DIRETTIVA 1999/27/CE DELLA COMMISSIONE

del 20 aprile 1999

che fissa i metodi di analisi comunitari per la determinazione dell'amprolium, del diclazuril e del carbadox negli alimenti per animali, che modifica le direttive 71/250/CEE e 73/46/CEE e che revoca la direttiva 74/203/CEE

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

vista la direttiva 70/373/CEE del Consiglio, del 20 luglio 1970, relativa all'introduzione di modi di prelievo di campioni e di metodi di analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per animali [1], modificata da ultimo dall'atto di adesione dell'Austria, della Finlandia e della Svezia, in particolare l'articolo 2,

(1) considerando che la direttiva 70/373/CEE prevede che i controlli ufficiali degli alimenti per animali, volti a costatare l'osservanza delle condizioni prescritte in virtù delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative concernenti la qualità e la composizione degli alimenti per animali, siano effettuati secondo metodi comunitari di prelievo di campioni e di analisi;

(2) considerando che la direttiva 70/524/CEE del Consiglio, del 23 novembre 1970, relativa agli additivi nell'alimentazione degli animali [2], modificata da ultimo dal regolamento (CE) n. 45/1999 della Commissione [3], prescrive che il contenuto di amprolium e diclazuril deve essere indicato al momento dell'etichettatura allorché tali sostanze sono aggiunte alle premiscele ed agli alimenti per animali; che l'autorizzazione dell'uso del carbadox come additivo nell'alimentazione animale è stata revocata con il regolamento (CE) n. 2788/98 della Commissione, del 22 dicembre 1998, che modifica la direttiva 70/524/CEE del Consiglio, relativa agli additivi nell'alimentazione degli animali, in ordine alla revoca dell'autorizzazione di taluni fattori di crescita [4], e che è necessaria una sorveglianza ufficiale sull'eventuale impiego illegale delle sostanze proibite;

(3) considerando che in vista dei necessari controlli è necessario stabilire metodi comunitari di analisi;

(4) considerando che la prima direttiva 71/250/CEE della Commissione, del 15 giugno 1971, che fissa i metodi d'analisi comunitari per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali [5], modificata da ultimo dalla direttiva 98/54/CE [6], stabilisce, fra l'altro, metodi di analisi per la determinazione dell'essenza di senape e della teobromina; che tali metodi non sono più validi per i fini previsti, perché superati dal progresso scientifico e tecnico; che pertanto è opportuno sopprimerli;

(5) considerando che la quarta direttiva 73/46/CEE della Commissione, del 5 dicembre 1972, che fissa i metodi d'analisi comunitari per i controlli ufficiali degli alimenti per animali [7], modificata da ultimo dalla direttiva 98/54/CE, stabilisce, fra l'altro, metodi di analisi per la determinazione del retinolo (vitamina A); che tali metodi non sono più validi per i fini previsti, perché superati dal progresso scientifico e tecnico; che pertanto è opportuno sopprimerli;

(6) considerando che la quinta direttiva 74/203/CEE della Commissione, del 25 marzo 1974, che fissa i metodi d'analisi comunitari per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali [8], modificata da ultimo dalla direttiva 81/680/CE [9], stabilisce metodi di analisi per la determinazione del contenuto in amido e suoi prodotti di degradazione ad elevato peso molecolare negli alimenti che contengono fettucce, polpe, foglie o colletti essiccati di barbabietole, polpe di patate, lieviti disidratati, prodotti ricchi in inulina o ciccioli, amprolium, etopabato, dinitolmide, nicarbazina e menadione (vitamina K3); che tali metodi non sono più validi per i fini previsti, perché superati dal progresso scientifico e tecnico; che pertanto è opportuno revocare tale direttiva;

(7) considerando che le misure previste dalla presente direttiva sono conformi al parere del comitato permanente degli alimenti per gli animali,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Gli Stati membri prescrivono che le analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per animali e delle premiscele, per quanto riguarda il loro contenuto in amprolium, diclazuril e carbadox, siano effettuate secondo i metodi descritti nell'allegato della presente direttiva.

[1] GU L 170 del 3.8.1970, pag. 2.
[2] GU L 270 del 14.12.1970, pag. 1.
[3] GU L 6 del 12.1.1999, pag. 3.
[4] GU L 347 del 23.12.1998, pag. 31.
[5] GU L 155 del 12.7.1971, pag. 13.
[6] GU L 208 del 24.7.1998, pag. 49.
[7] GU L 83 del 30.3.1973, pag. 21.
[8] GU L 108 del 22.4.1974, pag. 7.
[9] GU L 246 del 29.8.1981, pag. 32.

Articolo 2

La direttiva 71/250/CEE è modificata come segue:

1) all'articolo 1, le parole «essenza di senape» e «teobromina» sono soppresse;

2) i punti 8 e 13 dell'allegato sono soppressi.

Articolo 3

La direttiva 73/46/CEE è modificata come segue:

1) l'articolo 2 è soppresso;

2) l'allegato II è soppresso.

Articolo 4

La quinta direttiva 74/203/CEE è abrogata.

Articolo 5

Gli Stati membri mettono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva, non oltre il 31 ottobre 1999. Essi ne informano immediatamente la Commissione.

Essi applicano le misure a partire dal 1º novembre 1999.

Quando gli Stati membri adottano dette disposizioni, queste contengono un riferimento alla presente direttiva oppure sono corredate di un siffatto riferimento all'atto della loro pubblicazione ufficiale. Le modalità di tale riferimento sono decise dagli Stati membri.

Articolo 6

La presente direttiva entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*.

Articolo 7

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 20 aprile 1999.

Per la Commissione

Franz FISCHLER

Membro della Commissione

ALLEGATO

PARTE A

DETERMINAZIONE DELL'AMPROLIUM

Cloridrato del cloruro di 1-[(4-ammino-2 - propil-5 pirimidinil)metil]-2-picolinio

1. **Finalità e campo di applicazione**

Il presente metodo serve per la determinazione dell'amprolium negli alimenti per animali e nelle premiscele. Il limite di rivelazione è di 1 mg/kg, il limite di determinazione è di 25 mg/kg.

