DIRETTIVA 98/64/CE DELLA COMMISSIONE

del 3 settembre 1998

che fissa i metodi di analisi comunitari per la determinazione degli amminoacidi, delle materie grasse grezze e dell'olaquindox negli alimenti per animali e che modifica la direttiva 71/393/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,

considerando che la direttiva 70/373/CEE prevede che i controlli ufficiali degli alimenti per animali destinati ad accertare l'osservanza dei requisiti previsti da disposizioni legislative, regolamentari o amministrative, in materia di qualità e composizione degli alimenti per animali, siano effettuati secondo modi di prelievo di campioni e metodi di analisi comunitari;

considerando che la direttiva 79/373/CEE del Consiglio, del 2 aprile 1979, relativa alla commercializzazione degli alimenti composti per gli animali [2], modificata da ultimo dalla direttiva 97/47/CE della Commissione [3], e la direttiva 93/74/CEE del Consiglio, del 13 settembre 1993, concernente gli alimenti per animali destinati a particolari fini nutrizionali [4], modificata da ultimo dalla direttiva 96/25/CE [5], prevedono la dichiarazione degli amminoacidi e delle materie grasse grezze nell'etichettatura degli alimenti;

considerando peraltro che la direttiva 70/524/CEE del Consiglio, del 23 novembre 1970, relativa agli additivi nell'alimentazione degli animali [6], modificata da ultimo dalla direttiva 98/19/CE della Commissione [7], prescrive che il contenuto di olaquindox deve esser indicato al momento dell'etichettatura allorché tale sostanza è aggiunta agli alimenti composti per animali;

considerando che la seconda direttiva 71/393/CEE della Commissione, del 18 novembre 1971, che fissa i metodi d'analisi comunitari per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali [8], modificata da ultimo dalla direttiva 84/4/CEE della Commissione [9], stabilisce metodi d'analisi per la determinazione, tra l'altro, delle sostanze grasse gregge; che occorre modificare il metodo descritto;

considerando che è necessario stabilire metodi di analisi comunitari per il controllo di dette sostanze;

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, per quanto riguarda il loro contenuto in amminoacidi, in materie grasse grezze e in olaquindox, siano effettuate secondo i metodi descritti nell'allegato della presente direttiva.

Articolo 2

Nell'allegato della direttiva 71/393/CE, il punto «4. Determinazione delle sostanze grasse gregge» è sostituito dal testo della parte B dell'allegato della presente direttiva.

Articolo 3

1. Gli Stati membri adottano e pubblicano entro il 31 dicembre 1998 le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva. Essi ne informano immediatamente la Commissione.

Gli Stati membri applicano tali disposizioni a decorrere dal 1° gennaio 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 del suddetto riferimento sono stabilite dagli Stati membri.

[1] GU L 170 del 3. 8. 1970, pag. 2.
[2] GU L 86 del 6. 4. 1979, pag. 30.
[3] GU L 211 del 5. 8. 1997, pag. 45.
[4] GU L 237 del 22. 9. 1993, pag. 23.
[5] GU L 125 del 23. 5. 1996, pag. 35.
[6] GU L 270 del 14. 12. 1970, pag. 1.
[7] GU L 96 del 28. 3. 1998, pag. 39.
[8] GU L 279 del 20. 12. 1971, pag. 7.
[9] GU L 15 del 18. 1. 1984, pag. 28.

2. Gli Stati membri comunicano alla Commissione il testo delle principali disposizioni di diritto interno che essi adottano nel settore disciplinato dalla presente direttiva.

Articolo 4

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

Articolo 5

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 3 settembre 1998.

Per la Commissione
Franz FISCHLER
Membro della Commissione

ALLEGATO

PARTE A

DETERMINAZIONE DEGLI AMMINOACIDI

1. **Scopo e campo di applicazione**

Il metodo serve per determinare gli amminoacidi liberi (sia sintetici che naturali) e totali (legati a peptidi e liberi) nei mangimi mediante un analizzatore di amminoacidi. Il metodo è applicabile ai seguenti amminoacidi: cist(e)ina, metionina, lisina, treonina, alanina, arginina, acido aspartico, acido glutammico, glicina, istidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina e valina.

