

DECRETO 20 febbraio 2006

Approvazione del metodo ufficiale di analisi per la determinazione della vitamina B1 negli alimenti per animali - Supplemento n. 19.

Gazzetta Ufficiale n. 50 del 1-3-2006

IL MINISTERO DELLE POLITICHE
AGRICOLE E FORESTALI

Ispettorato centrale repressione frodi
di concerto con

IL MINISTERO DELL'ECONOMIA
E DELLE FINANZE

IL MINISTERO DELLA SALUTE

IL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE

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 di esecuzione dello stesso R.D.L., approvato con regio decreto 1° luglio 1926, n. 1361, i quali prescrivono che le analisi occorrenti in applicazione delle norme contenute nelle suddette disposizioni nazionali dovranno essere eseguite dai laboratori incaricati con i metodi prescritti da questo Ministero, di concerto con il Ministero delle finanze, il Ministero della sanita' ed il Ministero dell'industria, del commercio e dell'artigianato;

Visti gli articoli 110, 111 e 112 del decreto del Presidente della Repubblica 12 febbraio 1965, n. 162, che prevedono, rispettivamente, l'istituzione presso questo Ministero di una commissione di studio per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi relativi ai prodotti disciplinati dal citato R.D.L., la presenza in qualita' di componenti di detta commissione di rappresentanti dei Ministeri concertanti e di enti o istituti specializzati nei settori e la possibilita' che la commissione stessa sia articolata in sottocommissioni composte da esperti competenti per singole materie;

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 delle 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 18 gennaio 1988, che tra le funzioni attribuite alle divisioni dell'Ispettorato centrale repressione frodi ha previsto l'elaborazione ed aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi per i prodotti agroalimentari e le sostanze di uso agrario e forestale;

Visto il decreto-legge 11 gennaio 2001, n. 1, convertito, con modificazioni, nella legge 9 marzo 2001, n. 49, che all'art. 3, comma 3, stabilisce che l'Ispettorato centrale repressione frodi e' posto alle dirette dipendenze del Ministro delle politiche agricole e forestali, opera con organico proprio ed autonomia organizzativa ed amministrativa e costituisce un autonomo centro di responsabilita' di spesa;

Visto il decreto del Ministro delle politiche agricole e forestali 13 febbraio 2003, n. 44, modificato con il decreto 11 novembre 2004, n. 294, con il quale, ai sensi dell'art. 2 della legge 19 gennaio

2001, n. 3, e' stato emanato il Regolamento di riorganizzazione della struttura operativa dell'Ispettorato centrale repressione frodi, riconfermando, tra le funzioni attribuite agli uffici dell'amministrazione centrale, l'elaborazione e l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi per i prodotti agroalimentari e le sostanze di uso agrario e forestale;

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

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 2 novembre 2001, n. 433, concernente il Regolamento di attuazione di talune direttive in materia di additivi nell'alimentazione animale, il quale, agli articoli 17 e 18, prescrive che il contenuto delle vitamine diverse dalla A, D ed E, deve essere indicato in etichetta qualora dette sostanze sono aggiunte alle premiscele ed agli alimenti per animali e sono dosabili secondo metodi ufficiali di analisi;

Visto il decreto legislativo 17 giugno 2003, n. 223, relativo all'organizzazione dei controlli ufficiali nel settore dell'alimentazione animale, che impone in fase di commercializzazione il controllo ufficiale degli additivi, delle premiscele e degli alimenti per animali in relazione all'identita' ed al contenuto degli additivi incorporati;

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 devono essere caratterizzati, quando possibile, da opportuni criteri di precisione;

Visto il decreto ministeriale 21 settembre 1971, con il quale sono stati approvati i «Metodi ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico», modificati ed integrati da ultimo con il decreto ministeriale 9 settembre 2004 - Supplemento n. 18;

Ritenuto necessario integrare la raccolta dei suddetti metodi ufficiali nazionali con un metodo di analisi, rapido e preciso, idoneo al controllo del contenuto della vitamina B1 aggiunta alle premiscele ed agli alimenti per animali;

Considerato il decreto del Ministero della sanita' 21 febbraio 2001, con il quale sono state fissate le tolleranze in caso di divergenze tra il risultato del controllo ufficiale ed il tenore dichiarato, nelle premiscele e negli alimenti per animali, degli additivi appartenenti al gruppo delle vitamine, tra cui la vitamina B1;

Sentita la sottocommissione per l'aggiornamento periodico dei metodi ufficiali di analisi relativi agli alimenti per gli animali, nominata con decreto ministeriale 28 settembre 2000;

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 relativo alla determinazione del contenuto di vitamina B1 nelle premiscele e negli alimenti per animali, descritto nel Supplemento n. 19, allegato al presente decreto.

