Vortex.

5. Procedura

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 (punto 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 (punto 5.1); aggiungere 100,0 ml di acido cloridrico (punto 3.13) e 5,00 ml di soluzione concentrata dello standard interno (punto 3.16). Agitare o mescolare per 60 minuti con un agitatore meccanico o magnetico (punto 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 (punto 3.14). Portare il pH a 3 utilizzando idrossido di sodio (punto 3.10). Aggiungere sufficiente metanolo (punto 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 standard di taratura (punto 3.17)).

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

Proteggere la soluzione standard 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 (punto 5.1) nel matraccio di polipropilene (punto 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) (punto 3.4) e 10 ml di acqua. Miscelare con un miscelatore Vortex (punto 4.8) o con agitatore magnetico (punto 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 (punto 4.6) con acqua bollente e lasciare esposto al 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)₂·8 H₂O, aggiungere alla miscela calda 30 ml di acqua a temperatura ambiente. Scuotere o agitare non violentemente. Aggiungere 2,00 ml di soluzione concentrata dello standard interno (α-metil-triptofano) (punto 3.16). Lasciare raffreddare i recipienti in un bagno di acqua e ghiaccio per 15 minuti.

Aggiungere quindi 5 ml di acido orto-fosforico (punto 3.14). Tenere il recipiente nel bagno di refrigerazione e neutralizzare con HCl (punto 3.11) sempre agitando; regolare quindi il pH a 3,0 utilizzando HCl (punto 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.

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

Proteggere la soluzione standard 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 ai punti 9.1 e 9.2):

Colonna per cromatografia liquida (punto 4.2):	125 mm × 4 mm, C18, particelle di riempimento 3 µm, o equivalente
Temperatura della colonna:	temperatura ambiente
Fase mobile (punto 3.22):	3,00 g di acido acetico (punto 3.18) + 900 ml di acqua (punto 3.1) + 50,0 ml di soluzione (punto 3.21) di 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanolo (punto 3.19) in metanolo (punto 3.8) (1 g/100 ml); regolare il pH a 5,00 utilizzando etanolamina (punto 3.20); portare a 1 000 ml con acqua (punto 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 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 standard di taratura (3.17);
- B = area del picco del triptofano, estratto (punto 5.2) o idrolizzato (punto 5.3);
- V₁ = volume in ml (2 ml) di soluzione concentrata di triptofano (punto 3.15) aggiunta alla soluzione di taratura (punto 3.17);
- c = concentrazione in µmol/ml (= 2,50) di soluzione concentrata di triptofano (punto 3.15) aggiunta alla soluzione di taratura (punto 3.17);
- V₂ = volume in ml della soluzione concentrata dello standard interno (punto 3.16) aggiunta all'estrazione (punto 5.2) (= 5,00 ml) o all'idrolizzato (punto 5.3) (= 2,00 ml);
- C = area del picco dello standard interno, dell'estratto (punto 5.2) o dell'idrolizzato (punto 5.3);
- D = area del picco del triptofano, soluzione standard di taratura (punto 3.17);
- V₃ = volume in ml (= 2,00 ml) della soluzione concentrata dello standard interno (punto 3.16) aggiunta alla soluzione standard di taratura (punto 3.17);
- m = peso del campione in g (corretto al peso iniziale se essiccato e/o sgrassato);
- M = massa molare 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.

8. Risultati di uno studio collaborativo

È stato organizzato uno studio collaborativo a livello di UE (quarta intercomparazione) nel corso del quale 12 laboratori hanno analizzato tre campioni al fine di convalidare il metodo di idrolisi. Ogni campione è stato analizzato 5 volte. I risultati dello studio figurano nella tabella seguente.

	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, %;

CV_R = coefficiente di variazione della riproducibilità, %.

È stato organizzato un altro studio collaborativo a livello di UE (terza intercomparazione) nel corso del quale 13 laboratori hanno analizzato due campioni al fine di convalidare il metodo di estrazione del triptofano libero. Ogni campione è stato analizzato 5 volte. I risultati dello studio figurano nella tabella seguente.

	Campione 4 Miscela di frumento e soia	Campione 5 Miscela di frumento e soia (= campione 4) con aggiunta di triptofano (0,457 g/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, %;
CV_R =	coefficiente di variazione della riproducibilità, %.

È stato effettuato un altro studio di intercomparazione a livello di UE in cui 7 laboratori hanno analizzato quattro campioni ai fini della certificazione del triptofano per idrolisi. Più sotto sono riportati i risultati. Ogni campione è stato analizzato 5 volte.

	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_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	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_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, %.

9. Osservazioni

- 9.1. Speciali condizioni cromatografiche consentono una migliore separazione tra triptofano e α -metil-triptofano.

Eluizione isocratica seguita da pulitura della colonna a gradiente:

Colonna per cromatografia liquida:	125 mm × 4 mm, C18, particelle di riempimento 5 µm, o equivalente	
Temperatura della colonna:	32 °C	
Fase mobile:	0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /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 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 da consentire l'eluizione di tutti i prodotti di degradazione; in caso contrario 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.

G. DETERMINAZIONE DEGLI OLI E DEI GRASSI GREGGI

1. Finalità e campo di applicazione

Il metodo consente di determinare il contenuto di oli e grassi greggi negli alimenti per animali.

L'applicazione delle due procedure sotto descritte dipende dalla natura e dalla composizione dell'alimento, nonché dalla ragione per cui si esegue l'analisi.

Per la determinazione degli oli e dei grassi greggi nei semi e nei frutti oleaginosi nonché negli alimenti per animali il cui tenore di oli/grassi greggi è superiore al 15 %, l'estrazione deve essere effettuata secondo la procedura A e la riestrazione secondo la procedura B (punto 5.3).

- 1.1. Procedura 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 la procedura B.

1.2. Procedura 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 dalle quali gli oli e i grassi non possono essere completamente estratti senza idrolisi preliminare, ad esempio il glutine, i lieviti, le proteine di patata e i prodotti che sono stati sottoposti a procedimenti quali l'estrusione, la fioccatatura e il riscaldamento.

1.3. Interpretazione dei risultati

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

2. Principio

2.1. Procedura A

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

2.2. Procedura 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 la procedura A.

3. Reattivi

3.1. Etere di petrolio, intervallo di ebollizione tra 40 e 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. Dispositivo di estrazione. 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 prescrizioni di cui al punto 4.1.

4.3. Stufa per essiccazione a vuoto a $75 \pm 3 \text{ °C}$ o a pressione atmosferica a $100 \pm 3 \text{ °C}$.

5. Procedura

5.1. Procedura A (cfr. punto 8.1)

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

Porre il ditale in un estrattore (punto 4.1) ed estrarre per sei ore con etere di petrolio (punto 3.1). Raccogliere l'estratto in un pallone asciutto e tarato, contenente frammenti di pietra pomice ⁽⁹⁾.

Eliminare il solvente per distillazione. Essiccare il residuo introducendo il pallone in una stufa per essiccazione (punto 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 degli oli e dei grassi rimanga costante (la perdita di peso tra due pesate consecutive deve essere pari o inferiore a 1 mg).

⁽⁹⁾ Sostituire i frammenti di pietra pomice con alcune biglie di vetro quando si debbano eseguire ulteriori esami qualitativi sulla sostanza oleosa o grassa.

5.2. Procedura 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 (punto 3.3) e qualche frammento di pietra pomice. Ricoprire il becher con un vetro di 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 di un coadiuvante di filtrazione (punto 3.4) sufficiente a evitare qualsiasi perdita di olio o grasso 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 oli o grassi. La loro presenza nel filtrato indica che, prima dell'idrolisi, deve essere effettuata un'estrazione del campione con etere di petrolio, secondo la procedura A.

Porre il doppio filtro con il residuo su un vetro di orologio ed essiccare per un'ora e mezza nella stufa a pressione atmosferica (punto 4.3) a 100 ± 3 °C.

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

5.3. Procedura A e riestrazione secondo la procedura B

Per la determinazione degli oli e dei grassi greggi nei semi e nei frutti oleaginosi nonché negli alimenti per animali il cui tenore di oli/grassi greggi è superiore al 15 %, l'estrazione deve essere effettuata secondo la procedura A e la riestrazione secondo la procedura B.

Ciò significa che, dopo l'estrazione con etere di petrolio (procedura A), il residuo o una parte del residuo è sottoposto a riestrazione con acido cloridrico (procedura B). Il tenore di oli e grassi greggi è ottenuto sommando i risultati delle procedure A e B.

6. Espressione dei risultati

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 i contenuti di oli e grassi greggi inferiori al 5 %;
- il 4,0 % del valore ottenuto più elevato, per i contenuti compresi fra 5 e 10 %;
- lo 0,4 % in valore assoluto, per i contenuti superiori al 10 %.

8. Osservazioni

8.1. Per i prodotti a elevato tenore di oli e grassi, 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 (punto 3.2). Procedere all'estrazione con etere di petrolio (punto 3.1) come indicato al punto 5.1. Portare l'estratto ottenuto al volume di 500 ml con etere di petrolio (punto 3.1) e mescolare. Introdurre 50 ml della soluzione in un palloncino asciutto, contenente qualche frammento 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 di 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 tenore di oli e grassi greggi, espresso in percentuale del campione, è dato dalla seguente formula:

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

dove:

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

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

- 8.2. Per alcuni prodotti (ad esempio prodotti poveri di oli e grassi) il campione può essere più grande.
- 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 la procedura B.
- 8.4. Nella procedura descritta 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 (1,5 ore) deve essere prolungato; tuttavia è evitato un tempo di essiccazione eccessivo, che potrebbe dare scarsi risultati. È possibile usare altresì un forno a microonde.

H. DETERMINAZIONE DELLA CELLULOSA GREZZA

1. Finalità e campo di applicazione

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

Il metodo non è applicabile nel caso della lignocellulosa e del carbone vegetale (particelle troppo fini).

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, $c = 0,13$ 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, intervallo di ebollizione tra 40 e 60 °C.
- 3.6. Acido cloridrico, $c = 0,5$ mol/l.
- 3.7. Soluzione di idrossido di potassio, $c = 0,23$ mol/l.

4. Apparecchiatura

- 4.1. Unità riscaldante per la mineralizzazione con soluzioni di acido solforico e di idrossido di potassio, dotata di supporto per crogiolo filtrante (punto 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 (punto 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 (punto 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 (punto 4.1), il crogiolo (punto 4.2) e il cilindro (punto 4.3) e per collegare l'unità di estrazione a freddo (punto 4.6) e il crogiolo.

5. Procedura

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 1 g del campione preparato e introdurlo nel crogiolo (punto 4.2) (cfr. osservazioni ai punti 9.1, 9.2 e 9.3) e aggiungere 1 g di coadiuvante di filtrazione (punto 3.3).

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

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

Posizionare la valvola verso il tubo di scarico (punto 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 (punto 3.7) nel cilindro e nel crogiolo assemblati e aggiungere qualche goccia di agente antischiuma (punto 3.2). Portare il liquido all'ebollizione entro 5 ± 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 (punto 4.6). Applicare il vuoto e sciacquare il residuo nel crogiolo tre volte con 25 ml di acetone ciascuna (punto 3.4) assicurandosi che il residuo sia filtrato a secco dopo ogni lavaggio.

Essiccare il crogiolo nella stufa a 130 °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) a una temperatura compresa tra 475 e 500 °C per almeno 30 minuti.

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

Procedere a 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 espressione:

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

dove:

m = peso del campione, in grammi;

m₀ = perdita di peso conseguente all'incenerimento nel corso della determinazione, in grammi;

m₁ = perdita di peso conseguente all'incenerimento nel corso della 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 % del valore più elevato, per i contenuti di cellulosa grezza uguali o superiori al 10 %.

8. Riproducibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate sullo stesso campione in laboratori distinti non deve superare:

- l'1,0 % in valore assoluto, per i contenuti di cellulosa grezza inferiori al 10 %;
- il 10 % del valore più elevato, per i contenuti di cellulosa grezza uguali o superiori al 10 %.

9. Osservazioni

- 9.1. Gli alimenti per animali che contengono più del 10 % di grassi greggi debbono essere sgrassati prima dell'analisi con etere di petrolio (punto 3.5). Collegare il crogiolo filtrante (punto 4.2) e il suo contenuto all'unità di estrazione a freddo (punto 4.6), applicare il vuoto e sciacquare il residuo tre volte con 30 ml di etere di petrolio ciascuna, assicurandosi che il residuo sia secco. Collegare il crogiolo e il suo contenuto all'unità riscaldante (punto 4.1) e proseguire come indicato al punto 5.
- 9.2. Gli alimenti per animali contenenti grassi che non possono essere estratti direttamente con etere di petrolio (punto 3.5) vanno sgrassati una prima volta come descritto al punto 8.1 e una seconda volta dopo ebollizione con l'acido. Dopo l'ebollizione con acido e i successivi lavaggi, collegare il crogiolo e il suo contenuto all'unità di estrazione a freddo (punto 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.
- 9.3. Se l'alimento contiene più del 5 % di carbonati, espressi in carbonato di calcio, collegare il crogiolo (punto 4.2) con il campione pesato all'unità riscaldante (punto 4.1). Lavare il campione tre volte con 30 ml di acido cloridrico (punto 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.
- 9.4. Se l'apparecchio utilizzato è composto da più crogioli collegati alla stessa unità riscaldante, non eseguire due prove sullo stesso campione nella stessa serie.
- 9.5. 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.
- 9.6. 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 shock termico eccessivo durante i cicli di riscaldamento e di raffreddamento.

I. DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI

1. Finalità e campo di applicazione

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

Questo metodo deve essere utilizzato per determinare il contenuto di zuccheri da utilizzare nel calcolo del valore energetico dell'alimento per animali.

Nel caso in cui il contenuto di zuccheri debba essere determinato per altri scopi, possono essere utilizzati altri metodi di analisi.

2. Principio

Gli zuccheri presenti sono sciolti nell'etanolo diluito; la soluzione è chiarificata con soluzioni 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 in 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.
- 3.7. Soluzione di idrossido di sodio, 0,1 mol/l.
- 3.8. Reattivo di Luff-Schoorl:
aggiungere, agitando prudentemente, la soluzione di acido citrico (punto 3.8.2) alla soluzione di carbonato di sodio (punto 3.8.3). Aggiungere quindi la soluzione di solfato di rame (punto 3.8.1) e portare a 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), 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, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, esente da ferro, in 100 ml d'acqua.
- 3.8.2. Soluzione di acido citrico: sciogliere 50 g di acido citrico, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, 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 d'amido solubile in 30 ml d'acqua a 1 litro d'acqua bollente. Far bollire per tre minuti, lasciar raffreddare, aggiungere eventualmente, come conservante, 10 mg di ioduro di mercurio.
- 3.11. Acido solforico (punto 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. **Procedura**

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 (punto 3.1) e far girare il pallone per un'ora nell'agitatore rotativo. Aggiungere 5 ml di soluzione di Carrez I (punto 3.2) e agitare per circa 30 secondi. Aggiungere quindi 5 ml di soluzione di Carrez II (punto 3.3) e agitare nuovamente per un minuto. Portare a volume con etanolo (punto 3.1), omogeneizzare e filtrare. Prelevare 200 ml del filtrato ed evaporare circa la metà del volume allo scopo di eliminare la maggior parte dell'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 (punto 3.4), poi, con molta attenzione, e sempre agitando, aggiungere acido cloridrico (punto 3.5) fino a ottenere un viraggio nettamente al rosso. Aggiungere 15 ml di acido cloridrico (punto 3.6), immergere il pallone per trenta minuti in bagnomaria a forte ebollizione e lasciarvelo per trenta minuti. Raffreddare rapidamente alla temperatura di circa 20 °C e aggiungere 15 ml di soluzione di idrossido di sodio (punto 3.7). Portare a 100 ml con acqua e 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 (punto 3.8) e introdurlo in un erlenmeyer da 300 ml; aggiungere 25 ml esatti della soluzione zuccherina chiarificata. Dopo aver aggiunto 2 granuli di pietra pomice (punto 3.13) riscaldare, agitando a mano, su fiamma libera di altezza media e portare il liquido a ebollizione in circa due minuti. Trasferire immediatamente l'erlenmeyer su una tela metallica provvista di uno schermo d'amianto con un foro del diametro di circa 6 cm, sotto la 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 ricadere. A decorrere da questo momento far bollire per dieci minuti esatti. Raffreddare immediatamente in acqua fredda e dopo circa cinque minuti titolare nel modo seguente.

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

Effettuare la stessa titolazione su di una miscela, esattamente misurata, di 25 ml di reattivo di Luff-Schoorl (punto 3.8) e 25 ml d'acqua, dopo aver aggiunto 10 ml di soluzione di ioduro di potassio (punto 3.12) e 25 ml di acido solforico (punto 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, espressi in ml di tiosolfato di sodio 0,1 mol/l. Esprimere il risultato in percentuale del campione.

