

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI

DECRETO 28 luglio 2000

**Approvazione dei metodi di analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per animali
- Supplemento n. 17.**

L'ISPETTORE GENERALE CAPO PER LA REPRESSIONE DELLE FRODI di concerto con I Ministri delle finanze, della sanita' e dell'industria, del commercio e dell'artigianato

Visto il decreto legislativo 4 giugno 1997, n. 143, relativo al "Conferimento alle regioni delle funzioni amministrative in materia di agricoltura e pesca e riorganizzazione dell'Amministrazione centrale", ed in particolare l'art. 2 che istituisce il Ministero per le politiche agricole, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 129 del 5 giugno 1997;

Visto il decreto legislativo 30 luglio 1999, n. 300, inerente alla "Riforma dell'organizzazione del Governo, a norma dell'art. 11 della legge 15 marzo 1997, n. 59, ed in particolare l'art. 33, comma 1, con il quale il Ministro per le politiche agricole e il Ministero per le politiche agricole assumono rispettivamente la denominazione Ministro delle politiche agricole e forestali e Ministero delle politiche agricole e forestali;

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 di esecuzione dello stesso regio decreto-legge, approvato con regio decreto 10 luglio 1926, n. 1361, i quali prescrivono che le analisi occorrenti in applicazione delle norme contenute nel regio decreto-legge e nel regolamento suddetti 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;

Visto il decreto legislativo 23 novembre 1998, n. 460, di attuazione della direttiva 95/53/CE relativa all'organizzazione dei controlli ufficiali nel settore dell'alimentazione animale e, in particolare, l'art. 11, comma 1-b), il quale dispone che gli accertamenti analitici sono effettuati in conformita' a quanto previsto dalle metodiche comunitarie di riferimento;

Vista la direttiva n. 2000/45/CE della Commissione del 6 luglio 2000, che fissa i metodi di analisi comunitari per i controlli ufficiali degli alimenti per animali e delle premiscele, per quanto riguarda il loro contenuto di vitamina A, vitamina E e triptofano;

Visto il decreto ministeriale 9 novembre 1971, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 308 del 6 dicembre 1971, con il quale sono stati approvati i "Metodi ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico", modificati ed integrati da ultimo con decreto ministeriale 6 dicembre 1999 - Supplemento n. 16;

Visto il decreto ministeriale 30 settembre 1999, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 118 del 23 maggio 2000, cui e' allegato, in materia di metodi di analisi, il supplemento n. 15, con il quale all'art. 2, comma 2, sono stati soppressi, in attuazione della direttiva 99/27/CE, alcuni metodi inerenti al controllo ufficiale degli alimenti per animali tra i quali la determinazione del retinolo (vitamina A);

Ritenuto necessario adottare le opportune disposizioni per conformare le succitate norme nazionali a quelle comunitarie previste dalla predetta direttiva n. 2000/45/CE;

Sentita la commissione per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi per i prodotti agrari e le sostanze di uso agrario - sottocommissione alimenti per il bestiame di cui al decreto ministeriale 11 febbraio 1981, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 204 del 27 luglio 1981, rinnovata, da ultimo, per quanto attiene alla sottocommissione alimenti per il bestiame, col

decreto ministeriale 20 novembre 1995, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 18 del 23 gennaio 1996, e successive modificazioni;

Decreta:

Art. 1.

Sono approvati i "Metodi di analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per animali" descritti nel supplemento n. 17, allegato al presente decreto.

Art. 2.

Il presente decreto sara' inviato al competente organo di controllo per la registrazione ed entra a far parte della raccolta ufficiale dei metodi nazionali.

Il presente decreto sara' pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana.

