II

(Atti per i quali la pubblicazione non è una condizione di applicabilità)

COMMISSIONE

DECISIONE DELLA COMMISSIONE

del 14 luglio 1987

che stabilisce i metodi da impiegare per la ricerca dei residui di sostanze ad azione ormonica e di sostanze ad azione tireostatica

(87/410/CEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

vista la direttiva 85/358/CEE del Consiglio, del 16 luglio 1985, che completa la direttiva 81/602/CEE concernente il divieto di talune sostanze ad azione ormonica e delle sostanze ad azione tireostatica [1], modificata dal regolamento (CEE) n. 3768/85 [2], in particolare l'articolo 5,

considerando che, a norma dell'articolo 5, paragrafo 2 della direttiva 85/358/CEE, compete alla Commissione fissare, secondo la procedura di cui all'articolo 11 della stessa direttiva, i metodi di analisi dei campioni da impiegare per la ricerca dei residui di sostanze ad azione ormonica e di sostanze ad azione tireostatica;

considerando che, a norma dell'articolo 4, paragrafo 1, lettera b) della direttiva 64/433/CEE del Consiglio, del 26 giugno 1964, relativa a problemi sanitari in materia di scambi intracomunitari di carni fresche [3], modificata da ultimo dalla direttiva 86/587/CEE [4], nonché dell'articolo 11, paragrafo 4, secondo comma della direttiva 85/397/CEE del Consiglio, del 5 agosto 1985, concernente i problemi sanitari e di polizia sanitaria negli scambi intracomunitari di latte trattato termicamente [5], modificata dal regolamento (CEE) n. 3768/85, gli esami dei residui devono essere effettuati secondo metodi scientificamente riconosciuti e praticamente sperimentati, in particolare quelli definiti nelle direttive comunitarie o in altre disposizioni internazionali;

considerando che la determinazione dei metodi di analisi dei campioni comprende la definizione dei procedimenti di analisi da impiegare, delle regole da seguire per il campionamento e dei criteri relativi all'esecuzione delle analisi;

considerando che i procedimenti di analisi da impiegare devono essere abbastanza sensibili da individuare la presenza di residui di sostanze ad azione ormonica e di sostanze ad azione tireostatica;

considerando che il campionamento rappresenta una parte essenziale del metodo di analisi; che è pertanto opportuno stabilire regole per il prelievo dei campioni;

considerando che, il 20 dicembre 1985, il Consiglio ha adottato la direttiva 85/591/CEE concernente l'istituzione di modalità di prelievo dei campioni e di metodi di analisi comunitari per il controllo dei prodotti destinati all'alimentazione umana [6]; che, ai fini della presente decisione, è opportuno tener conto dei criteri previsti al punto 1 dell'allegato di detta direttiva;

considerando che le misure previste dalla presente decisione sono conformi al parere del comitato veterinario permanente,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DECISIONE:

Articolo 1

I procedimenti di analisi da impiegare per la ricerca dei residui di sostanze ad azione ormonica e di sostanze ad azione tireostatica sono i seguenti:

[1] GU n. L 191 del 23. 7. 1985, pag. 46.
[2] GU n. L 362 del 31. 12. 1985, pag. 8.
[3] GU n. 121 del 29. 7. 1964, pag. 2012/64.
[4] GU n. L 339 del 2. 12. 1986, pag. 26.
[5] GU n. L 226 del 24. 8. 1985, pag. 13.
[6] GU n. L 372 del 31. 12. 1985, pag. 50.

— prova immunologica (IA),
— cromatografia su strato sottile (TLC),
— cromatografia in fase liquida ad alta pressione (HPLC).
— cromatografia in fase gassosa (GC),
— spettrometria di massa (MS),
— spettrometria (SP).

Articolo 2

I campioni devono essere prelevati secondo le regole seguenti :

1) le dimensioni dei campioni devono essere sufficienti per consentire una analisi adeguata, di ripetere tale analisi e di fare delle analisi di conferma ;

2) i campioni devono essere contrassegnati in modo da rendere possibile la loro identificazione in tutte le fasi dell'esame ;

3) i metodi di condizionamento, di conservazione e di trasporto dei campioni devono essere tali da mantenerne l'integrità e non nuocere ai risultati dell'esame.

Articolo 3

I criteri per l'esecuzione delle analisi sono fissati in allegato.

Articolo 4

La presente decisione sarà riesaminata anteriormente al 1° gennaio 1991 allo scopo di tenere conto dell'evoluzione delle conoscenze scientifiche e tecnologiche.

Articolo 5

Gli Stati membri sono destinatari della presente decisione.

Fatto a Bruxelles, il 14 luglio 1987.

Per la Commissione
Frans ANDRIESSEN
Vicepresidente

ALLEGATO

CAPITOLO I : PRINCIPI GENERALI

Introduzione

Per poter valutare obiettivamente i metodi di rivelazione dei residui, occorre disporre dei dati quantitativi relativi ad alcune caratteristiche standard dei metodi stessi. Per una parte di queste caratteristiche si devono fissare inoltre requisiti quantitativi che tengano conto, fra l'altro, dello scopo del metodo (ad esempio screening, determinazione quantitativa, conferma). Nel presente capitolo si definiscono i criteri prescritti dall'allegato della direttiva 85/591/CEE da applicare nell'esame dei metodi correnti per l'analisi dei residui di sostanze ad azione ormonica e di sostanze ad azione tireostatica.