7. **Procedure 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'agitatore rotativo per un'ora. Chiarificare con le soluzioni di Carrez I (punto 3.2) e Carrez II (punto 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'agitatore rotativo per un'ora o più, se necessario. Chiarificare con le soluzioni di Carrez I (punto 3.2) e Carrez II (punto 3.3), come descritto al punto 5.1. Portare a volume con acqua fredda, 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 (punto 3.14) (senza tener conto del volume), prima dell'ebollizione con il reattivo di Luff-Schoorl, onde evitare la formazione di schiuma.

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. Per la determinazione del contenuto di zuccheri riduttori, a esclusione del lattosio, possono essere applicati due metodi.

- 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 alla procedura 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:

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

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

ml di Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/l, due minuti di riscaldamento, dieci minuti di ebollizione

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

J. DETERMINAZIONE DEL LATTOSIO

1. Finalità e campo di 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 con il 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 (punto 3.4.2) nella soluzione di carbonato di sodio (punto 3.4.3). Aggiungere la soluzione di solfato di rame (punto 3.4.1) e portare a 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 (punto 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 tre 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. Procedura

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 trenta minuti in un bagnomaria bollente e lasciarlo poi raffreddare a circa 35 °C. Aggiungere 5 ml di sospensione di lievito (punto 3.1) e omogeneizzare. Lasciar riposare il pallone per due 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 (punto 3.2) e agitare per trenta secondi; aggiungere poi 2,5 ml di soluzione di Carrez II (punto 3.3) e agitare nuovamente per trenta secondi. Portare a 100 ml con acqua, mescolare e 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 (punto 3.1). Determinare il contenuto di lattosio secondo il metodo di Luff-Schoorl come segue: aggiungere 25 ml esatti del reattivo di Luff-Schoorl (punto 3.4) e due granuli di pietra pomice (punto 3.5). Riscaldare agitando a mano su una fiamma libera di media altezza e portare il liquido all'ebollizione in circa due minuti. Trasferire immediatamente l'erlenmeyer su

una tela metallica provvista di uno schermo d'amianto con un foro del diametro di circa 6 cm, sotto la 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 ricadere. A decorrere da questo momento far bollire per dieci minuti esatti. Raffreddare immediatamente in acqua fredda e dopo circa cinque minuti titolare nel modo seguente.

Aggiungere 10 ml di soluzione di ioduro di potassio (punto 3.6) e, subito dopo, con molta attenzione (a causa del rischio di formazione di abbondante schiuma), 25 ml di acido solforico (punto 3.7). Titolare quindi con la soluzione di tiosolfato di sodio (punto 3.8) sino all'apparire di una colorazione giallo opaco, aggiungere l'indicatore all'amido (punto 3.9) e terminare la titolazione.

Effettuare la stessa titolazione su di una miscela, esattamente misurata, di 25 ml di reattivo di Luff-Schoorl (punto 3.4) e 25 ml d'acqua, dopo aver aggiunto 10 ml di soluzione di ioduro di potassio (punto 3.6) e 25 ml di acido solforico (punto 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 del lattosio anidro in percentuale del campione.

7. Osservazione

- Per i prodotti contenenti più del 40 % di zuccheri fermentescibili, utilizzare più di 5 ml di sospensione di lievito (punto 3.1).
- Negli alimenti a «ridotto tenore di lattosio» (ad esempio latte per gatti), il lattosio è convertito in fruttosio, che non fermenta completamente entro 2 ore; questo risulta in valori più elevati o falsi positivi (a causa dei residui di fruttosio che rimangono nell'estratto).

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

ml di Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/l, due minuti di riscaldamento, dieci minuti di ebollizione

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

K. DETERMINAZIONE DELL'AMIDO

METODO POLARIMETRICO

1. Finalità e campo di 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 al regolamento (CE) n. 767/2009.

Questo metodo deve essere utilizzato per determinare il contenuto di amido da utilizzare nel calcolo del valore energetico dell'alimento per animali.

Nel caso in cui il contenuto di amido debba essere determinato per altri scopi, possono essere utilizzati altri metodi di analisi.

2. Principio

Il metodo prevede due determinazioni. 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 in acqua 10,6 g di ferrocianuro di potassio $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Portare a 100 ml con acqua.

3.5. Soluzione di etanolo 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. Procedura

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 al punto 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 (punto 3.2), agitare per ottenere una buona ripartizione della sostanza e aggiungere altri 25 ml di acido cloridrico (punto 3.2). Immergere il pallone in bagnomaria bollente, agitando energicamente e regolarmente per i 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 (punto 3.3) e agitare per circa 30 secondi. Aggiungere quindi 5 ml di soluzione di Carrez II (punto 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 soluzioni 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 o 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 (punto 3.5) (cfr. osservazione al punto 7.2). Lasciar riposare il pallone per 1 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 (punto 3.5), mescolare e filtrare.

Pipettare 50 ml del filtrato (corrispondenti a 2,5 g del campione) in un erlenmeyer da 250 ml, aggiungere 2,1 ml di acido cloridrico (punto 3.1) e agitare energicamente. Applicare un refrigerante a ricadere sull'erlenmeyer e immergerlo in bagnomaria bollente. Dopo 15 minuti esatti ritirare l'erlenmeyer dal bagno, travasarne il contenuto in un pallone tarato da 100 ml, sciacquando con un po' di acqua fredda, e raffreddare sino a 20 °C.

Chiarificare quindi con le soluzioni di Carrez I (punto 3.3) e II (punto 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

$$\text{Contenuto di amido (\%)} = \frac{2000 \times (P - P')}{[\alpha]_D^{20}}$$

P = potere rotatorio totale in gradi d'arco;

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

$[\alpha]_D^{20}$ = potere rotatorio specifico dell'amido puro. I valori numerici 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*

$$\text{Contenuto di amido (\%)} = \frac{2000}{[\alpha]_D^{20}} \times \frac{(2N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20}}$$

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 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 (punto 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 con il 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;

— prodotti a base di soia.

In questi casi può essere applicato il metodo di analisi previsto dal regolamento (CE) n. 121/2008 della Commissione⁽⁷⁾. Questo metodo può essere utilizzato anche per gli alimenti per animali contenenti meno dell'1 % di amido.

⁽⁷⁾ Regolamento (CE) n. 121/2008 della Commissione, dell'11 febbraio 2008, che fissa il metodo di analisi per la determinazione del tenore di amido nelle preparazioni dei tipi utilizzati per l'alimentazione degli animali (codice NC 2309) (GU L 37 del 12.2.2008, pag. 3).

L. DETERMINAZIONE DELLE CENERI GREZZE

1. **Finalità e campo di applicazione**

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

2. **Principio**

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

3. **Reattivi**

Nitrato di 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 (circa 60 × 40 × 25 mm) o circolari (diametro di 60-75 mm, altezza da 20 a 40 mm).

5. **Procedura**

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 al punto 5.1 o 5.2.

5.1. Introdurre 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 deducendo 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 tre ore, lasciati raffreddare e addizionati di alcune gocce di una soluzione al 20 % di nitrato di ammonio o acqua (con cautela, per evitare la proiezione o l'aggregazione delle ceneri). Proseguire la calcinazione dopo essiccazione nella stufa. 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 tre 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 pari a 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.

M. DETERMINAZIONE DELLE CENERI INSOLUBILI IN ACIDO CLORIDRICO

1. **Finalità e campo di applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di sostanze minerali insolubili nell'acido cloridrico presenti negli alimenti per animali. Possono essere utilizzati due metodi, in funzione della natura del campione.

- 1.1. *Metodo A*: applicabile alle materie prime di origine organica per alimenti per animali e 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, 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 (circa 60 × 40 × 25 mm) o circolari (diametro di 60-75 mm, altezza da 20 a 40 mm).
- 4.4. Filtri senza ceneri.

5. Procedura

5.1. *Metodo A*

Incenerire la sostanza da analizzare secondo il metodo 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 di acido cloridrico (punto 3.1). Portare lentamente a ebollizione e lasciare bollire adagio per quindici 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 di acido cloridrico (punto 3.1), agitare sino a cessazione dell'effervescenza. Aggiungere altri 50 ml di acido cloridrico (punto 3.1). Attendere la fine della nuova effervescenza e porre il becher in un bagno di acqua bollente e tenervelo per la durata di trenta minuti o più, se necessario, al fine di 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 al punto 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 utilizzando 75 ml di acido cloridrico (punto 3.1) e continuare come descritto al punto 5.1, secondo capoverso.

6. Calcolo dei risultati

Calcolare il peso del residuo deducendo 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 (punto 3.1) con 50 ml di acido tricloroacetico, soluzione al 20 % (p/v) (punto 3.2), e lavando il filtro mediante una soluzione calda di acido tricloroacetico all'1 % (punto 3.3).

N. DETERMINAZIONE DEL FOSFORO TOTALE

Il fosforo totale deve essere determinato:

- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 15510 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione di calcio, sodio, fosforo, magnesio, potassio, ferro, zinco, rame, manganese, cobalto, molibdeno, e piombo mediante spettrometria di emissione atomica al plasma induttivamente accoppiato (ICP- AES); o
- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 15621 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione di calcio, sodio, fosforo, magnesio, potassio, zolfo, ferro, zinco, rame, manganese e cobalto dopo digestione sotto pressione mediante spettrometria di emissione atomica al plasma induttivamente accoppiato (ICP-AES); o
- mediante il metodo fotometrico descritto di seguito.

METODO FOTOMETRICO

1. Finalità e campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del contenuto di fosforo totale negli alimenti per 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 cloridrico, $\rho_{20} = 1,10$ 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 di ammonio (punto 3.6.1) con 200 ml di soluzione di monovanadato di ammonio (punto 3.6.2) e 134 ml di acido nitrico (punto 3.4). Portare a volume con acqua.
 - 3.6.1. Soluzione di eptamolibdato di ammonio: sciogliere in acqua calda 100 g di eptamolibdato di ammonio (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 NH_4VO_3 in 400 ml di acqua calda. Aggiungere lentamente sempre agitando 20 ml di acido nitrico diluito [7 ml di HNO_3 (punto 3.4) + 13 ml di H_2O] e portare a 1 litro con acqua.
- 3.7. Soluzione standard, contenente 1 mg di fosforo per ml: sciogliere in acqua 4,387 g di potassio diidrogeno fosfato KH_2PO_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. Provette a tappo smerigliato, diametro circa 16 mm, a smerigliatura normalizzata 14,5 mm; capacità: 25-30 ml.

5. **Procedura**

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 (punto 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 2 ml di acido nitrico (punto 3.4), riscaldare lentamente, lasciare ancora raffreddare leggermente, aggiungere dell'altro acido nitrico (punto 3.4) e portare il tutto nuovamente a ebollizione. Ripetere la procedura 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 matraccio di Kjeldahl con acqua calda. Lasciar raffreddare, portare a volume con acqua, omogeneizzare 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 (punto 3.1). Incenerire nella stufa 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 (punto 3.2) sino a cessazione dell'effervescenza. Aggiungere altri 10 ml di acido cloridrico (punto 3.2). Porre il becher su un bagno di sabbia ed evaporare a secco per insolubilizzare la silice. Riprendere il residuo con 10 ml di acido nitrico (punto 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, omogeneizzare e filtrare.

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

Diluire un'aliquota 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 una provetta (punto 4.6) 10 ml di questa soluzione e aggiungervi 10 ml del reattivo vanado-molibdico (punto 3.6). Omogeneizzare 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 (punto 3.6) a 10 ml di acqua.

5.3. *Curva di taratura*

Preparare, a partire dalla soluzione standard (punto 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 (punto 3.6). Omogeneizzare e lasciar riposare almeno 10 minuti alla temperatura di 20 °C. Misurare la densità ottica come indicato al punto 5.2. Tracciare la curva di taratura portando in ordinata i valori di densità ottica e 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 % del valore più elevato, per i contenuti di fosforo inferiori al 5 %;
- lo 0,15 % in valore assoluto, per i contenuti di fosforo uguali o superiori al 5 %.

O. DETERMINAZIONE DEL CLORO DEI CLORURI

1. Finalità e campo di 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 animali.

2. Principio

I cloruri sono disciolti in acqua. Se il prodotto contiene sostanze organiche, si procede a 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. Procedura

5.1. Preparazione della soluzione

Secondo la natura del campione preparare una soluzione come indicato al punto 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. Miscelare per trenta minuti nell'agitatore rotativo, portare a volume, omogeneizzare e filtrare.

5.1.2. Campioni contenenti sostanze 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 1 g 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 (punto 3.7), agitare per 30 secondi e aggiungere 5 ml di soluzione di Carrez II (punto 3.8). Miscelare per trenta minuti nell'agitatore rotativo, portare a volume, omogeneizzare e filtrare.

5.1.3. Alimenti cotti, panelli e farina di lino, prodotti ricchi di farina di lino e altri prodotti ricchi di mucillagini 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 surnatante e introdurli in un pallone tarato da 200 ml. Mescolare con acetone (punto 3.6) e portare a volume con tale solvente, omogeneizzare 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 al punto 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 almeno 50 ml, aggiungere 5 ml di acido nitrico (punto 3.4), 2 ml di soluzione satura di bis(solfato) di ammonio e ferro (punto 3.3) e due gocce di soluzione di tiocianato di ammonio (punto 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 (punto 3.2) fino ad averne un eccesso di 5 ml. Aggiungere 5 ml di etere dietilico (punto 3.5) e agitare energicamente per far coagulare il precipitato. Titolare l'eccesso di nitrato d'argento con la soluzione di tiocianato di ammonio (punto 3.1) fino a quando il viraggio al rosso-bruno persiste per un minuto.

6. **Calcolo dei risultati**

La quantità di cloro (X), espressa in % di 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 in g del campione nell'aliquota.

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 o amperometrico.

7.2. Per i prodotti molto ricchi in oli e grassi, 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

«ALLEGATO IV

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

A. DETERMINAZIONE DELLA VITAMINA A

La vitamina A deve essere determinata:

- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 17547 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione del contenuto di vitamina A, E e D ⁽¹⁾ - Metodo che utilizza la purificazione con estrazione in fase solida (SPE) e cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC); o
- mediante cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC) utilizzando un rivelatore UV o a fluorescenza, come descritto nei punti da 1 a 9 in appresso.

1. Finalità e campo di applicazione

Il metodo consente di determinare il contenuto di vitamina A (retinolo) negli alimenti per animali. La vitamina A comprende l'alcole retinilico tutto *trans* e i suoi isomeri *cis* che vengono determinati con questo 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 è idrolizzato con una soluzione etanolica di idrossido di potassio e la vitamina A è 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 mediante 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 °C-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 (punto 3.1).
- 3.8. 2-propanolo.
- 3.9. Fase mobile per HPLC: miscela di metanolo (punto 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.

⁽¹⁾ Il metodo di analisi di cui alla norma EN 17547 è indicato come metodo alternativo da utilizzare a fini di controllo ufficiale per la determinazione della vitamina A e della vitamina E invece del metodo descritto per la determinazione della vitamina A nella parte A del presente allegato e per la determinazione della vitamina E nella parte B del presente allegato.

- 3.11. Acetato di vitamina A tutto *trans*, purissimo, di attività certificata, ad esempio $2,80 \times 10^6$ 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 (punto 3.11). Sciogliere in 2-propanolo (punto 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 $1,80 \times 10^6$ UI/g.
- 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 (punto 3.12). Sciogliere in 2-propanolo (punto 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-*terz*-butil-4-metilfenolo (BHT) (cfr. osservazione 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 sistema di iniezione.
- 4.5.1. Colonna per cromatografia liquida, 250 mm \times 4 mm, C₁₈, particelle di riempimento 5 o 10 μ m, 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. 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. Procedura

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. Non frantumare i campioni se la distribuzione delle dimensioni delle particelle è adeguata (ad esempio premiscele e additivi per mangimi).

5.2. Saponificazione

A seconda del contenuto di vitamina A, pesare, con l'approssimazione di 1 mg, da 2 g a 25 g di campione in un matraccio a fondo piatto o in una beuta da 500 ml (punto 4.2.1). In caso di concentrazioni basse, il peso del campione può essere aumentato affinché nella quantità di sostanza sottoposta all'analisi vi siano particelle sufficienti. Aggiungere successivamente, sempre rimestando, 130 ml di etanolo (punto 3.1), circa 100 mg di BHT (punto 3.13), 2 ml di soluzione di ascorbato di sodio (punto 3.5) e 2 ml di soluzione di solfuro di sodio (punto 3.6). Adattare un refrigerante (punto 4.3) al matraccio o alla beuta e immergere il matraccio o la beuta in un bagnomaria con agitatore magnetico (punto 4.7). Portare a ebollizione e lasciare rifluire per 5 minuti. Aggiungere quindi 25 ml di soluzione di idrossido di potassio (punto 3.4) attraverso il refrigerante (punto 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 o della beuta 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 (punto 4.2.3) o nel dispositivo di estrazione (punto 4.8). Risciacquare successivamente il matraccio o la beuta di saponificazione con 25 ml di etanolo (punto 3.1) e 100 ml di etere di petrolio (punto 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 (punto 4.2.3)

Quando gli strati si sono separati (cfr. osservazione al punto 7.3) trasferire lo strato di etere di petrolio in un altro imbuto separatore (punto 4.2.3). Ripetere questa estrazione due volte con 100 ml di etere di petrolio (punto 3.2), poi ancora due volte con 50 ml di etere di petrolio (punto 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 fenoltaleina (punto 3.7) (in genere sono sufficienti quattro lavaggi). Filtrare l'estratto lavato attraverso un filtro piegheggiato asciutto per separazione di fase (punto 4.4) per rimuovere eventuale acqua residua e trasferire in un matraccio tarato da 500 ml (punto 4.2.2). Risciacquare l'imbuto separatore e il filtro con 50 ml di etere di petrolio (punto 3.2), portare a volume con etere di petrolio (punto 3.2) e mescolare bene.