2. Il metodo descritto nell'allegato al presente decreto si applica al controllo dei prodotti nazionali.

Art. 2.

Il presente decreto sarà pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana ed entra a far parte della raccolta ufficiale dei metodi nazionali.

Il presente decreto entra in vigore il giorno successivo alla sua pubblicazione.

Roma, 20 febbraio 2006

p. Il Ministero delle politiche agricole e forestali

- L'ispettore Generale Capo per la repressione delle frodi

Lo Piparo

p. Il Ministero dell'economia e delle finanze

Il Direttore generale dell'Agenzia delle dogane

Guaiana

p. Il Ministero della salute -

Il Direttore generale della sanità veterinaria e degli alimenti

Marabelli

p. Il Ministero delle attività produttive

Il Direttore generale per lo sviluppo produttivo

e la competitività

Goti

Allegato

METODI DI ANALISI PER IL CONTROLLO UFFICIALE DEGLI ALIMENTI PER ANIMALI

Supplemento n. 19

Determinazione della vitamina B1

DETERMINAZIONE DELLA VITAMINA B1

1. Scopo e campo di applicazione.

Il metodo serve per la determinazione della vitamina B1 negli alimenti per animali e nelle premiscele.

Il limite di quantificazione è 5 mg/kg.

2. Principio.

La vitamina viene estratta a caldo con acido cloridrico diluito, ossidata a tiocromo, purificata e quindi determinata mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione a fase inversa (RP-HPLC) utilizzando un rivelatore a fluorescenza.

3. Reagenti e materiali.

3.1. Acido cloridrico 37% p.a.

3.1.1. Soluzione 0,01 N

3.1.2. Soluzione 1 N

3.1.3. Soluzione 6 N

3.2. Acqua per HPLC

3.3. Sodio acetato 3H₂O p.a.

3.3.1. Soluzione acquosa 2,5 M

3.4. Acido tricloroacetico p.a.

3.4.1. Soluzione acquosa al 50%

3.5. Sodio idrossido p.a.

3.5.1. Soluzione acquosa al 15%

3.6. Ferricianuro di potassio [K₃Fe(CN)₆] p.a.

3.7. Reattivo ossidante (preparare al momento dell'uso):
soluzione all'1% di ferricianuro di potassio (3.6.) in sodio idrossido (3.5.1.)

- 3.8. Potassio fosfato bibasico anidro (K_2HPO_3) p.a.
- 3.9. Acido ortofosforico 85% p.a.
- 3.10. Tampone fosfato 5 mM a pH 7,0: g 0,871 di potassio fosfato bibasico (3.8.) in 800 ml di acqua (3.2.);
aggiustare a pH 7,0 con acido ortofosforico (3.9.) e portare a 1000 ml con acqua. (3.2.)
- 3.11. Acetonitrile per HPLC
- 3.12. Metanolo per HPLC
- 3.13. Soluzione di lavaggio per cartucce SPE: soluzione al 5% di metanolo (3.12.) in tampone fosfato (3.10.) (v/v)
- 3.14. Fase mobile: miscela tampone fosfato (3.10.): acetonitrile (3.11.) 70 30 (v/v)
- 3.15. Tiamina cloridrato purissimo
 - 3.15.1. Soluzione standard stock: pesare 50 mg di tiamina (3.15.) con l'approssimazione di 0,1 mg in un matraccio tarato da 100 ml, sciogliere con HCl 0,01 N (3.1.1.) e portare a volume. La soluzione, conservata al buio in frigorifero, e' stabile 1 mese
- 3.16. Cartine indicatrici di pH
- 3.17. Filtri di carta rapidi
- 3.18. Cartucce per purificazione SPE C18 500 mg

4. Strumentazione.

- 4.1. Bagno termostatico ad acqua od autoclave
- 4.2. Cromatografo liquido con rivelatore fluorimetrico
 - 4.2.1. Colonna C18 ODS2 250x4,6 mm con relativa precolonna

5. Modo di operare.

5.1. Preparazione del campione.

Per la preparazione dell'aliquota da sottoporre ad analisi, procedere come indicato nei metodi di analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per animali di cui al decreto ministeriale 25 maggio 1982 - punto 1 del Supplemento n. 6- pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 265 del 25 settembre 1982.