Definizioni

i) *Specificità*

La specificita è la capacità di un metodo di distinguere l'analita da misurare rispetto alle altre sostanze. Questa caratteristica dipende soprattutto dalla metodica adottata. I dati sulla specificità devono riferirsi almeno a tutte quelle sostanze che si pensa possano dare origine ad un segnale quando viene impiegata la metodica descritta (ad esempio omologhi, analoghi, prodotti metabolici del residuo che interessa). Da tali dati deve essere possibile risalire quantitativamente al limite oltre il quale il metodo non consente più di distinguere, nelle condizioni sperimentali, la sostanza da analizzare dalle altre sostanze.

ii) *Esattezza*

Nel presente documento per esattezza si intende l'esattezza del valore medio delle misure. La definizione che viene qui adottata è quella data dal punto 2.83 della norme ISO 3534-1977 (esattezza della media : lo scostamento tra il valore vero e il valore medio dei risultati di prove che si otterrebbero applicando il metodo sperimentale un gran numero di volte).

Note : I limiti principali dell'esattezza sono :

a) gli errori casuali,

b) gli errori sistematici, ad esempio : una bassa compensazione.

Nel caso di un gran numero di esperimenti l'esattezza del valore medio si avvicina all'errore sistematico.

Per valutare l'esattezza di un metodo occorre specificare il numero di esperimenti effettuati.

La misura dell'esattezza richiesta è data dalla differenza tra il valore medio misurato per la sostanza di riferimento ed il valore vero, espressa in percentuale del valore vero.

iii) *Precisione :* la variabilità della ripetibilità intralaboratorio (nello stesso laboratorio) e della riproducibilità interlaboratorio (in differenti laboratori).

Con il generico termine statistico « precisione » si intende la definizione data al punto 2.84 dalla norma ISO 3534-1977 (precisione : la concordanza tra i risultati di prove ottenuti applicando varie volte il procedimento sperimentale nelle condizioni fissate).

Ai sensi dell'allegato della direttiva 85/591/CEE, i valori di precisione dei metodi di analisi da adottare in conformità alle disposizioni di detta direttiva verranno determinati con una prova interlaboratorio effettuata di preferenza secondo la norma ISO 5725-1986 che definisce i termini ripetitibilità e riproducibilità.

Per effettuare una prima selezione dei metodi presentati sulla base della documentazione disponibile, è sufficiente che vengano prodotti i dati sulla ripetibilità. A tale scopo, il termine ripetibilità è da intendere nel significato definito al punto 2.85 a) della norma ISO 3534/1977 [ripetibilità : concordanza tra i risultati di prove mutualmente indipendenti ottenuti con lo stesso metodo su un identico materiale, nelle medesime condizioni (stesso operatore, stessa apparecchiatura, stesso laboratorio e in brevi intervalli di tempo].

Per misurare la ripetibilità si usa il coefficiente di varianza quale definitivo al punto 2.35 dalla norma ISO 3534-1977 (coefficiente di varianza : il rapporto tra la deviazione standard ed il valore assoluto della media aritmetica).

iv) *Limite di rivelazione*

Il limite di rivelazione è la minima concentrazione misurata da cui si possa dedurre con ragionevole certezza statistica la presenza dell'analita. Esso è uguale alla media dei tenori misurati nei bianchi ($n \geqslant 20$) più tre volte la deviazione standard del valore medio.

Nota : caso si preveda che fattori quali le specie, il sesso, l'età, ecc. possono influenzare le caratteristiche del metodo, occorre disporre di una serie di bianchi per ogni singola popolazione omogenea cui il metodo viene applicato.

v) *Sensibilità*

La sensibilità misura il grado in cui un metodo rivela piccole differenze nel tenore di un analita. Nel presente documento, la sensibilità è definita come la pendenza della curva di taratura in corrispondenza della concentrazione data.

vi) *Praticabilità ed applicabilità*

La praticabilità è una caratteristica non standardizzata di un procedimento analitico. Essa dipende dal campo di applicazione del metodo e dipende da parametri quali la quantità di campione necessaria ed i costi. L'applicabilità è un elenco dei prodotti cui il metodo può essere applicato sia direttamente che con lievi modifiche.

vii) *Altri criteri eventualmente adottabili*

Limite di decisione

Il limite di decisione è il più basso tenore dell'analita che, se realmente presente, può essere rivelato con un grado di probabilità statistica accettabile e può essere identificato con i criteri di identificazione del metodo. Se in un intorno del limite di rivelabilità l'esattezza e la precisione si mantengono costanti, allora il limite di decisione è uguale alla media del tenore misurato dei bianchi di riferimento più sei volte la deviazione standard del valore medio.

Limite di quantificazione

Il limite di quantificazione è il più piccolo tenore misurato al di sopra del quale è possibile determinare l'analita con un determinato grado di esattezza e ripetibilità (in uno stesso laboratorio).

Requisiti per l'esattezza e la ripetibilità

Esattezza :

Nel caso di più analisi sullo stesso campione di riferimento, la differenza tra il valore medio delle misure e il valore vero, espressa come percentuale del valore vero, non deve superare i seguenti limiti :

	limiti
— valore vero sino a 1 µg/kg :	da − 50 % a +20 %
— valore vero maggiore da 1 µg/kg sino a 10 µg/kg :	da − 30 % a +10 %
— valore vero maggiore di 10 µg/kg :	da − 20 % a +10 %

Ripetibilità :

Nel caso di più analisi effettuate sullo stesso campione di riferimento, il coefficiente di variazione (C.V.) della media non deve superare i seguenti valori :

	C.V.
— valore medio sino a 1 µg/kg :	0,30
— valore medio maggiore da 1 µg/kg sino a 10 µg/kg :	0,20
— valore medio maggiore di 10 µg/kg :	0,15

Curve di taratura

Se il metodo prevede l'uso di curve di taratura, occorre conoscere :

— la formula matematica che descrive la curva di taratura,

— i valori numerici dei parametri delle curve di taratura con intervalli di confidenza del 95 % (in condizioni ottimali),

— gli intervalli accettabili entro cui possono variare da un giorno all'altro i parametri della curva di taratura,

— l'intervallo di lavoro della curva di taratura,

— particolari sulla varianza delle variabili valida almeno nell'intervallo di lavoro della curva di taratura.