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

2. **Principio**

2.1. *Amminoacidi liberi*

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

2.2. *Amminoacidi totali*

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

L'ossidazione viene eseguita a 0 °C con una miscela di acido performico/fenolo. L'eccesso del reagente di ossidazione viene decomposto con metabisolfito di sodio. Il campione ossidato e non ossidato viene idrolizzato con acido cloridrico (c = 6 mol/l) per 23 ore. L'idrolizzato viene regolato a pH 2,20. Gli amminoacidi vengono separati mediante cromatografia a scambio ionico e determinati per reazione con la ninidrina, con rivelazione fotometrica a 570 nm (440 nm per la prolina).

3. **Reagenti**

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

3.1. Perossido d'idrogeno, p = 30 %.

3.2. Acido formico, p = 98-100 %.

3.3. Fenolo.

3.4. Metabisolfito di sodio.

3.5. Idrossido di sodio.

3.6. Acido 5-solfosalicilico diidrato.

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

3.8. Citrato trisodico diidrato.

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

3.10. Cloruro di sodio.

3.11. Ninidrina.

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

3.13. Norleucina, o altro composto adatto come standard interno.

3.14. Azoto grassoso (< 10 ppm di ossigeno).

3.15. 1-Ottanolo.

3.16. Amminoacidi.

3.16.1. Sostanze di riferimento elencate al paragrafo 1. Composti puri non contenenti acqua di cristallizzazione. Essiccare sotto vuoto su P_2O_5 o H_2SO_4 per 1 settimana prima dell'uso.

3.16.2. Acido cisteico.

3.16.3. Metionina solfone.

3.17. Soluzione di idrossido di sodio, 7,5 M.

Sciogliere 300 g NaOH (3.5) in acqua e portare a 1 litro.

3.18. Soluzione di idrossido di sodio, 1 M.

Sciogliere 40 g NaOH (3.5) in acqua e portare a 1 litro.

3.19. Soluzione di acido formico-fenolo:

Miscelare 889 g di acido formico (3.2) con 111 g d'acqua e aggiungere 4,73 g di fenolo (3.3).

3.20. Miscela di idrolisi, HCl 6 M contenente 1 g di fenolo.

Aggiungere 1 g di fenolo (3.3) a 492 ml HCl (3.7) e portare a 1 litro con acqua.

3.21. Miscela di estrazione, HCL 0,1 M contenente 2 % di tiodiglicole:

introdurre 8,2 ml di HCl (3.7), in circa 900 ml d'acqua e miscelare, aggiungere 20 ml di tiodiglicol (3.9) e portare a 1 litro con acqua (non miscelare 3.7 e 3.9 direttamente).

3.22. Acido 5-solfosalicilico ß = 6 %:

Sciogliere 60 g di acido 5-solfosalicilico (3.6) in acqua e portare a 1 litro con acqua.

3.23. Miscela di ossidazione (acido performico-fenolo):

Miscelare 0,5 ml di perossido di idrogeno (3.1) con 4,5 ml di soluzione di acido formico — fenolo (3.19) in un piccolo becher. Tenere in incubazione a 20-30 °C per 1 ora per formare acido performico; raffreddare su un bagno di acqua gelata (15 min) prima di aggiungere il campione.

Attenzione: evitare il contatto con la pelle e indossare abiti di protezione.

3.24. Tampone citrato, Na^+ 0,2 M, pH 2,20:

Sciogliere 19,61 g di citrato di sodio (3.8), 5 ml di tiodiglicol (3.9), 1 g di fenolo (3.3) e 16,50 ml HCl (3.7) in cira 800 ml d'acqua. Portare il pH a 2,20. Portare a 1 litro con acqua.

3.25. Tamponi di eluizione preparati come prescritto per l'analizzatore indicato.

3.26. Reattivo alla ninidrina, preparato come prescritto per l'analizzatore di cui si dispone.

3.27. Soluzioni standard di amminoacidi. Conservare queste soluzioni a temperatura inferiore a 5 °C.

3.27.1. Soluzione standard concentrata degli amminoacidi (3.16.1), 2,5 µmoli di ciascuno in acido cloridrico. Si può trovare in commercio.

3.27.2. Soluzione standard concentrata di acido cisteico e metionina solfone, c = 1,25 µmoli/ml.

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

3.27.3. Soluzione standard concentrata dello standard interno, per esempio norleucina, c = 20 µmoli/ml.

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

3.27.4. Soluzione di taratura degli amminoacidi standard da usarsi con idrolizzati, c = 5 nmoli/50 µl di acido cisteico e metionina solfone e c = 10 nmoli/50 µl degli altri amminoacido.

