
DECRETI, DELIBERE E ORDINANZE MINISTERIALI

MINISTERO DELLE RISORSE AGRICOLE, ALIMENTARI E FORESTALI

DECRETO 11 aprile 1994.

Approvazione dei «Metodi di analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per animali - Supplemento n. 9».

MINISTERO DELLE RISORSE AGRICOLE, ALIMENTARI E FORESTALI ISPETTORATO CENTRALE REPRESSIONE FRODI

DI CONCERTO CON

IL MINISTERO DELLE FINANZE, IL MINISTERO DELLA SANITÀ E IL
MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTI-
GIANATO

Visto il decreto legislativo 3 febbraio 1993, n. 29, concernente norme per la razionalizzazione dell'organizzazione delle amministrazioni pubbliche e revisione della

disciplina in materia di pubblico impiego, a norma dell'art. 2 della legge 23 ottobre 1992, n. 421;

Visti l'art. 43 del regio decreto-legge 15 ottobre 1925, n. 2033, convertito nella legge 18 marzo 1926, n. 562, riguardante la repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari, e l'art. 108 del regolamento per l'esecuzione dello stesso regio decreto-legge, approvato con regio decreto 1° luglio 1926, n. 1361, i quali prescrivono che le analisi occorrenti in applicazione delle norme contenute nel regio decreto-legge e nel regolamento di esecuzione suddetti dovranno essere eseguite dai laboratori incaricati con i metodi di analisi prescritti da questo Ministero, di concerto con il Ministero delle finanze, il Ministero della sanità ed il Ministero dell'industria, del commercio e dell'artigianato;

Visti i decreti ministeriali 18 luglio 1975, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 214 del 12 agosto 1975, e 30 settembre 1976, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 81

del 24 marzo 1977, con i quali sono stati approvati rispettivamente i «Metodi ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico» - Supplemento n. 2 e n. 3;

Visto il decreto legislativo 3 marzo 1993, n. 89, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 78 del 3 aprile 1993, attuazione della direttiva 90/44/CEE, concernente la commercializzazione degli alimenti composti per animali, ed in particolare la disposizione relativa alla dichiarazione facoltativa in etichetta del valore energetico per i mangimi destinati al pollame;

Vista la direttiva 92/95/CEE della Commissione del 9 novembre 1992, pubblicata nella «Gazzetta Ufficiale» delle Comunità europee n. L 327 del 13 novembre 1992, che modifica l'allegato della settima direttiva 76/372/CEE relativamente al metodo per il dosaggio dell'aflatossina B₁;

Vista la direttiva 92/89/CEE della Commissione del 3 novembre 1992, pubblicata nella «Gazzetta Ufficiale» delle Comunità europee n. L 344 del 26 novembre 1992, che modifica l'allegato I della quarta direttiva 73/46/CEE relativamente al metodo per il dosaggio della cellulosa grezza negli alimenti per gli animali;

Vista la direttiva 86/174/CEE della Commissione del 9 aprile 1986, pubblicata nella «Gazzetta Ufficiale» delle Comunità europee n. L 130 del 16 maggio 1986, che fissa il metodo di calcolo del valore energetico degli alimenti composti destinati al pollame;

Ritenuto necessario adottare le opportune disposizioni per conformare le norme nazionali a quelle delle predette direttive comunitarie;

Sentito il parere della commissione per l'aggiornamento periodico dei metodi ufficiali di analisi per i prodotti agrari e le sostanze di uso agrario — sottocommissione per i mangimi — di cui al decreto ministeriale 11 febbraio 1981, e successive modificazioni;

Visto l'art. 2 della legge 4 dicembre 1993, n. 491, che istituisce il Ministero delle risorse agricole, alimentari e forestali;

Decreta:

Art. 1.

1. Sono approvati i «Metodi di analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per animali» descritti nel supplemento n. 9, allegato al presente decreto.

Art. 2.

1. Nel metodo «Determinazione dell'Aflatossina B₁, A - metodo per cromatografia monodimensionale su strato sottile» descritto nei «Metodi ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico - Supplemento n. 3» di cui al decreto ministeriale 30 settembre 1976 citato nelle

premesse, la parte «1. Scopo e campo d'applicazione» è sostituita dal corrispondente punto «1. Scopo e campo d'applicazione» descritto nell'allegato al presente decreto.

2. Il metodo «Determinazione dell'Aflatossina B₁, B - metodo per cromatografia bidimensionale su strato sottile» descritto nei predetti «Metodi ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico - Supplemento n. 3», è sostituito dal corrispondente metodo «B - Determinazione dell'Aflatossina B₁ - metodo per cromatografia liquida ad alta risoluzione» descritto nell'allegato al presente decreto.

3. Il metodo «Determinazione della cellulosa grezza» descritto nei «Metodi ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico - Supplemento n. 2» di cui al decreto ministeriale 18 luglio 1975, citato nelle premesse, è sostituito dal corrispondente metodo «Determinazione della fibra grezza» descritto nell'allegato al presente decreto.

Art. 3.

1. Il presente decreto entra in vigore il giorno successivo alla sua pubblicazione nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

2. Il presente decreto sarà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, 11 aprile 1994

L'ispettore generale capo per la repressione delle frodi
GRIMALDI

*Il direttore centrale del dipartimento delle dogane
e delle imposte indirette*
FAVALE

Il direttore generale dei servizi veterinari
MARABELLI

Il direttore generale della produzione industriale
AMMASSARI

ALLEGATO

METODI DI ANALISI PER IL CONTROLLO UFFICIALE DEGLI ALIMENTI PER ANIMALI - SUPPLEMENTO N. 9

Determinazione dell'Aflatossina B₁ - modifica del metodo A per cromatografia monodimensionale su strato sottile.

Determinazione dell'Aflatossina B₁ - metodo B per cromatografia liquida ad alta risoluzione.

Determinazione della fibra grezza.

Metodo di calcolo del valore energetico degli alimenti composti destinati al pollame.

DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA B₁ - METODO A PER CROMATOGRAFIA MONODIMENSIONALE SU STRATO SOTTILE

Il testo del punto "1. Scopo e campo di applicazione" è sostituito dal testo seguente:

"1. Scopo e campo di applicazione

Il metodo permette di determinare il tasso di aflatoossina B₁ delle materie prime e dei mangimi semplici. Questo metodo non si applica in presenza di polpe di agrumi. Il limite inferiore del dosaggio è di 0,01 mg/kg (10 ppb).

In presenza di sostanze interferenti che intralciano le determinazioni, occorre ripetere l'analisi secondo il metodo B (cromatografia liquida ad alta pressione)."

DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA B₁ - METODO B PER CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA RISOLUZIONE

1. Scopo e campo di applicazione

Viene proposto un metodo per la determinazione dell'aflatoossina B₁ negli alimenti di uso animale, inclusi quelli contenenti polpe di agrumi. Il limite minimo di determinazione è 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. Principio

Il campione viene estratto con cloroformio. L'estratto è filtrato ed un'aliquota è purificata su cartuccia di florisil e poi su cartuccia di C₁₈. La separazione finale e determinazione sono ottenute per cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) usando una colonna C₁₈ in fase inversa, seguita da una reazione di derivatizzazione post-colonna con soluzione acquosa di iodio e rivelazione per fluorescenza.

Nota:

Le micotossine sono sostanze molto tossiche. La determinazione si deve eseguire sotto cappa per fumi adibita a questo scopo. Speciali precauzioni si devono prendere quando le tossine si trovano allo stato secco a causa della loro natura elettrostatica e la tendenza a disperdersi nell'area di lavoro.

3. Reattivi

- 3.1. Cloroformio, stabilizzato con 0,5 %-1 % di etanolo, in peso. Vedere osservazione al punto 10.2.
- 3.2. Metanolo, grado HPLC, per la preparazione della miscela al punto 3.6.
- 3.3. Acetone.
- 3.4. Acetonitrile, grado HPLC.
- 3.5. Solventi eluenti: da preparare il giorno prima dell'uso, oppure degassarli mediante bagno ad ultrasuoni.
 - 3.5.1. Miscela di acetone (3.3) e acqua, 98+2 (v+v).
 - 3.5.2. Miscela di acqua e metanolo (3.2), 80+20 (v+v).
 - 3.5.3. Miscela di acqua e acetone (3.3), 95+5 (v+v).
- 3.6. Fase mobile per HPLC.
Miscela di acqua, metanolo (3.2) e acetonitrile (3.4), 150+70+40 (v+v+v).
(V.B.): La composizione della fase mobile può essere modificata a seconda delle caratteristiche della colonna HPLC usata.
- 3.7. Soluzione acquosa saturata di iodio. Aggiungere 2 g di iodio a 400 ml di acqua. Agitare mediante agitatore magnetico per almeno 90 minuti e filtrare attraverso filtro a membrana (4.15). Proteggere la soluzione saturata dalla luce per prevenire effetti dovuti a fotodegradazione.
- 3.8. Celite 545 o equivalente trattata con acidi.
- 3.9. Cartuccia di florisil (Waters SEP-PAK), o equivalente.
- 3.10. Cartuccia C₁₈ (Waters SEP-PAK) o equivalente.
- 3.11. Gas inerte, per esempio azoto.

- 3.12. Soluzione standard di aflatoxina B₁ in cloroformio, concentrazione 10 µg/ml. Controllare la concentrazione della soluzione come segue: determinare lo spettro di assorbimento della soluzione fra 330 e 370 nm mediante spettrofotometro (4.23); misurare l'assorbanza (A) al massimo vicino a 365 nm; calcolare la concentrazione di aflatoxina B₁ in microgrammi per millilitro di soluzione mediante la formula:

$$\text{concentrazione } (\mu\text{g/ml}) = \frac{312 \times A \times 1000}{22300} = 13,991 \times A$$

- 3.12.1. Soluzione standard stock in aflatoxina B₁ in cloroformio.

Trasferire quantitativamente 2,5 ml della soluzione standard di aflatoxina B₁ (3.12) in un matraccio tarato da 50 ml portando a volume con cloroformio (3.1). Conservare questa soluzione, ben chiusa ed avvolta in un foglio di alluminio, in un posto fresco (4 °C) al buio.

- 3.13. Soluzione di calibrazione di aflatoxina B₁ per HPLC.

N.B.: Per la preparazione di questa soluzione usare vetreria preventivamente lavata con acido (vedi al punto 4, apparecchiatura).

- 3.13.1. Soluzione di calibrazione, 4 ng/ml.

Lasciar condizionare per qualche ora a temperatura ambiente la soluzione standard stock (3.12.1) avvolta in un foglio di alluminio. Trasferire 400 µl di questa soluzione (200 ng di aflatoxina B₁) in un pallone tarato da 50 ml ed evaporare la soluzione fino a secchezza per mezzo di una corrente di gas inerte (3.11). Sciogliere il residuo ottenuto con circa 20 ml della miscela acqua-acetone e miscelare bene, portare quindi a volume.

- 3.13.2. Soluzione di calibrazione 3 ng/ml.

Trasferire quantitativamente 7,5 ml della soluzione di calibrazione (3.13.1) in un matraccio da 10 ml e portare a volume con la miscela acqua-acetone (3.5.3) e miscelare bene.

- 3.13.3. Soluzione di calibrazione, 2 ng/ml.

Trasferire quantitativamente 25 ml della soluzione di calibrazione (3.13.1) in un matraccio da 50 ml e portare a volume con la miscela acqua-acetone (3.5.3) e miscelare bene.

Questa soluzione viene usata anche durante l'analisi per HPLC come standard di riferimento per le iniezioni ripetitive (5.5).

- 3.13.4. Soluzione di calibrazione 1 ng/ml.

Trasferire quantitativamente 2,5 ml della soluzione di calibrazione (3.13.1) in un matraccio da 10 ml e portare a volume con la miscela acqua-acetone (3.5.3) e miscelare bene.