Roma, 28 luglio 2000

L'ispettore generale capo per la repressione delle frodi del Ministero delle politiche agricole e forestali Lo Piparo

Il direttore generale del Dipartimento delle dogane e imposte indirette del Ministero delle finanze Guaiana

Il direttore generale del Dipartimento alimentare nutrizione e sanita' pubblica veterinaria del Ministero della sanita' Marabelli

Il direttore generale per lo sviluppo e la competitivita' del Ministero dell'industria del commercio e dell'artigianato Visconti

METODI DI ANALISI PER IL CONTROLLO UFFICIALE
DEGLI ALIMENTI PER ANIMALI

Supplemento n. 17

- Determinazione della vitamina A
- Determinazione della vitamina E
- Determinazione del triptofano

DETERMINAZIONE DELLA VITAMINA A

1. Finalità e campo d'applicazione

Il metodo serve per la determinazione della vitamina A (retinolo) negli alimenti per animali e nelle premiscele. La vitamina A comprende l'alcole retinilico tutto trans e i suoi isomeri cis che vengono determinati con tale metodo. Il contenuto di vitamina A viene espresso in unità internazionali (UI) per kg. Una UI corrisponde all'attività di 0,300 µg di alcole di vitamina A tutto trans oppure 0,344 µg di acetato di vitamina A tutto trans oppure 0,550 µg di palmitato di vitamina A tutto trans.

Il limite di determinazione è di 2000 UI di vitamina A/kg.

2. Principio

Il campione viene idrolizzato con una soluzione etanolica di idrossido di potassio e la vitamina A viene estratta in etere di petrolio. Il solvente viene rimosso per evaporazione ed il residuo viene disciolto in metanolo e, se necessario, diluito alla concentrazione richiesta. Il contenuto di vitamina A viene determinato per cromatografia liquida ad alta risoluzione a fase inversa (RP-HPLC) utilizzando un rivelatore UV o a fluorescenza. I parametri cromatografici vengono scelti in modo che non vi sia separazione tra l'alcole di vitamina A tutto trans e i suoi isomeri cis.

3. Reattivi

- 3.1. Etanolo, $\sigma = 96\%$
- 3.2. Etere di petrolio, intervallo di ebollizione: 40°C - 60°C
- 3.3. Metanolo
- 3.4. Soluzione di idrossido di potassio, $\beta = 50$ g/100 ml
- 3.5. Soluzione di ascorbato di sodio, $\beta = 10$ g/100 ml (cfr. osservazioni 7.7)
- 3.6. Solfuro di sodio, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
 - 3.6.1. Soluzione di solfuro di sodio, $c = 0,5$ mol/l in glicerolo, $\beta = 120$ g/l (per $x = 9$) (cfr. osservazioni 7.8)
- 3.7. Soluzione di fenolftaleina, $\beta = 2$ g/100 ml in etanolo (3.1)
- 3.8. 2-propanolo
- 3.9. Fase mobile per HPLC: miscela di metanolo (3.3) e acqua, ad esempio 980 + 20 (v + v). Il rapporto esatto sarà determinato dalle caratteristiche della colonna utilizzata
- 3.10. Azoto, senza ossigeno
- 3.11. Acetato di vitamina A tutto trans, purissimo, di attività certificata, ad esempio $2,80 \times 10^6$ UI/g
 - 3.11.1. Soluzione di riserva di acetato di vitamina A tutto trans: in un matraccio tarato da 100 ml pesare (a meno di 0,1 mg) 50 mg di acetato di vitamina A (3.11). Sciogliere in 2-propanolo (3.8) e portare a volume con lo stesso solvente. La concentrazione nominale di questa soluzione è di 1400 UI di

vitamina A/ml. il contenuto esatto deve essere determinato conformemente a 5.6.3.1.

- 3.12. Palmitato di vitamina A tutto trans, purissimo, di attività certificata, ad esempio $1,80 \times 10^6$ UI/g
 - 3.12.1. Soluzione di riserva di palmitato di vitamina A tutto trans: in un matraccio tarato da 100 ml pesare (a meno di 0,1 mg) 80 mg di palmitato di vitamina A (3.12). Sciogliere in 2-propanolo (3.8) e portare a volume con lo stesso solvente. La concentrazione nominale di questa soluzione è di 1400 UI di vitamina A/ml. Il contenuto esatto deve essere determinato conformemente a 5.6.3.2.
- 3.13. 2,6-di-tert-butil-4-metilfenolo (BHT) (cfr. osservazioni 7.5).