Sciogliere 2,2 g di clorurodi di sodio (3.10) in un becher da 100 ml con 30 ml di tampone citrato (3.24). Aggiungere 4,00 ml di soluzione standard concentrata di amminoacidi (3.27.1), 4,00 ml di soluzione standard concentrata di acido cisteico e metionina solfone (3.27.2) e 0,50 ml di soluzione standard concentrata dello standard interno (3.27.3), se usato. Portare il pH a 2,20 con idrossido di sodio (3.18).

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

Conservare a temperatura inferiore a 5 °C per non più di 3 mesi.

Si vedano anche le osservazioni 9.1.

3.27.5. Soluzione di taratura degli amminoacidi da usarsi con idrolizzati preparati secondo quanto prescritto al punto 5.3.3.1 e con gli estratti (5.2). La soluzione di taratura viene preparata secondo quanto indicato al punto 3.27.4, senza però cloruro di sodio.

Conservare a temperatura inferiore a 5 °C per non oltre 3 mesi.

4. **Apparecchiatura**

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

4.2. Bottiglia di vetro borosilicatico da 100 ml con tappo a vite e guarnizione di gomma/teflon (p. es. Duran, Schott) utilizzabile in stufa.

4.3. Stufa a ventilazione forzata con regolazione della temperatura avente una precisione superiore a ± 2 °C.

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

4.5. Filtro a membrana (0,2 µm).

4.6. Centrifuga.

4.7. Evaporatore rotante con possibilità di applicazione del vuoto.

4.8. Agitatore meccanico o magnetico.

4.9. Analizzatore di amminoacidi o apparecchiatura HPLC provvista di colonna a scambio ionico, apparecchio per ninidrina, derivatizzatore a valle della colonna e rivelatore fotometrico.

La colonna dev'essere riempita di resine polistireniche solfonate in grado di separare gli amminoacidi uno dall'altro e da altri materiali reattivi alla ninidrina. Le pompe del tampone e della ninidrina devono garantire una stabilità di portata di ± 0,5 % nel periodo che si estende dalla prova di taratura con gli standard fino all'analisi del campione.

Con alcuni analizzatori di amminoacidi si possono utilizzare procedure di idrolisi in cui l'idrolizzato presenta una concentrazione di sodio 0,8 M e contiene tutto l'acido formico residuo dalla fase di ossidazione. Altri analizzatori non forniscono una separazione soddisfacente di certi amminoacidi se l'idrolizzato contiene un eccesso di acido formico e/o elevate concentrazioni di ioni sodio. In questo caso ridurre il volume dell'acido a circa 5 ml mediante evaporazione dopo l'idrolisi e prima della regolazione del pH. L'evaporazione deve venire eseguita sotto vuoto a temperatura non superiore a 40 °C.

5. **Procedimento**

5.1. *Preparazione del campione*

Macinare il campione su griglia con fori da 0,5 mm di diametro. Campioni con elevata umidità devono essere essiccati all'aria ad una temperatura non superiore a 50 °C o crioessiccati prima della macinazione. I campioni con un elevato contenuto di grassi devono venire trattati con etere di petrolio (3.12) prima della macinazione.

5.2. *Determinazione degli amminoacidi liberi in mangimi e premiscele*

Pesare con una precisione di 0,2 mg una quantità appropriata (1-5 g) del campione preparato (5.1) in una beuta e aggiungere 100,0 ml di miscela di estrazione (3.21). Agitare la miscela per 60 minuti con un agitatore meccanico o magnetico (4.8). Lasciar depositare il sedimento e pipettare 10,0 ml della soluzione surnatante in un becher da 100 ml.

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

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

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

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

5.3. *Determinazione degli amminoacidi totali*

5.3.1. Ossidazione

Pesare, con una precisione di 0,2 mg, da 0,1 a 1 g del campione preparato (5.1) in:

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

— un pallone a fondo rotondo da 250 ml (4.1) se è richiesta una bassa concentrazione di sodio (5.3.3.1) o,

— un flacone da 100 ml dotato di tappo a vite (4.2) per l'idrolisi in sistema chiuso (5.3.2.4).

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

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

Procedere secondo il punto 5.3.2.1.

5.3.2. Idrolisi

5.3.2.1. Idrolisi dei campioni ossidati:

Aggiungere al campione ossidato, preparato secondo il punto 5.3.1, 25 ml di miscela di idrolisi (3.20) avendo cura di risciacquare eventuali residui di campione che aderiscono alle pareti del recipiente e alle spatola. Procedere come indicato al punto 5.3.2.3 o 5.3.2.4, a seconda del metodo di idrolisi utilizzato.