- 3.14. Fiala contenente una miscela delle aflatoxine B₁, B₂, G₁ e G₂ la cui concentrazione è approssimativamente di 1, 0,5, 1 e 0,5 µg/ml rispettivamente in 1 ml di cloroformio.

- 3.14.1. Soluzione per il controllo cromatografico.

Trasferire il contenuto della fiala (3.14) in una provetta con tappo di vetro o in una fiala con tappo a vite. Trasferire 40 µl di questa soluzione in un matraccio da 10 ml o in una provetta con un tappo di vetro (lavati con acido). Evaporare il cloroformio mediante una corrente di gas inerte (3.11) e ridisciogliere in 10 ml della miscela acqua-acetone (3.5.3).

- 3.15. Reagenti per la prova controllo di conferma (6).

- 3.15.1. Soluzione acquosa saturata di cloruro di sodio.

- 3.15.2. Solfato di sodio anidro, granulare.

4. Apparecchiatura

Attenzione: L'uso di vetreria non lavata con acidi può causare perdite di aflatoxina in soluzione acquosa. Particolare attenzione necessitano la vetreria nuova, le pipette Pasteur e la vetreria dei dispensatori automatici come ad esempio le fiale degli autocampionatori. Per questa ragione la vetreria da usare con le soluzioni acquose di aflatoxina dovrà essere immersa in acidi diluiti (ad esempio acido solforico 2 moli/l) per parecchie ore e sciacquata poi bene con acqua distillata per rimuovere ogni traccia di acido (ad esempio tre volte e controllo con cartine al tornasole). In pratica, questo trattamento è necessario per i matracci a fondo tondo (4.4), palloni tarati, cilindri graduati, fiale e provette per soluzioni di calibrazione ed estratti finali (in particolare, fialette per autocampionatori) e pipette Pasteur se usate per il prelievo di soluzioni di calibrazione o di estratti.

- 4.1. Mulino/miscelatore.

- 4.2. Setaccio con fori da 1,0 mm di diametro (ISO R 565).
- 4.3. Agitatore meccanico.
- 4.4. Evaporatore rotante da vuoto, munito di pallone a fondo tondo da 150-250 ml.
- 4.5. Apparecchiatura per cromatografia liquida ad alta risoluzione, iniettore con un avvolgimento a spirale adatto per iniezione da 250 µl. Vedere le istruzioni della ditta costruttrice per il parziale e completo riempimento dell'avvolgimento a spirale.
- 4.6. Colonna analitica per HPLC: C₁₈ impaccata, granuli da 3 o 5 µm.
- 4.7. Pompa a pulsazioni libere per l'erogazione post-colonna della soluzione di iodio.
- 4.8. Tubo a T per volume morto Valco zero, acciaio inossidabile (1/16" × 0,75 mm).
- 4.9. Sistema di reazione a spirale: teflon o acciaio inossidabile. Le dimensioni da 3 000 × 0,5 mm a 5 000 × 0,5 mm sono risultate appropriate in combinazione con colonne HPLC da 3 o 5 µm.
- 4.10. Bagno ad acqua con termostato regolato a 60 °C, capace di una regolazione di temperatura superiore a 0,1 °C.
- 4.11. Rivelatore a fluorescenza, regolato alla lunghezza d'onda di 365 nm di eccitazione ed a 435 nm di emissione (per strumento a filtri utilizzare un filtro con lunghezza d'onda maggiore di 400 nm). Devono essere possibili rivelazioni di almeno 0,05 ng di aflatossina B₁. Una leggera contropressione può essere consigliabile (ad esempio per mezzo di restrizione o connessione dell'uscita del rivelatore con una spirale di teflon o acciaio inossidabile) allo scopo di evitare formazione di bolle d'aria nella fotocellula.
- 4.12. Registratore con stampante.
- 4.13. Integratore elettronico (opzionale).
- 4.14. Filtro di carta piegheggiato di diametro 24 cm del tipo Macherey-Nagel 617 1/4 o equivalente.
- 4.15. Filtro a membrana con porosità 0,45 µm, (HAWP 04700) Millipore o equivalente.
- 4.16. Beuta da 500 ml con tappo a smeriglio.
- 4.17. Colonna di vetro (diametro interno circa 1 cm, lunghezza circa 30 cm) con serbatoio superiore da 50 ml.
- 4.18. Rubinetto di materiale resistente al cloroformio (per esempio Bio-rad 7328017, Analytichem AI 6078, J.T. Baker 4514 o equivalente).
- 4.19. Siringa chimicamente resistente, capacità 10 ml.
- 4.20. Siringa idonea per iniezioni in HPLC di 250 µl.
- 4.21. Microsiringa da 100 µl per la preparazione delle soluzioni di calibrazione (controllare mediante pesata che l'accuratezza sia entro il 2 %).
- 4.22. Palloncini tarati da 10 ml con tappo a smeriglio.
- 4.23. Spettrofotometro, idoneo per misure nella regione UV.
- 4.24. Apparecchiatura per la prova di conferma (6).
- 4.24.1. Imbutto separatore da 100 ml, lavato con acidi, con rubinetto in teflon.
- 4.24.2. Piastra riscaldante, 40-50 °C.
5. Procedimento
- 5.1. Preparazione del campione
Macinare il campione in modo che esso passi attraverso i fori da 1 mm di luce del setaccio (4.2).
- 5.2. Porzione di campione per l'analisi
Pesare 50 g del campione in esame in una beuta (4.16).
- 5.3. Estrazione
Aggiungere 25 g di celite (3.8), 250 ml di cloroformio (3.1) e 25 ml di acqua. Tappare la beuta ed agitare per 30 minuti su agitatore meccanico (4.3). Filtrare su carta da filtro piegheggiata (4.14). Raccogliere 50 ml del filtrato. Per campioni che richiedono diluizioni prelevare un'aliquota del filtrato e diluire fino a 50 ml con cloroformio in modo che la concentrazione di aflatossina B₁ non superi 4 ng/ml.
- 5.4. Purificazione (il procedimento non dovrà subire significative interruzioni)
Attenzione:
— proteggere adeguatamente il laboratorio dove viene eseguita l'analisi dalla luce diurna con i seguenti accorgimenti:

- 1) Fogli assorbenti raggi UV sulla finestra in presenza di luce attenuata (evitare la luce diretta del sole);
 - 2) tende o persiane in combinazione con luce artificiale (sono idonei anche i tubi fluorescenti),
- le soluzioni contenenti aflatossina debbono essere protette il più possibile dalla luce (tenere al buio con fogli di alluminio).