Sensibilità all'interferenza

Per quelle condizioni sperimentali che nella pratica potrebbero essere soggette a fluttuazione (ad esempio stabilità dei reagenti, composizione del campione, pH, temperatura) occorre indicare quali sono le variazioni che potrebbero condizionare i risultati analitici.

Occorre anche segnalare se si conoscono sostanze che possono interferire con la determinazione dell'analita indicando eventualmente anche come ovviare al problema. È di fondamentale importanza esaminare tutte le possibili interferenze dei componenti della matrice. Va quindi indicato almeno il massimo equivalente di campione che non ha effetti di interferenza sulla determinazione dell'analita (dopo una qualsiasi purificazione del campione specificata).

Relazione tra i valori di tolleranza e i limiti analitici

Per la sostanze con tolleranza zero, il limite di decisione del metodo analitico deve essere sufficientemente basso in modo che il tenore residuo che si pensa di trovare a causa di un uso illecito possa essere rivelato con una probabilità di almeno il 95 %.

Per le sostanze con un livello di tolleranza, fissato al massimo livello fisiologico naturale, il limite di quantificazione non deve superare la tolleranza di cui sopra meno tre volte la deviazione standard prodotta dal metodo per un campione a livello di tolleranza.

Materiale di riferimento

Si intende per materiale di riferimento un campione della sostanza o un singolo manufatto per il quale una o più proprietà sono determinate con sufficiente esattezza in modo da poterlo usare per calibrare una apparecchiatura o per verificare un metodo di misura. L'attestazione deve essere basata su un processo tecnicamente valido.

Nel caso in cui non sia disponibile un materiale di riferimento, i parametri da misurare possono essere valutati analizzando un campione di materiale cui sia stata addizionata la sostanza di riferimento.

CAPITOLO II: CRITERI DI QUALITÀ PER L'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1. Abbreviazioni e simboli

Metodi analitici

GC	= gascromatografia
HPLC	= cromatografia liquida ad alta pressione
HPTLC	= cromatografia su strato sottile ad alta efficienza
HRMS	= spettrometria di massa ad alta risoluzione
IA	= prova immunologica
IR	= infrarosso
UV	= ultravioletto
LRMS	= spettrometria di massa a bassa risoluzione
MS	= spettrometria di massa
RIA	= dosaggio radioimmunologico
SP	= spettrometria (ad esempio sistema a serie di diodi)
TLC	= cromatografia su strato sottile
/	= tecniche combinate off-line
—	= tecniche combinate on-line

Per esempio: HPLC/CG-MS = HPLC fuori linea seguito da GC con MS in linea.

Per RIA:

cpm	= impulsi al minuto
dpm	= disintegrazioni al minuto
T	= radioattività totale (cpm o dpm) indotta nel campione
B	= radioattività della frazione legata di un campione
Bo	= radioattività della frazione legata di un bianco campione
B/Bo	= frazione della radioattività della frazione legata di un campione rispetto a quella relativa ad un bianco campione (frazione di legame rispetto a legame zero)
%B/Bo	= radioattività della frazione legata di un campione espressa in percentuale di bianco
Bo/T	= frazione della radioattività della frazione legata di un bianco rispetto all'attività indotta (frazione a legame zero rispetto al totale)
NSB	= legame non specifico = legame aspecifico (ASB)

Per MS:

amu	= unità di massa atomica
CI	= ionizzazione chimica
EI	= ionizzazione a impatto elettronico
MID	= rivelazione multipla di ioni
M	= massa
Z	= carica
HFB	= acido eptafluorobutirrico o eptafluorobutirril derivato
MOX	= metossima derivato
TMS	= trimetilsilil derivato
MOX-TMS	= metossima e trimetilsilil derivato
F^+	= frammento ionico
$(F+1)^+$	= satellite dell'isotopo naturale, M/Z volte più grande del frammento ionico dell'isotopo principale corrispondente
M^+	= ione molecolare
$(M+1)^+$	= satellite dell'isotopo naturale, M/Z volte più grande dello ione molecolare dell'isotopo principale corrispondente.

2. Introduzione

I laboratori che eseguono le prove per la ricerca dei residui di sostanze ad azione ormonica e di sostanze ad azione tireostatica devono applicare i criteri di qualità per l'interpretazione di risultati ottenuti con metodi analitici conformemente alle prescrizioni del presente capitolo. I criteri di qualità sono previsti per l'analisi qualitativa allo scopo di impedire erronei risultati positivi. Perché una conclusione sia positiva i risultati analitici devono soddisfare i criteri di qualità fissati per il metodo di rivelazione applicato.

3. **Definizioni sulla presenza di un analita**

3.1. *Analita :* un componente del campione di cui occorre dimostrare la presenza. Il termine « analita » comprende i derivati che si formano dall'analita durante l'analisi qualora ciò si verifichi.

3.2. *Materiale standard :* una sostanza ben definita con il massimo grado di purezza ottenibile che viene usata nell'analisi come riferimento.

3.3. *Positivo :* la presenza dell'analita nel campione è provata, secondo il metodo, quando vengono soddisfatti i criteri generali ed i criteri fissati per il metodo di rivelazione adottato. Il risultato dell'analisi è « positivo ».