5.3.2.2. Idrolisi dei campioni non ossidati:

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

5.3.2.3. Idrolisi, sistema aperto:

Aggiungere 3 palline di vetro alla miscela (preparata secondo il punto 5.3.2.1 o 5.3.2.2) contenuta nel pallone e far bollire a ricadere per 23 ore a ebollizione continua. Al completamento dell'idrolisi, risciacquare il refrigerante con 5 ml di tampone citrato (3.24). Togliere il pallone e raffreddarlo in un bagno di ghiaccio. Procedere secondo il punto 5.3.3.

5.3.2.4. Idrolisi, sistema chiuso:

Introdurre il flacone contenente la miscela, preparata secondo il punto 5.3.2.1 o 5.3.2.2, in un forno (4.3) a 110 °C. Durante la prima ora, allo scopo di evitare un accumulo di pressione in conseguenza dello sviluppo di sostanze gassose e di evitare un'esplosione, *porre il tappo a vite sopra al recipiente senza chiuderlo.* Dopo 1 ora, chiudere il recipiente con il tappo e lasciarlo nel forno (4.3) per 23 ore. Al completamento dell'idrolisi, togliere il flacone dal forno, aprire con cautela il tappo del flacone e introdurre il flacone in un bagno di acqua e ghiaccio. Lasciar raffreddare.

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

Procedere secondo il punto 5.3.3.

5.3.3. Aggiustamento del pH

Procedere, secondo il punto 5.3.3.1 o 5.3.3.2, all'aggiustamento, del pH, in base alla tolleranza al sodio dell'analizzatore di amminoacidi (4.9).

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

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

In questo caso aggiungere 2 ml della soluzione di standard interno 3.27.3 all'idrolizzato prima o dopo l'evaporazione.

Aggiungere 2 gocce di 1-ottanolo (3.15) all'idrolizzato ottenuto secondo il punto 5.3.2.3 o 5.3.2.4.

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

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

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

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

Portare il pH a 2,20 a temperatura ambiente utilizzando le soluzioni di idrossido di sodio (3.17) e (3.18). Procedere secondo il punto 5.3.4.

5.3.4. Soluzione campione per la cromatografia

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

Se non è stato già utilizzato uno standard interno, aggiungere 2,0 ml dello standard interno (3.27.3) e portare a volume con tampone citrato (3.24). Miscelare accuratamente.

Procedere alla fase della cromatografia (5.4).

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

5.4. *Cromatografia*

Prima della cromatografia, portare l'estratto (5.2) o l'idrolizzato (5.3.4) a temperatura ambiente. Agitare la miscela e filtrarne una quantità opportuna attraverso un filtro a membrana da 0,2 μm (4.5). La soluzione limpida risultante viene sottoposta a cromatografia di scambio ionico utilizzando un analizzatore di amminoacidi (4.9).

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

La frequenza delle corse di calibrazione dipende dalla stabilità del reattivo alla ninidrina e del sistema analitico in generale. Lo standard o il campione viene diluito con tampone citrato (3.24) in misura tale che l'area del picco dello standard sia compresa tra il 30 e il 200 % dell'area del picco degli amminoacidi del campione.

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

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

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

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

6. **Calcolo dei risultati**

Determinare le aree dei picchi del campione e dello standard per ogni singolo amminoacido e calcolare la quantità in g di amminoacido per kg di campione secondo la formula:

$$\frac{A \times E \times PM \times F}{B \times P \times 1\,000} = g \text{ di amminoacido per kg di campione}$$

Se si usa uno standard interno moltiplicare per D/C

A = area del picco dell'idrolizzato o dell'estratto

B = area del picco della soluzione standard di calibrazione

C = area del picco dello standard interno nell'idrolizzato e nell'estratto

D = area del picco dello standard interno, soluzione standard di taratura

PM = peso molecolare

E = concentrazione dello standard in µmol/ml

P = peso del campione (g) (corretto al peso originale se essiccato o sgrassato)

F = ml totali di idrolizzato (5.3.4) o ml del volume di diluizione totale calcolati dell'estratto (6.1).

La cistina e la cisteina vengono ambedue determinate come acido cisteico in idrolizzati di campione ossidato, ma vengono calcolate come cistina ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, PM 240,30) utilizzando un peso molecolare di 120,15 (= 0,5 × 240,30).

La metionina viene determinata come metionina sulfone negli idrolizzati del campione ossidato, ma viene calcolata come metionina utilizzando il peso molecolare PM = 149,21 della metionina.

