II

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

COMMISSIONE

UNDICESIMA DIRETTIVA 93/70/CEE DELLA COMMISSIONE del 28 luglio 1993 che fissa i metodi d'analisi comunitari per il controllo degli alimenti per animali

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il Trattato che istituisce la Comunità economica 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 dal regolamento (CEE) n. 3768/85 [2], in particolare l'articolo 2,

considerando che la direttiva 70/373/CEE prevede che i controlli ufficiali degli alimenti per animali intesi a verificare l'osservanza delle condizioni prescritte in forza delle disposizioni legislative, regolamentari o amministrative, concernenti le qualità e la composizione degli alimenti per animali, siano effettuati secondo i modi di prelievo di campioni ed i metodi di analisi comunitari;

considerando che, per controllare il rispetto delle condizioni di impiego dell'alofuginone nell'alimentazione animale, è opportuno stabilire un metodo di analisi comunitario per tale additivo;

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

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Gli Stati membri prescrivono che le analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per animali, per quanto riguarda il loro contenuto in alofuginone, siano effettuate secondo il metodo descritto nell'allegato della presente direttiva.

Articolo 2

Gli Stati membri mettono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alle disposizioni della presente direttiva entro il 30 giugno 1994. Essi ne informano immediatamente la Commissione.

Quando gli Stati membri adottano tali disposizioni, queste contengono un riferimento alla presente direttiva o sono corredate da siffatto riferimento all'atto della pubblicazione ufficiale. Le modalità del riferimento sono decise dagli Stati membri.

Articolo 3

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 28 luglio 1993.

Per la Commissione
René STEICHEN
Membro della Commissione

---

[1] GU n. L 170 del 3. 8. 1970, pag. 2.
[2] GU n. L 362 del 31. 12. 1985, pag. 8.

ALLEGATO

DETERMINAZIONE DELL'ALOFUGINONE

DL-trans-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-idrossi-2-piperidil) acetonil]-chinazolin-4-(3H)-one bromidrato

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

Il metodo serve a determinare l'alofuginone nei mangimi. Il limite minimo di determinazione è di 1 mg/kg.

2. **Principio**

Dopo essere stato trattato con acqua calda, l'alofuginone viene estratto come base libera in acetato di etile e successivamente ripartito come cloridrato in soluzione acquosa acida. L'estratto viene purificato mediante cromatografia a scambio ionico. Il tenore di alofuginone viene determinato mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) su base inversa, usando un rivelatore UV.

3. **Reattivi**

3.1. Acetonitrile per 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 sostanza standard (DL-trans-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-idrossi-2-piperidil)acetonil]-china zolin-4-(3H)-one bromidrato, E 764)

3.6.1. Alofuginone, soluzione madre standard, 100 µg/ml

Pesare con l'approssimazione di 0,1 mg 50 mg di alofuginone (3.6) in un pallone graduato da 500 ml, sciogliere in soluzione tampone di acetato ammonico (3.18), portare a volume con soluzione tampone ed agitare, Questa soluzione è stabile per tre settimane a + 5 °C, se conservata al buio.

3.6.2. Soluzioni di taratura

In una serie di palloni graduati da 100 ml trasferire 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 e 6,0 ml della soluzione madre standard (3.6.1). Portare a volume con la fase mobile (3.21) ed agitare. Queste soluzioni hanno concentrazioni rispettivamente di 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 e 6,0 µg/ml di alofuginone. Queste soluzioni devono essere preparate al momento dell'uso.

3.7. Acido cloridrico (ρ_{20} ca. 1,16 g/ml).

3.8. Metanolo

3.9. Nitrato di argento

3.10. Ascorbato di sodio

3.11. Carbonato di sodio

3.12. Cloruro di sodio

3.13. EDTA (acido etilendiamminotetracetico, sale bisodico)

3.14. Acqua per HPLC

3.15. Soluzione di carbonato di sodio, 6 = 10 g/100 ml

3.16. Soluzione di carbonato di sodio saturata con cloruro di sodio 6 = 5 g/100 ml.

Sciogliere 50 g di carbonato di sodio (3.11) in acqua, portare a 1 l ed aggiungere cloruro di sodio (3.12) fino a saturazione.

3.17. Acido cloridrico, circa 0,1 mol/l

Portare 10 ml di HCI (3.7) con acqua a 1 l.

3.18. Soluzione tampone di acetato di ammonio, circa 0,25 mol/l

Sciogliere 19,3 g di acetato di ammonio (3.3) e 30 ml di acido acetico (3.5) in acqua (3.14) e portare a 1 l.

3.19. Preparazione della resina amberlite XAD-2

Sciacquare un quantitativo opportuno di amberlite (3.2) con acqua fino a eliminazione completa di tutti gli ioni cloruro, eliminazione che viene verificata eseguendo una prova al nitrato di argento (3.20) sulla fase acquosa che è stata messa da parte. Sciacquare quindi la resina con 50 ml di metanolo (3.8), eliminare il metanolo e conservare la resina in metanolo fresco.