5.3.2. Estrazione con dispositivo di estrazione (punto 4.8)

Quando gli strati si sono separati (cfr. osservazione al punto 7.3) sostituire il tappo del cilindro di vetro (punto 4.8.1) con l'insert di vetro smerigliato (punto 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 (punto 4.2.3). Aggiungere 100 ml di etere di petrolio (punto 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 (punto 3.2), poi ancora due volte con volumi di 50 ml di etere di petrolio (punto 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 al punto 5.3.1 o 5.3.2) in un matraccio a pera da 250 ml (punto 4.2.4). Far evaporare il solvente sin quasi all'essiccazione nell'evaporatore rotante (punto 4.1), a pressione ridotta, a una temperatura del bagno non superiore a 40 °C. Ripristinare la pressione atmosferica facendovi fluire azoto (punto 3.10) e togliere il matraccio dall'evaporatore rotante. Togliere il solvente rimanente con un flusso di azoto (punto 3.10) e disciogliere immediatamente il residuo in un volume noto (10-100 ml) di metanolo (punto 3.3) (la concentrazione di vitamina A deve essere dell'ordine di 5-30 UI/ml).

5.5. Determinazione HPLC

La vitamina A è separata su una colonna C₁₈ a fase inversa (punto 4.5.1) e la concentrazione è misurata mediante rivelatore UV (punto 325 nm) o a fluorescenza (eccitazione: 325 nm, emissione: 475 nm) (punto 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 (punto 3.9). Calcolare l'altezza (area) media dei picchi di diverse iniezioni della stessa soluzione del campione e le altezze (aree) medie dei picchi di diverse iniezioni di soluzioni di taratura (punto 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 (punto 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C18, particelle di riempimento 5 o 10 µm, o equivalente
Fase mobile (punto 3.9):	miscela di metanolo (punto 3.3) e acqua, ad esempio 980 + 20 (v + v)
Velocità di efflusso:	1-2 ml/min
Rivelatore (punto 4.5.2):	rivelatore UV (punto 325 nm) o rivelatore a fluorescenza (eccitazione: 325 nm/emissione: 475 nm).

5.6. Taratura

5.6.1. Preparazione delle soluzioni standard di lavoro

Pipettare 20 ml della soluzione madre di acetato di vitamina A (punto 3.11.1) o 20 ml della soluzione madre di palmitato di vitamina A (punto 3.12.1) in un matraccio a fondo piatto o in una beuta da 500 ml (punto 4.2.1) e idrolizzare come indicato al punto 5.2, ma senza aggiunta di BHT. Successivamente, estrarre con etere di petrolio (punto 3.2) secondo le indicazioni di cui al punto 5.3 e portare a 500 ml con etere di petrolio (punto 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 (punto 3.10) e ridisciogliere il residuo in 10,0 ml di metanolo (punto 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 standard di lavoro deve essere preparata al momento, prima dell'uso.

Pipettare 2,0 ml di questa soluzione standard di lavoro in un matraccio tarato da 20 ml, portare a volume con metanolo (punto 3.3) e mescolare. La concentrazione nominale di questa soluzione standard di lavoro diluita 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, 2,0, 5,0 e 10,0 ml della soluzione standard di lavoro diluita, portare a volume con metanolo (punto 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 (aree) medie dei picchi. Sulla base delle altezze (aree) medie dei picchi tracciare una curva di taratura tenendo presenti i risultati del controllo UV (punto 5.6.3.3).

5.6.3. Standardizzazione UV delle soluzioni standard

5.6.3.1. Soluzione madre di acetato di vitamina A

Pipettare 2,0 ml della soluzione madre di acetato di vitamina A (punto 3.11.1) in un matraccio tarato da 50 ml (punto 4.2.2) e portare a volume con 2-propanolo (punto 3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è 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 (punto 3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è 6,72 UI di vitamina A/ml. Misurare lo spettro UV di questa soluzione su 2-propanolo (punto 3.8) nello spettrofotometro (punto 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:

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

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

5.6.3.2. Soluzione madre di palmitato di vitamina A

Pipettare 2,0 ml della soluzione madre di palmitato di vitamina A (punto 3.12.1) in un matraccio tarato da 50 ml (punto 4.2.2) e portare a volume con 2-propanolo (punto 3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è 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 (punto 3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è 6,72 UI di vitamina A/ml. Misurare lo spettro UV di questa soluzione su 2-propanolo (punto 3.8) nello spettrofotometro (punto 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:

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

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

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 (punto 4.2.2) e portare a volume con 2-propanolo (punto 3.8). Pipettare 5,0 ml di questa soluzione in un matraccio tarato da 25 ml e portare a volume con 2-propanolo (punto 3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è 6,72 UI di vitamina A/ml. Misurare lo spettro UV di questa soluzione su 2-propanolo (punto 3.8) nello spettrofotometro (punto 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:

$$\text{UI di vitamina A/ml} = E_{325} \times 18,30$$

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

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 di tale soluzione, per riferimento alla curva di taratura (punto 5.6.2).

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 (punto 5.4), in UI/ml;

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

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

m = peso della quantità di sostanza sottoposta all'analisi, in grammi.

7. Osservazioni

- 7.1. Per i campioni con bassa 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 peso del campione prelevato per l'analisi non contiene più di 2 g di grassi.
- 7.3. Se non ha luogo la separazione di fase, aggiungere circa 10 ml di etanolo (punto 3.1) affinché l'emulsione si rompa.
- 7.4. Con olio di fegato di merluzzo e 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. 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. In caso di analisi della vitamina A negli alimenti d'allattamento, va prestata particolare attenzione:
- alla saponificazione (punto 5.2): a causa della quantità di grasso presente nel campione, potrebbe rivelarsi necessario aumentare la quantità di soluzione di idrossido di potassio (punto 3.4);
 - all'estrazione (punto 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'aliquota da saggio 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 tra 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 collaborativo ⁽²⁾

	Premiscela	Alimento premiscelato	Concentrato minerale	Alimento 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

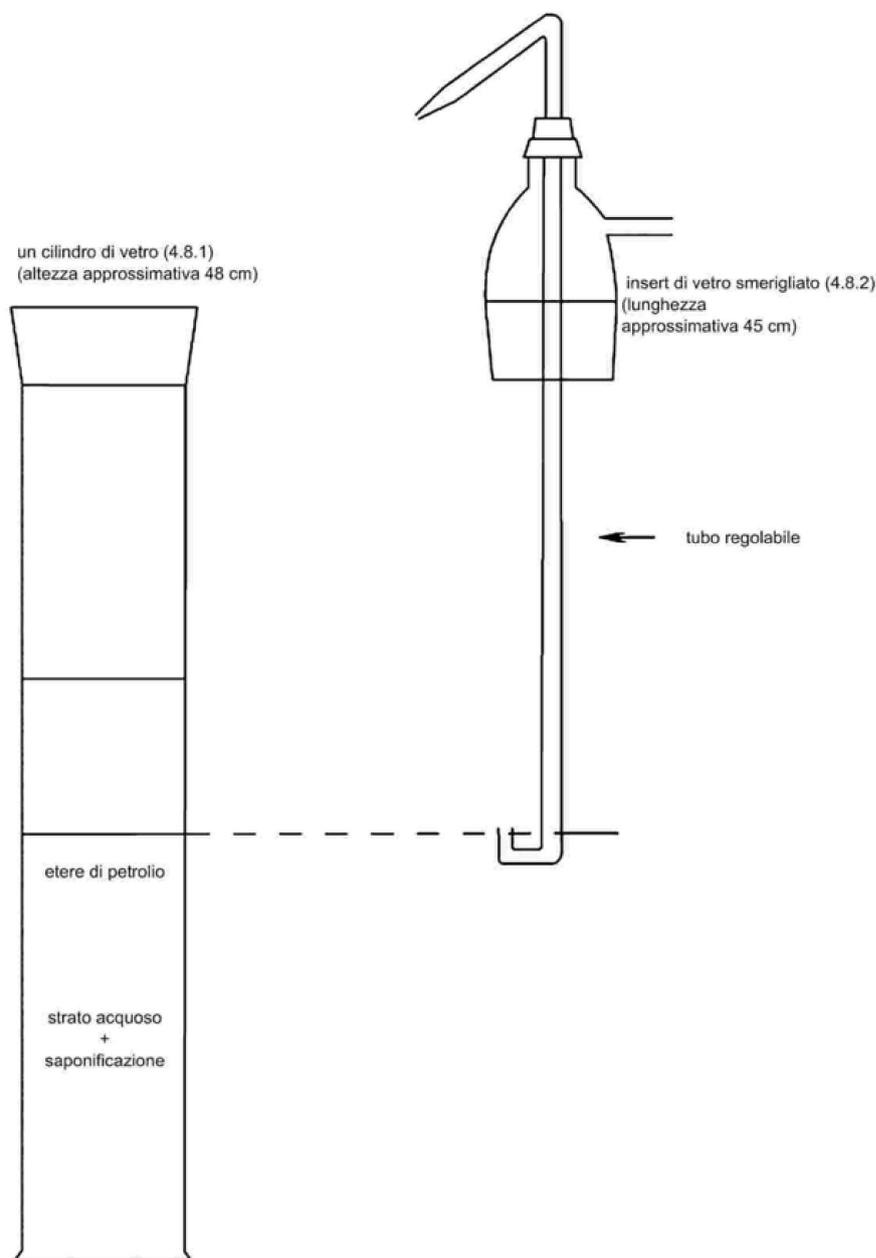
⁽²⁾ Studio effettuato dal gruppo di lavoro Alimenti per animali del Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA)

CV_R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20
------------	-----	-----	-----	----	----

L: numero di laboratori
n: numero di valori singoli
sr: deviazione standard della ripetibilità
sR: deviazione standard della riproducibilità
r: ripetibilità
R: riproducibilità
CVr: coefficiente di variazione della ripetibilità
CVR: coefficiente di variazione della riproducibilità

Figura 1

Dispositivo di estrazione (punto 4.8.)



B. DETERMINAZIONE DELLA VITAMINA E

La vitamina E deve essere determinata:

- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 17547 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione del contenuto di vitamina A, E e D ⁽³⁾ - Metodo che utilizza la purificazione con estrazione in fase solida (SPE) e cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC); o
- mediante cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC) utilizzando un rivelatore UV o a fluorescenza, come descritto nei punti da 1 a 9 in appresso.

1. Finalità e campo di applicazione

Il metodo consente di determinare il contenuto di vitamina E negli alimenti per animali. Il contenuto di vitamina E è espresso in mg di acetato di DL- α -tocoferolo per kg. 1 mg di acetato di DL- α -tocoferolo corrisponde a 0,91 mg di DL- α -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 è rimosso per evaporazione e il residuo sciolto in metanolo e, se necessario, diluito alla concentrazione richiesta. Il contenuto di vitamina E è determinato mediante 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 °C-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 (punto 3.1).
- 3.8. Fase mobile per HPLC: miscela di metanolo (punto 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- α -tocoferolo, purissimo, di attività certificata.
- 3.10.1. Soluzione madre di acetato di DL- α -tocoferolo: in un matraccio tarato da 100 ml, pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 100 mg di acetato di DL- α -tocoferolo (punto 3.10). Sciogliere in etanolo (punto 3.1) e portare a volume con lo stesso solvente. 1 ml di questa soluzione contiene 1 mg di acetato di DL- α -tocoferolo (per il controllo UV, cfr. punto 5.6.1.3; per la stabilizzazione cfr. osservazione al punto 7.4).

⁽³⁾ Il metodo di analisi di cui alla norma EN 17547 è indicato come metodo alternativo da utilizzare a fini di controllo ufficiale per la determinazione della vitamina A e della vitamina E invece del metodo descritto per la determinazione della vitamina A nella parte A del presente allegato e per la determinazione della vitamina E nella parte B del presente allegato.

- 3.11. DL- α -tocoferolo, purissimo, di attività certificata.
 - 3.11.1. Soluzione madre di DL- α -tocoferolo: in un matraccio tarato da 100 ml, pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 100 mg di DL- α -tocoferolo (punto 3.11). Sciogliere in etanolo (punto 3.1) e portare a volume con lo stesso solvente. 1 ml di questa soluzione contiene 1 mg di DL- α -tocoferolo (per il controllo UV, cfr. punto 5.6.2.3; per la stabilizzazione cfr. osservazione al punto 7.4).
- 3.12. 2,6-di-*terz*-butil-4-metilfenolo (BHT) (cfr. osservazione al punto 7.5).

4. **Apparecchiatura**

- 4.1. Evaporatore rotante a film.
- 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 sistema di iniezione.
 - 4.5.1. Colonna per cromatografia liquida, 250 mm \times 4 mm, C₁₈, particelle di riempimento 5 o 10 μ m, 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 2) 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. **Procedura**

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 a fondo piatto o in una beuta da 500 ml (punto 4.2.1). Aggiungere successivamente, sempre rimestando, 130 ml di etanolo (punto 3.1), circa 100 mg di BHT (punto 3.12), 2 ml di soluzione di ascorbato di sodio (punto 3.5) e 2 ml di soluzione di solfuro di sodio (punto 3.6). Adattare il refrigerante (punto 4.3) al matraccio o alla beuta e immergere il matraccio o la beuta in un bagnomaria con agitatore magnetico (punto 4.7). Portare a ebollizione e lasciare rifluire per 5 minuti. Aggiungere quindi 25 ml di soluzione di idrossido di potassio (punto 3.4) attraverso il refrigerante (punto 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 o della beuta 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 (punto 4.2.3) o nel dispositivo di estrazione (punto 4.8). Risciacquare successivamente il matraccio o la beuta di saponificazione con 25 ml di etanolo (punto 3.1) e 100 ml di etere di petrolio (punto 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 (punto 4.2.3)

Quando gli strati si sono separati (cfr. osservazione al punto 7.3) trasferire lo strato di etere di petrolio in un altro imbuto separatore (punto 4.2.3). Ripetere questa estrazione due volte con 100 ml di etere di petrolio (punto 3.2), poi ancora due volte con 50 ml di etere di petrolio (punto 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 fenoltaleina (punto 3.7) (in genere sono sufficienti quattro lavaggi). Filtrare l'estratto lavato attraverso un filtro pieghettato asciutto per separazione di fase (punto 4.4) per rimuovere eventuale acqua residua e trasferire in un matraccio tarato da 500 ml (punto 4.2.2). Risciacquare l'imbuto separatore e il filtro con 50 ml di etere di petrolio (punto 3.2), portare a volume con etere di petrolio (punto 3.2) e mescolare bene.

5.3.2. Estrazione con dispositivo di estrazione (punto 4.8)

Quando gli strati si sono separati (cfr. osservazione al punto 7.3) sostituire il tappo del cilindro di vetro (punto 4.8.1) con l'inserto di vetro smerigliato (punto 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 (punto 4.2.3). Aggiungere 100 ml di etere di petrolio (punto 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 (punto 3.2), poi ancora due volte con volumi di 50 ml di etere di petrolio (punto 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 al punto 5.3.1 o 5.3.2) in un matraccio a pera da 250 ml (punto 4.2.4). Far evaporare il solvente sin quasi all'essiccazione nell'evaporatore rotante (punto 4.1), a pressione ridotta, a una temperatura del bagno non superiore a 40 °C. Ripristinare la pressione atmosferica facendovi fluire azoto (punto 3.9) e togliere il matraccio dall'evaporatore rotante. Togliere il solvente rimanente con un flusso di azoto (punto 3.9) e disciogliere immediatamente il residuo in un volume noto (10-100 ml) di metanolo (punto 3.3) (la concentrazione di DL- α -tocoferolo deve essere dell'ordine di 5-30 $\mu\text{g/ml}$).

5.5. Determinazione HPLC

La vitamina E è separata su una colonna C_{18} a fase inversa (punto 4.5.1) e la concentrazione è misurata mediante rivelatore a fluorescenza (eccitazione: 295 nm, emissione: 330 nm) o rivelatore UV (292 nm) (punto 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 (punto 3.8). Calcolare le altezze (aree) medie dei picchi di diverse iniezioni della stessa soluzione del campione e le altezze (aree) medie dei picchi di diverse iniezioni delle soluzioni di taratura (punto 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 (punto 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C18, particelle di riempimento 5 o 10 µm, o equivalente
Fase mobile (punto 3.8):	miscela di metanolo (punto 3.3) e acqua, ad esempio 980 + 20 (v + v)
Velocità di efflusso:	1-2 ml/min
Rivelatore (punto 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 (punto 3.10.1) in un matraccio a fondo piatto o in una beuta da 500 ml (punto 4.2.1) e idrolizzare come indicato al punto 5.2. Successivamente, estrarre con etere di petrolio (punto 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 rotante (cfr. punto 5.4) sin quasi all'essiccazione, togliere il solvente residuo con una corrente di azoto .9) e ridisciogliere il residuo in 25,0 ml di metanolo (punto 3.3). La concentrazione nominale di questa soluzione è 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, 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 (punto 3.3) e mescolare. 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 (aree) medie dei picchi. Sulla base delle altezze (aree) medie dei picchi tracciare una curva di taratura.