3.4. *Negativo :* il risultato dell'analisi è considerato « negativo » se i criteri fissati per il metodo in questione non sono soddisfatti o se l'analisi non indica una presenza dell'analita nel campione superiore al limite di decisione.

3.5. *Co-cromatografia :* si applica il seguente procedimento. Prima della cromatografia la soluzione purificata da esaminare viene suddivisa in due parti.

a) su una parte viene direttamente effettuata la cromatografia,

b) all'altra parte si addiziona il materiale standard da identificare e si effettua la cromatografia della soluzione ottenuta.

La quantità del materiale standard addizionato deve essere circa uguale alla quantità dell'analita che si ritiene presente.

4. **Considerazioni generali per l'intero procedimento analtico**

4.1. *Criteri generali per l'intero procedimento*

Occorre provare che il metodo è in grado di distinguere l'analita da tutti i materiali di una adeguata matrice che possono interferire.

Il comportamento fisico e chimico dell'analita durante l'analisi non deve discostarsi da quello del corrispondente materiale standard nella matrice adeguata.

4.2. *Criteri generali per le tecniche di separazione*

L'intero procedimento va effettuato simultaneamente su ciascuna porzione di campione da anlizzare e su campioni di riferimento che contengono quantità note dell'analita. In alternativa si può aggiungere uno standard interno ai campioni.

4.3. *Criteri per l'eventuale preconcentrazione, purificazione e separazione fisica e/o chimica off-line*

L'analita deve trovarsi nella frazione che è caratteristica del corrispondente materiale standard nel materiale di una matrice adeguata.

4.4. *Criteri per l'eventuale separazione on-line* (ad esempio GC)

L'analita deve essere eluito nel tempo di ritenzione che è caratteristico del corrispondente materiale standard nel materiale di una matrice adeguata.

4.5. *Preparazione del campione per l'analisi*

Il campione per l'analisi deve essere ricavato dal campione di laboratorio in modo che si abbiano le massime probabilità di rivelare l'analita se è presente.

4.6. *Preparazione della porzione per l'analisi*

La porzione per l'analisi deve essere preparata a partire da un campione di analisi in modo che si abbiano le massime probabilità di rivelare l'analita se è presente.

5. **Requisiti di almeno sei la determinazione di un analita mediante RIA**

Per effettuare uno screening :

5.1. Occorre specificare l'intervallo di lavoro della curva di taratura che deve coprire un intervallo di concentrazione di almeno 10 unità.

5.2. Ogni prova comprende i controlli. Valori della concentrazione : zero e un valore preso nella prima metà dell'intervallo di lavoro, un valore centrale ed un valore preso nella seconda metà dell'intervallo di lavoro. I risultati ottenuti devono essere coerenti con quelli delle prove precedenti.

5.3. Al limite di decisione, il coefficiente di variazione per i controlli deve essere inferiore a 0,15.

5.4. Si richiedono almeno sei punti di taratura adeguatamente distribuiti lungo la curva di taratura.

5.5. Controllare e specificare il recupero.

5.6. Nell'intorno del limite di decisione la curva di taratura deve essere tracciata con la massima precisione.

5.7. Determinati parametri del controllo di qualità devono essere conformi a quelli delle prove precedenti, ad esempio Bo/T, NSB, pendenza e intercetta della curva di taratura.

Nota : La conformità con questi requisiti di qualità non esclude la possibilità di risultati positivi errati che traggono origine da errori sistematici quali reattività incrociate di anticorpi e dall'interferenza di materiale campionato non rappresentativo.

6. **Criteri di identificazione di un analita mediante GC**

6.1. L'analita deve eluire nel tempo di ritenzione che è caratteristico del materiale standard corrispondente.

6.2. Nel cromatogramma il massimo del picco più vicino al picco relativo all'analita rivelato deve distare da quest'ultimo almeno una larghezza misurata a metà altezza massima.

6.3. Per l'identificazione, alla GC deve essere abbinata anche una co-cromatografia. In quest'ultima, dovrebbe risultare ingrandito soltanto il picco che si ritiene dovuto all'analita e la larghezza misurata a metà altezza massima non dovrebbe discostarsi di ± il 10 % dalla larghezza misurata a metà altezza massima.

7. **Criteri di identificazione di un analita mediante TLC o HPTLC**

7.1. I valori R_f dell'analita devono corrispondere a quelli caratteristici del materiale standard. Questa condizione è soddisfatta quano i valori R_f dell'analita non si discostano di oltre il ±3 % dei valori R_f del materiale standard nelle stesse condizioni.

7.2. Alla vista, l'analita non deve risultare diverso del materiale standard.

7.3. Il centro della macchia più vicina a quella dell'analita deve distare da quest'ultima di una distanza pari almeno alla metà della somma dei diametri delle macchie.

7.4. Per l'identificazione, alla TLC si deve abbinare una co-cromatografia. In questa dovrebbe risultare ingrandita soltanto la macchia che si presume dovuta all'analita : non dovrebbe formarsi nessuna nuova macchia e l'aspetto della macchia non dovrebbe cambiare.

7.5. Come prova di conferma occorre effettuare una TLC bidimensionale.

8. **Criteri per l'identificazione di un analita mediante HPLC-SP**

8.1. La massima lunghezza d'onda di assorbimento dell'analita nello spettro UV deve risultare la stessa del materiale standard con un margine che dipende dalla risoluzione del sistema detettore. Per la rivelazione a serie di diodi tale margine è di solito ±2 mm.

8.2. Per le parti dei due spettri con un assorbanza relativa > 10 %, lo spettro dell'analita non deve apparire diverso dallo spettro del materiale standard. Questo criterio è soddisfatto quando si hanno gli stessi massimi e in nessuno dei punti osservati la differenza tra i due spettri risulta superiore al 10 % dell'assorbanza del materiale standard.