3.20. Soluzione di nitrato di argento, circa 0,1 mol/l

Sciogliere 0,17 g di nitrato di argento (3.9) in 10 ml di acqua.

3.21. Fase mobile per HPLC

Mescolare 500 ml di acetonitrile (3.1), 300 ml di soluzione tampone di acetato ammonico (3.18) e 1 200 ml di acqua (3.14). Regolare il pH a 4,3 con acido acetico (3.5). Far passare la soluzione attraverso un filtro di 0,22 µm (4.8) e degassarla (ad es., sottoponendola per 10 minuti a trattamento con ultrasuoni). Qusta soluzione è stabile per un mese se conservata al buio in un contenitore chiuso.

4. Apparecchiature

4.1. Bagno ad ultrasuoni

4.2. Evaporare rotante a film

4.3. Centrifuga

4.4. Apparecchiatura per 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 mm × 4 mm, C 18, con riempimento da 10 µm o colonna equivalente

4.5. Colonna di vetro (300 mm × 10 mm) provvista di filtro in vetro e di rubinetto di arresto

4.6. Filtri in fibra di vetro, diametro 150 mm

4.7. Filtri a membrana, 0,45 µm

4.8. Filtri a membrana, 0,22 µm

5. Procedimento

Nota: L'alofuginone come base libera è instabile in soluzione alcalina e in soluzione di acetato di etile. Non deve restare in acetato di etile per oltre 30 minuti.

5.1. Generalità

5.1.1. Analizzare un campione di mangime in bianco, per accertare l'assenza dell'alofuginone o di altre sostanze capaci di interferire.

5.1.2. Procedere a una prova di recupero, analizzando un campione del mangime in bianco rinforzato con una quantità di alofuginone simile a quella presente nel campione.

Per rinforzare al livello di 3 mg/kg, aggiungere 300 µl della soluzione di riserva standard (3.6.1) a 10 g del mangime in bianco, mescolare e attendere 10 minuti prima di procedere all'estrazione (5.2).

Nota: Ai fini del presente metodo, il mangime in bianco deve avere una composizione simile a quella del campione, ed all'analisi l'alofuginone non deve risultare presente.

5.2. Estrazione

Pesare 10 g del campione preparato, con l'approssimazione di 0,01 g, in una provetta da centrifuga da 200 ml, aggiungere 0,5 g di ascorbato sodico (3.10), 0,5 g di EDTA (3.13) e 20 ml di acqua e agitare. Immergere la provetta in bagnomaria (80 °C) per 5 minuti. Dopo aver fatto raffreddare a temperatura ambiente, aggiungere 20 ml di soluzione di carbonato di sodio (3.15) ed agitare. Aggiungere immediatamente 100 ml di acetato di etile (3.4) ed agitare vigorosamente a mano per 15 secondi. Introdurre quindi la provetta nel bagno ultrasonico (4.1) per 3 minuti ed allentare il tappo. Centrifugare per 2 minuti e decantare la fase di acetato etilico, attraverso un filtro in fibra di vetro (4.6), in un imbuto separatore da 500 ml. Ripetere l'estrazione del campione con una seconda porzione di 100 ml di acetato di etile. Lavare gli estratti combinati, per un minuto, con 50 ml di soluzione di carbonato di sodio saturata con cloruro di sodio (3.16) ed eliminare lo strato acquoso.

Estrarre lo strato organico, per un minuto, con 50 ml di acido cloridico (3.17). Raccogliere lo strato acido inferiore in un imbuto separatore da 250 ml. Riestrarre lo strato organico per 1,5 minuti con altri 50 ml di acido cloridrico e aggiungere al primo estratto. Lavare gli estratti acidi combinati agitando per 10 secondi con 10 ml di acetato di etile (3.4).

Trasferire quantitativamente lo strato acquoso in un pallone da 250 ml ed eliminare la fase organica. Far evaporare tutto l'acetato di etile rimanente dalla soluzione acida mediante un evaporatore rotante a film (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 viene rimosso entro 5 minuti a 38 °C.

5.3. Purificazione

5.3.1. Preparazione della colonna di amberlite

Per ciascun estratto di campione viene preparata una colonna XAD-2. Mediante metanolo (3.8) trasferire in una colonna di vetro (4.5) 10 g di amberlite preparata (3.19). Aggiungere un piccolo tappo di lana di vetro alla sommità del letto della resina. Drenare 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. Far equilibrare la colonna per 10 minuti prima dell'uso. Evitare comunque che la colonna si essicchi.

5.3.2. Purificazione del campione

Transferire quantitativamente l'estratto (5.2) sulla sommità della colonna di amberlite preparata (5.3.1) ed eluire, scartando l'eluato. Il tasso di eluizione non deve superare 20 ml/min. Riprendere il pallone con 20 ml di acido cloridrico (3.17) ed usare quest'ultimo liquido per lavare la colonna di resina. Eliminare eventuali residui di soluzione acida insufflando aria. Eliminare i liquidi di lavaggio. Aggiungere 100 ml di metanolo (3.8) alla colonna e lasciar eluire per 5-10 minuti, raccogliendo l'eluato in un pallone da 250 ml. Lasciar equilibrare per 10 minuti il metanolo residuo 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 (4.2); la temperatura del bagnomaria non deve superare i 40 °C. Trasferire quantitativamente il residuo in un pallone graduato da 10 ml usando la fase mobile (3.21). Portare a volume con la fase mobile ed agitare. Far passare un'aliquota attraverso un filtro a membrana (4.7). Riservare questa soluzione per la determinazione mediante HPLC (5.4).