2. **Principio**

Il campione viene estratto con una miscela metanolo/acqua. Dopo diluizione con una fase mobile e filtrazione per membrana, il contenuto di amprolium viene determinato per cromatografia in fase liquida ad alte prestazioni (HPLC) a scambio cationico, impiegando un rivelatore UV.

3. **Reattivi**

3.1. Metanolo

3.2. Acetonitrile, qualità per HPLC

3.3. Acqua, qualità per HPLC

3.4. Soluzione di fosfato monosodico, c = 0,1 mol/1

In un matraccio tarato da 1 000 ml, sciogliere 13,80 g di fosfato monosodico monoidrato in acqua (3.3), portare a volume con acqua (3.3) e mescolare.

3.5. Soluzione di perclorato sodico, c = 1,6 mol/1

In un matraccio tarato da 1 000 ml, sciogliere 224,74 g di perclorato sodico monoidrato in acqua (3.3), portare a volume con acqua (3.3) e mescolare.

3.6. Fase mobile per HPLC (cfr. osservazione 9.l)

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

3.7. Sostanza di riferimento (*standard*): cloridrato di 1-[(4-ammino-2-propilpirimidin5-il)metil]-2-metil-piridinio (amprolium, E 750), di purezza garantita (cfr. 9.2).

3.7.1. Soluzione madre di amprolium, 500 µg/ml

In un matraccio tarato da 100 ml, pesare 50 mg di standard (amprolium, 3.7) con l'approssimazione di 0,1 mg; sciogliere in 80 ml di metanolo (3.l) e collocare per 10 minuti il matraccio in bagno ad ultrasuoni (4.4). Dopo il trattamento ultrasonico raffreddare la soluzione a temperatura ambiente, portare a volume con acqua e mescolare. A temperatura ≤ 4 °C, la soluzione rimane stabile per un mese.

3.7.2. Soluzione intermedia di amprolium, 50 µg/ml.

In un matraccio tarato da 50 ml, pipettare 5,0 ml della soluzione madre (3.7.l), portare a volume col solvente di estrazione (3.8) e mescolare. A temperatura ≤ 4 °C la soluzione rimane stabile per un mese.

3.7.3. Soluzioni di taratura

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

3.8. Solvente di estrazione

Miscela metanolo (3.l)- acqua 2 + 1 (v + v).

4. **Apparecchiatura**

4.1. Apparecchiatura HPLC con sistema di iniezione adeguato a volumi da 100 µl.

4.1.1. Colonna per cromatografia in fase liquida, 125 mm x 4 mm, a scambio cationico (riempimento: Nucleosil 10 SA, 10 µm, od 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 ad ultrasuoni.

4.5. Agitatore meccanico o mescolatore magnetico.

5. **Modo di operare**

5.1. Generalità

5.1.1. «Bianco»

Per poter procedere alla prova di recupero (5.l.2) è necessario disporre di un mangime di riferimento («bianco»), di tipo simile a quello del campione e da utilizzare come termine di confronto. L'analisi non deve evidenziare la presenza di quantità rivelabili di amprolium o di sostanze capaci di interferire.

5.1.2. Prova di recupero

Deve essere eseguita una prova di recupero analizzando il «bianco» addizionato di una quantità di amprolium analoga a quella presente nel campione. Per ottenere una concentrazione di 100 mg/kg, trasferire 10,0 ml della soluzione madre (3.7.l) in una beuta da 250 ml, e concentrare evaporando fino a 0,5 ml circa. Aggiungere 50 g di «bianco», mescolare accuratamente e lasciar riposare per 10 minuti agitando nuovamente varie volte prima di procedere all'estrazione (5.2).

Se non fosse disponibile un «bianco» di tipo simile a quello del campione (cfr. 5.1.1), la prova di recupero può essere eseguita col metodo di addizione della sostanza di riferimento. In questo caso, un'aliquota del campione da analizzare viene addizionata di una quantità nota di amprolium, analoga a quella già presente. Quest'aliquota viene analizzata insieme ad una del campione non addizionato, e il recupero può essere calcolato per differenza.

5.2. Estrazione

5.2.1. Premiscele (contenenti meno dell'1 % di amprolium) ed alimenti per animali.

In una beuta da 500 ml, pesare con l'approssimazione di 0,01 g un'adeguata quantità del campione (da 5 a 40 g, secondo il suo contenuto in amprolium), ed aggiungere 200 ml di solvente di estrazione (3.8). Collocare la beuta nel bagno (4.4) e lasciarvela per 15 minuti. Togliere la beuta dal bagno ad ultrasuoni e mantenerla per un'ora sotto agitazione meccanica o magnetica (4.5). Diluire un'aliquota dell'estratto con la fase mobile (3.6) fino a un contenuto di amprolium dell'ordine di 0,5-2 µg/ml, poi mescolare. Filtrare per filtro a membrana (4.2) da 5 a 10 ml della soluzione diluita. Procedere alla determinazione HPLC (5.3).

5.2.2. Premiacele (contenenti fino all'l % di amprolium) ed alimenti per animali.

In una beuta da 500 ml, pesare con l'approssimazione di 0,001 g un'adeguata quantità del campione (da 1 a 5 g, secondo il suo contenuto in amprolium) ed aggiungere 200 ml di solvente ed estrazione (3.8). Collocare la beuta nel bagno ad ultrasuoni (4.4) e lasciarvela per 15 minuti. Togliere la beuta dal bagno ad ultrasuoni e mantenerla per un'ora sotto agitazione meccanica o magnetica (4.5). Diluire un'aliquota dell'estratto con la fase mobile (3.6) fino a un contenuto di amprolium dell'ordine di 0,5-2 µg/ml, poi mescolare. Filtrare per filtro a membrana (4.2) da 5 a 10 ml della soluzione diluita. Procedere alla determinazione HPLC (5.3).