4. Apparecchiatura

- 4.1. Evaporatore rotante sotto vuoto
- 4.2. Vetreria in vetro ambra
 - 4.2.1. Matracci a fondo piatto o beute, da 500 ml, con base di vetro smerigliato
 - 4.2.2. Matracci tarati con tappi di vetro smerigliato, a collo piccolo, da 10, 25, 100 e 500 ml
 - 4.2.3. Imbuti separatori, conici, da 1000 ml, con tappi di vetro smerigliato
 - 4.2.4. Matracci a pera, da 250 ml, con base di vetro smerigliato
- 4.3. Condensatore Allihn, lunghezza tubo di raffreddamento 300 mm, con giunzione di vetro smerigliato, con adattatore per tubo di alimentazione gas
- 4.4. Carta filtro pieghettata per separazione di fase; diametro: 185 mm (ad esempio Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. Apparecchiatura HPLC con dispositivo di iniezione
 - 4.5.1. Colonna analitica da 250 mm \times 4 mm, C₁₈ riempimento 5 o 10 μ m, o equivalente (criterio della prestazione: soltanto un unico picco per tutti gli isomeri di retinolo in condizioni HPLC)
 - 4.5.2. Rivelatore UV o a fluorescenza, con regolazione lunghezza d'onda variabile
- 4.6. Spettrofotometro con celle al quarzo da 10 mm
- 4.7. Bagno in acqua con agitatore magnetico
- 4.8. Il dispositivo di estrazione (cfr. figura 1) è costituito da:
 - 4.8.1. Cilindro di vetro della capacità di 1 l, con collo e tappo di vetro smerigliato
 - 4.8.2. Insert di vetro smerigliato con braccio laterale e tubo adattabile che attraversa la parte centrale. Il tubo adattabile dovrebbe avere la terminazione inferiore ad U ed un beccuccio alla terminazione opposta, in modo che lo strato liquido superiore nel cilindro possa essere trasferito in un imbuto separatore.

5. *Modo di operare*

Nota: La vitamina A è sensibile alla luce ultravioletta e all'ossidazione. Tutte le operazioni devono essere effettuate in assenza di luce (utilizzando vetreria di vetro ambra o vetreria protetta con foglio di alluminio) e di ossigeno (con un getto di azoto). Durante l'estrazione, l'aria presente sopra il liquido deve essere sostituita con azoto (evitare una pressione eccessiva alzando ogni tanto il tappo).

5.1. Preparazione del campione

Frantumare il campione affinché passi attraverso un vaglio da 1 mm, facendo attenzione che non venga prodotto calore. La frantumazione deve essere effettuata immediatamente prima della pesatura e della saponificazione, altrimenti si possono verificare perdite di vitamina A.

5.2. Saponificazione

A seconda del contenuto di vitamina A, pesare (a meno di 0,01 g) da 2 g a 25 g di campione in un matraccio o beuta da 500 ml (4.2.1). Aggiungere, rimestando ogni volta, 130 ml di etanolo (3.1), circa 100 mg di BHT (3.13), 2 ml di soluzione di ascorbato di sodio (3.5) e 2 ml di soluzione di solfuro di sodio (3.6). Inserire un condensatore (4.3) nel matraccio e immergere quest'ultimo in un bagno d'acqua con agitatore magnetico (4.7). Portare ad ebollizione e consentire il riflusso per 5 minuti. Aggiungere 25 ml di soluzione di idrossido di potassio (3.4) attraverso il condensatore (4.3) e consentire il riflusso per altri 25 minuti, agitando con una lenta corrente di azoto. Risciacquare il condensatore con circa 20 ml di acqua e lasciare raffreddare il contenuto del matraccio a temperatura ambiente.

5.3. Estrazione

Trasferire quantitativamente per decantazione la soluzione di saponificazione risciacquando con un volume totale di 250 ml di acqua in un imbuto separatore da 1000 ml (4.2.3) o nel dispositivo di estrazione (4.8). Risciacquare il matraccio di saponificazione più volte con 25 ml di etanolo (3.1) e 100 ml di etere di petrolio (3.2) e trasferire i residui nell'imbuto separatore o nel dispositivo di estrazione. Il rapporto di acqua ed etanolo nelle soluzioni combinate deve essere di circa 2:1. Agitare energicamente per 2 minuti e lasciare riposare per 2 minuti.