5.2. Estrazione del campione:

5.2.1. Pesare (con l'approssimazione di 0,01g) da 5 a 20 grammi di campione, a seconda del contenuto di vitamina B1, in un matraccio da 200 ml. Aggiungere 100 ml di HCl 1 N (3.1.2.). Agitare per 15 minuti, verificare con la cartina (3.16.) che il pH sia inferiore a 3; altrimenti aggiungere 5 ml di HCl 6 N (3.1.3.), agitare per 15 minuti e verificare di nuovo il pH; se necessario, procedere con ulteriori aggiunte di HCl 6 N (3.1.3.).

5.2.2. Porre il matraccio in bagno termostatico ad acqua bollente od in autoclave in corrente di vapore per 5 minuti. Aggiungere 10 ml di soluzione di sodio acetato (3.3.1.) e agitare. Aggiungere 2 ml di soluzione di acido tricloroacetico (3.4.1.). Scaldare a 90°C per 15 minuti. Raffreddare, portare a volume con acqua e filtrare su filtro di carta (3.17.). Il filtrato, puo' essere utilizzato il giorno seguente se conservato in frigorifero.

5.3. Ossidazione del campione.

Porre in un matraccio da 20 ml un'aliquota del filtrato, eventualmente diluito con acqua, contenente da 5 a 10µg di vitamina B1 e portare il volume a 10 ml con acqua; aggiungere 5 ml di reattivo ossidante (3.7.), agitare per 60 secondi esatti, aggiungere 1 ml di acido ortofosforico (3.9.) mescolare e portare a volume con acqua.

5.4. Purificazione del campione.

Attivare la cartuccia SPE (3.18.) facendo passare 2 ml di metanolo (3.12.), seguiti da 2 ml di acqua (3.2.). Far passare

attraverso la cartuccia 5 ml di soluzione preparata come in (5.3.), lavare la cartuccia con 3 ml di soluzione di lavaggio (3.13.) scartando l'eluato ed evitando di mandare a secco la cartuccia. Eluire il tiocromo con 5 ml di metanolo (3.12.), raccogliere l'eluato in un matraccio da 5 ml e portare a volume con metanolo.

6. Preparazione delle soluzioni di taratura.

6.1. Preparazione delle soluzioni standard di lavoro: porre 1 ml della soluzione standard stock (3.15.1.) in un matraccio da 100 ml e portare a volume con acqua, da questa soluzione preparare le soluzioni standard di lavoro aventi concentrazioni comprese tra 0,5 e 2,5 µg/ml.

6.2. Ossidazione.

Porre 5 ml di ciascuna soluzione standard di lavoro (6.1.) in un matraccio da 20 ml, aggiungere 5 ml di acqua e 5 ml di reattivo ossidante (3.7.), agitare per 60 secondi esatti, aggiungere 1 ml di acido ortofosforico (3.9.) mescolare e portare a volume.

6.3. Purificazione.

Per ciascuna soluzione standard di lavoro procedere come al punto (5.4.).

7. Cromatografia.

Iniettare 50 µl delle soluzioni come preparate in (5.4.) e (6.3.) nel cromatografo, alle seguenti condizioni di lavoro: temperatura della colonna: ambiente; velocità di flusso della fase mobile: 0,6 ml/min.; rivelazione fluorimetrica: λ di eccitazione: 360 nm, λ di emissione: 430 nm.

8. Calcolo dei risultati.

Determinare la concentrazione di vitamina B1 in µg/ml nella soluzione campione, interpolando sulla curva di taratura, costruita riportando sulle ascisse i valori delle aree dei picchi corrispondenti alle soluzioni standard e sulle ordinate le relative concentrazioni, il valore dell'area del picco della soluzione campione. Il contenuto di vitamina B1 del campione (C) espresso in mg/kg si ottiene tenendo conto delle diluizioni effettuate in base alla seguente formula:

$$C \text{ (mg/kg)} = c * d/m$$

dove:

c = contenuto in vitamina B1 (µg/ml) della soluzione campione, ottenuto per interpolazione

d = fattore di diluizione

m = massa, in grammi, dell'aliquota del campione sottoposta ad analisi.

9. Risultati statistici di uno studio collaborativo.

E' stato organizzato uno studio collaborativo (anno 2003) nel quale 11 laboratori hanno analizzato una premiscela, un mangime minerale complementare ed un mangime completo (8 laboratori). Su ogni tipologia di prodotto sono state eseguite 3 determinazioni.

La seguente tabella riporta i risultati ottenuti: