

## **DECRETO 17 luglio 2012**

**Approvazione del metodo ufficiale di analisi per la determinazione del contenuto di vitamina D 3 negli alimenti per gli animali. (12A08560) (GU n. 180 del 3-8-2012 )**

IL DIRETTORE GENERALE

della ex direzione generale della prevenzione

e repressione frodi

del Ministero delle politiche agricole

alimentari e forestali

di concerto con

IL DIRETTORE GENERALE

della sanità animale e dei farmaci veterinari

del Ministero della salute

IL DIRETTORE

dell'agenzia delle dogane

e

IL DIRETTORE GENERALE

per la politica industriale e la competitività

del Ministero dello sviluppo economico

Visti gli articoli 43 del regio decreto-legge 15 ottobre 1925, n. 2033, convertito nella legge 18 marzo 1926, n. 562, recante

disposizioni su «Repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari» e 108 del Regio decreto 1° luglio 1926, n. 1361, recante il regolamento di esecuzione del citato Regio decreto-legge n. 2033/1925, i quali stabiliscono che le analisi dei prodotti e delle sostanze di cui al decreto-legge sono eseguite dai laboratori incaricati con i metodi ufficiali prescritti e adottati da questo Ministero di concerto con il Ministero delle finanze, della sanità e dell'industria commercio e artigianato;

Visto il decreto-legge 18 giugno 1986, n. 282 convertito, con modificazioni, nella legge 7 agosto 1986, n. 462, che all'art. 10 ha previsto l'istituzione dell'Ispettorato centrale repressione frodi presso il Ministero dell'agricoltura e foreste per l'esercizio, tra l'altro, delle funzioni inerenti alla prevenzione e repressione delle infrazioni nella preparazione e nel commercio dei prodotti agroalimentari e delle sostanze di uso agrario e forestale;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 14 febbraio 2012, n. 41, recante «Riorganizzazione del Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali, (omissis)», che all'art. 4 ha previsto per l'Ispettorato centrale l'attuale denominazione di «Dipartimento dell'Ispettorato centrale della tutela della qualità e repressione frodi dei prodotti agro-alimentari» con acronimo ICQRF, riconfermando, tra le competenze allo stesso demandate, le funzioni in materia di aggiornamento delle metodiche ufficiali di analisi dei prodotti agroalimentari e delle sostanze di uso agrario e forestali;

Visto l'art. 2, comma 1, del decreto legislativo 30 luglio 1999, n. 300, così come modificato dal decreto-legge 16 maggio 2008, n. 85

convertito con modificazioni in legge 14 luglio 2008, n. 121, recante «Disposizioni urgenti per l'adeguamento delle strutture di governo in applicazione dell'art. 1, commi 376 e 377, della legge 24 dicembre 2007, n. 244» che stabilisce il numero e la denominazione dei Ministeri;

Visti gli articoli 57, 63 e 68, commi 1, del citato decreto legislativo n. 300/1999, in materia di istituzione delle agenzie fiscali, tra cui «l'Agenzia delle Dogane» e per quest'ultima, l'attribuzione delle competenze nonché l'individuazione delle funzioni di Direttore cui spetta la rappresentanza e la direzione dell'Agenzia delle Dogane medesima;

Vista la legge 13 novembre 2009, n. 172 recante, tra l'altro, l'istituzione del «Ministero della salute» entrata in vigore il 13 dicembre 2009;

Visto il decreto legislativo 30 marzo 2001, n. 165, e successive modificazioni;

Visto il decreto ministeriale 5 maggio 2006 del Ministro delle politiche agricole e forestali pro-tempore, concernente a norma dell'art. 44 della legge 20 febbraio 2006, n. 82, l'istituzione della Commissione consultiva per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi dei prodotti agroalimentari e delle sostanze di uso agrario e forestale, articolata in dieci sottocommissioni con competenze settoriali;

Vista la Direttiva della Presidenza del Consiglio dei Ministri 4 agosto 2010, relativa ad indirizzi interpretativi in materia di riordino degli organismi collegiali e di riduzione dei costi degli apparati amministrativi;

Visto il Regolamento (CE) n. 1831/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio sugli additivi destinati all'alimentazione animale, che individua all'ALLEGATO I, nella categoria degli additivi nutrizionali, le vitamine, in quanto il loro apporto nella dieta favorisce lo sviluppo ed il mantenimento della vita;