5.4.1. Purificazione con florisil SEP-PAK

5.4.1.1. Preparazione dell'assemblaggio colonna-cartuccia

Attaccare un rubinetto (4.13) al gambo più corto della cartuccia di florisil (3.8) (vedi figura 1). Lavare la cartuccia e rimuovere l'aria con 10 ml di cloroformio facendone passare 8 ml attraverso la cartuccia con l'aiuto di una siringa (4.19). Collegare il gambo lungo della cartuccia alla colonna (4.17) e far passare i rimanenti 2 ml della cartuccia alla colonna. Chiudere il rubinetto. Rimuovere la siringa.

5.4.1.2. Purificazione

Aggiungere il filtrato raccolto in 5.3 alla colonna-cartuccia già assemblate e scaricare per gravità. Lavare con 5 ml di cloroformio (3.1) seguiti da 20 ml di metanolo (3.2). Scartare gli eluati. Durante queste operazioni l'assemblaggio colonna-cartuccia non deve rimanere a secco. Eluire l'aflatossina B₁ con 40 ml della miscela acetone-acqua (3.5.1) e raccogliere l'intero eluato nel pallone da 150 ml dell'evaporatore rotante (4.4). Concentrare l'eluato nell'evaporatore a 40-50 °C sino al termine della distillazione dell'acetone (*NB*: A questo punto rimangono nel pallone circa 0,5 ml di liquido. Prove sperimentali hanno dimostrato che un'ulteriore evaporazione è opportuna e che nei rimanenti 0,5 ml di liquido non c'è significativa traccia di acetone. Residui di acetone potrebbero causare perdite di aflatossina B₁ nella cartuccia C₁₈). Aggiungere 1 ml di metanolo (3.2), agitare il pallone allo scopo di dissolvere l'aflatossina sulle pareti nel pallone, aggiungere 4 ml di acqua e miscelare. Disinserire e scartare la cartuccia. Lavare la colonna di vetro con acqua e conservarla per la successiva purificazione su C₁₈.

5.4.2. Purificazione su SEP-PAK C₁₈

5.4.2.1. Preparazione dell'assemblaggio colonna-cartuccia

Collegare un rubinetto (4.13) al gambo più corto di una cartuccia C₁₈ (3.10) (vedi figura 1). Caricare la cartuccia rimuovendo l'aria e facendo passare rapidamente 10 ml di metanolo (3.2) via rubinetto con l'aiuto della siringa (4.19) (le bolle d'aria nella cartuccia sono visibili come macchie di luce sul fondo altrimenti uniformemente grigiastro). Aspirare 10 ml di acqua e farne passare 8 ml nella cartuccia (nel passaggio da metanolo ad acqua evitare introduzioni di aria nella cartuccia). Collegare il gambo più lungo della cartuccia alla colonna di vetro (4.17) e far passare i rimanenti 2 ml dalla cartuccia alla colonna. Chiudere il rubinetto. Rimuovere la siringa.

5.4.2.2. Purificazione

Trasferire quantitativamente l'estratto raccolto in 5.4.1.2 nella colonna di vetro (4.17) lavando due volte il matraccio con 5 ml della miscela acqua-metanolo (3.5.2) e scaricare per gravità. L'insieme colonna-cartuccia non deve rimanere mai secco. (Se le bolle d'aria si sviluppano in prossimità della cartuccia interrompere il flusso e picchiare la sommità della colonna per rimuovere le bolle d'aria. Poi continuare). Eluire con 25 ml della miscela acqua-metanolo. Scaricare l'eluato. Eluire l'aflatossina B₁ con 50 ml della miscela acqua/acetone (3.5.3), e raccogliere l'intero eluato in un palloncino tarato da 50 ml. Portare a volume con acqua ed agitare: questa soluzione è usata per la cromatografia (5.5).

Attenzione: Generalmente non è necessaria la filtrazione di questo estratto finale. In caso contrario non usare filtri di cellulosa perché causerebbero perdite di aflatossina ma, per esempio, filtri di teflon.

5.5. Cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC)

(Vedi figura 2 per la messa in opera dell'apparecchiatura). Prima dell'uso far condizionare per un tempo sufficiente lo strumento.

Nota 1:

Le velocità di flusso indicate per i solventi ed i reagenti post-colonna sono indicative. Esse possono essere variate in dipendenza del tipo di colonna disponibile.

Nota 2:

I picchi della aflatoxina B₁ dipendono dalla temperatura, quindi si dovrà effettuare una compensazione della deriva (vedi figura 3). Iniettando ad intervalli regolari una quantità fissa dello standard di riferimento di aflatoxina (3.13.3) (per esempio ogni tre iniezioni), i valori dei picchi di aflatoxina B₁ tra due successive iniezioni di standard possono essere corretti usando il valore medio dei risultati, sempreché la differenza fra i due valori delle risposte sia molto piccola (< 10 %). Perciò debbono essere fatte iniezioni senza interruzioni. Se è necessaria un'interruzione, l'ultima iniezione prima dell'interruzione e la prima iniezione dopo l'interruzione devono essere considerate standard di riferimento (3.13.3). Dato che la curva di calibrazione è lineare e passa per l'origine, le quantità di aflatoxina B₁ nei campioni estratti sono determinate direttamente riferendosi agli standards adiacenti.