5.4. Determinazione mediante HPLC

5.4.1. Parametri

I parametri qui riportati sono di riferimento. Possono essere tuttavia utilizzate altre condizioni cromatografiche in grado di dare risultati equivalenti.

Colonna di cromatografia liquida (4.4.1)

Fase mobile per HPLC (3.21)

Velocità flusso: 1,5 — 2 ml/min.

Lunghezza d'onda di rivelazione: 243 nm

Volume iniettato: 40 — 100 µl

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando parecchie volte la soluzione titolata (3.6.2) contenente 3,0 µg/ml fino a ottenimento di altezze di picco e tempi di ritenzione costanti.

5.4.2. Curva di taratura

Iniettare ciascuna soluzione di taratura (3.6.2) parecchie volte e misurare le altezze (aree) dei picchi per ciascuna concentrazione. Calcolare una curva di taratura riportando l'altezza media dei picchi o area delle soluzioni di taratura sulle ordinate e le corrispondenti concentrazioni in µg/ml sulle ascisse.

5.4.3. Soluzione di campione

Iniettare parecchie volte l'estratto di campione (5.3.2) usando lo stesso volume usato per le soluzioni di taratura e determinare l'altezza media (area) dei picchi di alofuginone.

6. Calcolo dei risultati

Dall'altezza media (area) dei picchi di alofuginone della soluzione di campione dedurre la concentrazione della soluzione di campione in µg/ml basandosi sulla curva di taratura (5.4.2).

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

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

dove:

— c: concentrazione di alofuginone della soluzione di campione in µg/ml,

— m: massa della quantità di sostanza da analizzare, in grammi.

7. Convalida dei risultati

7.1. Identità

L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia oppure usando un rivelatore a serie di diodi in cui vengono confrontati gli spettri dell'estratto di campione e della soluzione di taratura (3.6.2) contenente 6,0 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografia

Un estratto di campione viene « rinforzato » mediante aggiunta di un quantitativo adeguato di soluzione di taratura (3.6.2). Il quantitativo di alofuginone aggiunto deve essere analogo a quello stimato di alofuginone trovato nell'estratto di campione.

Solo l'altezza del picco di alofuginone dovrebbe essere aumentata aggiungendo un quantitativo opportuno dopo aver tenuto conto sia della quantità di alofuginone aggiunta che della diluizione dell'estratto. La ampiezza del picco, a metà della sua altezza massima, deve rientrare nel ± 10 % dell'ampiezza originale.

7.1.2. Rivelazione a serie di diodi

I risultati sono valutati con i seguenti criteri :

a) le lunghezze d'onda massime di assorbimento degli spettri relativi al campione ed allo standard, registrate all'apice del picco, devono essere le stesse entro un margine determinato dal potere di risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione a serie di diodi, esso si situa tipicamente entro ± 2 nm ;

b) tra 225 e 300 nm, gli spettri relativi al campione ed allo standard registrati all'apice del picco cromatografico, non devono essere differenti per le parti dello spettro comprese tra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio viene rispettato quando sono presenti gli stessi massimi e quando in nessun punto che viene osservato la deviazione tra i due spettri supera il 15 % dell'assorbanza dell'analita standard ;

c) tra 225 e 300 nm, gli spettri relativi al campione, registrati nel tratto ascendente, all'apice, nel tratto discendente del picco cromatografico, non devono essere differenti per quelle parti dello spettro comprese tra il 10 ed il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio viene soddisfatto quando sono presenti gli stessi massimi e quando in nessun punto che viene osservato la deviazione tra gli spettri supera il 15 % dell'assorbanza di spettro dell'apice.

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

7.2. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve superare 0,5 mg/kg per contenuti di alofuginone fino ad un massimo di 3 mg/kg.

7.3. Recupero

Per il campione di bianco rinforzato il ricupero deve essere di almeno 80 %.

8. Risultati di uno studio effettuato in cooperazione

È stato organizzato uno studio in cooperazione (1) in cui tre campioni sono stati analizzati da otto laboratori.

Risultati

	Campione A (bianco) appena ricevuto	Campione B (sfarinato)		Campione C (pellet)	
		appena ricevuto	dopo due mesi	appena ricevuto	dopo due mesi
Media (1)	n.d.	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R	—	16	18	14	17
rec.		86	74	88	75

(1) : unità in mg/kg.
n.d. : non rivelato.
S_R : deviazione standard della riproducibilità.
CV_R : coefficiente di variazione (%).
rec. : recupero (%).

(1) *The Analyst* 1983, 108 : 1252-1256.