Visto il Regolamento (CE) n. 767/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio che disciplina l'immissione e l'uso sul mercato dei mangimi, che prescrive, tra l'altro, specifiche disposizioni di etichettatura in merito al tenore di additivi, soggette a verifica di conformità nell'ambito dei controlli ufficiali;

Visto il Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio in materia di controlli ufficiali nei mangimi e negli alimenti, che dispone all'art. 11 Capo III: «Campionamento ed analisi», che i «metodi di analisi utilizzati nel contesto dei controlli ufficiali sono conformi alle pertinenti norme comunitarie o se tali norme non esistono, a norme o protocolli riconosciuti internazionalmente, (omissis), o quelli accettati dalla legislazione nazionale;» e che «i metodi di analisi devono essere caratterizzati, quando possibile, da opportuni criteri di precisione»;

Visto il Regolamento (CE) n. 152/2009 della Commissione che fissa i metodi campionamento e di analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali, tra i quali non è presente il metodo di dosaggio della vitamina D3;

Visto il Regolamento (CE) n. 887/2009 della Commissione concernente l'autorizzazione di una forma stabilizzata di 25-idrossicolecalciferolo, come additivo per mangimi, che nell'Allegato alla voce «Metodo analitico» riporta, per la

determinazione della vitamina D3 nell'alimento completo,  
l'indicazione della norma EN 12821:2000;

Ritenuto necessario stabilire un metodo di analisi per il controllo  
di detta sostanza anche negli alimenti complementari e nelle  
premiscele;

Sentito il parere della precitata Commissione consultiva per  
l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi dei prodotti  
agroalimentari e delle sostanze di uso agrario e forestale -  
Sottocommissione alimenti per animali, istituita e nominata con  
decreto ministeriale 19 dicembre 2008 n. 1790, da ultimo modificata  
nella composizione con decreto ministeriale 16 dicembre 2011,  
operativa in regime di proroga ai sensi della precitata Direttiva 4  
agosto 2010;

Vista la direttiva 98/34/CE e successive modifiche, che prevede una  
procedura d'informazione nel settore delle norme e regolamentazioni  
tecniche;

Decreta:

Art. 1

1. E' approvato il metodo ufficiale di analisi per la  
determinazione del contenuto di vitamina D3 negli alimenti per  
animali, descritto in allegato al presente decreto.

2. Il campo di applicazione del metodo di cui al comma 1 e'  
riferito a: mangimi composti complementari e premiscele.

Art. 2

Il metodo di analisi di cui al presente decreto si applica al controllo dei prodotti nazionali.

Il presente decreto, che sara' trasmesso al competente organo di controllo, entra in vigore il giorno successivo alla sua pubblicazione nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana.

Roma, 17 luglio 2012

Il direttore generale  
della ex direzione generale della prevenzione  
e repressione frodi  
del Ministero delle politiche agricole  
alimentari e forestali  
Gatto

Il direttore generale  
della sanita' animale e dei farmaci veterinari  
del Ministero della salute  
Ferri

Il direttore  
dell'Agenzia delle dogane  
Peleggi

Il direttore generale  
per la politica industriale e la competitività  
del Ministero dello sviluppo economico  
Bianchi

## ALLEGATO : METODO DI ANALISI

Alimenti per animali - Determinazione della VITAMINA D3 - Metodo RP-HPLC-UV

### 1 Scopo e campo di applicazione

Il metodo consente di determinare il contenuto di vitamina D3 (colecalciferolo) negli alimenti per gli animali.

Il metodo si applica a mangimi composti complementari e premiscele.

Il contenuto in vitamina D3 viene espresso in UI/kg (1 UI = 0,025 ..g di vitamina D3).

Il limite di quantificazione (LOQ) è di 2000 UI/kg.

AVVERTENZA - l'utilizzo del presente metodo può richiedere l'uso di sostanze pericolose o l'esecuzione di operazioni che comportano un certo rischio. Il presente metodo non ha lo scopo di affrontare tutti i problemi di sicurezza connessi col suo impiego, l'utilizzatore è responsabile della definizione di procedure di sicurezza appropriate e del rispetto della legislazione vigente.

### 2. Principio

La vitamina D3 viene determinata per cromatografia liquida ad alta risoluzione in fase inversa (RP-HPLC) utilizzando un rilevatore spettrofotometrico UV, previa idrolisi in soluzione etanolica, estrazione in esano e purificazione su colonnina per estrazione in fase solida.

### 3. Reagenti e materiali

#### 3.1 Etanolo assoluto

#### 3.2 Etanolo 96%

### 3.3 Miscela antiossidanti:

Vitamina C: EDTA: BHT p.a. (10:1:1)

oppure: 100 mg di BHT p.a.

### 3.4 Soluzione acquosa di potassio idrossido al 50%

### 3.5 Acido acetico soluzione acquosa al 10%

### 3.6 Soluzione alcolica di fenolftaleina al 1%

### 3.7 Sodio

### 3.8 Esano p.a.

### 3.9 Isopropanolo per HPLC

### 3.10 Diclorometano per HPLC

### 3.11 Etil acetato per HPLC

### 3.12 Metanolo per HPLC

### 3.13 Miscele diclorometano:isopropanolo:

a= (80:20), b= (99,8:0,2)

### 3.14 Acetonitrile per HPLC

### 3.15 Fase mobile per HPLC: metanolo (3.12):acetonitrile (3.14) 15:85 v/v

### 3.16 Colecalciferolo purissimo

#### 3.16.1 Soluzione madre di vitamina D3 in etanolo concentrazione nominale 250

..g/ml (10.000 UI/ml):

pesare accuratamente 25,0 mg di vitamina D3(colecalciferolo), scioglierli in

etanolo assoluto (3.1) e portare a volume finale di 100 ml in matraccio tarato

di vetro ambrato o coperto da carta stagnola

### 3.17 Olio di semi.

## 4 Attrezzature

### 4.1 Vetreria tarata e graduata da laboratorio (per la misura dei volumi utilizzare

pipette e matracci tarati di classe A o equivalente )

### 4.2 Bagnomaria o mantello riscaldante termoregolabile



#### 4.3 Evaporatore rotante

#### 4.4 Palloni a fondo tondo da 250 ml con cono smerigliato

#### 4.5 Imbuti separatori da 500 ml

#### 4.6 Refrigerante a ricadere con accessorio per flusso di azoto

#### 4.7 Apparecchiatura HPLC con rivelatore spettrofotometrico UV/Vis

#### 4.8 Colonna semipolimerica (tipo Vydac ) 201 TP54 C18 250x4,6/5..m con relativa precolonna o C18 equivalenti

#### 4.9 Colonnina per estrazione in fase solida a base silice: 500 mg con reservoir da 5 ml, attivata con 4 ml della miscela diclorometano:isopropanolo (80:20) (3.13a) e poi con 5 ml della miscela diclorometano:isopropanolo (99,8:0,2) (3.13b)

#### 4.10 Bilancia analitica

### 5 Modo di operare

#### 5.1 Preparazione del campione

animali descritti nel Regolamento (CE) 152/2009 – ALLEGATO II lettera “A. preparazione dei campioni per analisi”.

#### 5.2 Estrazione del campione

Pesare (con l'approssimazione di 0,01 g) da 5 a 20 grammi di campione in un pallone a fondo tondo (4.4), aggiungere 100 ml di etanolo (3.2), 10 ml della soluzione di potassio idrossido (3.4) e una punta di spatola di miscela antiossidanti Vit. C:EDTA:BHT 10:1:1 o 100 mg di BHT (3.3). Inserire il pallone sotto al refrigerante a ricadere (4.6) e riscaldare all'ebollizione in atmosfera di azoto per 30 minuti agitando frequentemente (l'atmosfera di azoto è consigliabile solo in questo passaggio dell'analisi in quanto è la fase più stressante per il campione). Al termine della saponificazione lavare il refrigerante con 50 ml di acqua e quindi raffreddare il pallone in bagno di acqua e ghiaccio.

Trasferire quantitativamente il contenuto del pallone in un imbuto separatore, aggiungere 100 ml di esano (3.8). Agitare per 90”, lasciare separare le fasi e

trasferire quella acquosa in un secondo imbuto separatore. Ripetere l'estrazione della fase acquosa con altri 100 ml di esano (3.8).

Riunire nel primo imbuto separatore gli estratti in esano e lavare con 2 porzioni da 100 ml di acqua, più qualche goccia di acido acetico (3.5) fino a scomparsa della reazione alcalina con saggio alla fenolftaleina (3.6).

Filtrare l'estratto su sodio solfato anidro (3.7) e lavare l'imbuto separatore ed il filtro con esano portando ad un volume di 250 ml (V1). Evaporare a secchezza un'aliquota nota dell'estratto; il volume dell'aliquota (V2) deve essere tale da contenere al massimo 200 UI di vitamina (5,0 ..g) (si usa l'evaporatore rotante nei casi in cui ci siano grossi volumi, per piccole quantità è consigliabile utilizzare l'azoto). Riprendere il residuo con 2 ml di miscela diclorometano:isopropanolo (3.13b).

### 5.3 Purificazione del campione su colonnina SPE

Versare la soluzione preparata, contenente il campione, nella colonnina SPE (4.9) attivata come descritto. Lavare il contenitore della soluzione di vitamina con 1 ml di miscela (3.13b) e trasferire anch'esso in colonnina.

Lavare poi la colonnina con 1 ml della miscela (3.13b) e scartare queste frazioni.

Eluire con 7 ml della miscela (3.13b). Evaporare l'eluato a secchezza e riprendere il residuo con 1 ml di fase mobile (3.15) (V3).

## 6 Preparazione delle soluzioni di taratura

### 6.1 Preparazione delle Soluzioni standard di lavoro:

Trasferire un'aliquota da 5 ml della soluzione madre (3.16.1) in un pallone a fondo tondo (4.4), aggiungere alcune gocce (0,5 ml) di olio di semi (3.17) e procedere come per il campione in 5.2 " Estrazione ", fino ad ottenere i 250 ml di estratto in esano. Prelevare 4 aliquote di volume rispettivamente pari a 2 – 4 – 8 – 16 ml evaporare sotto azoto e riprendere ciascun residuo con 10 ml di fase mobile (3.15) in modo da ottenere 4 soluzioni standard di lavoro di concentrazione

rispettivamente 1- 2- 4 - 8 ..g/ml di vitamina D3.

In alternativa: pesare accuratamente 25,0 mg di colecalciferolo purissimo (3.16) aggiungere 0,5 ml di olio di semi (3.17) e procedere alla saponificazione e all'estrazione in esano come per il campione in 5.2 “ Estrazione”. Prelevare 5 ml dell'estratto, evaporare e portare a 100 ml con la fase mobile (3.15). Da questa soluzione approntare direttamente le soluzioni di lavoro per diluizione.

## 7 Determinazione HPLC

La vitamina D3 viene separata mediante una colonna a fase inversa C18 e la determinazione avviene misurando – tramite un rivelatore UV-Vis - l'area del picco di assorbimento a 265 nm, ottenuto iniettando 50 ..l dell'estratto purificato del campione. La determinazione si effettua con il metodo della standardizzazione esterna; la curva di taratura viene costruita misurando i segnali prodotti iniettando 50 ..l delle soluzioni standard di lavoro (6.1) nell'HPLC.

### Condizioni HPLC

Colonna analitica: Colonna semipolimerica (tipo Vydac ) 201 TP54 C18 250x4,6/5m con relativa precolonna o C18 equivalenti;

Temperatura della colonna: 27 °C;

Fase mobile: miscela di metanolo (3.12):acetonitrile (3.14) 15:85 v/v

Velocità di efflusso: 1,0 ml/min

Rivelatore: UV-Vis (265 nm)

Lavare la colonna con etil acetato (3.11) dopo ciascuna iniezione (il tempo di ritenzione della vitamina D3 determina l'inizio del tempo di lavaggio) avendo cura di effettuare un breve gradiente di velocità di flusso fino a raggiungere un flusso massimo di 2,5 ml/min per 4 minuti.

Condizionare la colonna con la fase mobile prima dell'iniezione successiva, operando anche in questo passaggio un breve gradiente di velocità di flusso fino al flusso di 1,0 ml/min per 4 minuti.

## 8 Calcolo ed Espressione dei risultati

Costruire la curva di taratura riportando sull'asse delle ordinate i valori delle aree dei picchi ottenuti iniettando le soluzioni standard di lavoro e sull'asse delle ascisse le concentrazioni corrispondenti. Dalla misura dell'area del picco ottenuto iniettando la soluzione campione, si calcola la concentrazione di vitamina D3 per interpolazione sulla curva di taratura.