5.5.1. Messa in funzione della pompa HPLC

Regolare la pompa HPLC (4.5) per avere un flusso di 0,5 o 0,3 ml/min per una colonna HPLC, rispettivamente di μ m o 3 μ m (4.6) usando la fase mobile indicata al punto 3.6.

5.5.2. Messa in funzione della pompa post-colonna

Regolare la pompa (4.7) in modo da avere un flusso di 0,2-0,4 ml/min della soluzione acquosa satura di iodio (3.7). Come guida approssimativa: Flussi di circa 0,4 o 0,2 ml/min circa sono consigliati in combinazione con flussi della fase mobile (3.6) di 0,5 o 0,3 ml/min rispettivamente.

5.5.3. Rivelatore a fluorescenza

Regolare il rivelatore a fluorescenza (4.11) ad un'eccitazione = 365 nm ed un'emissione = 435 nm (per strumenti a filtri, lunghezza d'onda > 400 nm). Regolare l'attenuatore del rivelatore in modo da ottenere, per 1 ng di aflatoxina B₁, circa l'80 % di deflessione dell'intera scala del pennino del registratore.

5.5.4. Iniettore

Iniettare, per tutte le soluzioni, 250 μ l seguendo sempre le indicazioni della ditta costruttrice dello strumento.

5.5.5. Controllo della separazione cromatografica

Iniettare la soluzione di controllo cromatografico (3.14.1). Le valli dei picchi dovrebbero essere meno del 5 % della somma delle altezze dei picchi adiacenti.

5.5.6. Controllo della stabilità del sistema

Prima di ogni serie di analisi iniettare ripetutamente lo standard di riferimento (3.14.3) sino al raggiungimento della stabilità del valore delle aree dei picchi (NB: la risposta dei picchi per l'aflatoxina B₁ tra due iniezioni consecutive dovrà essere meno del 6 %. Procedere senza ritardo con il controllo della linearità) (5.5.7).

5.5.7. Controllo della linearità

Iniettare le soluzioni di calibrazione dell'aflatoxina B₁ (3.13.1-3.13.4). Ogni 3 iniezioni usare lo standard di riferimento (3.13.3) per la correzione della deriva nella risposta (NB: in 90 minuti i valori dei picchi degli standards di riferimento non devono differire più del 10 %). Correggere per la deriva secondo le indicazioni delle formule al punto 7. Il grafico di calibrazione dovrebbe essere lineare e passare per l'origine entro $2 \times$ l'errore standard del valore di Y stimato. I valori trovati non devono differire più del 3 % dei valori teorici. Se quanto richiesto è soddisfatto, proseguire senza ritardo. Se non, identificare e quindi correggere le cause dell'anomalia prima di continuare.

5.5.8. Iniezione dei campioni estratti

Iniettare gli estratti dei campioni purificati (5.4.2.2). Dopo ogni due campioni estratti ripetere l'iniezione dello standard di riferimento (3.13.3) secondo tale sequenza: standard di riferimento, estratto, estratto, standard di riferimento, estratto, estratto, standard di riferimento, ecc.

6. Prova di conferma

6.1. Ulteriore trattamento dell'estratto (5.4.2.2)

Aggiungere 5 ml della soluzione di cloruro di sodio (3.15.1) all'estratto finale ottenuto al punto 5.4.2.2. Estrarre 3 volte con 2 ml di cloroformio (3.1) per 1 minuto, usando un imbuto separatore (4.24.1).

Filtrare gli estratti di cloroformio su 1 gr circa di solfato di sodio (3.15.3) e raccogliere in una provetta da 10 ml. Si può usare un piccolo imbuto (diametro: 4 cm) ponendo un bavaglio di cotone nel punto di restrizione dell'imbuto che viene coperto con 1 gr di solfato di sodio. Lavare lo strato di solfato di sodio con pochi ml di cloroformio che vengono raccolti nella stessa provetta e portati a secco usando la piastra riscaldante (4.24.2) e riprendere con 1 ml di cloroformio.

6.2. Preparazione della derivativa e cromatografia su strato sottile

Vedi D.M. 30 settembre 1976 - Suppl. n. 3, metodo A, punto 5.6.2.

7. Calcolo dei risultati

Calcolare il contenuto dell'aflatossina B₁ (µg/kg) presente nel campione usando la formula:

$$\text{aflatossina B}_1 (\mu\text{g/kg}) = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_i}{V_c}}$$

dove:

m = quantità di aflatossina B₁ in ng, rappresentata dal picco del campione e calcolata nel modo seguente:

$$m = \frac{P(\text{campione})}{P(st_1) + P(st_2)} \times 2 r(st)$$

P(campione)

= area picco aflatossina B₁ del campione

P(st₁)

= area picco aflatossina B₁ risultante dalla precedente iniezione dello standard di riferimento (3.13.3)

P(st₂)

= area picco aflatossina B₁ risultante dalla successiva iniezione dello standard di riferimento (3.13.3)

r(st)

= quantità di aflatossina B₁ dello standard di riferimento (3.13.3) iniettato in g

V_m

= volume del campione estratto iniettato in ml

V_{ext}

= volume finale dell'estratto del campione in ml, conseguente ad ogni diluizione effettuata (vedi punto 5.3)

M

= massa del campione in g

V_i

= volume del filtrato trasferito sulla cartuccia di florisil (5.4.1.2) in ml

V_c

= volume del cloroformio, usato per l'estrazione del campione, in ml

Se il procedimento seguito è lo stesso di questo protocollo, la formula ridotta finale è la seguente:

il contenuto di aflatossina B₁ in (µg/kg) = 20 × m

7.1. Il calcolo dei risultati si può fare anche misurando l'altezza dei picchi.

8. Ripetibilità

Vedi al punto 10.1 (osservazioni).

9. Riproducibilità

Vedi al punto 10.1.

10. Osservazioni

10.1. Precisione

Un studio collaborativo⁽¹⁾, condotto a livello internazionale su mangimi composti, ha fornito i valori relativi alla ripetibilità e riproducibilità, i cui risultati sono indicati in tabella 1. Il termine ripetibilità (r), qui usato, è definito come il rapporto più ampio non significativo al livello di probabilità del 95 %, confrontando due letture dello stesso campione nel medesimo laboratorio alle stesse condizioni. Il termine riproducibilità (R) è definito allo stesso modo confrontando due diversi laboratori. In base a quanto stabilito da ISO 3534-1977, 2.35⁽²⁾ e dalla decisione 89/610/CEE della Commissione⁽³⁾, r e R sono anche indicate in tabella 1 in termini di coefficienti di variazione.

Tabella 1

Ripetibilità (r) e riproducibilità (R) espresse come rapporti e coefficienti di variazione corrispondenti
(15 laboratori)

Livello	r	R	CV ^(*)	CV _r
(µg/kg)			(%)	(%)
8 e 14	1,4	1,7	11	18

(*) CV = coefficiente di variazione.

⁽¹⁾ Egmond, H.P., van, Heisterkamp, S.H. and Paulsch, W.E. (1991). *Food Additives and Contaminants* 8, 17-29.

⁽²⁾ ISO 3534-1977.

⁽³⁾ GU n. L 351 del 2.12.1989, pag. 39.

10.2. *Stabilizzazione del cloroformio (3.1)*

Le caratteristiche di assorbimento della cartuccia di florisil si possono cambiare se vengono usati altri stabilizzatori diversi dall'alcol. Ciò si può verificare in accordo al punto 10.3 quando non è disponibile il cloroformio indicato.

10.3. *Accuratezza*

La corretta applicazione del metodo dovrà essere verificata facendo ripetute analisi su materiali di riferimento certificati. Se questi non sono disponibili, l'idoneità del metodo si verificherà con altre prove di recuperi effettuati su campioni di controllo. La deviazione della media dal valore reale, espressa come percentuale del valore reale, non dovrà porsi fuori dai limiti $- 20 \%$, $+ 10 \%$.

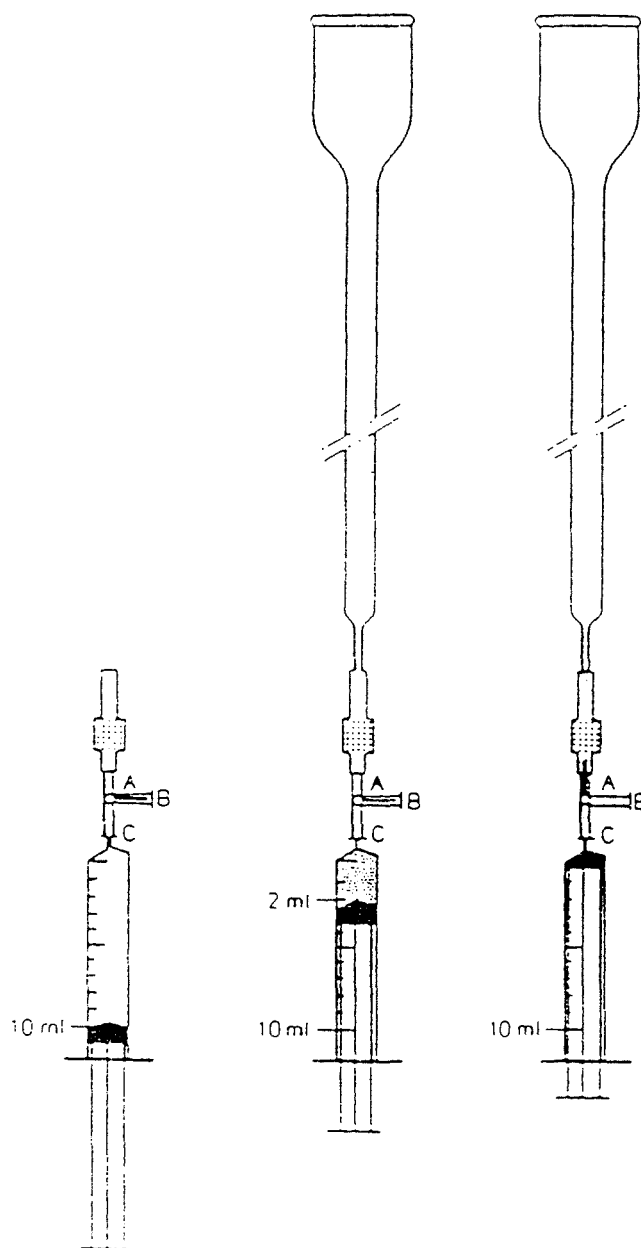
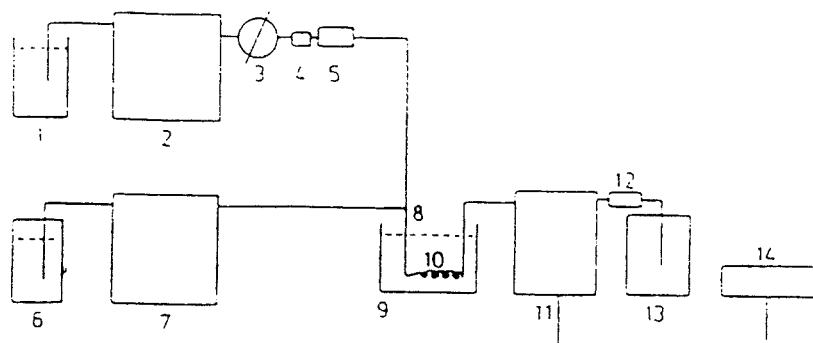


Figura 1. Assemblaggio colonna-cartuccia



- | | |
|------------------------------|--|
| 1. Fase mobile | 8. Giunto a T |
| 2. Pompa | 9. Bagno con controllo termostatico |
| 3. Valvola d'iniezione | 10. Avvolgimento di reazione a spirale |
| 4. Precolonna (saivacolonna) | 11. Rivelatore di fluorescenza |
| 5. Colonna analitica HPLC | 12. Tubo di restringimento |
| 6. Soluzione satura di iodio | 13. Scarico |
| 7. Pompa del reagente | 14. Registratore, integratore |