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

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

5.6.2. Standard di DL- α -tocoferolo

5.6.2.1. Preparazione della soluzione standard di lavoro

Pipettare 2 ml della soluzione madre di DL- α -tocoferolo (punto 3.11.1) in un matraccio tarato da 50 ml, sciogliere in metanolo (punto 3.3) e portare a volume con metanolo. La concentrazione nominale di questa soluzione è 40 µg di DL- α -tocoferolo/ml, equivalente a 44,0 µg di acetato di DL- α -tocoferolo/ml. La soluzione standard di lavoro deve essere preparata al momento, 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 (punto 3.3) e mescolare. Le concentrazioni nominali di queste soluzioni sono 2,0, 4,0, 8,0 e 20,0 µg/ml di DL- α -tocoferolo e cioè 2,20, 4,40, 8,79 e 22,0 µg/ml di acetato di DL- α -tocoferolo.

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

5.6.2.3. Standardizzazione UV della soluzione madre di DL- α -tocoferolo (punto 3.11.1)

Diluire 2,0 ml della soluzione madre di DL- α -tocoferolo (punto 3.11.1) sino a 25,0 ml con etanolo e misurare lo spettro UV di questa soluzione su etanolo (punto 3.1) nello spettrofotometro (punto 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 deve ottenere un valore di estinzione di 0,6.

6. Calcolo dei risultati

Determinare la concentrazione della soluzione del campione in µg/ml (calcolata come acetato di DL- α -tocoferolo) in base all'altezza (area) media dei picchi della vitamina E di tale soluzione, per riferimento alla curva di taratura (punto 5.6.1.2 o 5.6.2.2).

Il contenuto w di vitamina E (in mg/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 acetato di DL- α -tocoferolo) nella soluzione del campione (punto 5.4), in µg/ml;

V1 = volume della soluzione del campione (punto 5.4), in ml;

V2 = volume dell'aliquota prelevata come indicato al punto 5.4, in ml;

m = peso della quantità di sostanza sottoposta all'analisi, in grammi.

7. Osservazioni

7.1. Per i campioni con bassa 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 grassi.

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

7.4. Dopo la misurazione spettrofotometrica dell'acetato di DL- α -tocoferolo o della soluzione di DL- α -tocoferolo rispettivamente secondo il punto 5.6.1.3 o 5.6.2.3, aggiungere circa 10 mg di BHT (punto 3.12) alla soluzione (punto 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 α , β , γ e δ .

- 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 tra 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 collaborativo (*)**

	Premiscela	Alimento premiscelato	Concentrato minerale	Alimento 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

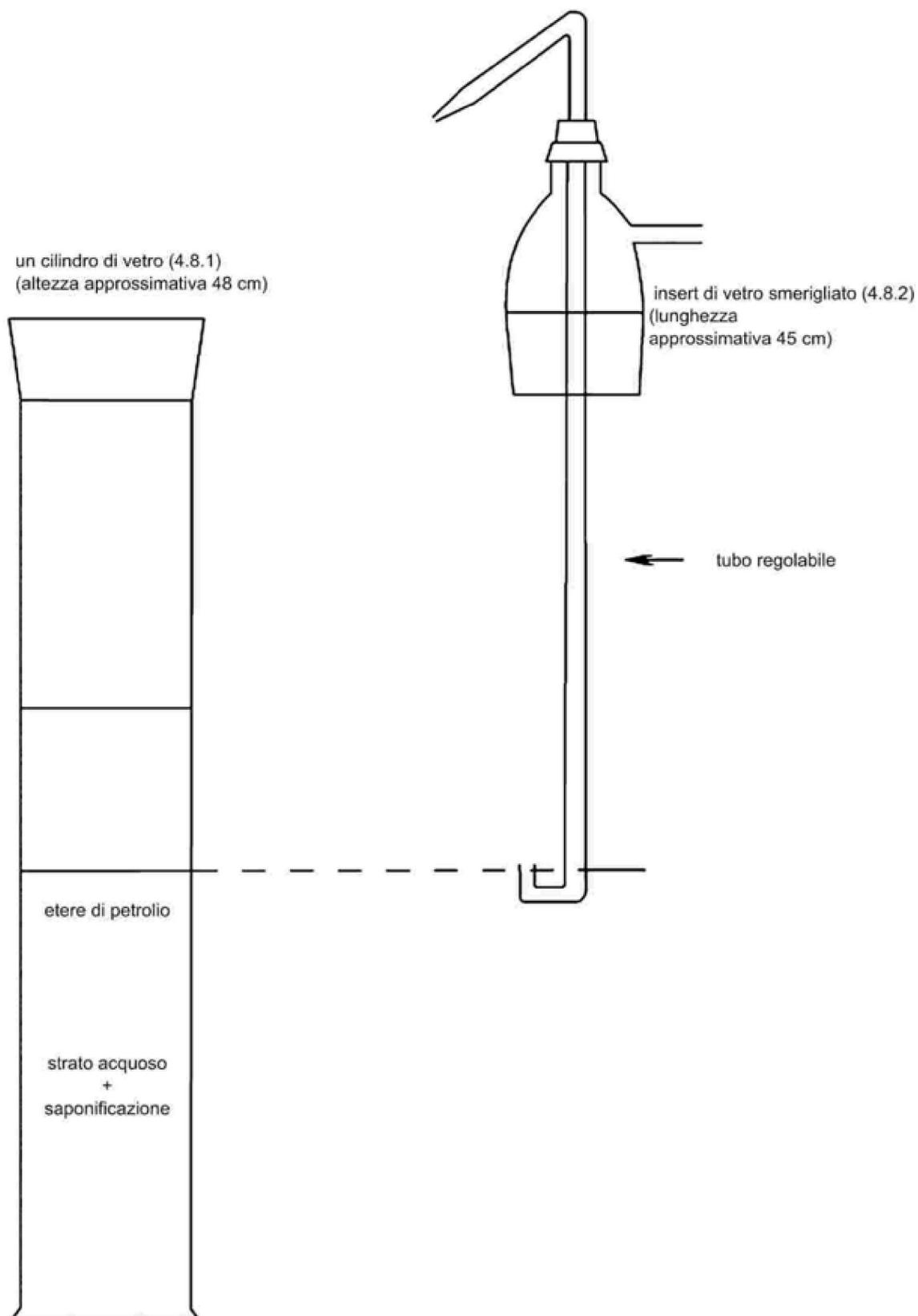
CV_r: coefficiente di variazione della ripetibilità

CV_R: coefficiente di variazione della riproducibilità

(*) Studio effettuato dal gruppo di lavoro Alimenti per animali del Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA)

Figura 2

Dispositivo di estrazione (punto 4.8.)



C. DETERMINAZIONE DEGLI OLIGOELEMENTI FERRO, RAME, MANGANESE E ZINCO

Il contenuto di ferro, rame, manganese e zinco deve essere determinato:

- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 15510 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione di calcio, sodio, fosforo, magnesio, potassio, ferro, zinco, rame, manganese, cobalto, molibdeno, e piombo mediante spettrometria di emissione atomica al plasma induttivamente accoppiato (ICP- AES); o
- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 15621 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione di calcio, sodio, fosforo, magnesio, potassio, zolfo, ferro, zinco, rame, manganese e cobalto dopo digestione sotto pressione mediante spettrometria di emissione atomica al plasma induttivamente accoppiato (ICP-AES); o
- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 17053 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione di elementi in tracce, metalli pesanti e altri elementi nei mangimi attraverso ICP-MS (multi-metodo); o
- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN ISO 6869 Mangimi per animali - Determinazione dei contenuti di calcio, rame, ferro, magnesio, manganese, potassio, sodio e zinco - Metodo per spettrometria ad assorbimento atomico;
- mediante il metodo di spettrometria di assorbimento atomico in fiamma (FAAS), come descritto nei punti da 1 a 8 in appresso.

1. Finalità e campo di applicazione

Questo metodo consente di determinare gli oligoelementi ferro, rame, manganese e zinco contenuti negli alimenti per animali ⁽⁵⁾. I limiti 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.

⁽⁵⁾ Questo metodo è stato convalidato mediante uno studio collaborativo per diverse matrici di alimenti per animali. Per ulteriori informazioni consultare il sito <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

- 3.5. Acido solforico (d: 1,84 g/ml).
- 3.6. Perossido di idrogeno (a 100 volumi circa di ossigeno (punto 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 (punto 3.2), aggiungere 16 ml di perossido di idrogeno (punto 3.6) e portare a un litro con acqua.
- 3.7.1. Soluzione standard di lavoro di ferro (100 µg Fe/ml): diluire un volume della soluzione standard (punto 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 (punto 3.2), aggiungere 5 ml di perossido di idrogeno (punto 3.6) e portare a un litro con acqua.
- 3.8.1. Soluzione standard di lavoro di rame (10 µg Cu/ml): diluire 1 volume della soluzione standard (punto 3.8) con 9 volumi d'acqua, poi ridiluire 1 volume della soluzione così ottenuta con 9 volumi di acqua.
- 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 (punto 3.2) e portare a un litro con acqua.
- 3.9.1. Soluzione standard di lavoro di manganese (10 µg Mn/ml): diluire 1 volume della soluzione standard (punto 3.9) con 9 volumi d'acqua, poi ridiluire 1 volume 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 (punto 3.2) e portare a un litro con acqua.
- 3.10.1. Soluzione standard di lavoro di zinco (10 µg Zn/ml): diluire 1 volume della soluzione standard (punto 3.10) con 9 volumi d'acqua, poi ridiluire 1 volume 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 (punto 3.2) e portare a un litro con acqua.

4. **Apparecchiatura**

- 4.1. Forno a 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. Procedura ⁽⁶⁾

5.1. Campioni contenenti sostanze organiche

5.1.1. Incenerimento e preparazione della soluzione da analizzare ⁽⁷⁾

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 (punto 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 le sostanze carboniose; aprire poi il forno e lasciar raffreddare [cfr. nota d)].

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 (punto 3.1) e travasare lentamente e con cautela quest'ultimo nel becher (si può avere una reazione violenta per formazione di CO₂). Aggiungere goccia a goccia dell'acido cloridrico (punto 3.1), agitando finché l'effervescenza sia terminata. Evaporare a secco agitando ogni tanto con una bacchetta di vetro.

Aggiungere al residuo 15 ml di acido cloridrico 6 mol/l (punto 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 (punto 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 tre a cinque ore), è completo allorché le ceneri appaiono bianche o quasi. Sciogliere di nuovo il residuo con circa 2 ml di acido cloridrico (punto 3.1), evaporare a secco e aggiungere 5 ml di acido cloridrico 6 mol/l (punto 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 priva di 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.

⁽⁶⁾ Possono essere utilizzati altri metodi di mineralizzazione purché abbiano dimostrato di dare risultati simili (ad esempio la mineralizzazione in pressione a microonde).

⁽⁷⁾ Nel foraggio verde (fresco o essiccato) possono essere presenti notevoli quantità di silice vegetale, che può trattenere oligoelementi e che va quindi eliminata. Ai campioni di tali prodotti va pertanto applicata la procedura modificata 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.

Calcinare nel forno a 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 (punto 3.4), quindi evaporare a secco a 150 °C circa. Se nel residuo rimane ancora della silice, scioglierla in pochi ml di acido fluoridrico (punto 3.4) ed evaporare a secco. Aggiungere cinque gocce di acido solforico (punto 3.5) e riscaldare fino a scomparsa dei fumi bianchi. Aggiungere 5 ml di acido cloridrico 6 mol/l (punto 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 0,5 mol/l circa). Procedere quindi alla determinazione a partire dal punto 5.1.2.

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.

Ferro

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml di soluzione standard di lavoro (punto 3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (punto 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (punto 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 (punto 3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (punto 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 (punto 3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (punto 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (punto 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 (punto 3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (punto 3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (punto 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 matraccio tarato da 100 ml e portata a volume con acido cloridrico 0,5 mol/l (punto 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 matraccio tarato da 100 ml; aggiungere 10 ml di soluzione di cloruro di lantanio (punto 3.11) e portare a volume con acido cloridrico 0,5 mol/l (punto 3.3) (cfr. anche punto 8, «Osservazione»).

5.1.2.3. Prova in bianco

Effettuare una prova in bianco comprendente tutte le operazioni prescritte nella procedura, 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 atomico 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

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Ripetere ogni misurazione quattro volte.

5.2. *Alimenti a base di minerali*

In assenza di sostanze organiche, 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 oligoelemento 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 (punto 3.11). Tuttavia, se nel campione il rapporto di peso Ca + Mg/P risulta > 2, non è necessario aggiungere soluzione di cloruro di lantanio (punto 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]l-chinazolin-4-(3H)-one bromidrato

Il contenuto di alofuginone deve essere determinato:

- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 17299 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Screening e determinazione di coccidiostatici autorizzati agli additivi e livelli di contaminazione crociata dell'1 e del 3 %, e di coccidiostatici non registrati e di un antibiotico a livelli sub-additivi, in mangimi animali utilizzando la cromatografia liquida ad alta risoluzione - Rivelazione con spettrometria di massa Tandem (LC-MS/MS); o
- mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a fase inversa utilizzando un rivelatore UV, come descritto nei punti da 1 a 8 in appresso.

1. **Finalità e campo di 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 contenuto di alofuginone è determinato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a fase inversa utilizzando 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.
- 3.6. Alofuginone standard (DL-trans-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-idrossi-2-piperidil)acetoni]l-chinazolin-4-(3H)-one bromidrato, E 764).
 - 3.6.1. Soluzione madre standard di alofuginone, 100 µg/ml.

In un matraccio tarato da 500 ml pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 50 mg di alofuginone (punto 3.6), sciogliere in una soluzione tampone di acetato di ammonio (punto 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 matracci tarati da 100 ml trasferire 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 6,0 ml della soluzione madre standard (punto 3.6.1). Portare a volume con la fase mobile (punto 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. Esse devono essere preparate al momento, prima dell'uso.
- 3.7. Acido cloridrico (ρ_{20} circa 1,16 g/ml).
- 3.8. Metanolo.
- 3.9. Nitrato d'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, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$.
- 3.16. Soluzione di carbonato di sodio saturata con cloruro di sodio, $c = 5 \text{ g}/100 \text{ ml}$.
Sciogliere 50 g di carbonato di sodio (punto 3.11) in acqua, portare a 1 litro e aggiungere cloruro di sodio (punto 3.12) fino a saturazione.
- 3.17. Acido cloridrico, circa $0,1 \text{ mol}/\text{l}$.
Diluire 10 ml di HCl (punto 3.7) con acqua e portare a 1 litro.
- 3.18. Soluzione tampone di acetato di ammonio, circa $0,25 \text{ mol}/\text{l}$.
Sciogliere 19,3 g di acetato di ammonio (punto 3.3) e 30 ml di acido acetico (punto 3.5) in acqua (punto 3.14) e portare a 1 litro.
- 3.19. Preparazione della resina Amberlite XAD-2.
Sciacquare un quantitativo adatto di Amberlite (punto 3.2) con acqua fino a eliminazione completa di tutti gli ioni cloruro, eliminazione che viene verificata eseguendo una prova al nitrato d'argento (punto 3.20) sulla fase acquosa che è stata messa da parte. Sciacquare quindi la resina con 50 ml di metanolo (punto 3.8), eliminare il metanolo e conservare la resina in metanolo fresco.
- 3.20. Soluzione di nitrato d'argento, circa $0,1 \text{ mol}/\text{l}$.
Sciogliere 0,17 g di nitrato d'argento (punto 3.9) in 10 ml di acqua.
- 3.21. Fase mobile per HPLC.
Mescolare 500 ml di acetonitrile (punto 3.1), 300 ml di soluzione tampone di acetato di ammonio (punto 3.18) e 1 200 ml di acqua (punto 3.14). Regolare il pH a 4,3 con acido acetico (punto 3.5). Filtrare la soluzione attraverso un filtro da $0,22 \mu\text{m}$ (punto 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.

4. **Apparecchiatura**

- 4.1. Bagno ultrasonico.
- 4.2. Evaporatore rotante a film.
- 4.3. Centrifuga.
- 4.4. Apparecchiatura HPLC con rivelatore a ultravioletti, a lunghezza d'onda variabile, oppure con rivelatore a serie di diodi.
- 4.4.1. Colonna per cromatografia liquida, $300 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, C_{18} , particelle di riempimento $10 \mu\text{m}$, o colonna equivalente.
- 4.5. Colonna di vetro (punto $300 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$) con filtro in vetro sinterizzato e rubinetto.
- 4.6. Filtri in fibra di vetro, diametro 150 mm.
- 4.7. Filtri a membrana, da $0,45 \mu\text{m}$.
- 4.8. Filtri a membrana, da $0,22 \mu\text{m}$.

5. **Procedura**

Nota: L'alofuginone in quanto base libera è instabile in soluzioni alcaline e di acetato di etile. Non deve restare 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 (punto 3.6.1) a 10 g del bianco, mescolare e attendere 10 minuti prima di procedere all'estrazione (punto 5.2).

Nota: Ai fini del presente metodo, il bianco ha una composizione simile a quella del campione e all'analisi l'alofuginone non deve risultare 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 di sodio (punto 3.10), 0,5 g di EDTA (punto 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 (punto 3.15) e agitare. Aggiungere immediatamente 100 ml di acetato di etile (punto 3.4) e agitare vigorosamente a mano per 15 secondi. Introdurre quindi la provetta nel bagno ultrasonico (punto 4.1) per tre minuti e allentare il tappo. Centrifugare per due minuti e decantare la fase di acetato etilico attraverso un filtro in fibra di vetro (punto 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 (punto 3.16) ed eliminare lo strato acquoso.

Estrarre lo strato organico, per 1 minuto, con 50 ml di acido cloridrico (punto 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 circa 10 secondi con 10 ml di acetato di etile (punto 3.4).

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 a film (punto 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 del campione viene preparata una colonna XAD-2. Mediante metanolo (punto 3.8) trasferire in una colonna di vetro (punto 4.5) 10 g di Amberlite preparata (punto 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 (punto 5.2) sulla sommità della colonna di Amberlite preparata (punto 5.3.1) ed eluire, scartando l'eluato. La velocità di eluizione non deve superare 20 ml/min. Risciacquare il pallone a fondo arrotondato con 20 ml di acido cloridrico (punto 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 (punto 3.8) alla colonna e lasciar eluire 5-10 ml, raccogliendo l'eluato in un pallone a fondo arrotondato 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 a film (punto 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 (punto 3.21). Portare a volume con la fase mobile e agitare. Filtrare un'aliquota attraverso un filtro a membrana (punto 4.7). Riservare questa soluzione per la determinazione HPLC (punto 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 (punto 4.4.1)

Fase mobile per HPLC (punto 3.21)

Velocità di efflusso: 1,5-2 ml/min

Lunghezza d'onda di rivelazione: 243 nm

Volume di iniezione: 40-100 µl

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando più volte la soluzione di taratura (punto 3.6.2) contenente 3,0 µg/ml fino a ottenimento di altezze (o aree) dei picchi e tempi di ritenzione costanti.

5.4.2. Curva di taratura

Iniettare più volte ciascuna soluzione di taratura (punto 3.6.2) e misurare le altezze (aree) dei picchi per ciascuna concentrazione. Tracciare una curva di taratura riportando in ordinata le altezze medie o le aree medie dei picchi delle soluzioni di taratura e in ascissa le corrispondenti concentrazioni in µg/ml.

5.4.3. Soluzione del campione

Iniettare più volte l'estratto del campione (punto 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 di tale soluzione, per riferimento alla curva di taratura (punto 5.4.2).

Il contenuto *w* di alofuginone (in mg/kg) del campione è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

dove:

c: concentrazione di alofuginone nella soluzione del campione, in µg/ml;

m: peso della quantità di sostanza sottoposta all'analisi, 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 (punto 3.6.2) contenente 6,0 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografia

Un estratto del campione viene «rinforzato» mediante aggiunta di un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (punto 3.6.2). Il quantitativo di alofuginone addizionato deve essere analogo al quantitativo stimato di alofuginone rilevato nell'estratto del 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:

- 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 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) 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.

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 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 deve essere inferiore all'80 %.

8. Risultati di uno studio collaborativo

È stato organizzato uno studio collaborativo ⁽⁸⁾ 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 _R [mg/kg]	–	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	–	16	18	14	17
Rec. [%]		86	74	88	75

NR = non riscontrata

S_R = deviazione standard della riproducibilità

CV_R = coefficiente di variazione della riproducibilità (%)

Rec. = recupero (%).

E. DETERMINAZIONE DELLA ROBENIDINA

Cloridrato di 1,3-bis[(4-clorobenzilidene) amino]guanidina

Il contenuto di robenidina deve essere determinato:

- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 17299 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Screening e determinazione di coccidiostatici autorizzati agli additivi e livelli di contaminazione crociata dell'1 e del 3 %, e di coccidiostatici non registrati e di un antibiotico a livelli sub-additivi, in mangimi animali utilizzando la cromatografia liquida ad alta risoluzione - Rivelazione con spettrometria di massa Tandem (LC-MS/MS); o
- mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a fase inversa utilizzando un rivelatore UV, come descritto nei punti da 1 a 8 in appresso.

⁽⁸⁾ Analyst 108, 1983, pagg. 1252-1256.

1. Finalità e campo di 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 un'aliquota è purificata in una colonna di allumina. La robenidina, eluita dalla colonna con metanolo, è concentrata e portata a volume adeguato con la fase mobile. Il contenuto 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.

Trasversare 4,0 ml di acido cloridrico ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) in un matraccio tarato da 500 ml, portare a volume con metanolo (punto 3.1) e agitare. Questa soluzione è preparata al momento, prima dell'uso.

3.3. Acetonitrile, di qualità HPLC.

3.4. Setacci molecolari.

Sferette di tipo 3 A, 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 (punto 3.3);

250 ml di acqua (di qualità HPLC);

50 ml di soluzione di potassio diidrogeno fosfato (punto 3.6);

50 ml di soluzione di fosfato di sodio bibasico (punto 3.7).

Filtrare la soluzione attraverso un filtro da 0,22 μm (punto 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. Soluzione madre standard di robenidina: 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 30 mg di robenidina standard (punto 3.9). Sciogliere con metanolo acidificato (punto 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 µg/ml.

Trasferire 10,0 ml della soluzione madre standard (punto 3.9.1) in un matraccio tarato da 250 ml, portare a volume con la fase mobile (punto 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 trasferire 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 e 25,0 ml della soluzione standard intermedia (punto 3.9.2). Portare a volume con la fase mobile (punto 3.8) e agitare. Queste soluzioni corrispondono rispettivamente a 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 e 6,0 µg/ml di robenidina. Esse devono essere preparate al momento, prima dell'uso.

3.10. Acqua di qualità HPLC.

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 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, C18, 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. **Procedura**

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 (punto 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 (punto 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 e attendere 10 minuti prima di procedere all'estrazione (punto 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 (punto 3.2), tappare e agitare per un'ora con l'agitatore (punto 4.2). Filtrare la soluzione attraverso una carta da filtro in fibra di vetro (punto 4.5) e raccogliere tutto il filtrato in una beuta da 150 ml. Aggiungere 7,5 g di setacci molecolari (punto 3.4), tappare e agitare per cinque minuti. Filtrare immediatamente attraverso una carta da filtro in fibra di vetro. Conservare questa soluzione per la fase di purificazione (punto 5.3).

5.3. Purificazione

5.3.1. Preparazione della colonna di allumina

Introdurre un piccolo tampone di lana di vetro all'estremità inferiore della colonna di vetro (punto 4.1) e comprimerlo con un'asticella di vetro. Pesare e trasferire nella colonna 11,0 g di allumina preparata (punto 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.

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 lasciare che l'allumina assorba la soluzione. Eluire la robenidina con 100 ml di metanolo (punto 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 a film (punto 4.3). Ridisciogliere il residuo in 3-4 ml di fase mobile (punto 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 da 0,45 µm (punto 4.7). Riservare questa soluzione per la determinazione HPLC (punto 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 (punto 4.4.1.)

Fase mobile per HPLC (punto 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 (punto 3.9.3) contenente 3,6 µg/ml fino a ottenimento di altezze dei picchi e tempi di ritenzione costanti.

5.4.2. Curva di taratura

Iniettare più volte ciascuna soluzione di taratura (punto 3.9.3) e misurare le altezze (aree) dei picchi per ciascuna concentrazione. Tracciare una curva di taratura riportando in ordinata le altezze medie o le aree medie dei picchi delle soluzioni di taratura e in ascissa le corrispondenti concentrazioni in µg/ml.

5.4.3. Soluzione del campione

Iniettare più volte l'estratto del campione (punto 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 di tale soluzione, per riferimento alla curva di taratura (punto 5.4.2).

Il contenuto w di robenidina (in mg/kg) nel campione è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

dove:

c = concentrazione di robenidina nella soluzione del campione, in $\mu\text{g/ml}$;

m = peso della quantità di sostanza sottoposta all'analisi, 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 (punto 3.9.3) contenente 6 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Co-cromatografia

Un estratto del campione viene «rinforzato» mediante aggiunta di un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (punto 3.9.3). Il quantitativo di robenidina addizionato deve essere analogo al quantitativo stimato di robenidina rilevato nell'estratto del campione.

Deve aumentare soltanto l'altezza del picco della robenidina, 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:

- 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;
- tra 250 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;
- 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 deve essere inferiore all'85 %.

8. Risultati di uno studio collaborativo

È stato organizzato uno studio collaborativo a livello di UE nel corso del quale 12 laboratori hanno analizzato quattro campioni di mangimi per pollame e per conigli, in forma di farina o di granulare. Ogni campione è stato analizzato due volte. I risultati dello studio figurano nella seguente tabella:

	Pollame		Conigli	
	Farina	Granulare	Farina	Granulare
MEDIA [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66

CV _r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S _r [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV _R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Recupero [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

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, %.

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]acetoneitrile

Il contenuto di diclazuril deve essere determinato:

- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 17299 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Screening e determinazione di coccidiostatici autorizzati agli additivi e livelli di contaminazione crociata dell'1 e del 3 %, e di coccidiostatici non registrati e di un antibiotico a livelli sub-additivi, in mangimi animali utilizzando la cromatografia liquida ad alta risoluzione - Rivelazione con spettrometria di massa Tandem (LC-MS/MS); o
- mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a gradiente ternario e a fase inversa utilizzando un rivelatore UV, come descritto nei punti da 1 a 9 in appresso.

1. Finalità e campo di applicazione

Il metodo consente di determinare il contenuto di diclazuril nei mangimi composti e nelle premiscele^(*). Il limite di rilevazione è di 0,1 mg/kg; il limite di quantificazione è di 0,5 mg/kg. È possibile conseguire limiti di quantificazione più bassi, previa convalida da parte dell'utilizzatore.

2. Principio

Dopo aggiunta di uno standard interno, il campione viene estratto con metanolo acidificato. Nel caso degli alimenti per animali, un'aliquota dell'estratto viene purificata su una cartuccia C18 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 mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a gradiente ternario e a 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, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.
- 3.8. Sostanza di riferimento (standard): diclazuril:
(+)-4-clorofenil[2,6-dicloro-4-(2,3,4,5-tetraidro-3,5-diosso-1,2,4-triazina-2-il)fenil]acetoneitrile, di purezza garantita.

^(*) Il metodo può essere applicabile anche per la determinazione del diclazuril nelle materie prime per mangimi.

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 (punto 3.8). Sciogliere in DMF (punto 3.6), portare a volume con DMF (punto 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 1 mese ⁽¹⁰⁾.

3.8.2. Soluzione standard di diclazuril, 50 µg/ml.

Trasferire 5,00 ml della soluzione madre standard (punto 3.8.1) in un matraccio tarato da 50 ml, portare a volume con DMF (punto 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 1 mese.

3.9. Standard interno: 2,6 dicloro- α -(4-clorofenil)-4-[4,5-diidro-3,5-diosso-1,2,4-triazina-2(3H)-il] α -metilbenzene-acetonitrile (metil-diclazuril).

3.9.1. Soluzione madre dello standard interno, 500 µg/ml.

In un matraccio tarato da 50 ml, pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 25 mg dello standard interno (punto 3.9). Sciogliere in DMF (punto 3.6), portare a volume con DMF (punto 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 1 mese.

3.9.2. Soluzione dello standard interno, 50 µg/ml.

Trasferire 5,00 ml della soluzione madre dello standard interno (punto 3.9.1) in un matraccio tarato da 50 ml, portare a volume con DMF (punto 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 1 mese.

3.9.3. Soluzione dello standard interno per le premiscele, p/1 000 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 (punto 3.6) in un bagno ultrasonico (punto 4.7), 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 1 mese.

3.10. Soluzioni di taratura.

3.10.1. Soluzione di taratura, 1 µg/ml (diclazuril).

In un matraccio tarato da 50 ml, pipettare 1,00 ml di soluzione standard di diclazuril (punto 3.8.2) e 2,00 ml di soluzione dello standard interno (punto 3.9.2). Aggiungere 17 ml di DMF (punto 3.6), portare a volume con acqua (punto 3.1) e mescolare. Questa soluzione deve essere preparata al momento, prima dell'uso.

3.10.2. Soluzione di taratura, 2 µg/ml (diclazuril).

In un matraccio tarato da 50 ml, pipettare 2,00 ml di soluzione standard di diclazuril (punto 3.8.2) e 2,00 ml di soluzione dello standard interno (punto 3.9.2). Aggiungere 16 ml di DMF (punto 3.6), portare a volume con acqua (punto 3.1) e mescolare. Questa soluzione deve essere preparata al momento, prima dell'uso.

3.10.3. Soluzione di taratura, 3 µg/ml (diclazuril).

In un matraccio tarato da 50 ml, pipettare 3,00 ml di soluzione standard di diclazuril (punto 3.8.2) e 2,00 ml di soluzione dello standard interno (punto 3.9.2). Aggiungere 15 ml di DMF (punto 3.6), portare a volume con acqua (punto 3.1) e mescolare. Questa soluzione deve essere preparata al momento, prima dell'uso.

⁽¹⁰⁾ È possibile ottenere una stabilità più lunga (fino a 1 anno), previa conferma da parte del singolo laboratorio.

3.10.4. Soluzione di taratura, 4 µg/ml (diclazuril).

In un matraccio tarato da 50 ml, pipettare 4,00 ml di soluzione standard di diclazuril (punto 3.8.2) e 2,00 ml di soluzione dello standard interno (punto 3.9.2). Aggiungere 14 ml di DMF (punto 3.6), portare a volume con acqua (punto 3.1) e mescolare. Questa soluzione deve essere preparata al momento, prima dell'uso.

3.10.5. Soluzione di taratura, 5 µg/ml (diclazuril).

In un matraccio tarato da 50 ml, pipettare 5,00 ml di soluzione standard di diclazuril (punto 3.8.2) e 2,00 ml di soluzione dello standard interno (punto 3.9.2). Aggiungere 13 ml di DMF (punto 3.6), portare a volume con acqua (punto 3.1) e mescolare. Questa soluzione deve essere preparata al momento, prima dell'uso.

Nota: Le soluzioni di taratura (punto 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 e 3.10.5) coprono la concentrazione di diclazuril negli alimenti per animali compresa tra 0,5 e 2,5 mg/kg quando si utilizza il protocollo in vigore.

3.11. Cartuccia C₁₈ per estrazione in fase solida, ad esempio Mega Bond Elut, misura: 20 cm³, peso sorbente: 5 000 mg (precondizionamento secondo le linee guida del fornitore).

3.12. Solvente di estrazione: metanolo acidificato.

Pipettare 5,0 ml di acido cloridrico (punto 3.7) in 1 000 ml di metanolo (punto 3.5) e mescolare.

3.13. Fase mobile per HPLC.

3.13.1. Eluente A: soluzione di acetato di ammonio — solfidrato di tetrabutylammonio.

Sciogliere 5 g di acetato di ammonio (punto 3.2) e 3,4 g di TBHS (punto 3.3) in 1 000 ml d'acqua (punto 3.1) e mescolare.

3.13.2. Eluente B: acetonitrile (punto 3.4).

3.13.3. Eluente C: metanolo (punto 3.5).

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, Hypersil ODS, particelle di riempimento 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 (ad esempio nylon chimicamente resistente), da 0,45 µm.

4.5. Siringa monouso, 5 ml.

4.6. Collettore a vuoto.

4.7. Bagno ultrasonico.

5. **Procedura**

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 devono risultare 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 standard (punto 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 (punto 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 con il metodo di addizione della sostanza di riferimento. In questo caso, un'aliquota del campione da analizzare viene addizionata di una quantità di diclazuril analoga a quella già presente nel campione. 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. Mangimi composti

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 (punto 3.9.2) e 200 ml di solvente di estrazione (punto 3.12), poi tappare la beuta. Mantenere sotto agitazione la miscela per una notte, nell'agitatore (punto 4.1). Lasciare depositare per 10 minuti. Trasferire un'aliquota da 20 ml del surnatante in un contenitore adatto in vetro e diluire con 20 ml d'acqua (punto 3.1). Trasferire questa soluzione in una cartuccia per estrazione (punto 3.11) e filtrare sotto vuoto (punto 4.6). Lavare la cartuccia con 25 ml di una miscela di solvente di estrazione (punto 3.12) e d'acqua (punto 3.1), 65 + 35 (V + V). Eliminare le frazioni raccolte ed eluire i composti con 25 ml di una miscela di solvente di estrazione (punto 3.12) e d'acqua, 80 + 20 (V + V). Evaporare questa frazione a 60 °C nell'evaporatore rotante (punto 4.3) fino a quando comincia a seccare. Sciogliere il residuo con 1,0 ml di DMF (punto 3.6), aggiungere 1,5 ml d'acqua (punto 3.1) e mescolare. Filtrare attraverso un filtro a membrana (punto 4.4) montato su una siringa monouso (punto 4.5). Procedere alla determinazione HPLC (punto 5.3).

5.2.2. Premiscele

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 (punto 3.9.3) e 200 ml di solvente di estrazione (punto 3.12), poi tappare la beuta. Mantenere sotto agitazione la miscela per una notte, nell'agitatore (punto 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 surnatante in un pallone a fondo arrotondato di dimensioni adatte. Evaporare nell'evaporatore rotante (punto 4.3), sotto pressione ridotta e a 60 °C, fino a quando il composto comincia a seccare. Sciogliere il residuo con 10,0 ml di DMF (punto 3.6), aggiungere 15,0 ml d'acqua (punto 3.1) e mescolare. Procedere alla determinazione HPLC (punto 5.3).

5.3. Determinazione HPLC

5.3.1. Parametri

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

- Colonna per cromatografia liquida (punto 4.2.1): 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, particelle di riempimento 3 µm, o equivalente.
- Fase mobile:
 - eluente A (punto 3.13.1): soluzione acquosa di acetato di ammonio e di solfidrato di tetrabutilammonio;
 - eluente B (punto 3.13.2): acetonitrile;
 - eluente C (punto 3.13.3): metanolo.
- Metodo di eluizione - 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);
 - quindi 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 (punto 3.10.2), contenente 2 µg/ml di diclazuril e di standard interno, fino a ottenimento di altezze dei picchi e tempi di ritenzione costanti.

5.3.2. Analisi cromatografica delle soluzioni di taratura

Iniettare due volte 20 µl di ciascuna delle soluzioni di taratura (punto 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 e 3.10.5), identificare e integrare i picchi del diclazuril e dello standard interno, tracciare la curva di taratura in base al rapporto tra l'altezza media o l'area media dei picchi del diclazuril e l'altezza media o l'area media dei picchi dello standard interno rispetto alla concentrazione di diclazuril nelle soluzioni di taratura (in µg/ml).

5.3.3. Analisi cromatografica delle soluzioni del campione

Iniettare due volte 20 µl della soluzione del campione (punto 5.2.1 o 5.2.2) e determinare l'altezza media o l'area media dei picchi del diclazuril e dello standard interno.

6. Calcolo dei risultati

6.1. *Mangimi composti*

Il contenuto *w* di diclazuril (in mg/kg) nel campione è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{\text{Altezza}(d,s) - b}{\text{Altezza}(i,s)} \times \frac{10V}{m} \times \text{ow} = \frac{\text{Area}(d,s) - b}{\text{Area}(i,s)} \times \frac{10V}{m}$$

dove:

- *Altezza*(d,s) è l'altezza del picco del diclazuril nella soluzione del campione (punto 5.2.1);
- *Area*(d,s) è l'area del picco del diclazuril nella soluzione del campione (punto 5.2.1);
- *Altezza*(i,s) è l'altezza del picco dello standard interno nella soluzione del campione (punto 5.2.1);
- *Area*(i,s) è l'area del picco dello standard interno nella soluzione del campione (punto 5.2.1);
- *b* è l'intercetta della curva di taratura tracciata a partire dalle soluzioni di taratura (punto 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 e 3.10.5) conformemente al punto 5.3.2;
- *a* è la pendenza della curva di taratura tracciata a partire dalle soluzioni di taratura (punto 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 e 3.10.5) conformemente al punto 5.3.2;
- *m* è la massa della quantità di sostanza sottoposta all'analisi, in grammi;
- *V* è il volume finale in millilitri dell'estratto del campione dopo ridiscioglimento conformemente al punto 5.2.1 (ossia 2,5 ml).

6.2. *Premiscele*

Il contenuto *w* di diclazuril (in mg/kg) nel campione è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{\text{Altezza}(d,s) - b}{\text{Altezza}(i,s)} \times \frac{0,02V}{m} \times \text{pow} = \frac{\text{Area}(d,s) - b}{\text{Area}(i,s)} \times \frac{0,02V}{m} \times p$$

dove:

- *Altezza*(d,s) è l'altezza del picco del diclazuril nella soluzione del campione (punto 5.2.2);
- *Area*(d,s) è l'area del picco del diclazuril nella soluzione del campione (punto 5.2.2);
- *Altezza*(i,s) è l'altezza del picco dello standard interno nella soluzione del campione (punto 5.2.2);
- *Area*(i,s) è l'area del picco dello standard interno nella soluzione del campione (punto 5.2.2);

- b è l'intercetta della curva di taratura tracciata a partire dalle soluzioni di taratura (punto 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 e 3.10.5) conformemente al punto 5.3.2;
- a è la pendenza della curva di taratura tracciata a partire dalle soluzioni di taratura (punto 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 e 3.10.5) conformemente al punto 5.3.2;
- m è la massa della quantità di sostanza sottoposta all'analisi, in grammi;
- V è il volume finale in millilitri dell'estratto del campione dopo ridiscioglimento conformemente al punto 5.2.2 (ossia 25 ml);
- p è il contenuto nominale di diclazuril nella premiscela, in 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 (punto 5.2.1 o 5.2.2) e della soluzione di taratura (punto 3.10.2).

7.1.1. Co-cromatografia

Un estratto del campione (punto 5.2.1 o 5.2.2) viene «rinforzato» mediante aggiunta di un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (punto 3.10.2). Il quantitativo di diclazuril addizionato deve essere analogo al quantitativo di diclazuril rilevato nell'estratto del campione.

Devono aumentare soltanto le altezze del picco del diclazuril e dello standard interno, tenuto conto sia della quantità addizionata 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 del diclazuril o del picco dello standard interno dell'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) tra 230 e 320 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) tra 230 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 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 misurazioni indipendenti effettuate su due sottocampioni non deve superare:

- il 30 % del valore più elevato, per i contenuti di diclazuril compresi fra 0,5 mg/kg e 2,5 mg/kg;
- 0,75 mg/kg per i contenuti di diclazuril compresi fra 2,5 mg/kg 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 deve essere inferiore all'80 %.

8. Risultati di uno studio collaborativo

Sono stati organizzati due studi collaborativi. Nel primo, eseguito da un altro gruppo di laboratori nel 1994, sono stati analizzati due campioni di premiscela (O 100, A 100) e tre campioni di mangimi complementari per pollame (L1, Z1, K1). Un campione di premiscela era mescolato con una matrice organica (O 100) e l'altro con una matrice inorganica (A 100). Il contenuto teorico era di 100 mg di diclazuril/kg. Ai laboratori è stato chiesto di analizzare ciascun campione una sola volta o in duplicato. (Per informazioni più dettagliate sul primo studio collaborativo consultare il *Journal of AOAC International*, volume 77, n. 6, 1994, pagg. 1359-1361).

Nel secondo studio collaborativo sono stati analizzati tre mangimi composti per pollame contenenti diclazuril a concentrazioni di 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) e in bianco (MAT 3). Per informazioni dettagliate sul secondo studio collaborativo consultare la relazione tecnica del JRC (2016) e il *Journal of AOAC International*, volume 102, n. 2, 2019, pagg. 646-652. I risultati dei due studi collaborativi figurano nella tabella in appresso.

	Campione 1 A 100	Campione 2 O 100	Campione 3 L1	Campione 4 Z1	Campione 5 K1	Campione 6 MAT 1	Campione 7 MAT 2	Campione 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
MEDIA (mg/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	< LOQ
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Contenuto nominale (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Riferimento (*)	Primo studio del 1994	Secondo studio del 2015	Secondo studio del 2015	Secondo studio del 2015				

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

LOQ = limite di quantificazione

(*) Primo studio del 1994: *Journal of AOAC International*, volume 77, n. 6, 1994, pagg. 1359-1361. Secondo studio del 2015: Relazione tecnica del JRC «Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study» (2016).

9. Osservazioni

Deve essere dimostrato preliminarmente che il diclazuril dà una risposta lineare per l'insieme delle concentrazioni misurate.

Almeno per l'analisi del diclazuril nei mangimi composti ad alto tenore di grassi (a tal fine con tenore di grassi superiore al 12 %) il metodo analitico può essere sostituito da altri metodi basati su HPLC, ad esempio un metodo basato su cromatografia liquida ad alta prestazione associata a spettrometria di massa (HPLC-MS), a condizione che il metodo alternativo presenti caratteristiche di rendimento equivalenti (tasso di recupero, precisione in condizioni di ripetibilità e riproducibilità).

G. DETERMINAZIONE DEL LASALOCID SODICO

Sale sodico di un acido monocarbossilico polietere prodotto da Streptomyces lasaliensis

Il contenuto di lasalocid sodico deve essere determinato:

- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 17299 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Screening e determinazione di coccidiostatici autorizzati agli additivi e livelli di contaminazione crociata dell'1 e del 3 %, e di coccidiostatici non registrati e di un antibiotico a livelli sub-additivi, in mangimi animali utilizzando la cromatografia liquida ad alta risoluzione - Rivelazione con spettrometria di massa Tandem (LC-MS/MS); o
- mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a fase inversa utilizzando un rivelatore spettrofluorimetrico (a fluorescenza), come descritto nei punti da 1 a 8 in appresso.

1. Finalità e campo di applicazione

Il metodo consente di determinare il contenuto di lasalocid sodico negli alimenti per animali. 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 mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a fase inversa utilizzando un rivelatore spettrofluorimetrico (a fluorescenza).

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 (punto 3.2) e portare a 100 ml.

3.4. 6-metil-2-eptilammina (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 (punto 3.11) sciogliere 1,36 g di KH_2PO_4 (punto 3.1), aggiungere 3,5 ml di acido ortofosforico (punto 3.2) e 10,0 ml di 6-metil-2-eptilammina (punto 3.4). Portare il pH a 4,0 con soluzione di acido ortofosforico (punto 3.3) e portare a 1 000 ml con acqua (punto 3.11).

3.8. Metanolo acidificato.

Travasare 5,0 ml di acido cloridrico (punto 3.6) in un matraccio tarato da 1 000 ml, portare a volume con metanolo (punto 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 (punto 3.7) con 95 ml di metanolo (punto 3.5).

3.10. Sostanza standard lasalocid sodico, di purezza garantita, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (sale sodico di un acido monocarbossilico polietere prodotto da *Streptomyces lasaliensis*), E763.

3.10.1. Soluzione madre standard di lasalocid sodico, 500 µg/ml.

In un matraccio tarato da 100 ml, pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 50 mg di lasalocid sodico (punto 3.10), sciogliere in metanolo acidificato (punto 3.8), portare a volume con lo stesso solvente e mescolare. Questa soluzione deve essere preparata al momento, prima dell'uso.

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 (punto 3.10.1), portare a volume con metanolo acidificato (punto 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, 2,0, 4,0, 5,0 e 10,0 ml della soluzione standard intermedia (punto 3.10.2). Portare a volume con metanolo acidificato (punto 3.8) e mescolare. Queste soluzioni corrispondono rispettivamente a 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 e 10,0 µg/ml di lasalocid sodico. Esse devono essere 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, da 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, C₁₈ a fase inversa, particelle di riempimento 5 µm, o equivalente.

4.3.2. Spettrofluorimetro con regolazione a lunghezza d'onda variabile (eccitazione ed emissione).

5. **Procedura**

5.1. *Indicazioni generali*

5.1.1. Alimento bianco

Per eseguire la prova di recupero (punto 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 devono risultare 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 standard (punto 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 accuratamente e lasciar riposare per 10 minuti, agitando nuovamente varie volte prima di procedere all'estrazione (punto 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 con il metodo di addizione della sostanza di riferimento. In questo caso, un'aliquota del campione da analizzare viene addizionata di una quantità di lasalocid sodico analoga a quella già presente nel campione. 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 (punto 3.8). Chiudere senza stringere e scuotere per disperdere. Collocare la beuta in un bagno ultrasonico (punto 4.1) a circa 40 °C per 20 minuti; quindi toglierla e lasciarla raffreddare a temperatura ambiente. Lasciare riposare per circa 1 ora finché la sostanza in sospensione si sia depositata; filtrare quindi un'aliquota con filtro a membrana da 0,45 µm (punto 4.2) in un recipiente adeguato. Procedere alla determinazione HPLC (punto 5.3).

5.2.2. Premiscele

In un matraccio tarato da 250 ml pesare, con l'approssimazione di 0,001 g, circa 2 g di premiscela non macinata. Aggiungere 100,0 ml di metanolo acidificato (punto 3.8) e scuotere per disperdere. Collocare la beuta e il suo contenuto in un bagno ultrasonico (punto 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 (punto 3.8) e mescolare accuratamente. Lasciare riposare per 1 ora finché la sostanza in sospensione si sia depositata; filtrare quindi un'aliquota con filtro a membrana da 0,45 µm (punto 4.2). Diluire un volume adeguato di filtrato chiaro con metanolo acidificato (punto 3.8) ottenendo così una soluzione di prova finale contenente circa 4 µg/ml di lasalocid sodico. Procedere alla determinazione HPLC (punto 5.3).

5.3. Determinazione HPLC

5.3.1. Parametri

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

Colonna per cromatografia liquida (punto 4.3.1):	125 mm × 4 mm, C18 a fase inversa, particelle di riempimento 5 µm, o equivalente
Fase mobile (punto 3.9):	miscela di soluzione tampone fosfato (punto 3.7) e metanolo (punto 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 di iniezione:	20 µl

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando più volte la soluzione di taratura (punto 3.10.3) contenente 4,0 µg/ml, fino a ottenimento di altezze (o aree) dei picchi e tempi di ritenzione costanti.

5.3.2. Curva di taratura

Iniettare più volte ciascuna soluzione di taratura (punto 3.10.3) e determinare le altezze (aree) medie dei picchi per ciascuna concentrazione. Tracciare una curva di taratura riportando in ordinata le altezze (aree) medie dei picchi e in ascissa le corrispondenti concentrazioni in µg/ml.

5.3.3. Soluzione del campione

Iniettare più volte gli estratti dei campioni di cui al punto 5.2.1 o 5.2.2 utilizzando lo stesso volume usato per le soluzioni di taratura e determinare le altezze (aree) medie dei picchi del lasalocid sodico.

6. Calcolo dei risultati

Determinare la concentrazione di lasalocid sodico in µg/ml in base all'altezza (area) media dei picchi ottenuta per iniezione della soluzione del campione (punto 5.3.3), per riferimento alla curva di taratura.

6.1. Alimenti per animali

Il contenuto *w* di lasalocid sodico (in mg/kg) nel campione 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 (punto 5.2.1), in µg/ml;
*V*₁ = volume dell'estratto del campione, espresso in ml, conformemente al punto 5.2.1 (ossia 100 ml);
m = peso della quantità di sostanza sottoposta all'analisi, in grammi.

6.2. *Premiscele*

Il contenuto w di lasalocid sodico (in mg/kg) nel campione 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 (punto 5.2.2), in $\mu\text{g/ml}$;
 V_2 = 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 sottoposta all'analisi, in grammi.

7. **Convalida dei risultati**7.1. *Identità*

I metodi basati sulla spettrofluorimetria sono meno soggetti a interferenza rispetto a quelli in cui si fa ricorso alla rivelazione UV. L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia.

7.1.1. *Co-cromatografia*

Un estratto del campione (punto 5.2.1 o 5.2.2) viene «rinforzato» mediante aggiunta di un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (punto 3.10.3). Il quantitativo di lasalocid sodico addizionato deve essere analogo al quantitativo di lasalocid sodico rilevato nell'estratto del campione. Deve aumentare soltanto l'altezza del picco del lasalocid sodico, tenuto conto della quantità di lasalocid sodico addizionata 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 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 mg/kg e 100 mg/kg;
- 15 mg/kg per i contenuti di lasalocid sodico compresi fra 100 mg/kg 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 deve essere inferiore all'80 %. Per i campioni addizionati di premiscela, il recupero non deve essere inferiore al 90 %.

8. **Risultati di uno studio collaborativo**

È stato organizzato uno studio collaborativo (*) nel corso del quale 12 laboratori hanno analizzato 2 premiscele (campioni 1 e 2) e 5 mangimi (campioni 3-7). Ogni campione è stato analizzato due volte. I risultati dello studio figurano nella seguente tabella:

	Campione 1 Premiscela per polli	Campione 2 Premiscela per tacchini	Campione 3 Granulare per tacchini	Campione 4 Briciolame per polli	Campione 5 Mangime per tacchini	Campione 6 Mangime per pollame A	Campione 7 Mangime per pollame 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_r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	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 (†)

L = numero di laboratori

n = numero di valori singoli

s_r = deviazione standard della ripetibilità

s_R = deviazione standard della riproducibilità

CV_r = coefficiente di variazione della ripetibilità, %

CV_R = coefficiente di variazione della riproducibilità, %.

(*) *Analyst* 120, 1995, pag. 2175-2180.

(**) Contenuto dichiarato dal produttore.

(†) Mangime preparato in laboratorio.

H. DETERMINAZIONE DEL CLORIDRATO DI AMPROLIO

Monocloridrato di cloruro di (1-[(4-ammino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridinio

1. Finalità e campo di applicazione

Il metodo consente di determinare il contenuto di amprolio negli alimenti per animali. Il limite di rilevazione è di 1 mg/kg, il limite 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 amprolio è determinato mediante cromatografia 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 (punto 3.3), portare a volume con acqua (punto 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 (punto 3.3), portare a volume con acqua (punto 3.3) e mescolare.

3.6. Fase mobile per HPLC (cfr. osservazione al punto 9.1).

Miscela di acetonitrile (punto 3.2), soluzione di fosfato monosodico (punto 3.4) e soluzione di perclorato sodico (punto 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Prima dell'impiego, filtrare attraverso filtro a membrana da 0,22 μ m (punto 4.3) e degassare la soluzione (ad esempio nel bagno ultrasonico (punto 4.4), per almeno 15 minuti).

3.7. Sostanza di riferimento (standard): cloruro di (1-[(4-ammino-2-propil-5-pirimidinil)metil]-2-metilpiridinio (amprolio, E 750), di purezza garantita (cfr. punto 9.2).

3.7.1. Soluzione madre standard di amprolio, 500 µg/ml.

In un matraccio tarato da 100 ml, pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 50 mg di amprolio (punto 3.7), sciogliere in 80 ml di metanolo (punto 3.1) e collocare per 10 minuti il matraccio in bagno ultrasonico (punto 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 1 mese.

3.7.2. Soluzione standard intermedia di amprolio, 50 µg/ml.

In un matraccio tarato da 50 ml, pipettare 5,0 ml della soluzione madre standard (punto 3.7.1), portare a volume con il solvente di estrazione (punto 3.8) e mescolare. A temperatura non superiore a 4 °C la soluzione si mantiene stabile per 1 mese.

3.7.3. Soluzioni di taratura.

Trasferire 0,5, 1,0 e 2,0 ml della soluzione standard intermedia (punto 3.7.2) in una serie di matracci tarati da 50 ml. Portare a volume con la fase mobile (punto 3.6) e mescolare. Queste soluzioni corrispondono rispettivamente a 0,5, 1,0 e 2,0 µg/ml di amprolio. Esse devono essere preparate al momento, prima dell'uso.

3.8. Solvente di estrazione.

Miscela metanolo (punto 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 × 4 mm, Nucleosil 10 SA a scambio cationico, particelle di riempimento 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. **Procedura**

5.1. *Indicazioni generali*

5.1.1. Alimento bianco

Per eseguire la prova di recupero (punto 5.1.2), analizzare un alimento di riferimento (bianco) per accertare l'assenza di amprolio o di altre sostanze che possono interferire. L'alimento bianco ha una composizione simile a quella del campione e all'analisi l'amprolio o sostanze capaci di interferire non devono risultare presenti.

5.1.2. Prova di recupero

Effettuare una prova di recupero analizzando il bianco addizionato di una quantità di amprolio simile a quella presente nel campione. Per ottenere una concentrazione di 100 mg/kg, trasferire 10,0 ml della soluzione madre standard (punto 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 accuratamente e lasciar riposare per 10 minuti, agitando nuovamente varie volte prima di procedere all'estrazione (punto 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 con il metodo di addizione della sostanza di riferimento. In questo caso, un'aliquota del campione da analizzare viene addizionata di una quantità di amprolio analoga a quella già presente nel campione. 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 < 1 % di amprolio) e alimenti per animali

A seconda del contenuto di amprolio, pesare, con l'approssimazione di 0,01 g, da 5 g a 40 g di campione in una beuta da 500 ml e aggiungere 200 ml di solvente di estrazione (punto 3.8). Collocare la beuta nel bagno ultrasonico (punto 4.4) e mantenerla per 15 minuti. Togliere la beuta dal bagno ultrasonico e agitare per 1 ora con agitatore meccanico o magnetico (punto 4.5). Diluire un'aliquota dell'estratto con la fase mobile (punto 3.6) sino a ottenere un contenuto di amprolio di 0,5-2 µg/ml e mescolare (cfr. osservazione al punto 9.3). Filtrare 5-10 ml di questa soluzione diluita attraverso un filtro a membrana (punto 4.2). Procedere alla determinazione HPLC (punto 5.3).

5.2.2. Premiscele (contenuto ≥ 1 % di amprolio)

A seconda del contenuto di amprolio, 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 (punto 3.8). Collocare la beuta nel bagno ultrasonico (punto 4.4) e mantenerla per 15 minuti. Togliere la beuta dal bagno ultrasonico e agitare per 1 ora con agitatore meccanico o magnetico (punto 4.5). Diluire un'aliquota dell'estratto con la fase mobile (punto 3.6) sino a ottenere un contenuto di amprolio di 0,5-2 µg/ml e mescolare. Filtrare 5-10 ml di questa soluzione diluita attraverso un filtro a membrana (punto 4.2). Procedere alla determinazione HPLC (punto 5.3).

5.3. Determinazione HPLC

5.3.1. Parametri

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

Colonna per cromatografia liquida (punto 4.1.1):	125 mm × 4 mm, Nucleosil 10 SA scambio cationico, particelle di riempimento 5 o 10 µm, o equivalente
Fase mobile (punto 3.6):	miscela di acetonitrile (punto 3.2), soluzione di fosfato monosodico (punto 3.4) e soluzione di perclorato sodico (punto 3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v)
Velocità di efflusso:	0,7-1 ml/min
Lunghezza d'onda di rivelazione:	264 nm
Volume di iniezione:	100 µl

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando più volte la soluzione di taratura (punto 3.7.3) contenente 1,0 µg/ml, fino a ottenimento di altezze dei picchi e tempi di ritenzione costanti.

5.3.2. Curva di taratura

Iniettare più volte ciascuna soluzione di taratura (punto 3.7.3) e determinare le altezze (aree) medie dei picchi per ciascuna concentrazione. Tracciare una curva di taratura riportando in ordinata le altezze (aree) medie dei picchi delle soluzioni di taratura e in ascissa le corrispondenti concentrazioni in µg/ml.

5.3.3. Soluzione del campione

Iniettare più volte l'estratto del campione (punto 5.2) utilizzando lo stesso volume usato per le soluzioni di taratura e determinare le altezze (aree) medie dei picchi dell'amprolio.

6. Calcolo dei risultati

Determinare la concentrazione della soluzione del campione in µg/ml in base all'altezza (area) media dei picchi dell'amprolio di tale soluzione, per riferimento alla curva di taratura (punto 5.3.2).

Il contenuto *w* di amprolio (in mg/kg) nel campione è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

dove:

- V = volume del solvente di estrazione (punto 3.8), espresso in ml, conformemente al punto 5.2 (ossia 200 ml);
- c = concentrazione di amprolio nell'estratto del campione (punto 5.2), in µg/m;
- f = fattore di diluizione conformemente al punto 5.2;
- m = peso della quantità di sostanza sottoposta all'analisi, 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 (punto 5.2) e della soluzione di taratura (punto 3.7.3) contenente 2,0 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografia

Un estratto del campione (punto 5.2) viene «rinforzato» mediante aggiunta di un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (punto 3.7.3). Il quantitativo di amprolio addizionato deve essere analogo al quantitativo di amprolio rilevato nell'estratto del campione.

Deve aumentare soltanto l'altezza del picco dell'amprolio, tenuto conto sia della quantità addizionata 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'amprolio dell'estratto del campione non addizionato.

7.1.2. Rivelazione a serie di diodi

I risultati sono valutati in base ai seguenti criteri:

- 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;
- tra 210 e 320 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;
- tra 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 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 15 % del valore più elevato, per i contenuti di amprolio compresi fra 25 mg/kg e 500 mg/kg;
- 75 mg/kg per i contenuti di amprolio compresi fra 500 mg/kg e 1 000 mg/kg;
- il 7,5 % del valore più elevato, per i contenuti di amprolio superiori a 1 000 mg/kg.

7.3. Recupero

Per un campione addizionato (bianco), il recupero non deve essere inferiore al 90 %.

8. Risultati di uno studio collaborativo

È stato organizzato uno studio collaborativo nel corso del quale sono stati analizzati tre alimenti destinati al 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

9. Osservazioni

- 9.1. Se il campione contiene tiamina, il relativo picco compare nel cromatogramma poco prima di quello dell'amprolio. Secondo questo metodo, l'amprolio e la tiamina debbono essere separati. Se l'amprolio e la tiamina non vengono separati dalla colonna (punto 4.1.1) impiegata con questo metodo, sostituire con metanolo fino al 50 % della porzione di acetonitrile della fase mobile (punto 3.6).
- 9.2. Secondo la farmacopea britannica, lo spettro di una soluzione di amprolio (c = 0,02 mol/l) in acido cloridrico (c = 0,1 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'amprolio potrebbe spostarsi significativamente per effetto delle variazioni della forza ionica.

I. DETERMINAZIONE DELLA NARASINA

Il contenuto di narasina deve essere determinato:

- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 17299 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Screening e determinazione di coccidiostatici autorizzati agli additivi e livelli di contaminazione crociata dell'1 e del 3 %, e di coccidiostatici non registrati e di un antibiotico a livelli sub-additivi, in mangimi animali utilizzando la cromatografia liquida ad alta risoluzione - Rivelazione con spettrometria di massa Tandem (LC-MS/MS); o
- mediante il metodo di cui alla norma EN ISO 14183 Mangimi per animali - Determinazione dei contenuti di monensin, narasin e salinomycin - Metodo per cromatografia liquida con derivazione post-colonna.

J. DETERMINAZIONE DELLA NICARBAZINA

Il contenuto di nicarbazina deve essere determinato:

- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 17299 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Screening e determinazione di coccidiostatici autorizzati agli additivi e livelli di contaminazione crociata dell'1 e del 3 %, e di coccidiostatici non registrati e di un antibiotico a livelli sub-additivi, in mangimi animali utilizzando la cromatografia liquida ad alta risoluzione - Rivelazione con spettrometria di massa Tandem (LC-MS/MS); o

- mediante il metodo di cui alla norma EN 15782 Mangimi per animali - Determinazione della nicarbazina - Metodo per cromatografia liquida ad alta risoluzione.

K. DETERMINAZIONE DEL DECOCHINATO

Il contenuto di decochinato deve essere determinato:

- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 17299 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Screening e determinazione di coccidiostatici autorizzati agli additivi e livelli di contaminazione crociata dell'1 e del 3 %, e di coccidiostatici non registrati e di un antibiotico a livelli sub-additivi, in mangimi animali utilizzando la cromatografia liquida ad alta risoluzione - Rivelazione con spettrometria di massa Tandem (LC-MS/MS); o
- mediante il metodo di cui alla norma EN 16162 Mangimi per animali - Determinazione di decochinato mediante HPLC con rivelatore a fluorescenza.

L. DETERMINAZIONE DELLA MONENSINA

Il contenuto di monensina deve essere determinato:

- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 17299 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Screening e determinazione di coccidiostatici autorizzati agli additivi e livelli di contaminazione crociata dell'1 e del 3 %, e di coccidiostatici non registrati e di un antibiotico a livelli sub-additivi, in mangimi animali utilizzando la cromatografia liquida ad alta risoluzione - Rivelazione con spettrometria di massa Tandem (LC-MS/MS); o
- mediante il metodo di cui alla norma EN ISO 14183 Mangimi per animali - Determinazione dei contenuti di monensin, narasin e salinomycin - Metodo per cromatografia liquida con derivazione post-colonna.

M. DETERMINAZIONE DELLA SALINOMICINA

Il contenuto di salinomicina deve essere determinato:

- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 17299 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Screening e determinazione di coccidiostatici autorizzati agli additivi e livelli di contaminazione crociata dell'1 e del 3 %, e di coccidiostatici non registrati e di un antibiotico a livelli sub-additivi, in mangimi animali utilizzando la cromatografia liquida ad alta risoluzione - Rivelazione con spettrometria di massa Tandem (LC-MS/MS); o
- mediante il metodo di cui alla norma EN ISO 14183 Mangimi per animali - Determinazione dei contenuti di monensin, narasin e salinomycin - Metodo per cromatografia liquida con derivazione post-colonna.

N. DETERMINAZIONE DELLA SEMDURAMICINA

Il contenuto di semduramicina deve essere determinato:

- mediante il metodo di analisi di cui alla norma EN 17299 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Screening e determinazione di coccidiostatici autorizzati agli additivi e livelli di contaminazione crociata dell'1 e del 3 %, e di coccidiostatici non registrati e di un antibiotico a livelli sub-additivi, in mangimi animali utilizzando la cromatografia liquida ad alta risoluzione - Rivelazione con spettrometria di massa Tandem (LC-MS/MS); o
- mediante il metodo di cui alla norma EN 16158 Mangimi per animali - Determinazione del contenuto di semduramicina - Metodo per cromatografia liquida che utilizza un approccio analitico ad «albero».

O. NORME EN

Ai fini dell'applicazione dell'articolo 34, paragrafo 2, lettera a), del regolamento (UE) 2017/625 sono pertinenti le seguenti norme EN:

EN ISO 30024 Mangimi per animali – Determinazione dell'attività fitasica

EN 17050 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi – Determinazione dello iodio nel mangime per animali attraverso spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS);

EN 17550 Mangimi per animali: Determinazione dei carotenoidi nei mangimi composti per animali e premiscele mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni - Rivelazione UV (HPLC-UV);

EN 15784 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Rilevazione e conta di *Bacillus* spp.;

EN 15785 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Isolamento e conta di *Bifidobacterium* spp.;

- EN 15786 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Individuazione e conta di *Pediococcus* spp.;
- EN 15787 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Rilevazione e conta di *Lactobacillus* spp. utilizzato come additivo per mangimi;
- EN 15788 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Rilevazione e conta di *Enterococcus* (*E. faecium*) spp. utilizzato come additivo per mangimi;
- EN 15789 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Individuazione e conta di *Saccharomyces cerevisiae* utilizzato come additivo per mangimi;
- EN 15510 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione di calcio, sodio, fosforo, magnesio, potassio, ferro, zinco, rame, manganese, cobalto, molibdeno, e piombo mediante spettrometria di emissione atomica al plasma induttivamente accoppiato (ICP- AES) (per l'analisi degli additivi per mangimi cobalto e molibdeno);
- EN 15621 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione di calcio, sodio, fosforo, magnesio, potassio, zolfo, ferro, zinco, rame, manganese e cobalto dopo digestione sotto pressione mediante spettrometria di emissione atomica al plasma induttivamente accoppiato (ICP-AES) (per l'analisi dell'additivo per mangimi cobalto);
- EN 16159 Mangimi per animali — Determinazione di selenio mediante spettrometria ad assorbimento atomico per formazione di idruri (HGAAS) dopo digestione con microonde (digestione con 65 % di acido nitrico e 30 % perossido di idrogeno) (per l'analisi dell'additivo per mangimi selenio);
- EN 17053 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione di elementi in tracce, metalli pesanti e altri elementi nei mangimi attraverso ICP-MS (multi-metodo) (per l'analisi degli additivi per mangimi cobalto, molibdeno e selenio).»
-

ALLEGATO V

«ALLEGATO V

METODI DI ANALISI PER IL CONTROLLO DELLA PRESENZA DI SOSTANZE INDESIDERABILI NEGLI ALIMENTI PER ANIMALI

A. DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI DIOSSINE (PCDD/PCDF) E PCB

CAPO I

METODI DI CAMPIONAMENTO E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI ANALITICI**1. Campo di applicazione e definizioni**

I campioni destinati al controllo ufficiale dei livelli di policlorodibenzo-p-diossine (PCDD), policlorodibenzofurani (PCDF), policlorobifenili (PCB) diossina-simili⁽¹⁾ 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 distribuiti in modo uniforme negli alimenti per animali di cui all'allegato I, punto 5.1. I campioni globali così ottenuti sono considerati rappresentativi dei lotti o sottolotti 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 si applicano le definizioni di cui all'allegato I del regolamento di esecuzione (UE) 2021/808 della Commissione⁽²⁾.

In aggiunta a tali definizioni, ai fini della presente parte si applicano inoltre le definizioni seguenti.

- (1) 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)).

Congenere	Valore TEF	Congenere	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.

- (2) Regolamento di esecuzione (UE) 2021/808 della Commissione, del 22 marzo 2021, sul rendimento dei metodi analitici in relazione ai residui di sostanze farmacologicamente attive impiegate negli animali destinati alla produzione di alimenti, sull'interpretazione dei risultati e sui metodi da utilizzare per il campionamento e che abroga le decisioni 2002/657/CE e 98/179/CE (GU L 180 del 21.5.2021, pag. 84).

«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 d'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 d'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 del lotto o sottolotto al livello massimo

2.1. PCB non diossina-simili

Il lotto o sottolotto 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 ⁽³⁾. Il lotto o sottolotto non è conforme al livello massimo fissato dalla direttiva 2002/32/CE se la media di due risultati analitici upperbound ⁽⁴⁾ ottenuti attraverso una doppia analisi ⁽⁵⁾, 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. Un lotto o sottolotto non è conforme se la media dei valori misurati meno l'incertezza estesa della media supera il livello massimo.

Le norme di cui ai capoversi precedenti del presente punto si applicano al risultato analitico ottenuto sul campione utilizzato per il controllo ufficiale. Per le analisi effettuate nel quadro di controperizie o procedure arbitrali si applicano le norme nazionali.

2.2. PCDD/PCDF e PCB diossina-simili

Il lotto o sottolotto 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.

⁽³⁾ 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» (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf).

⁽⁴⁾ «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.

⁽⁵⁾ 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, parte C, punto 3. Tuttavia, per i metodi che utilizzano lo standard interno marcato con ¹³C per gli analiti di interesse, la doppia analisi è necessaria solo qualora il risultato della prima determinazione non sia conforme. La doppia analisi è necessaria per escludere la possibilità di una contaminazione crociata 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.

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.

Il lotto o sottolotto non è conforme al livello massimo fissato dalla direttiva 2002/32/CE se la media di due risultati analitici upperbound ⁽⁶⁾ ottenuti attraverso una doppia analisi ⁽⁷⁾ 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. Un lotto o sottolotto 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 capoversi precedenti del presente punto si applicano al risultato analitico ottenuto sul campione utilizzato per il controllo ufficiale. Per le analisi effettuate nel quadro di controversie o procedure arbitrali si applicano le norme nazionali.

3. Risultati eccedenti le soglie d'intervento di cui all'allegato II della direttiva 2002/32/CE

Le soglie d'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 d'intervento mediante una doppia analisi eseguita con un metodo di conferma e tenendo conto dell'incertezza di misura estesa ⁽⁸⁾.

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 di 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 ⁽⁹⁾.

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:

⁽⁶⁾ «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.

⁽⁷⁾ Di norma si applicano le prescrizioni relative alla doppia analisi di cui all'allegato II, parte C, punto 3. Tuttavia, per i metodi di conferma che utilizzano lo standard interno marcato con ¹³C per gli analiti di interesse, la doppia analisi è necessaria solo qualora il risultato della prima determinazione non sia conforme. La doppia analisi è necessaria per escludere la possibilità di una contaminazione crociata 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.

⁽⁸⁾ Le precisazioni e le prescrizioni relative alla doppia analisi per il controllo delle soglie d'intervento sono identiche a quelle indicate alla nota 5 per i livelli massimi.

⁽⁹⁾ 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).

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 d'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 d'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 sono atti a dimostrare la conformità o la sospetta non conformità alle soglie d'intervento o 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 rivalutazione delle soglie d'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 singoli congeneri. Questi metodi permettono pertanto di controllare i livelli massimi e le soglie d'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 rivalutazione delle soglie d'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 27 al capo I) e quindi sommate per ottenere la concentrazione totale di composti diossina-simili espressa in TEQ.

Ai fini della presente parte A, 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 (Mangimi per animali - Determinazione di diossine e PCB diossina simili e di PCB indicatori mediante GC/HRMS) e/o nei metodi EPA 1613 e 1668 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 livelli 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.

I metodi di screening bioanalitici non danno risultati al livello del congenere, ma solo un'indicazione ⁽¹⁰⁾ del livello di TEQ espresso in BEQ, in considerazione del fatto che non tutti i composti presenti in un estratto del 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 crociate 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 essiccati.
- 3.5. I reattivi, 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 utilizzata per l'estrazione è sufficiente a permettere la conformità alle prescrizioni in relazione a un working range sufficientemente basso comprendente le concentrazioni dei livelli massimi o della soglia d'intervento.
- 3.9. Le procedure specifiche di preparazione dei campioni utilizzate per i prodotti considerati sono conformi a linee guida accettate a livello internazionale, ossia EN ISO 6498.

4. **Prescrizioni per i laboratori**

- 4.1. Come prescritto dal regolamento (UE) 2017/625, i laboratori sono accreditati da un organismo riconosciuto operante secondo la Guida ISO/IEC 58, per garantire che alle loro analisi sia applicata l'assicurazione della qualità. I laboratori sono accreditati in base alla norma EN ISO/IEC 17025. 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 ⁽¹¹⁾.
- 4.2. La competenza del laboratorio è dimostrata dalla partecipazione regolare ed efficace a studi interlaboratorio per la determinazione di PCDD/PCDF e di PCB diossina-simili nelle matrici di alimenti per animali e nei range di concentrazioni corrispondenti.

⁽¹⁰⁾ 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.

⁽¹¹⁾ «Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry» (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf) e «Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food» (https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf).

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 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 di 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.

	Screening con metodi bioanalitici o fisico-chimici	Metodi di conferma
Tasso di falsi conformi (*)	< 5 %	
Esattezza		da - 20 % a + 20 %
Ripetibilità (RSD _r)	< 20 %	
Precisione intermedia (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) 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 d'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 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 d'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 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 d'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 RSDr intralaboratorio è di norma inferiore rispetto al risultato ottenuto in condizioni di riproducibilità (RSDR).

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 d'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 ¹³C e standard interni di PCB diossina-simili marcati con ¹³C 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 ¹³C e tutti i 12 standard interni di PCB diossina-simili marcati con ¹³C.

6.2.2. Sono inoltre determinati i fattori di risposta relativa per i congeneri ai quali non è aggiunto alcun analogo marcato con ¹³C, 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'appropriate 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 d'intervento.

6.5. *Criteri specifici per i metodi di conferma*

- Per la GC-HRMS:

nella HRMS, risoluzione 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 (Mangimi per animali - Determinazione di diossine e PCB diossina simili e di PCB indicatori mediante GC/HRMS) e/o nei metodi EPA 1613 e 1668 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 ± 15 % per gli ioni prodotti dalla transizione selezionati rispetto a valori calcolati o misurati (media degli standard di calibrazione), 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.

Risoluzione per ciascun quadrupolo 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 (Mangimi per animali - Determinazione di diossine e PCB diossina simili e di PCB indicatori mediante GC/HRMS) e/o nei metodi EPA 1613 e 1668 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 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 d'intervento una percentuale appropriata della rispettiva soglia d'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. punti 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 di almeno un fattore tre. L'estremo superiore del working range è di norma rappresentato dal valore EC₇₀ (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 %.

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 di 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 R², 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 di 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 di BEQ di idonei campioni di riferimento con pattern di congeneri rappresentativi attorno al livello massimo o alla soglia d'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, 1x e 2x il livello massimo o la soglia d'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 d'intervento il valore di cut-off è costituito da una percentuale appropriata di queste soglie d'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'indicazione 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 d'intervento ed espresso in percentuale del livello di BEQ rispetto al livello di TEQ. A seconda del tipo di dosaggio e di TEF utilizzati ⁽¹³⁾, 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 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 biosaggio 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 di 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 del campione, i pattern di congeneri e i range di concentrazione per PCDD/PCDF e PCB diossina-simili attorno al livello massimo o alla soglia d'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 d'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 d'intervento, possono essere inclusi per dimostrare la performance adeguata del test nel range di interesse per il controllo del livello massimo o della soglia d'intervento. Combinati, questi campioni possono essere utilizzati per calcolare i livelli di BEQ nei campioni da analizzare (cfr. punto 7.1.2.2).

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 a 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.

⁽¹³⁾ Le attuali prescrizioni si basano sui TEF pubblicati in: M. Van den Berg et al., Toxicol. Sci. 93 (2), 223-241 (2006).

Sono stabiliti valori di cut-off per le decisioni sulla conformità del campione ai livelli massimi o per il controllo delle soglie d'intervento, se pertinenti, con i rispettivi livelli massimi o le rispettive soglie d'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 a un livello di fiducia del 95 %, implicante un tasso di falsi conformi < 5 % e a una $RSD_R < 25$ %. 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

$$\text{Valore di cut - off} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f = m - 2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_1 - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

dove:

BEQ _{DL}	BEQ corrispondente al limite di decisione del metodo di conferma, ossia al livello massimo, tenendo conto dell'incertezza di misura estesa;
$s_{y,x}$	deviazione standard residua;
$t_{\alpha, f = m - 2}$	fattore di Student ($\alpha = 5$ %, $f =$ gradi di libertà, un lato);
m	numero totale dei punti di calibrazione (indice j);
n	numero di ripetizioni a ogni livello;
x_i	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;

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2 \quad \text{parametro somma dei quadrati, } i = \text{indice per il punto di calibrazione } i.$$

7.3.2. Calcolo a partire dai risultati bioanalitici (corretti del bianco e del recupero) di analisi multiple di campioni ($n \geq 6$) contaminati al limite di decisione del metodo di conferma, come endpoint inferiore della distribuzione dei dati al corrispondente valore BEQ medio:

$$\text{Valore di cut - off} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

dove:

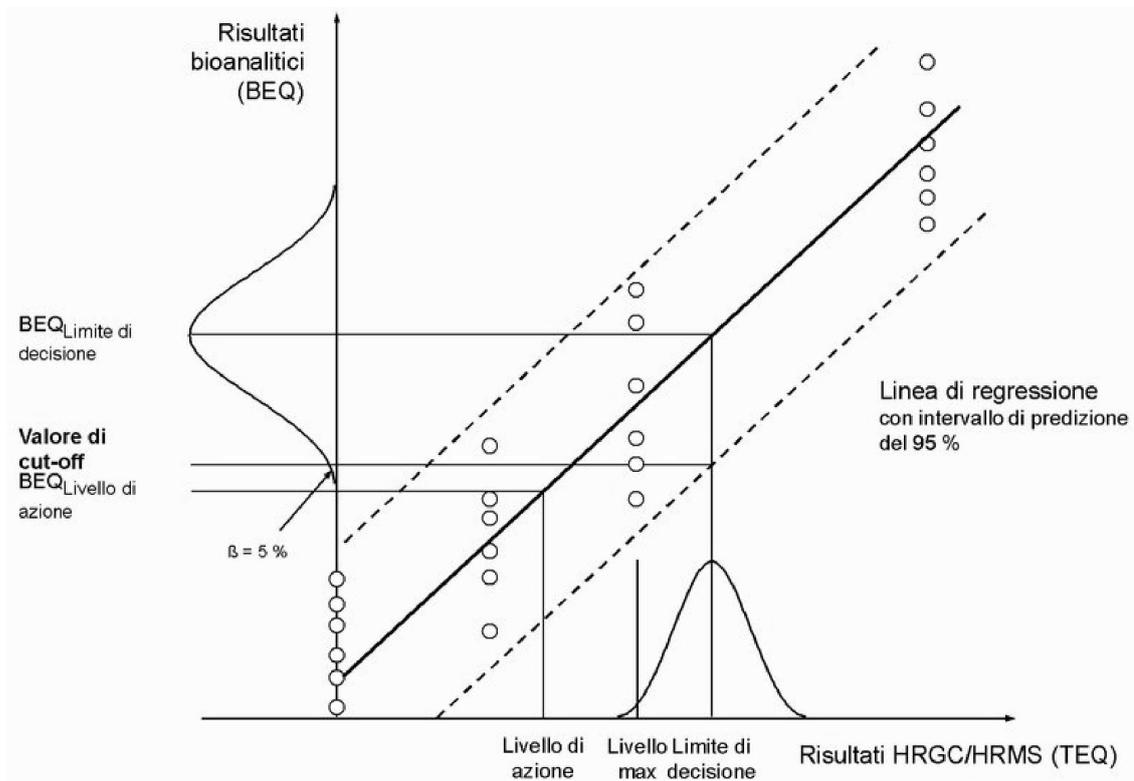
SD_R	deviazione standard dei risultati del biosaggio a BEQ_{DL} , misurata in condizioni di riproducibilità in laboratorio.
---------------	--

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 d'intervento, sulla base dell'osservazione che questo livello sarà prossimo al valore di cut-off determinato come indicato al punto 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 1 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 d'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 d'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 deve essere inferiore al 20% e la riproducibilità intralaboratorio inferiore al 25%, in base ai livelli calcolati in BEQ dopo correzione del bianco e del recupero.

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 d'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, 2x 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 informazioni 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.
- 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 d'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 d'intervento su cui si basa la valutazione.
- 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 di 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 dei mangimi 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 gascromatografica 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 ⁽¹³⁾.

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;
- 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 superano 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 dei LOQ ⁽¹⁴⁾ dei PCB non diossina-simili non è superiore a un terzo del livello massimo ⁽¹⁵⁾.

6. **Controllo di qualità**

Controlli in bianco regolari, analisi di campioni spiked, campioni di controllo 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 il 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.

⁽¹³⁾ 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.

⁽¹⁴⁾ 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" (<https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931>).

⁽¹⁵⁾ 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.

- 7.4. Prescrizioni per i metodi che non utilizzano tutti i sei standard interni marcati con isotopi o utilizzano altri standard interni:
- controllo del recupero degli standard interni per ogni campione;
 - recuperi degli standard interni compresi tra il 60 % e il 120 %;
 - 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 (UE) 2017/625, i laboratori sono accreditati da un organismo riconosciuto operante secondo la Guida ISO/IEC 58, per garantire che alle loro analisi sia applicata l'assicurazione della 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 ⁽¹⁶⁾.

9. Caratteristiche di performance: criteri per la somma dei PCB non diossina-simili al livello massimo

	Spettrometria di massa con diluizione isotopica (*)	Altre tecniche
Esattezza	da - 20 a + 20 %	da - 30 a + 30 %
Precisione intermedia (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Differenza tra calcolo upperbound e lowerbound	≤ 20 %	≤ 20 %

(*) È richiesto l'uso di tutti e sei gli analoghi marcati con ¹³C 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 informazioni 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.

⁽¹⁶⁾ Cfr. nota 37.

B. NORME EN

Ai fini dell'applicazione dell'articolo 34, paragrafo 2, lettera a), del regolamento (UE) 2017/625 sono pertinenti le seguenti norme EN:

EN 17194 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione di Deossinivalenolo, Aflatossina B1, Fumonisina B1 e B2, tossine T-2 e HT-2, Zearalenone e Ocratossina A in materie prime per mangimi e mangimi composti mediante LC-MS/MS;

EN 17270 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione della teobromina nelle materie prime per mangimi e nei mangimi composti, compresi gli ingredienti derivati dal cacao, mediante cromatografia liquida;

EN 17504 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione del gossipolo nei semi di cotone e nei mangimi mediante LC-MS/MS;

EN 17362 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione del pentaclorofenolo (PCP) nelle materie prime per mangimi e nei mangimi composti mediante LC-MS/MS;

EN 16279 Mangimi per animali - Determinazione del contenuto di fluoruro dopo trattamento con acido cloridrico mediante metodo ad elettrodo ione-selettivo (ISE);

EN 17053 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione di elementi in tracce, metalli pesanti e altri elementi nei mangimi attraverso ICP-MS (multi-metodo);

EN 15550 Mangimi per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione di cadmio e piombo mediante spettrometria ad assorbimento atomico con camera di incenerimento di grafite (GF-AAS) dopo digestione sotto pressione;

EN 16206 Mangimi per animali - Determinazione di arsenico mediante spettrometria ad assorbimento atomico per formazione di idruri (HGAAS) dopo digestione sotto pressione con microonde (digestione con 65 % di acido nitrico e 30 % perossido di idrogeno);

EN 16277 Mangimi per animali - Determinazione di mercurio mediante spettrometria ad assorbimento atomico con vapore-a freddo (CVAAS) dopo digestione sotto pressione con microonde (estrazione con 65 % di acido nitrico e 30 % perossido di idrogeno);

EN 16278 Mangimi per animali - Determinazione di arsenico inorganico mediante spettrometria ad assorbimento atomico per formazione di idruri (HG-AAS) dopo estrazione con microonde e separazione mediante estrazione in fase solida (SPE);

EN 17374 Alimenti per animali: Metodi di campionamento e analisi - Determinazione dell'arsenico inorganico negli alimenti per animali mediante HPLC-ICP-MS a scambio anionico.»

ALLEGATO VI

«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 al pollame deve essere 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:

$MJ/kg \text{ di ME} = 0,1551 \times \% \text{ proteine gregge} + 0,3431 \times \% \text{ grassi greggi} + 0,1669 \times \% \text{ amido} + 0,1301 \times \% \text{ zuccheri totali}$
(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 di 0,4 MJ/kg di ME.

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 indicati nel metodo di calcolo devono essere effettuati rispettivamente secondo i metodi di campionamento e i metodi di analisi dell'Unione per il controllo ufficiale degli alimenti per animali.

Vanno applicati:

- per la determinazione dei grassi greggi: la procedura B del metodo per la determinazione degli oli e dei grassi greggi, di cui all'allegato III, parte G;
- per la determinazione dell'amido: il metodo polarimetrico, di cui all'allegato III, parte K.

**METODO DI CALCOLO DEL VALORE ENERGETICO DELLE MATERIE PRIME PER MANGIMI E DEI MANGIMI
COMPOSTI PER GATTI E CANI**

Il valore energetico delle materie prime per mangimi e dei mangimi composti per gatti e cani deve essere calcolato conformemente alla norma EN 16967 Alimenti per animali: Metodi per campionamento e analisi - Equazioni predittive per l'energia metabolizzabile nei materiali per mangimi e mangimi composti (alimenti per animali da compagnia) per gatti e cani compresi i prodotti alimentari dietetici.»