Nel caso in cui la concentrazione di vitamina D3 nel campione risulti maggiore del limite del campo di lavoro ( $1 \div 8 \mu\text{g/ml}$ ) è necessario diluire un volume noto di campione con un volume noto di fase mobile (3.15). Il contenuto di vitamina D3, nel campione, si calcola a partire dalla concentrazione di vitamina D3 misurata nella soluzione campione applicando la seguente equazione:

$V_1$  1000

Contenuto di vitamina D3 UI/kg =  $c \times V_3 \times \frac{V_1}{V_2 \times m} \times 0,025$

dove :

dove :

-  $c$  = concentrazione di vitamina D3 nella soluzione campione espressa in

$\mu\text{g/ml}$

-  $m$  = massa in grammi dell'aliquota del campione sottoposta ad analisi

-  $V_1$  = volume in ml dell'estratto in esano *di cui al punto 5.2*

-  $V_2$  = volume in ml dell'aliquota da purificare *di cui al punto 5.2.1*

-  $V_3$  = volume in ml dell'estratto purificato ripreso con la fase mobile *di cui al punto 5.3*

Il risultato si esprime in UI /kg ( $1 \text{ UI} = 0,025 \mu\text{g}$ )

## 9 Precisione

### 9.1 Risultati statistici di uno studio collaborativo

È stato organizzato uno studio collaborativo (anno 2007) nel quale (8-10) laboratori esperti hanno analizzato due premiscele e tre mangimi composti complementari contenenti diversi livelli di vitamina D3.

Su ciascuna delle cinque matrici di prodotti sono state eseguite tre determinazioni in condizioni di ripetibilità stretta.

I risultati riportati in tabella, sono stati ottenuti secondo criteri di analisi statistica conformi alla norma 5725:2004.

MATRICE MANGIME

COMPLEMENTARE

MANGIME

COMPLEMENTARE

MANGIME

COMPLEMENTARE

PREMISCELA PREMISCELA

valore riferimento (UI/kg) 20.000 77.000 200.000 400.000 1.400.000

MEDIA (UI/kg) 21.400 71.000 185.000 385.000 1.390.000

recupero 107,00% 92,21% 92,50% 96,25% 99,29%

N LABORATORI 8 8 10 9 9

N MISURE 24 24 30 27 27

sigma r (UI/kg) 1.600 6.100 11.000 27.000 79.000

sigma R (UI/kg) 3.800 9.500 26.000 38.000 231.000

r (UI/kg) 4.500 17.300 31.000 76.000 223.000

R (UI/kg) 10.700 26.900 74.000 107.000 653.000

CV% r 7,48% 8,59% 5,95% 7,01% 5,68%

CV% R 17,76% 13,38% 14,05% 9,87% 16,62%

Legenda

- sigma r = scarto tipo di ripetibilità
- sigma R = scarto tipo di riproducibilità
- r = limite di ripetibilità
- R = limite di riproducibilità

- CV % r = coefficiente di variazione percentuale di ripetibilità.
- CV % R = coefficiente di variazione percentuale di riproducibilità.

#### *10 Appendice informativa*

- La colonnina (4.9) posta su sostegno e lasciata fluire a caduta ha una velocità di eluizione di circa 1 ml/min. Attenzione a non mandare a secco .
- Durante l'estrazione con esano, se si verifica il formarsi di emulsione, aggiungere alcuni ml di etanolo per romperla.
- Quando è necessario evaporare tutto l'estratto: evaporare fino a secchezza, riprendere con 10 ml di esano. Prelevare 5 ml di questa soluzione, evaporare e riprendere con 2 ml di miscela diclorometano:isopropanolo (3.13b). Non viene usato tutto l'estratto in quanto il carico di frazioni che interferiscono è superiore alla tenuta della colonnina.
- Il carico massimo della SPE è 5 □g di vitamina .
- .. Il lavaggio della colonna C18 con etil-acetato è necessario sempre.
- .. La purificazione su SPE è utile farla anche su campioni a concentrazione alta di vitamina D3, a meno che non si tratti di mangimi con contenuti > 10.000.000 UI/kg.
- .. Le soluzioni standard si controllano con una misura spettrofotometrica in etanolo a 265nm - E 1% 1cm 450

#### 11 Riferimenti bibliografici

- Staffas & Nyman : Journal of AOAC International Vol. 86, No.2, 2003
- AOAC Method 2002.05 Determination of Cholecalciferol in Selected Food
- Euro FIR guidelines for assessment of methods of Analysis –  
Nutrient – vitamin D3, vitamina D2
- Sliva et Al : Journal of AOAC International vol.75, No.3, 1992