8.3. Per l'identificazione, all'HPLC deve essere abbinata anche una co-cromatografia. In questa, dovrebbe risultare ingrandito soltanto il picco che si ritiene dovuto all'analita.

9. **Criteri di identificazione di un analita medianta TLC-SP o HPTLC-SP**

9.1. I valori R_f dell'analita devono corrispondere a quelli caratteristici del materiale standard. Questa condizione è soddisfatta quando i valori R_f dell'analita non si discostano di oltre il 3 % dai valori R_f del materiale standard nelle stesse condizioni.

9.2. L'analita non deve apparire diverso dal materiale standard.

9.3. Il centro della macchia più vicina a quella dell'analita deve distare da quest'ultima di un segmento pari almeno alla metà della somma dei diametri delle macchie.

9.4. Per l'identificazione, alla TLC deve essere abbinata anche una co-cromatografia. In questa, dovrebbe risultare ingrandita soltanto la macchia che si ritiene sia dovuta all'analita ; non si dovrebbe avere alcuna nuova macchia.

9.5. La massima lunghezza d'onda di assorbimento dell'analita nello spettro deve risultare la stessa del materiale standard con un margine che dipende dalla risoluzione del sistema detettore.

9.6. Lo spettro dell'analita non deve apparire diverso dallo spettro del materiale standard.

10. **Criteri di identificazione di un analita mediante GC-HRMS**

10.1. Per essere classificate come misure ad alta risoluzione occorre ottenere risultati con una risoluzione superiore a 9 500 con una valle tra picchi adiacenti non superiore al 10 % delle altezze dei picchi.

10.2. Il rapporto di intensità della risposta ioni F^+ e $(F+1)^+$ o M^+ e $(M+1)^+$ del derivato del materiale standard dev'essere uguale al valore teorico con uno scostameno dell'A %.

10.3. La massa del frammento del derivato dell'analita (determinato in corrispondenza del picco) dev'essere uguale al valore teorico del derivato corrispondente del materiale di riferimento con uno scostamento massimo di B amu.

Nota: Per alcuni anabolizzanti i valori di A e B sono riportati a titolo esemplificativo nella tabella 1 dell'appendice. Il metodo ha però applicazione generale e non è limitato ai soli agenti anabolici.

11. **Criteri di identificazione di un analita per GC-LRMS**

11.1. *Criteri per la gascromatografia*

11.1.1. Il tempo di ritenzione di un'analita nella GC dev'essere uguale a quello degli standard di riferimento con uno scostamento massimo di ± 5 sec.

11.1.2. Se si usa uno standard interno, il tempo di ritenzione relativo (B/A) dell'analita dev'essere uguale, con uno scostamento massimo di ± 5/A, a quello del materiale standard nella matrice appropriata, essendo:

A = tempo di ritenzione assoluto di un interno standard espresso in secondi,

B = tempo di ritenzione assoluto, espresso in secondi.

11.2. *Criteri per la spettrometria di massa*

11.2.1. Tutti gli ioni determinati devono essere derivati dall'analita eluito in un solo tempo di ritenzione.

11.2.2. Determinare le intensità di almeno due ioni o, meglio, più di due.

Nota: Per identificare con certezza un analita occorre scegliere un numero adeguato di ioni che dipenderà dal particolare composto e dalla specificità degli ioni scelti. Per la maggior parte dei derivati degli anabolizzanti riportati nelle tabelle da 2 a 6 dell'appendice si raccomanda di prendere in considerazione almeno quattro ioni.

11.2.3. Intensità relativa degli ioni rivelati, espressa in percentuale dell'intensità dello ione che presenta l'intensità più elevata (picco base) deve essere uguale a quella dello standard di riferimento adeguato con uno scostamento massimo di ± 20 % (metodo CI) o ± 10 % (metodo EI).

11.2.4. Se possibile, lo ione molecolare, del materiale standard dev'essere presente nello spettro MID dell'analita.

Nota: Le tabelle da 2 a 6 dell'appendice riportano a titolo esemplificativo alcuni dati sugli ioni molecolari e sui frammenti ionici dei derivati di alcuni agenti anabolici e relativi composti ottenuti per TMS, MOX-TMS, MOX e HFB. I criteri hanno però applicazione generale e non sono limitati soltanto a questi derivati.

12. **Criteri di identificazione di un analita mediante spettrometria IR**

12.1. *Definizione di picchi idonei*

Si definiscono picchi idonei i massimi di assorbimento dello spettro IR di un materiale standard, che soddisfino alle seguenti condizioni:

12.1.1. Assorbimento massimo nella zona compresa tra 1 800 e 500 cm^{-1}.

12.1.2. L'intensità dell'assorbimento non inferiore a:

12.1.2.1. un coefficiente di assorbanza molare specifico uguale a:

— 40 rispetto ad assorbanza zero, e

— 20 rispetto alla linea di base del picco

oppure a

12.1.2.2. una assorbanza relativa di:

— 12,5 % dell'assorbanza del picco più alto della zona 1 800-500 cm^{-1} se sono entrambi misurati rispetto ad assorbanza zero, e

— 5 % dell'assorbanza del picco intenso della zona 1 800-500 cm^{-1} se sono entrambi misurati rispetto alla loro linea di base del picco.

Nota: Anche se i picchi idonei di cui al punto 12.1.2.1 possono essere preferibili da un punto di vista teorico, quelli di cui al punto 12.1.2.2 sono in pratica di più facile determinazione.

12.2. *Numero di picchi idonei*

Si richiede un minimo di sei picchi idonei.

12.3. *Individuazione dei picchi idonei*

Le esatte posizioni dei picchi idonei, espresse in numeri d'onda interi fungono da parametri oggettivi e digitalizzati per valutare gli spettri dei campioni.

Nota: La tabella 7 dell'appendice riporta i picchi idonei degli spettri IR di 49 agenti anabolici e relativi composti. Il metodo ha però applicazione generale e non è limitato ai soli anabolizzanti.

12.4. *Uso delle tabelle dei picchi idonei*

12.4.1. Si confrontano le posizioni dei picchi dello spettro IR dell'analita con le posizioni dei picchi adeguati dello spettro IR del materiale standard.

12.4.2. Si determina il numero di picchi dello spettro IR dell'analita le cui frequenze corrispondono a un picco adeguato dello spettro IR del materiale standard con uno scostamento massimo di ± 1 cm^{-1};

12.4.3. Si calcola quindi l'indice del materiale standard nello spettro dell'analita.

12.4.4. Definizione di « indice »:

l'« indice » è la percentuale dei picchi idonei trovata nello spettro IR dell'analita.

12.5. *Criteri*

12.5.1. L'indice deve risultare almeno al 50 %.

12.5.2. Il procedimento è applicabile soltanto ai picchi di assorbimento dello spettro del campione aventi un'altezza almeno tre volte maggiore alla distanza tra picco e picco del rumore.

APPENDICE

TABELLA 1

Dati per la conferma di anabolizzanti mediante HRMS

Derivati (1)	Massa dello ione		Rapporto di intensità		Massa dello ione	
	ione F^+ o ione M^+ valore nominale M/Z (amu)	ione $(F+1)^+$ o ione $(M+1)^+$ valore nominale M/Z (amu)	valore teorico	scostamento A (%)	valore teorico M/Z (2) (amu)	scostamento B M/Z (amu)
DES-TMS	M^+ 412	413	0,3777	8	412,2254	0,0012
DE-TMS	M^+ 410	411	0,3772	8,5	410,2097	0,0012
HEX-TMS	F^+ 207	208	0,1889	17	207,1205	0,0007
NT-TMS	M^+ 346	347	non applic.		346,2328	0,0015
NT-TMS	F^+ 256	257	non applic.		256,1827	0,0015
NT-MOX-TMS	M^+ 375	376	non applic.		375,2593	0,0015
epi NT-MOX-TMS	M^+ 375	376	non applic.		375,2593	0,0015
E2-di-TMS	M^+ 416	417	non applic.		416,2567	0,0015

(1) DES = Dietilstilbestrolo,
DE = Dienoestrolo,
HEX = Esoestrolo,
NT = 19-nortestosterone-17β (nandrolone),
epi NT = 19-nortestosterone-17α,
E2 = oestradiolo-17β.

(2) Calcolati prendendo come base l'isotopo ^{12}C = 12,0000.

TABELLA 2

TMS derivati di alcuni anabolizzanti e composti correlati. Ioni da usare per la conferma mediante LRMS (metodo EI)

	PM	M/Z (1)			
Dienoestrolo	410	410	395	381	
Dietilstilboestrolo	412	412	397	383	
5α-Estrano-(3β,17α)-diolo	422	407	332	242	201
17α-Estradiolo	416	416	401	326	285
17β-Estradiolo	416	416	401	326	285
17β-Estradiolo-16,16,17(d3) (2)	419	419	404	329	285
Etinilestradiolo	440	440	425	300	285
Esoestrolo	414	207	191	179	
Metandrostenolone	372	372	357	302	282
Metiltestosterone	374	359	317	304	284
α-Nortestosterone	346	346	331	256	215
β-Nortestosterone	346	346	331	256	215
Testosterone	360	360	345	270	226
17-α-Trenbolone	342	342	252	237	211
17-β-Trenbolone	342	342	252	237	211
α-Zearalanolo	538	538	523	433	307
β-Zearalanolo	538	538	523	433	307
Zearalanolone	464	464	449	335	307
Zearalenone	462	462	429	333	305

(1) Ione sottolineato: picco base.
(2) Standard interno.

TABELLA 3

MOX-TMS derivati di alcuni composti anabolici e relativi omotopi. Ioni da usare per la conferma mediante MRLS (metodo EI)

	PM	M/Z (1)			
Medrossiprogesterone	474	474	459	443	353
Metandrostenolone	401	401	386	370	280
Metiltestosterone	403	403	313	298	282
α-Nortestosterone	375	375	360	344	285
β-Nortestosterone	375	375	360	344	285
Testosterone	389	389	374	358	268
α-Trenbolone	371	371	281	266	253
β-Trenbolone	371	371	281	266	253
Zearalanolone	493	493	478	462	406
Zearalenone	491	491	460	444	333

(1) Ione sottolineato: picco base.

TABELLA 4

MOX derivati di alcuni anabolizzanti e composti correlati. Ioni da usare per la conferma mediante LRMS (metodo EI)

	PM	M/Z (1)			
Acetato di medrossiprogesterone	415	415	330	312	287
Acetato di megestrolo	413	413	353	338	310
Acetato di melengestrolo	425	425	365	350	322
Acetato di trenbolone	341	341	298	281	266

(1) Ione sottolineato: picco base.

TABELLA 5

HFB derivati di alcuni anabolizzanti e composti correlati. Ioni da usare per la conferma mediante LRMS (metodo EI)

	PM	M/Z (1)			
Dietilstilboestrolo	660	660	631	447	341
Dienoestrolo	658	658	629	445	341
Esoestrolo	662	332	331	304	303
17-β-Estradiolo,16,16,17(d3) (2)	667	667	454	412	359

(1) Ione sottolineato: picco base.
(2) Standard interno.

TABELLA 6

HFB derivati di stilbeni. Ioni da usare per la conferma mediante LRMS (metodo CI)

a) *CI dell'ammoniaca*

	MP	M/Z (1)			
Esoestrolo	662	681	680	484	466
Dietilstilboestrolo	660	678	482	464	

(1) Ione sottolineato : picco base.

b) *CI del metano*

	MP	M/Z (1)			
Dietilstilboestrolo	660	661	465	464	
Dienoestrolo	658	659	463	462	369

(1) Ione sottolineato : picco base.

Note

1. L'intensità relativa di alcuni degli ioni sopra riportati è troppo bassa (circa 10 %) per essere usata con una sufficiente affidabilità nella conferma.
2. L'intensità relativa degli ioni può variare con la quantità di analita iniettato nella colonna. Nel caso del dietistilboestrolo a basse concentrazioni nella CI del metano, lo ione 661 diventa il picco base (cioè si ha meno frammentazione nella forma mono-HFB). È pertanto importante che il confronto fra l'intensità degli ioni relativi dell'analita e quella dello standard di riferimento venga effettuata all'incirca alla stessa concentrazione.
3. La ionizzazione con il metano produce la scissione della molecola di estrolo. I frammenti ionici di piccola massa non si separano completamente dagli altri estratti.

TABELLA 7

Picchi idonei degli spettri IR di 49 composti anabolizzanti e composti correlati

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
βE2	αE2	E2Ac	E2diAc	E2P	E2diP	E2S	E2Bz	E2ME	EE
		1 701	1 766 1 734	1 712	1 763 1 757 1 733		1 729		
1 610	1 610	1 620		1 696 1 619			1 600	1 610	1 615
1 586	1 586 1 500	1 584		1 583				1 577 1 502	1 584 1 501
1 498 1 449 1 416	1 443	1 498 1 460	1 494	1 499 1 460 1 444	1 492 1 460 1 419	1 494 1 420	1 498 1 451	1 469 1 444	1 473 1 449 1 433
1 382 1 357 1 320 1 302	1 379 1 352	1 373 1 351	1 375	1 350	1 381 1 351	1 392 1 307	1 380 1 315	1 374 1 334 1 313	1 384 1 358
1 283 1 250 1 231	1 284 1 253 1 234	1 292 1 276 1 248 1 235	1 262 1 248	1 288 1 249 1 225 1 212	1 273 1 247 1 224	1 241	1 266 1 223 1 216	1 291 1 278 1 252 1 236	1 299 1 257 1 203
1 156 1 130 1 118 1 102	1 154 1 119 1 101	1 152	1 198 1 177 1 149	1 151	1 197 1 154 1 139	1 176	1 176 1 152 1 128	1 183 1 153 1 130 1 120	1 184 1 160 1 147 1 135 1 122 1 111
1 056 1 021 1 012	1 074 1 054 1 036 1 013	1 017	1 040 1 015	1 086 1 072 1 012	1 078 1 055 1 033 1 014	1 097 1 075 1 049 1 018	1 067 1 025 1 012	1 055 1 042 1 025	1 069 1 055 1 043 1 022 1 006
962 930 917 905	994 970 945 919		946	962	917	932 908			971 930 914
874 820	866 821	873	885	878 871 816	897 807	887 866 847 822 808	889	898 870 818	880 857 823
786 733	787					770	705	785	789
		624				650	688		646 622
	573					579 519			568

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
M	E1	E3	Eq	Eqln	βT	αT	TAc	TP	TiC
	1 719		1 719	1 717			1 741	1 729	1 733
1 612	1 621	1 610	1 623	1 622	1 666 1 658 1 612	1 654 1 610	1 672 1 618	1 669 1 611	1 667 1 617
1 580 1 506	1 584	1 501	1 588 1 509 1 500	1 599					
1 467 1 449	1 499	1 452	1 470 1 407	1 480 1 460 1 423	1 470 1 432	1 432	1 449 1 433	1 450	1 470 1 450
1 377 1 352 1 325	1 396 1 361	1 384 1 353 1 322	1 354	1 389	1 378 1 360	1 380	1 377 1 362 1 333	1 331	1 378 1 331
1 291 1 255 1 242	1 287 1 250	1 285 1 254 1 238 1 201	1 278 1 246	1 225 1 208	1 277 1 233	1 276 1 231	1 274 1 232	1 270 1 240	1 294 1 272 1 230
1 183 1 165 1 146 1 133 1 121 1 109		1 174 1 149 1 118 1 103	1 158 1 148	1 169	1 199 1 131 1 114	1 189		1 185	1 182 1 125 1 103
1 062 1 036 1 019	1 055	1 068 1 062 1 034	1 056	1 066	1 067 1 056 1 017		1 041 1 022	1 080 1 043 1 020	1 043 1 009
967 905	920	964 943 928 917			957 943		945		941
862 844 833 823	877 819	886 871 851 818	875 810	849 817	870		863	863	864
789 702	788	787							
658 620	673	662							
		582							