5.3. Determinazione HPLC

5.3.1. Parametri:

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

Colonna analitica (4.1.1):	125 mm × 4 mm, a scambio cationico, riempita con Nucleosil 10 SA, 10 µm, od equivalente
Fase mobile (3.6):	miscela di acetonitrile (3.2), soluzione di fosfato monosodico (3.4) e soluzione di perclorato sodico (3.5), 450 + 450 + 100 (V + V + V).
Velocità di efflusso:	0,7-1 ml/min.
Lunghezza d'onda di rivelazione:	264 nm
Volume di iniezione:	100 µl

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando varie volte la soluzione di taratura (3.7.3) contenente 1,0 µg/ml, fino a costanza dell'altezza delle cuspidi e dei tempi di ritenzione.

5.3.2. Curva di taratura

Iniettare più volte ciascuna soluzione di taratura (3.7.3) varie volte, e determinare le altezze (le superfici) medie delle cuspidi per ciascuna concentrazione. Tracciare la curva di taratura, riportando in ordinata le altezze (le superfici) medie delle cuspidi delle soluzioni di taratura, e in ascissa le corrispondenti concentrazioni, espresse in µg/ml.

5.3.3. Soluzione del campione

Iniettare più volte l'estratto del campione (5.2), impiegando lo stesso volume di quello prelevato per le soluzioni di taratura e determinare le altezze (le superfici) medie delle cuspidi dell'amprolium.

6. Calcolo dei risultati

Partendo dall'altezza (dalla superficie) media delle cuspidi dell'amprolium nella soluzione del campione, determinare la concentrazione di tale soluzione, espressa in µg/ml, riportandosi alla curva di taratura (5.3.2).

Il contenuto w di amprolium nel campione, espresso in mg/kg, è dato dalla seguente formula:

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

dove:

V = volume del solvente di estrazione (3.8) in ml, secondo (5.2) (cioè: 200 ml);

δ = concertazione in amprolium dell'estratto del campione (5.2), espressa in µg/ml;

f = fattore di diluizione secondo (5.2);

m = massa dell'aliquota esaminata, espressa in g.

7. Convalida dei risultati

7.1. Identità

L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia, oppure mediante un rivelatore a serie di diodi che permetta di confrontare gli spettri dell'estratto del campione (5.2) e della soluzione di taratura (3.7.3) contenente 2,0 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografia

A un estratto del campione (5.2) viene aggiunto un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (3.7.3). Il quantitativo di amprolium aggiunto deve essere analogo a quello di amprolium rilevato nell'estratto del campione.

Soltanto l'altezza della cuspide dell'amprolium deve essere aumentata, tenendo conto del quantitativo aggiunto e della diluizione dell'estratto. L'ampiezza della cuspide, a mezza altezza, deve rientrare nel 10 % in più o in meno dell'ampiezza iniziale della cuspide dell'amprolium per l'estratto del campione non addizionato.

7.1.2. Rivelazione mediante serie di diodi

I risultati vengono valutati secondo i seguenti criteri:

a) la lunghezza d'onda di assorbimento massimo degli spettri del campione e dello standard, registrata al vertice della cuspide sul cromatogramma, deve rientrare in un margine determinato dal potere di risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione mediante serie di diodi essa è generalmente di 2 nm;

b) fra 210 e 320 nm, gli spettri del campione e dello standard registrati al vertice della cuspide sul cromatogramma non debbono essere diversi per le parti dello spettro situate fra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto fra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dello standard dell'analita;

c) fra 210 e 320 nm, gli spettri della curva ascendente, del vertice e della curva discendente della cuspide prodotta dall'estratto del campione non devono essere diversi gli uni dagli altri per le parti dello spettro situate fra il 10 % e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto fra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dello spettro del vertice della cuspide.

Se uno di questi criteri non è soddisfatto, la presenza dell'analita non è confermata.

7.2. Ripetibilità

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

— il 15 %, rispetto al valore più elevato per i contenuti di amprolium compresi fra 25 mg/kg e 500 mg/kg;

— 75 mg/kg, per i contenuti di amprolium compresi fra 500 mg/kg e 1 000 mg/kg;

— il 7,5 %, rispetto al valore più elevato per i contenuti di amprolium superiori a 1 000 mg/kg.

7.3. Recupero

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

8. **Risultati di uno studio collaborativo**

E' stato organizzato uno studio collaborativo durante il quale sono stati analizzati tre alimenti per pollame (campioni 1-3), un alimento minerale (campione 4) ed 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 individuali

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, la relativa cuspide compare nel cromatogramma poco prima di quella dell'amprolium. Secondo questo metodo, l'amprolium e la tiamina debbono essere separati. Se l'amprolium e la tiamina non vengono separati dalla colonna (4.1.1) impiegata col presente metodo, sostituire con metanolo fino al 50 % della porzione di acetonitrile della fase mobile (3.6).

9.2. Secondo la farmacopea britannica, lo spettro di una soluzione di amprolium (c = 0,02 mol/l) in acido cloridrico (c = 0,1 mol/l) mostra dei massimi a 246 nm e 262 nm. La densità ottica deve essere di 0,84 a 246 nm e 0,80 a 262 nm.

9.3. L'estratto deve essere sempre diluito con la fase mobile, poiché altrimenti il tempo di ritenzione della cuspide dell'amprolium potrebbe spostarsi significativamente per effetto delle variazioni della forza ionica.

PARTE B

DETERMINAZIONE DEL DICLAZURIL

2,6 cloro-alfa-(4-clorofenil)-4-[4,5-diidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yi]benzenacetonitrile

1. **Finalità e campo di applicazione**

Il presente metodo serve per la determinazione del diclazuril negli alimenti per animali e nelle premiscele. Il limite di rivelazione è di 0,1 mg/kg, il limite di determinazione è di 0,5 mg/kg.

2. **Principio**

Dopo aggiunta di uno standard interno, il campione viene estratto con metanolo acidificato. Nel caso degli alimenti, un'aliquota dell'estratto viene purificata su una cartuccia C 18 per estrazione in fase solida. Il diclazuril viene eluito dalla cartuccia con una miscela di metanolo acidificato ed acqua. Dopo evaporazione, il residuo viene ripreso con DMF/acqua. Nel caso delle premiacele, l'estratto viene evaporato ed il residuo viene ripreso con DMF/acqua. Il contenuto di diclazuril viene determinato per cromatografia in fase liquida ad alto rendimento (HPLC), a gradiente ternario e fase invertita, impiegando un rivelatore UV.

3. **Reattivi**

3.1. Acqua, qualità per HPLC

3.2. Acetato di ammonio

3.3. Solfidrato di tetrabutilammonio (TBHS)

3.4. Acetonitrile, qualità per HPLC

3.5. Metanolo, qualità per HPLC

3.6. N, N-dimetilformammide (DMF)

3.7. Acido cloridico, p_{20} = 1,19 g/ml

3.8. Sostanza di riferimento (*standard*): (+)-4-clorofenil[2,6-dicloro-4-(2,3,4,5-tetraidro-3,5-dioxo-l,2,4-triazin-2-il)fenil] acetonitrile (diclazuril II-24, E 771), di purezza garantita

3.8.1. Soluzione madre di diclazuril, 500 µg/ml.

In un matraccio tarato da 50 ml, pesare 25 mg di standard (diclazuril, 3.8) con l'approssimazione di 0,1 mg. Sciogliere in DMF (3.6), portare a volume con DMF (3.6) e mescolare. Avvolgere il matraccio con foglio d'alluminio (od impiegare un matraccio in vetro scuro) e conservare in frigorifero. A temperatura ≤ 4 °C, la soluzione rimane stabile per un mese.

3.8.2. Soluzione standard di diclazuril, 50 µg/ml

Trasferire 5,00 ml della soluzione madre (3.8.l) in un matraccio tarato da 50 ml, portare a volume con DMF (3.6) e mescolare. Avvolgere il matraccio con foglio d'alluminio (od impiegare un matraccio in vetro scuro) e conservare in frigorifero. A temperatura ≤ 4 °C, la soluzione rimane stabile per un mese.

3.9. Standard interno: 2,6 cloro-alfa-(4-clorofenil)-4-[4,5-diidro-3,5-dioxo-l,2,4-triazin-2(3H)-yi]benzen-acetonitrile, E771

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

In un matraccio tarato da 50 ml, pesare 25 mg dello standard interno (3.9) con l'approssimazione di 0,1 mg. Sciogliere in DMF (3.6), portare a volume con DMF (3.6) e mescolare. Avvolgere il matraccio con foglio d'alluminio (od impiegare un matraccio in vetro scuro) e conservare in frigorifero. A temperatura non superiore a 4 °C, la soluzione rimane stabile per un mese.

3.9.2. Soluzione dello standard interno, 50 µg/ml

Trasferire 5,00 ml della soluzione madre dello standard interno (3.9.l) in un matraccio tarato da 50 ml, portare a volume con DMF (3.6) e mescolare. Avvolgere il matraccio con foglio d'alluminio (od impiegare un matraccio in vetro scuro) e conservare in frigorifero. A temperatura non superiore a 4 °C, la soluzione rimane stabile per un 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 p/10 mg dello standard interno con l'approssimazione di 0,1 mg, Sciogliere in DMF (3.6) in bagno ad ultrasuoni (4.6), portare a volume con DMF e mescolare. Avvolgere il matraccio con foglio d'alluminio (od impiegare un matraccio in vetro scuro) e conservare in frigorifero. A temperatura ≤ 4 °C, la soluzione rimane stabile per un mese.

3.10. Soluzione di taratura, 2 µg/ml

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

3.11. Cartuccia C18 per estrazione in fase solida (es.: Bond Elut). Misura: 1 cm. Massa sorbente: 100 mg.

3.12. Solvente di estrazione: metanolo acidificato

Pipettare 5,0 ml di acido cloridrico (3.7) in 1000 ml di metanolo (3.5) e mescolare.

3.13. Fase mobile per HPLC.

Eluente A: soluzione di acetato di ammonio — solfidrato di tetrabutilammonio.

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

3.13.2. Eluente B: acetonitrile (3.4).

3.13.3. Eluente C: metanolo (3.5)

4. **Apparecchiatura**

4.1. Agitatore meccanico

4.2. Apparecchiatura per HPLC a gradiente ternario

4.2.1. Colonna per cromatografia in fase liquida, 100 mm x 4,6 mm, con riempimento in Hypersil ODS da 3 µm, od equivalente

4.2.2. Rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile, o rivelatore a serie di diodi

4.3. Evaporatore rotativo sotto vuoto

4.4. Filtro a membrana, 0,45 µm

4.5. Collettore da vuoto

4.6. Bagno ad ultrasuoni.

5. **Modo di operare**

5.1. Generalità

5.1.1. «Bianco»

È necessario disporre di un mangime di riferimento («bianco»), nel quale dev'essere verificata l'assenza del diclazuril e di sostanze capaci di interferire. Il «bianco» deve essere di tipo simile a quello del campione, e la sua analisi non deve evidenziare la presenza di diclazuril o di sostanze capaci di interferire.

5.1.2. Prova di recupero

Deve essere eseguita una prova di recupero analizzando il «bianco» addizionato di una quantità di diclazuril analoga a quella presente nel campione. Per ottenere una concentrazione di 1 mg/kg, aggiungere 0,1 ml della soluzione madre (3.8.l) a 50 g di «bianco», mescolare accuratamente e lasciar riposare per 10 minuti, agitando nuovamente varie volte prima di procedere all'estrazione (5.2).

Se non fosse disponibile un «bianco» di tipo simile a quello del campione (cfr. 5.1.1), la prova di recupero può essere eseguita col metodo di addizione della sostanza di riferimento. In questo caso, un'aliquota del campione da analizzare viene addizionata di una quantità nota di diclazuril, analoga a quella già presente. Quest'aliquota viene analizzata insieme ad una del campione non addizionato, ed il recupero può essere calcolato per differenza.

5.2. Estrazione

5.2.1. Alimenti

Pesare 50 g circa del campione con l'approssimazione di 0,01 g. Trasferire in una beuta da 500 ml, aggiungere 1,00 ml di soluzione dello standard interno (3.9.2) e 200 ml di solvente di estrazione (3.12), poi coprire il recipiente. Mantenere sotto agitazione la miscela per una notte, nell'agitatore (4.l). Lasciar depositare per 10 minuti. Trasferire un'aliquota da 20 ml del surnatante in un adatto contenitore in vetro e diluire con 20 ml d'acqua. Trasferire questa soluzione in una cartuccia di estrazione (3.11) e filtrare sotto vuoto (4.5). Lavare la cartuccia con 25 ml di una miscela di solvente di estrazione (3.12) e d'acqua, 65 + 35 (V + V). Eliminare le frazioni raccolte ed eluire la mescolanza con 25 ml di una miscela di solvente di estrazione (3.12) e d'acqua, 80 + 20 (V + V). Evaporare questa frazione a 60 °C, nell'evaporatore rotativo (4.3), fino a secchezza incipiente. Riprendere il residuo con 1,0 ml di DMF (3.6), aggiungere 1,5 ml d'acqua (3.1) e mescolare. Filtrare per filtro a membrana (4.4). Procedere alla determinazione HPLC (5.3).

5.2.2. Premiscele

Pesare 1 g circa del campione, con l'approssimazione di 0,01 g. Trasferire in una beuta da 500 ml, aggiungere 1,00 ml di soluzione dello standard interno (3.9.3) e 200 ml di solvente di estrazione (3.12), poi coprire il recipiente. Agitare per una notte sull'agitatore (4.1). Lasciare depositare per 10 minuti. Trasferire un'aliquota da 10 000/p ml (p = contenuto nominale di diclazuril nella premiscela, espresso in mg/kg) del surnatante in un matraccio a fondo arrotondato di dimensioni convenienti. Evaporare nell'evaporatore rotativo (4.3), sotto pressione ridotta e a 60 °C, fino a secchezza incipiente. Riprendere il residuo con 10,0 ml DMF (3.6), aggiungere 15,0 d'acqua (3.1) e mescolare. Procedere alla determinazione HPLC (5.3).

5.3. Determinazione HPLC

5.3.1. Parametri

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

— Colonna cromatografica in fase liquida (4.2.1.):	100 mm × 4,6 mm, con Hypersil ODS, riempimento da 3 μm, od equivalente	
— Fase mobile:	Eluente A (3.13.1):	soluzione acquosa di acetato di ammonio e di solfidrato di tetrabutilammonio
	Eluente B (3.13.2):	acetonitrile
	Eluente C (3.13.3):	metanolo

— Modo di eluizione:	— gradiente lineare
	— condizioni iniziali: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)
	— dopo 10 minuti, gradiente di eluizione per 30 minuti fino a: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V)
	Risciacquare con B per 10 minuti
— Velocità di efflusso:	1,5 – 2 ml/min
— Volume di iniezione:	20 µl
— Lunghezza d'onda di rivelazione:	280 ml

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando più volte la soluzione di taratura (3.10), contenente 2 µg/ml, fino a costanza dell'altezza delle cuspidi e dei tempi di ritenzione.

5.3.2. Soluzione di taratura

Iniettare più volte 20 µl della soluzione di taratura (3.10) e determinare l'altezza (la superficie) media delle cuspidi del diclazuril e dello standard interno.

5.3.3. Soluzione del campione

Iniettare più volte 20 µl della soluzione del campione (5.2.1 o 5.2.2) e determinare l'altezza (la superficie) media delle cuspidi del diclazuril e dello standard interno.

6. **Calcolo dei risultati**

6.1. Alimenti

Il contenuto w di diclazuril nel campione, espresso in mg/kg, è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c}} \cdot \frac{\beta_{d,c} \cdot 10V}{m} \text{ [mg/kg]}$$

dove:

$h_{d,s}$ = altezza (superficie) della cuspide del diclazuril nella soluzione del campione (5.2.1);

$h_{i,s}$ = altezza (superficie) della cuspide dello standard interno nella soluzione del campione (5.2.1);

$h_{d,c}$ = altezza (superficie) della cuspide del diclazuril nella soluzione di taratura (3.10);

$h_{i,c}$ = altezza (superficie) della cuspide dello standard interno nella soluzione di taratura (3.10);

$\beta_{d,c}$ = concentrazione del diclazuril nella soluzione di taratura, µg/ml (3.10);

m = massa dell'aliquota analizzata, g

V = volume dell'estratto del campione secondo 5.2.1 (cioè: 2,5 ml).

6.2. Premiscele

Il contenuto w di diclazuril nel campione, espresso in mg/kg, è data dalla seguente formula:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c}} \cdot \frac{\beta_{d,c} \cdot 0{,}02V.p}{m} \text{ [mg/kg]}$$

dove:

$h_{d,c}$ = altezza (superficie) della cuspide del diclazuril nella soluzione di taratura (3.10);

$h_{i,c}$ = altezza (superficie) della cuspide dello standard interno nella soluzione di taratura (3.10);

$h_{d,s}$ = altezza (superficie) della cuspide del diclazuril nella soluzione del campione (5.2.2);

$h_{i,s}$ = altezza (superficie) della cuspide dello standard interno nella soluzione del campione (5.2.2);

$\beta_{d,c}$ = concentrazione del diclazuril nella soluzione di taratura (3.10);

m = massa dell'aliquota analizzata, g;

V = volume dell'estratto del campione secondo 5.2.2 (cioè: 2,5 ml);

p = contenuto nominale di diclazuril nella premiscela, mg/kg.

7. **Convalida dei risultati**

7.1. Identità

L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia, oppure mediante un rivelatore a serie di diodi che permetta di confrontare gli spettri dell'estratto del campione (5.2.1 o 5.2.2) e della soluzione di taratura (3.10).

7.1.1. Co-cromatografia

A un estratto del campione (5.2.1 o 5.2.2) viene aggiunto un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (3.10). Il quantitativo di diclazuril aggiunto deve essere analogo a quello di diclazuril trovato nell'estratto del campione.

Debbono essere aumentate soltanto le altezze delle cuspidi del diclazuril e dello standard interno, tenendo conto dei quantitativi aggiunti e della diluizione dell'estratto. L'ampiezza delle cuspidi, a metà altezza, deve rientrare nel ± 10 % dell'ampiezza iniziale della cuspide del diclazuril o di quella dello standard interno del campione non addizionato.

7.1.2. Rivelazione mediante serie di diodi

I risultati vengono valutati secondo i seguenti criteri:

a) La lunghezza d'onda dell'assorbimento massimo degli spettri del campione e dello standard, registrata al vertice della cuspide sul cromatogramma, deve rientrare in un margine derminato dal potere di risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione mediante serie di diodi, essa è generalmente di ± 2 nm.

b) fra 210 e 320 nm, gli spettri del campione e dello standard registrati al vertice della cuspide sul cromatogramma non debbono essere diversi per le parti dello spettro situate fra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto fra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dello standard dell'analita;

c) fra 210 e 320 nm, gli spettri della curva ascendente, del vertice e della curva discendente della cuspide prodotta dall'estratto del campione non debbono essere diversi gli uni dagli altri per le parti dello spettro situate fra il 10 % e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi massimi e quando in tutti i punti osservati lo scarto fra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dello spettro del vertice della cuspide.

Se uno di questi criteri non è soddisfatto, la presenza dell'analita non è confermata.

7.2. Ripetibilità

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

— il 30 % rispetto al 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 % rispetto al valore più elevato, per i contenuti di diclazuril oltre 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**

È stato organizzato uno studio collaborativo, nel corso del quale 5 campioni sono stati analizzati da 11 laboratori. Questi campioni consistevano di due premiscele; una era mescolata con una matrice organica (O 100) e l'altra con una matrice inorganica (A 100). Il contenuto teorico era di 100 mg diclazuril/kg. I tre mangimi misti per il pollame sono stati preparati da tre diversi produttori (NL) (L1/Z1/K1). Il contenuto teorico era di 1 mg diclazuril/kg. Ai laboratori è stato chiesto di analizzare ciascun campione uno sola volta o in duplicato. (Maggiori informazioni: *Journal of AOAC International, Volume 77, n. 6, 1994, p. 1359-1361).* I risultati sono riportati nella tabella che segue.

	Campione 1 A 100	Campione 2 O 100	Campione 3 L 1	Campione 4 Z 1	Campione 5 K 1
L	11	11	11	11	6
N	19	18	19	19	12
Media	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S_r [mg/kg]	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV_r [%]	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S_R [mg/kg]	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV_R [%]	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Contenuto nominale [mg/kg]	100	100	1	1	1

L: numero di laboratori
n: numero di valori singoli
S_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**

Deve essere dimostrato in precedenza che il responso del diclazuril è lineare in tutto entro il campo di concentrazioni misurate.

PARTE C

DETERMINAZIONE DEL CARBADOX

Metil-3-(2-chinossalinilinmetilene) carbazato-N1,N4-diossido

1. **Finalità e campo di applicazione**

Il presente metodo serve per la determinazione del carbadox negli alimenti per animali, premiscele e preparati. Il limite di rivelazione è di 1 mg/kg. Il limite di determinazione è di 10 mg/kg.

2. **Principio**

Il campione viene equilibrato con acqua ed estratto con metanolo-acetonitrile. Nel caso degli alimenti, un'aliquota dell'estratto filtrato viene purificata su colonna di ossido di alluminio. Per le premiscele e i preparati, un'aliquota dell'estratto filtrato viene diluita a concentrazione appropriata con acqua, metanolo ed acetonitrile. Il contenuto di carbadox viene determinato per cromatografia in fase liquida ad alte prestazioni, in fase invertita, impiegando un rivelatore UV.

3. **Reattivi**

3.1. Metanolo

3.2. Acetonitrile, qualità per HPLC

3.3. Acido acetico, w = 100 %

3.4. Ossido di alluminio: neutro, grado di attività I

3.5. Metanolo-acetonitrile 1 + 1 (v + v)

Miscelare 500 ml di metanolo (3.l) con 500 ml di acetonitrile (3.2).

3.6. Acido acetico, σ = 10 %

Diluire con acqua 10 ml di acido acetico (3.3) e portare a 100 ml.

3.7. Acetato di sodio, CH_3COONa

3.8. Acqua, qualità per HPLC

3.9. Soluzione tampone all'acetato, c = 0,01 mol/1, pH = 6.0

Sciogliere 0,82 grammi di acetato di sodio (3.7) in 700 ml d'acqua (3.8) e regolare il pH a 6,0 con acido acetico (3.6). Trasferire in un matraccio tarato da 1 000 ml, portare a volume con acqua (3.8) e mescolare.

3.10. Fase mobile per HPLC

Mescolare 825 ml di soluzione tampone all'acetato (3.9) con 175 ml di acetonitrile (3.2). Filtrare per filtro da 0,22 µm (4.5) e degassare la soluzione (ad esempio trattando ad ultrasuoni per 10 minuti).

3.11. Sostanza di riferimento (*standard*):

N^1,N^4-diossido del metil 3-(2-chinossalinilmetilen) carbazato (carbadox, E 850), di purezza garantita.

3.11.1. Soluzione madre di carbadox, 100 µg/ml (cfr. 5, *Modo di operare*)

In un matraccio tarato da 250 ml, pesare 25 mg di carbadox standard con l'approssimazione di 0,1 mg. Sciogliere in metanolo-acetonitrile (3.5) trattando con ultrasuoni (4.7). Dopo il trattamento con ultrasuoni, raffreddare a temperatura ambiente, portare a volume con metanolo-acetonitrile (3.5) e mescolare. Avvolgere il matraccio con foglio d'alluminio od utilizzare vetreria scura e conservare in frigorifero. A temperatura non superiore a 4 °C, questa soluzione si mantiene stabile per un mese

3.11.2. Soluzione di taratura

Trasferire 2,0, 5,0, 10,0 e 20,0 ml della soluzione madre (3.11.1) in una serie di matracci tarati da 100 ml. Aggiungere 30 ml d'acqua, portare a volume con metanolo-acetonitrile (3.5) e mescolare. Avvolgere i matracci con foglio d'alluminio. Queste soluzioni corrispondono rispettivamente a 2,0, 5,0, 10,0 e 20,0 µg/ml di carbadox. Le soluzioni di taratura debbono essere preparate estemporaneamente prima dell'uso.

Nota: per la determinazione del carbadox negli alimenti contenenti meno di 10 mg/kg si dovranno preparare soluzioni di taratura a concentrazioni inferiori a 2,0 µg/ml.

3.12. Miscela acqua [metanolo-acetonitrile] (3.5), 300 + 700 (v + v)

Mescolare 300 ml d'acqua con 700 ml della miscela metanolo-acetonitrile (3.5).

4. Apparecchiatura

4.1. Agitatore da laboratorio o mescolatore magnetico.

4.2. Carta da filtro in fibra di vetro (Whatman GF/A od equivalente).

4.3. Colonna in vetro (lunghezza: 300-400 mm, diametro interno: 10 mm circa), con setto in vetro sinterizzato e valvola di scarico.

Nota: si può anche impiegare una colonna di vetro provvista di rubinetto oppure una colonna di vetro ad estremità affusolata. In questo caso, si deve inserire un piccolo tampone di lana di vetro all'estremità inferiore e pressarlo verso il basso con una bacchetta di vetro.

4.4. Apparecchiatura HPLC con sistema di iniezione adeguato a volumi da 20 µl.

4.4.1. Colonna per cromatografia in fase liquida: 300 mm x 4 mm, C 18, con riempimento 10 µm o equivalente.

4.4.2. Rivelatore UV con regolazione variabile della lunghezza d'onda o rivelatore a serie di diodi, funzionante nell'intervallo 225-400 nm.

4.5. Filtro a membrana, 0,22 µm.

4.6. Filtro a membrana, 0,45 µm.

4.7. Bagno ad ultrasuoni.

5. Modo di operare

Nota: il carbadox è fotosensibile. Effettuare tutte le operazioni in luce attenuata od impiegare vetreria scura od avvolta in foglio d'alluminio.

5.1. Generalità

5.1.1. «Bianco»

Per eseguire la prova di recupero (5.1.2) è necessario disporre di un mangime di riferimento («bianco»), nel quale dev'essere verificata l'assenza del carbadox e di sostanze capaci di interferire. Il «bianco» deve essere di tipo simile a quello del campione, e la sua analisi non deve evidenziare la presenza di carbadox o di sostanze capaci di interferire.

5.1.2. Prova di recupero

Deve essere eseguita una prova di recupero analizzando il «bianco» (5.1.1) addizionato di una quantità di carbadox analoga a quella presente nel campione. Per ottenere una concentrazione di 50 mg/kg, introdurre 5,0 ml della soluzione madre (3.11.1) in una beuta da 200 ml. Evaporare la soluzione a 0,5 ml circa, in corrente di azoto. Aggiungere 10 g del «bianco», mescolare ed aspettare 10 minuti prima di passare all'estrazione.

Se non fosse disponibile un «bianco» di tipo simile a quello del campione (cfr. 5.1.1), la prova di recupero può essere eseguita col metodo di addizione della sostanza di riferimento. In questo caso, un'aliquota del campione da analizzare viene addizionata di una quantità nota di carbadox, analoga a quella già presente. Quest'aliquota viene analizzata insieme ad una del campione non addizionato, ed il recupero può essere calcolato per differenza.

5.2. Estrazione

5.2.1. Alimenti

Pesare 10 gr circa del campione con l'approssimazione di 0,01 g, e trasferirli in una beuta da 200 ml. Aggiungere 15,0 ml d'acqua, mescolare ed equilibrare per 5 minuti. Aggiungere 35,0 ml di metanolo-acetonitrile (3.5), coprire ed agitare per 30 minuti sull'agitatore o col mescolatore magnetico (4.1). Filtrare la soluzione per carta in fibre di vetro (4.2). Conservare questa soluzione per lo stadio della purificazione (5.3).

5.2.2. Premiscele (0,1-2,0 %)

Pesare 1 g circa del campione non macinato con l'approssimazione di 0,001 g, e trasferirlo in una beuta da 200 ml. Aggiungere 15,0 ml d'acqua, mescolare ed equilibrare per 5 minuti. Aggiungere 35,0 ml di metanolo-acetonitrile (3.5), tappare ed agitare per 30 minuti sull'agitatore o col mescolatore magnetico (4.l). Filtrare la soluzione per carta in fibre di vetro (4.2). Pipettare un'aliquota del filtrato in un matraccio tarato da 50 ml. Aggiungere 15,0 ml d'acqua, portare a volume con metanolo-acetonitrile (3.5) e mescolare. La concentrazione di carbadox nella soluzione finale è circa di 10 µg/ml. Filtrare un'aliquota per filtro da 0,45 µm (4.6). Procedere alla determinazione HPLC (5.4).

5.2.3. Preparazioni (> 2 %)

Pesare 0,2 g circa del campione non macinato con l'approssimazione di 0,001 g, e trasferirli in un matraccio da 250 ml. Aggiungere 45,0 ml d'acqua, mescolare ed equilibrare per 5 minuti. Aggiungere 105 ml di metanolo-acetonitrile (3.5), coprire ed omogeneizzare. Sottoporre il campione ad ultrasuoni (4.7) per 15 minuti, poi scuotere od agitare per 15 minuti (4.1). Filtrare la soluzione per carta da filtro in fibre di vetro (4.2). Diluire un'aliquota del filtrato con la miscela acqua-metanolo-acetonitrile (3.12), fino a una concentrazione finale di carbadox dell'ordine di 10-15 µg/ml (per una preparazione al 10 %, il fattore di diluizione è 10). Filtrare un'aliquota per filtro da 0,45 µm (4.6). Procedere alla determinazione HPLC (5.4).

5.3. Purificazione

5.3.1. Preparazione della colonna di ossido di alluminio

Pesare 4 g di ossido di alluminio (3.4) e trasferire nella colonna di vetro (4.3).

5.3.2. Purificazione del campione

Far passare 15 ml-dell'estratto filtrato (5.2.1) per la colonna di ossido di alluminio ed eliminare i primi due ml di eluato. Raccogliere i successivi 5 ml e filtrare un'aliquota per filtro da 0,45 µm (4.6). Procedere alla determinazione HPLC (5.4).

5.4. Determinazione HPLC

5.4.1. Parametri

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

Colonna per cromatografia in fase liquida (4.1.1):	300 mm × 4 mm, C18, riempimento da 10 µm od equivalente
Fase mobile (3.10):	miscela di soluzioni tampone all'acetato (3.9) e di acetonitrile (3.2), 825+175 (V + V)
Velocità di efflusso:	1,5-2 ml/min
Lunghezza d'onda di rivelazione:	365 nm.
Volume di iniezione:	20 µl

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando più volte la soluzione di taratura (3.11.2) contenente 5,0 µg/ml, fino a costanza delle altezze (delle superfici) delle cuspidi e dei tempi di ritenzione.

5.4.2. Curva di taratura

Iniettare più volte ciascuna soluzione di taratura (3.11.2) e determinare le altezze (le superfici) delle cuspidi per ciascuna concentrazione. Tracciare una curva di taratura riportando in ordinata le altezze (le superfici) medie delle cuspidi della soluzione di taratura e in ascissa le corrispondenti concentrazioni, espresse in µg/ml.

5.4.3. Soluzione del campione

Iniettare più volte l'estratto del campione [(5.3.2) per gli alimenti, (5.2.2) per le premiscele e (5.2.3) per i preparati], e determinare l'altezza (la superficie) media delle cuspidi del carbadox.

6. Calcolo dei risultati

Partendo dall'altezza (dalla superficie) media delle cuspidi del carbadox nella soluzione del campione, determinare la concentrazione di tale soluzione in µg/ml riportandosi alla curva di taratura (5.4.2).

6.1. Alimenti

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

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

dove:

ɓ = concentrazione di carbadox nell'estratto del campione, (5.3.2) µg/kg;

V_1 = volume di estrazione in ml (cioè 50);

m = massa dell'aliquota analizzata in g.

6.2. Premiscele e preparati

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

$$w = \frac{\text{ɓ} \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

dove:

ɓ = concentrazione di carbadox nell'estratto del campione, (5.3.2) µg/kg;

V_2 = volume di estrazione in ml (cioè 50 per le premiscele, 150 per i preparati);

f = fattore di diluizione secondo 5.2.2 (premiscele) o 5.2.3 (preparati);

m = massa dell'aliquota analizzata in g.

7. **Convalida dei risultati**

7.1. L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia, oppure mediante un rivelatore a serie di diodi che permetta di confrontare gli spettri dell'estratto del campione e della soluzione di taratura (3.11.2) contenente 10,0 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografia

All'estratto del campione si aggiunge un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (3.11.2). Il quantitativo di carbadox aggiunto deve essere analogo a quello di cui è valutata la presenza nell'estratto del campione.

Deve essere aumentata soltanto l'altezza della cuspide del carbadox, tenendo conto del quantitativo aggiunto e della diluizione dell'estratto. L'ampiezza della cuspide, a metà della sua altezza massima, deve rientrare nel 10 % circa dell'ampiezza originale.

7.1.2. Rivelatore a serie di diodi

I risultati vengono valutati secondo i criteri che seguono:

a) La lunghezza d'onda di assorbimento massimo degli spettri del campione dello standard, registrata al vertice della cuspide sul cromatogramma, deve essere la stessa entro un margine determinato dal potere di risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione mediante serie di diodi, essa è generalmente di ± 2 nm.

b) Fra 225 e 400 nm, gli spettri del campione e dello standard registrati al vertice della cuspide sul cromatogramma non debbono 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 nessun caso lo scarto osservato fra gli spettri supera il 15 % della densità ottica dello spettro della sommità del picco.

c) Tra 225 e 400 nm, gli spettri della curva ascendente, del vertice della curva discendente della cuspide prodotta dall'estratto del campione non debbono essere diversi fra loro per le parti dello spettro situate fra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando gli stessi massimi sono presenti e quando in tutti i punti osservati la deviazione fra gli spettri non superi il 15 % dell'assorbanza dello spettro al vertice.

Se uno di questi criteri non è soddisfatto, la presenza dell'analita non è confermata.

7.2. Ripetibilità

Per contenuti di 10 mg/kg e superiori, la differenza fra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve superare il 15 % rispetto al risultato più alto.

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 quale 8 laboratori hanno analizzato 6 alimenti, 4 premiscele e 3 preparati. Su ciascun campione sono state eseguite analisi in doppio. (Per maggiori informazioni: *Journal of the AOAC, Volume 71, 1998, pag. 484-490).* I risultati (ad esclusione di quelli fuori campo) sono mostrati qui appresso:

Tabella 1. Risultato dello studio collaborativo sugli alimenti

	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Media [mg/kg]	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S_r [mg/kg]	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV_r [%]	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S_R [mg/kg]	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV_R [%]	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Contenuto nominale [mg/kg]	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabella 2. Risultati dello studio collaborativo sulle premiscele e i preparati

	Premiscele				Preparati		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Media [mg/kg]	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S_r [mg/kg]	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_r [%]	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S_R [mg/kg]	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CV_R [%]	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Contenuto nominale [mg/kg]	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

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.