La metionina libera aggiunta viene determinata dopo estrazione come metionina e per il calcolo si usa lo stesso valore di PM.

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

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

V = volume dell'estratto finale

7. Valutazione del metodo

Il metodo è stato testato mediante confronto internazionale tra laboratori nel 1990 utilizzando quattro mangimi differenti (mangime composto per maiali, mangime composto per polli, concentrato di proteine, premiscela). Le medie e le deviazioni standard ottenute dopo eliminazione dei risultati anomali sono presentati nella seguente tabella:

Medie in g/kg

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

n = Numero dei laboratori partecipanti.

7.1. *Ripetibilità*

Valori di ripetibilità per gli amminoacidi testati. La ripetibilità (espressa come «deviazione standard entro i laboratori») del confronto entro laboratori è presentata nelle seguenti tabelle:

Deviazione standard entro laboratori (S_r) in g/kg

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

n = Numero dei laboratori partecipanti.

Coefficiente di variabilità (%) per la deviazione standard entro laboratori (S_r)

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

n = Numero dei laboratori partecipanti.

7.2. *Riproducibilità*

I risultati della deviazione standard tra laboratori ottenuti mediante la comparazione interlaboratori suddetta sono presentati nella seguente tabella:

Deviazione standard tra laboratori (S_R) in g/kg

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

n = Numero dei laboratori partecipanti.

Coefficiente di variabilità (%) per la deviazione standard tra laboratori (S_R)

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

n = Numero dei laboratori partecipanti.

8. **Utilizzazione di materiali di riferimento**

La corretta applicazione del metodo può venire verificata effettuando misure multiple su materiali di riferimento certificati. Si raccomanda di effettuare la calibrazione con una soluzione standard certificata di amminoacidi.

9. **Osservazioni**

9.1. A causa delle differenze tra gli analizzatori di amminoacidi, le concentrazioni finali delle soluzioni di taratura di amminoacidi standard (vedi 3.27.4 e 3.27.5) e dell'idrolizzato (vedi 5.3.4) devono essere considerate valori indicativi.

Per tutti gli amminoacidi deve essere testato il «range» della risposta lineare dell'apparecchiatura.

La soluzione standard viene diluita con tampone al citrato per ottenere le aree dei picchi al centro del «range».

9.2. Se si fa uso di apparecchi di cromatografia liquida ad alta prestazione per analizzare gli idrolisati, le condizioni sperimentali devono essere ottimizzate secondo le raccomandazioni del fabbricante.

9.3. Con l'applicazione del metodo a mangimi contenenti cloruro in misura superiore all'1 % (concentrato, alimenti a base di minerali, mangimi integrativi) può risultare una sottostima della metionina ed è necessario un trattamento speciale.

PARTE B

DETERMINAZIONE DI OLI E GRASSI GREGGI

1. **Scopo e campo di applicazione**

Il metodo permette di determinare il contenuto di oli e grassi greggi negli alimenti per gli animali. Esso non riguarda l'analisi dei semi e dei frutti oleosi descritta nel regolamento n. 136/66/CEE del Consiglio, del 22 settembre 1996.

Dei due procedimenti sotto descritti, dovrà essere applicato il primo o il secondo in funzione della natura e della composizione dell'alimento, nonché del motivo per cui si esegue l'analisi.

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

Il metodo è applicabile a singoli materiali di origine vegetale, fatta eccezione per quelli di cui al procedimento B.

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

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

1.3. *Interpretazione dei risultati*

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

2. **Principio**

2.1. *Procedimento A*

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

2.2. *Procedimento B*

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

3. **Reattivi**

3.1. Etere di petrolio, con punto di ebollizione compreso fra 40 °C e 60 °C. L'indice di bromo deve essere inferiore a 1 ed il residuo all'evaporazione inferiore a 2 mg/100 ml.

3.2. Solfato di sodio, anidro.

3.3. Acido cloridrico 3 M.

3.4. Coadiuvante di filtrazione, per esempio farina fossile, Hyflo-supercel.

4. **Apparecchiatura**

4.1. Estrattore. Se l'apparecchio è munito di un sifone (apparecchio di Soxhlet), la portata del riflusso deve essere regolata in modo da ottenere almeno 10 cicli l'ora. Se si tratta di un apparecchio senza sifone, il liquido deve rifluire in quantità pari a circa 10 ml al minuto.

4.2. Ditali da estrazione, esenti da sostanze solubili nell'etere di petrolio, la cui porosità sia compatibile con le esigenze di cui al punto 4.1.

4.3. Stufa per essiccazione nel vuoto a 75 °C ± 3 °C o a pressione atmosferica a 100 °C ± 3 °C.

5. **Modo di operare**

5.1. *Procedimento A (punto 8.1)*

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

Porre il ditale in un estrattore (4.1) ed estrarre per 6 ore con etere di petrolio (3.1). Raccogliere l'estratto in un pallone essiccato, contenente qualche granello di pietra pomice [1], e tarato.

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

5.2. *Procedimento B*

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 2,5 g del campione (punto 8.2); introdurli in un becher da 400 ml o in una beuta da 300 ml ed aggiungere 100 ml di acido cloridrico 3 M (3.3) e qualche frammento di pietra pomice. Ricoprire il becher con un vetro da orologio o applicare sulla beuta un refrigerante a ricadere. Portare la miscela a lenta ebollizione su piccola fiamma o su piastra riscaldante e mantenerla per un'ora. Evitare che la sostanza aderisca alle pareti del recipiente.

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

Porre il doppio filtro con il residuo su un vetro da orologio ed essiccare per un'ora e mezza nella stufa a 100 °C ± 3 °C.

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

[1] Sostituire i frammenti di pietra con alcune palline di vetro, quando si debbano eseguire ulteriori esami qualitativi sulla sostanza oleosa o grassa.

6. **Calcolo dei risultati**

Esprimere il risultato della pesata in parti per cento del campione.

7. **Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione dallo stesso analista non deve essere superiore a:

— 0,2 %, in valore assoluto, per i contenuti in materie oleose e grasse gregge inferiori a 5 %,

— 4,0 % del risultato più elevato, per i contenuti compresi fra 5 % e 10 %,

— 0,4 %, in valore assoluto, per i contenuti superiori a 10 %.

8. **Osservazioni**

8.1. Per i prodotti ad elevato tenore in sostanze oleose e grasse, difficili da macinare o non appropriati per il prelevamento di una piccola quantità omogenea, procedere come segue:

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

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

Il contenuto in materie oleose e grasse gregge in parti per cento del campione è dato dalla formula:

$(10\ a + b) \times 5$

nella quale

a = massa, in grammi, del residuo della prima estrazione (parte aliquota dell'estratto)

b = massa, in grammi, del residuo della seconda estrazione.

8.2. La quantità di sostanza sottoposta all'analisi nel caso di prodotti poveri di materie oleose e grasse può essere portata a 5 g.

8.3. Gli alimenti per animali domestici, contenenti un elevato tenore di acqua, possono rendere necessaria l'aggiunta di solfato di sodio anidro prima dell'idrolisi e dell'estrazione ai sensi del procedimento B.

8.4. Nel procedimento descritto al punto 5.2 può essere preferibile usare acqua calda, invece che fredda, per lavare il residuo dopo la filtrazione.

8.5. Per alcuni mangimi il tempo di essiccazione di 1,5 h deve essere prolungato; va tuttavia evitata una essiccazione eccessiva, che potrebbe portare a risultati insoddisfacenti. È possibile usare altresì un forno a microonde.

8.6. Se il tenore di sostanza oleosa o grassa è superiore al 15 %, nel procedimento A si raccomanda di effettuare una estrazione preliminare prima dell'idrolisi e nel procedimento B una riestrazione. Ciò può dipendere in parte dalla natura del mangime e da quella della sostanza oleosa o grassa contenuta nel mangime stesso.

PARTE C

DOSAGGIO DELL'OLAQUINDOX

2-[N-2′-(idrossietil) carbamoil]-3-metilchinoxalin-N^1,N^4-biossido

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

Il presente metodo serve per la determinazione dell'olaquindox nei mangimi. Il limite inferiore di dosaggio è di 5 mg/kg.

2. **Principio**

Il campione viene estratto con una miscela acqua/metanolo. Il tenore di olaquindox viene determinato mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) in fase inversa, usando un rivelatore UV.

[1] Sostituire i frammenti di pietra con alcune palline di vetro, quando si debbano eseguire ulteriori esami qualitativi sulla sostanza oleosa o grassa.

3. **Reattivi**

3.1. Metanolo.

3.2. Metanolo di qualità HPLC.

3.3. Acqua di qualità HPLC.

3.4. Fase mobile per HPLC:

Miscela acqua (3.3)-metanolo (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5. Sostanza standard: olaquindox puro: 2-[N-2′-(idrossietil)carbamoil]-3-metilchinoxalin-N^1,N^4-biossido, E 851.