21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
TD	TUn	TPP	TBz	MT	MT-D9 (11)	βNT	αNT	NTP	NTD
1 734	1 738	1 734	1 709					1 741	1 734
1 670 1 618	1 674 1 610	1 672 1 615	1 673 1 617	1 664 1 611	1 651 1 607	1 666 1 619	1 663 1 643 1 615	1 650 1 620	1 676 1 619
1 471 1 415	1 473	1 455 1 424	1 452 1 435	1 450		1 412		1 448 1 422	1 465 1 453
1 379 1 352 1 327	1 379 1 335 1 315	1 381	1 316	1 374	1 370 1 348 1 332	1 335		1 346	1 381 1 332
1 291 1 256 1 216	1 276 1 249 1 208	1 298 1 270 1 229	1 275 1 229	1 297 1 278 1 234	1 274 1 232	1 259 1 228 1 206	1 258 1 211	1 265 1 202	1 258 1 212
1 180	1 172	1 171	1 178 1 110	1 190 1 156	1 188 1 173 1 153 1 128 1 104	1 133	1 135		1 177
		1 068 1 009	1 070 1 023	1 091		1 075 1 052 1 023	1 051	1 085 1 052 1 025	
		944	998 941	950	956 937	967	968	968	
867	887	862	866	873	882	885	880	884	
		748 709	719						
		699	688		692				

31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
NTL	NTPP	Eti	βTB	αTB	TBA	P	MP	MPA	MGA
1 735	1 730				1 737			1 732 1 717	1 731 1 710
1 676 1 619	1 675 1 618	1 659 1 612	1 639	1 643	1 660	1 699 1 663 1 616	1 696 1 664 1 603	1 673 1 608	1 664 1 629
	1 501		1 569	1 578	1 573				1 584
1 473 1 418	1 447	1 430 1 418	1 438	1 450 1 435	1 439	1 439	1 448		1 460 1 447
1 381 1 335	1 330	1 383 1 331	1 379 1 353 1 346 1 322	1 391 1 369 1 346 1 321 1 310	1 375	1 386 1 358 1 328	1 349	1 365	1 390 1 366
1 299 1 269 1 240 1 205	1 297 1 259 1 205	1 288 1 232	1 288 1 267 1 226	1 279 1 240 1 229	1 245	1 279 1 237 1 228 1 204	1 271 1 233	1 261 1 253	1 269 1 260 1 247 1 224
1 175	1 177	1 191 1 125	1 199 1 101	1 198 1 150 1 126		1 162	1 186 1 123	1 187	1 167 1 143 1 127 1 109
1 053	1 080 1 049	1 068 1 060	1 075 1 054 1 017	1 088 1 028 1 011	1 096 1 053 1 023		1 093	1 080 1 056	1 083 1 059 1 014
	965			937	987	948		965	963
	879	869		852		871	871		878
	752 704	724		795 762					
		697							
							597		

41	42	43	44	45	46	47	48	49
MLGA	DE	DES	HEX	DEdiAc	DESdiP	Z	Cort	HCort
1 738 1 716				1 757	1 763 1 754			1 714
1 666 1 625	1 619 1 608	1 609	1 613			1 644 1 615	1 694 1 648 1 618	1 644 1 610
1 579	1 591 1 513	1 590 1 514	1 598 1 516	1 503	1 504	1 587		
1 444 1 416	1 426	1 462 1 427	1 458 1 440		1 459	1 464	1 447 1 413	1 432
1 389 1 372 1 318	1 333	1 337		1 368	1 363	1 381 1 353 1 311	1 391	
1 260 1 245 1 231 1 205	1 247 1 205	1 282 1 247 1 204	1 218	1 218	1 210	1 259 1 200	1 269	1 271 1 237
1 123	1 171 1 102	1 173 1 114	1 174 1 107	1 196 1 164	1 157	1 167	1 186 1 159	1 133 1 115
1 037		1 012		1 019	1 076 1 019	1 096 1 075	1 075 1 064 1 037	1 047 1 006
972 953 930				910		989		942 900
881	853 834 826	851 831 805	847 830 804	865	895	840	875	865
	775	721	716					
627 612	649 620	646	646	679				
551	520	586	573 510					

Elenco delle abreviazioni

1	βE2	Estradiolo-17β
2	αE2	Estradiolo-17α
3	E2Ac	Estradiolo-17-acetato
4	E2diAc	Estradiolo diacetato
5	E2P	Estradiolo-17-propionato
6	E2diP	Estradiolo dipropionato
7	E2S	Estradiolo-3-solfato
8	E2Bz	Estradiolo-3-benzoato
9	E2ME	Estradiolo-3-metiletere
10	EE	Etinilestradiolo
11	M	Mestranolo
12	E1	Estrone
13	E3	Estriolo
14	Eq	Equilino
15	Eqln	Equilenino
16	βT	Testosterone-17β
17	αT	Testosterone-17α
18	TAc	Acetato di testosterone
19	TP	Propionato di testosterone
20	TiC	Isocaproato di testosterone
21	TD	Decanoato di testosterone
22	TUn	Undecanoato di testosterone
23	TPP	Fenilpropionato di testosterone
24	TBz	Benzoato di testosterone
25	MT	Metiltestosterone-17α
26	MT-D9(11)	Metiltestosterone-D9(11)
27	βNT	Nortestosterone-17β
28	αNT	Nortestosterone-17α
29	NTP	Nortestosterone propionato
30	NTD	Nortestosterone decanoato
21	NTL	Nortestosterone laurato
32	NTPP	Nortestosterone fenilproprionato
33	Eti	Etilsterone
34	βTB	Trenbolone-17β
35	αTB	Trenbolone-17α
36	TBA	Acetato di trenbolone
37	P	Progesterone
38	MP	Medrossiprogesterone
39	MPA	Acetato di medrossiprogesterone
40	MGA	Acetato di megestrolo
41	MLGA	Acetato di melengestrol
42	DE	Dienoestrolo
43	DES	Dietilstilboestrolo
44	HEX	Esoestrolo
45	DEdiAc	Dienoestrolo diacetato
46	DESdiP	Dietilstilboestrolo dipropionato
47	Z	Zeranolo
48	Cort	Corticosterone
49	HCort	Idrocortisone