Figura 2: Diagramma di flusso del sistema di cromatografia liquida (CL) e derivatizzazione post-colonna con iodio

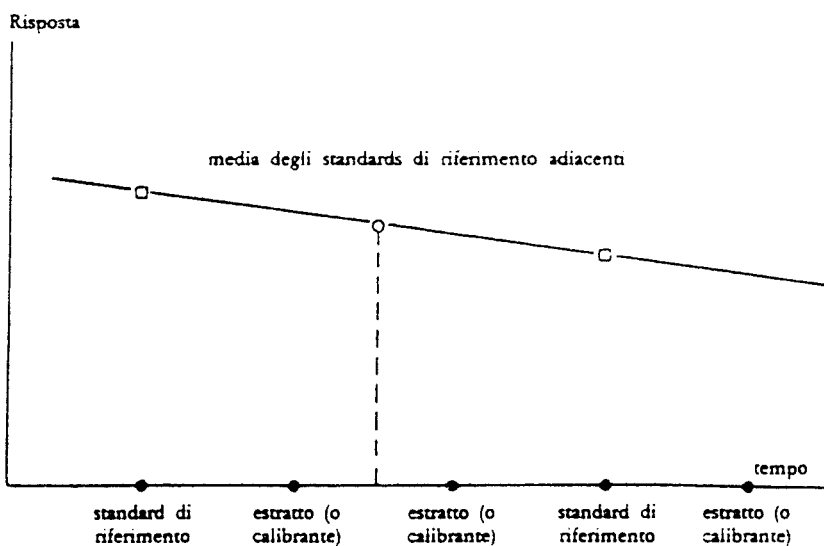


Figura 3: Compensazione per la deriva nella risposta di aflatossina B, all'iniezione dello standard di riferimento (3.3.3) ad intervalli regolari.

DETERMINAZIONE DELLA FIBRA GREZZA

Scopo e campo di applicazione

Questo metodo rende possibile la determinazione nei mangimi della quota di sostanza organica, esente da lipidi, insolubile in mezzi acidi e alcalini e convenzionalmente denominata fibra grezza.

2. Principio

Il campione sgrassato, quando necessario, è trattato in sequenza con soluzioni bollenti di acido solforico e idrossido di potassio a determinate concentrazioni. Il residuo è separato per filtrazione su filtro di vetro sinterizzato, lavato, seccato, pesato ed incenerito tra 475 e 500 °C. La perdita di peso, dopo incenerimento, corrisponde alla fibra grezza presente nel campione in esame.

3. Reattivi

3.1. Acido solforico, $c = 0,13$ moli/L.

3.2. Antischiuma (per esempio n-ottanolo).

3.3. Aiuto-filtrazione (Celite 545 o equivalente) trattato a 500 °C per 4 ore (8.6).

3.4. Acetone.

3.5. Etere di petrolio (per esempio 40-60 °C).

3.6. Acido cloridrico, $c = 0,5$ moli/L.

3.7. Idrossido di potassio, $c = 0,23$ moli/L.

4. Apparecchiature

4.1. Unità a caldo per il trattamento del campione in esame con la soluzione di acido solforico o di idrato di potassio, munita di un supporto per il crogiolo filtrante (4.2) e di un condotto con la valvola a più vie per lo scarico del liquido e per il collegamento al vuoto e possibilmente ad un sistema di ana compressa.

Prima dell'uso, ogni giorno, preriscaldare per cinque minuti l'acqua della caldaia, annessa all'unità per il lavaggio del residuo per il preriscaldamento dei reattivi.

4.2. Crogiolo di vetro filtrante, capacità 50 ml con setto di vetro filtrante sinterizzato di porosità 40-90 μm , condizionato a 500 °C per breve tempo, e raffreddato prima dell'uso.

4.3. Cilindro della capacità di almeno 270 ml portante un refrigerante a ricadere per l'ebollizione.

4.4. Snufa di essiccazione con termostato.

4.5. Forno a muffola con termostato.

4.6. Unità di estrazione a freddo consistente di un supporto per il crogiolo filtrante (4.2) e munita di condotto con valvola per il vuoto e per lo scarico dei liquidi.

4.7. Anelli di connessione in gomma per collegare all'unità a caldo (4.1) il crogiolo (4.2) e il cilindro (4.3) e per collegare all'unità di estrazione a freddo (4.6) il crogiolo.

5. Procedimento

Pesare, con la precisione di 1 mg, 1 g del campione preparato e introdurlo nel crogiolo (4.2) (vedere le osservazioni 8.1, 8.2 e 8.3) ed aggiungere 1 g di aiuto-filtrazione (3.3).

Sistemare il crogiolo nell'unità a caldo (4.1), collegarlo poi al cilindro (4.3). Introdurre nel cilindro a crogiolo, già collegati, 150 ml di acido solforico (3.1) preriscaldato vicino al punto di ebollizione e poche gocce di antischiuma (3.2). Portare il liquido all'ebollizione entro 5 ± 2 minuti e far bollire in modo vigoroso esattamente per 30 minuti.

Aprire la valvola di scarico e filtrare l'acido solforico sotto vuoto (4.1) attraverso il crogiolo filtrante. Lavare il residuo raccolto sul crogiolo tre volte consecutive con porzioni di acqua bollente, impiegandone ogni volta 30 ml, cercare di eliminare sotto vuoto il liquido fino a secchezza dopo ciascun lavaggio.

Disinserire il vuoto e introdurre 150 ml di idrossido di potassio (3.7) preriscaldato vicino al punto di ebollizione, nel cilindro e crogiolo collegati, aggiungere poche gocce di antischiuma (3.2). Portare il liquido all'ebollizione 5 ± 2 minuti e fare bollire in modo vigoroso esattamente per 30 minuti. Filtrare e ripetere le operazioni di lavaggio usate per il trattamento con acido solforico.