3.5.1. Soluzione standard madre di olaquindox, 250 µg/ml:

Pesare con l'approssimazione di 0,1 mg 50 mg di olaquindox (3.5) in un matraccio tarato da 200 ml ed aggiungere circa 190 ml di acqua. Immergere quindi il matraccio per 20 minuti in un bagno ultrasonico (4.1). Dopo il trattamento ultrasonic, portare la soluzione a temperatura ambiente, portare il contenuto a volume con acqua e agitare. Avvolgere il matraccio in un foglio di alluminio e conservare in frigorifero. La soluzione va preparata di fresco ogni mese.

3.5.2. Soluzioni standard media di olaquindox, 25 µg/ml:

Trasferire 10,0 ml di soluzione standard madre (3.5.1) in un matraccio tarato da 100 ml, portare a volume con la fase mobile (3.4) ed agitare. Avvolgere il matraccio in un foglio di alluminio e conservare in frigorifero. La soluzione va preparata di fresco quotidianamente.

3.5.3. Soluzioni di taratura:

In una serie di matracci graduati da 50 ml trasferire 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 ml di soluzione standard intermedia (3.5.2). Portare a volume con la fase mobile (3.4) ed agitare. Avvolgere i matracci in fogli di alluminio. Queste soluzioni corrispondono rispettivamente a 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 µg di olaquindox e vanno rinnovate ogni giorno.

4. **Apparecchiatura**

4.1. Bagno ultrasonico.

4.2. Agitatore meccanico.

4.3. Apparecchiatura HPLC a rivelatore UV, a lunghezza d'onda variabile, oppure rivelatore a serie diodi.

4.3.1. Colonna per cromatografia liquida, 250 mm × 4 mm, C 18, con riempimento da 10 µm o equivalente.

4.4. Filtri a membrana 0,45 µm.

5. **Modo di operare**

NB: L'olaquindox è fotosensibile. Effettuare tutte le operazioni in luce soffusa, oppure usare vetreria scura.

5.1. *Generalità*

5.1.1. Analizzare un mangime testimone, onde verificare l'assenza di olaquindox o di sostanze che possano interferire.

5.1.2. Deve essere effettuata una prova di recupero analizzando il mangime testimone al quale è stato addizionato un certo quantitativo di olaquindox analogo a quello presente nel campione. Per ottenere una concentrazione di 50 mg/kg, trasferire 10,0 ml della soluzione madre standard (3.5.1) in una beuta da 250 ml e concentrare la soluzione mediante evaporazione a circa 0,5 ml. Aggiungere 50 g del mangime testimone, miscelare accuratamente e lasciar riposare per 10 minuti agitando nuovamente parecchie volte prima di procedere all'estrazione.

NB: Il mangime testimone deve essere di tipo analogo a quello del campione e in esso non dev'essere presente olaquindox.

5.2. *Estrazione*

Pesare con l'approssimazione di 0,01 g 50 g circa del campione. Trasferire in una beuta da 1 000 ml, aggiungere 100 ml di metanolo (3.1) e immergere per 5 minuti la beuta in un bagno ultrasonico (4.1). Aggiungere 410 ml di acqua e lasciare nel bagno ultrasonico altri 15 minuti. Togliere la beuta dal bagno ultrasonico, agitare per 30 minuti mediante l'agitatore (4.2) e filtrare attraverso un filtro a pieghe. Trasferire 10,0 ml del filtrato in un matraccio tarato da 20 ml, portare a volume con acqua e agitare. Un'aliquota viene filtrata attraverso un filtro a membrana (4.4). (cfr. osservazione al paragrafo 9). Procedere al dosaggio HPLC (5.3).

5.3. *Dosaggio HPLC*

5.3.1. Parametri

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

Colonna analitica (4.3.1.)

Fase mobile (3.4):	miscela di acqua (3.3) e di metanolo (3.2), 900 + 100 (V + V)
Flusso:	1,5-2 ml/min
Lunghezza d'onda di rivelazione:	380 nm
Volume di iniezione:	20 µl-100 µl

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando più volte la soluzione di taratura (3.5.3) contenente 2,5 µg/ml fino ad ottenimento di altezze dei picchi e di tempi di ritenzione costanti.

5.3.2. Curva di taratura

Iniettare ciascuna soluzione di taratura (3.5.3) parecchie volte e determinare le altezze (superfici) medie dei picchi per ciascuna concentrazione. Tracciare una curva di taratura indicando le altezze (superfici) medie dei picchi delle soluzioni di taratura sulle ordinate e le concentrazioni corrispondenti in mg/ml nelle ascisse.

5.3.3. Soluzione del campione

Iniettare l'estratto del campione (5.2) parecchie volte usando lo stesso volume di quello preso per le soluzioni di taratura e determinare l'altezza media del picco (superficie) dei picchi di olaquindox.

6. Calcolo dei risultati

Partendo dall'altezza (superficie) media dei picchi di olaquindox della soluzione del campione, determinare la concentrazione di tale soluzione in mg/ml rispetto alla curva di taratura (5.3.2).

Il tenore t di olaquindox, espresso in mg/kg del campione, è dato dalla seguente formula:

$$t = \frac{c \times 1\,000}{m}$$

in cui:

c = concentrazione di olaquindox nell'estratto del campione (5.2) espresso in µg/ml

m = massa della sostanza da analizzare 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 permette di confrontare gli spettri dell'estratto del campione (5.2) e della soluzione di taratura (3.5.3) contenente 5,0 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografia

A un estratto del campione (5.2) viene aggiunto un quantitativo adeguato della soluzione di taratura (3.5.3). Il quantitativo di olaquindox aggiunto deve essere analogo a quello di olaquindox rilevato nell'estratto del campione.

Soltanto l'altezza del picco dell'olaquindox deve essere aumentata tenendo conto del quantitativo aggiunto e della diluizione dell'estratto. L'ampiezza del picco a mezza altezza deve essere situata approssimativamente al ± 10 % dell'ampiezza iniziale del picco dell'olaquindox dell'estratto del campione iniziale.

7.1.2. Rivelazione mediante serie di diodi

I risultati vengono valutati secondo i criteri seguenti:

a) La lunghezza d'onda di assorbimento massimo degli spettri del campione e dello standard, registrata alla sommità del picco sul cromatogramma, deve situarsi in un margine determinato dal potere di risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione mediante serie di diodi essa è in genere di ± 2 nm.

b) Tra 220 e 400 nm gli spettri del campione e dello standard registrati alla sommità del picco del cromatogramma non devono essere diversi per le parti dello spettro situate tra il 10 % e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi valori massimi e quando in nessun caso lo scarto osservato tra gli spettri supera il 15 % della densità ottica dello spettro alla sommità del picco.

c) Tra 220 e 400 nm gli spettri della curva ascendente, dell'apice e della curva discendente del picco prodotti dall'estratto del campione non devono essere diversi gli uni dagli altri per le parti dello spettro situate tra 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 derivazione tra gli spettri non supera il 15 % dell'assorbanza dello spettro dell'apice del picco.

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

7.2. *Ripetibilità*

La differenza tra i risultati di due dosaggi paralleli effettuati sullo stesso campione non deve superare il 15 % del risultato superiore per i tenori di olaquindox compresi tra 10 e 200 mg/kg.

7.3. *Resa*

Per un campione addizionato, la resa deve essere di almeno il 90 %.

8. **Risultati di uno studio effettuato in cooperazione tra vari laboratori**

È stato organizzato uno studio comunitario in cooperazione tra vari laboratori durante il quale quattro campioni di alimenti per suinetti, ivi compreso un alimento testimone, sono stati analizzati da 13 laboratori. I risultati dello studio figurano qui di seguito.

	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
media (mg/kg)	—	14,6	48,0	95,4
S_r (mg/kg)	—	0,82	2,05	6,36
S_R (mg/kg)	—	1,62	4,28	8,42
CV_r (%)	—	5,6	4,3	6,7
CV_R (%)	—	11,1	8,9	8,8
Contenuto nominale (mg/kg)	—	15	50	100
resa (%)	—	97,3	96,0	95,4

L : numero di laboratori
n : numero di valori individuali
S_r : scarto tipo della ripetibilità
S_R : scarto tipo della riproducibilità
CV_r : coefficiente di variazione dello scarto tipo della ripetibilità
CV_R : coefficiente di variazione dello scarto tipo della riproducibilità

9. **Osservazione**

Anche se il metodo non è stato validato per quantità superiori a 100 mg/kg, è possibile ottenere risultati soddisfacenti pesando una quantità di campione più piccola e/o diluendo l'estratto (5.2) fino a raggiungere una concentrazione entro il campo della curva di calibrazione.