Dopo il lavaggio finale e l'essiccazione sotto vuoto, scollegare il crogiolo contenente il residuo e collegarlo all'unità di estrazione a freddo (4.6). Applicare il vuoto e lavare il residuo nel crogiolo 3 volte con acetone (3.4), impiegandone ogni volta 25 ml. Dopo ciascun lavaggio fare sempre in modo che tutto il residuo sia raccolto sul filtro, mantenendo il vuoto fino a completa eliminazione dell'acetone.

Essiccare il crogiolo in stufa a 130 °C fino a peso costante. Raffreddarlo poi in essiccatore e pesarlo rapidamente. Trasferire il crogiolo in muffola ed incenerire il contenuto a 475-500 °C per almeno 30 minuti, sino a peso costante.

Dopo ogni incenerimento raffreddare il crogiolo prima in muffola e poi in essiccatore prima della pesata.

Eseguire una prova in bianco con solo i reattivi. La perdita di peso risultante dopo l'incenerimento non deve superare i 4 mg.

6. Calcolo dei risultati

Il contenuto percentuale di fibra grezza nel campione è dato dall'espressione:

$$\frac{[b-c] \times 100}{a}$$

dove

a = massa del campione in g.

b = perdita della massa dopo incenerimento a 475-500 °C del residuo del campione essiccato a 130 °C in g.

c = perdita della massa dopo incenerimento del residuo del bianco essiccato a 130 °C in g.

7. Ripetibilità

La differenza tra due determinazioni parallelamente effettuate sullo stesso campione non deve eccedere:

— 0,3 valore assoluto per contenuto in fibra grezza più basso del 10 %.

— 3 % sul risultato più elevato, per contenuto in fibra grezza uguale o maggiore di 10 %.

8. Osservazioni

8.1. I mangimi contenenti più del 10 % di lipidi grezzi debbono essere, prima dell'analisi, sgrassati con etere di petrolio (3.5). A tale scopo, porre il crogiolo (4.2) contenente il campione pesato nell'unità di estrazione a freddo (4.6), applicare il vuoto a lavare per tre volte consecutive con 30 ml di etere di petrolio (3.5). Mantenere il crogiolo sotto vuoto fino a completa eliminazione del solvente dal campione, e trasferirlo poi nell'unità di estrazione a caldo (4.1) e continuare come descritto al punto 5.

8.2. I mangimi, contenenti lipidi che non possono essere estratti direttamente con etere di petrolio (3.5), debbono essere sgrassati come indicato al punto 8.1 e sgrassati un'altra volta dopo ebollizione con acido.

Dopo ebollizione con acido e successivo lavaggio, collegare il crogiolo nell'unità di estrazione a freddo (4.6) e lavarlo tre volte con acetone impiegandone ogni volta 30 ml. Lavare poi con etere di petrolio sempre 3 volte con aliquote di 30 ml. Mantenere il campione sotto vuoto fino a completa eliminazione del solvente e continuare l'analisi come descritto al punto 5 iniziando con il trattamento con idrossido di potassio.

8.3. Se i mangimi contengono più del 5 % di carbonati, espressi come carbonato di calcio, porre il crogiolo contenente il campione (4.2) nell'unità di estrazione a caldo (4.1) e lavare il campione tre volte con acido cloridrico (5.6) usando aliquote di 30 ml. Dopo ciascuna addizione lasciare riposare il campione per almeno 1 minuto prima della filtrazione. Lavare una volta con acqua e poi continuare come descritto al punto 5.

8.4. Se viene impiegato un apparecchio a più posti (diversi crogioli posti nella stessa unità a caldo) non deve essere eseguita nella stessa serie di analisi la determinazione in doppio dello stesso campione.

8.5. Se dopo ebollizione è difficile filtrare la soluzione acida o basica, introdurre aria compressa attraverso il condotto di scarico dell'unità a caldo proseguendo poi la filtrazione.

8.6. La temperatura di incenerimento non deve superare i 500 °C allo scopo di allungare la vita dei filtri di vetro dei crogioli. Evitare con attenzione di procurare sbalzi termici durante i cicli di riscaldamento e raffreddamento ai crogioli.

**METODO DI CALCOLO DEL VALORE ENERGETICO DEGLI ALIMENTI COMPOSTI
DESTINATI AL POLLAME**

1. Metodo di calcolo ed espressione del valore energetico

Il valore energetico degli alimenti composti destinati al pollame è calcolato secondo la formula che segue, in base alle percentuali di alcuni componenti analitici degli alimenti; il valore è espresso in megajoules (MJ) di energia metabolizzabile (EM), corretta in azoto, per chilogrammo di alimento composto:

$$\text{MJ/kg di EM} = 0,1551 \times \% \text{ proteina greggia} + 0,3431 \times \% \text{ sostanze grasse gregge} + 0,1669 \times \% \text{ amido} + 0,1301 \times \% \text{ zuccheri totali (espressi in saccarosio)}.$$

2. Tolleranze applicabili ai valori dichiarati

Se, a seguito dei controlli ufficiali, si constata una differenza di valore energetico dell'alimento in più o in meno fra il risultato del controllo e il valore energetico dichiarato, viene applicata una tolleranza minima di 0,4 MJ/kg di EM.

3. Espressione del risultato

Prima applicazione della formula suindicata, il risultato ottenuto è approssimato al primo decimale.

4. Metodi di prelievo dei campioni e metodi d'analisi da applicare

Il prelievo del campione dell'alimento composto e il dosaggio dei tenori dei componenti analitici impiegati nel metodo di calcolo sono effettuati rispettivamente secondo i metodi di prelievo dei campioni e i metodi di analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per animali.

Si devono applicare:

- per il dosaggio delle sostanze grasse gregge: il procedimento B del metodo di cui al D.M. 5.10.1984 suppl. n. 7, GU 30.11.1984, n. 330;
- per il dosaggio dell'amido: il metodo polarimetrico di cui al D.M. 18.07.1975 suppl. n. 2, GU 12.08.1975, n. 214.

L'ispettore generale capo per la repressione delle frodi
GRIMALDI

94A2600