5.3.1. Estrazione con imbuto separatore (4.2.3)

Quando gli strati si sono separati (cfr. osservazione 7.3) trasferire lo strato dell'etere di petrolio in un altro imbuto separatore (4.2.3). Ripetere questa estrazione due volte, con 100 ml di etere di petrolio (3.2) ed altre due volte con 50 ml di etere di petrolio (3.2).

Lavare due volte gli estratti combinati nell'imbuto separatore rimestando delicatamente (per evitare la formazione di emulsione) con aliquote di 100 ml di acqua e quindi agitando ripetutamente con altre aliquote di 100 ml di acqua finché l'acqua risulti incolore con l'aggiunta di soluzione di fenoltaleina (3.7) (di norma sono sufficienti quattro successivi lavaggi). Filtrare l'estratto, lavato attraverso un filtro asciutto per separazione di fase (4.4) per rimuovere eventuale acqua sospesa, in un matraccio tarato da 500 ml (4.2.2). Risciacquare l'imbuto separatore ed il filtro con 50 ml di etere di petrolio (3.2), portare a volume con etere di petrolio (3.2) e mescolare bene.

5.3.2. Estrazione con apparecchiatura per estrazione (4.8)

Quando gli strati si sono separati (cfr. osservazione 7.3) sostituire il tappo del cilindro di vetro (4.8.1) con l'inserto di vetro smerigliato (4.8.2) e disporre la terminazione inferiore ad U del tubo adattabile in modo che risulti appena al di sopra del livello dell'interfaccia. Applicando una pressione con getto d'azoto nel braccio laterale, trasferire lo strato superiore dell'etere di petrolio in un imbuto separatore da 1000 ml (4.2.3). Aggiungere 100 ml di etere di petrolio (3.2) nel cilindro di vetro, tappare e scuotere bene. Lasciare che gli strati si separino e trasferire lo strato superiore nell'imbuto separatore come prima. Ripetere la procedura di estrazione con altri 100 ml di etere di petrolio (3.2), ed altre due volte con aliquote di 50 ml di etere di petrolio (3.2); aggiungere gli strati di etere di petrolio nell'imbuto separatore.

Lavare gli estratti di etere di petrolio combinati come descritto al punto 5.3.1. e procedere come ivi indicato.

5.4. Preparazione della soluzione campione per HPLC

Pipettare un'aliquota della soluzione di etere di petrolio (da 5.3.1 o da 5.3.2) in un matraccio a pera da 250 ml (4.2.4). Far evaporare il solvente sin quasi all'essiccazione nell'evaporatore rotante (4.1), a pressione ridotta, ad una temperatura del bagno non superiore a 40°C. Ripristinare la pressione atmosferica facendovi fluire azoto (3.10) e togliere il matraccio dall'evaporatore. Togliere il solvente rimanente con un flusso di azoto (3.10) e disciogliere il residuo immediatamente in un volume noto (10-100 ml) di metanolo (3.3) (la concentrazione di vitamina A deve situarsi nell'intervallo da 5 UI/ml a 30 UI/ml).

5.5. Determinazione HPLC

La vitamina A viene separata su una colonna a fase inversa C_{18} (4.5.1) e la concentrazione viene misurata mediante rivelatore UV (325 nm) o a fluorescenza (eccitazione: 325 nm, emissione: 475 nm) (4.5.2).

Iniettare un'aliquota (ad esempio 20 μ l) della soluzione di metanolo ottenuta secondo 5.4 ed eluire con la fase mobile (3.9). Calcolare l'altezza media di picco (area) di diverse iniezioni della stessa soluzione campione e le altezze medie di picco di diverse iniezioni delle soluzioni di taratura (5.6.2).

Condizioni HPLC

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

| | |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Colonna analitica (4.5.1): | 250 mm \times 4 mm, C_{18} riempimento 5 o 10 μ m, o equivalente |
| Fase mobile (3.9): | Miscela di metanolo (3.3) ed acqua ad esempio 980 + 20 (v + v) |
| Velocità di flusso: | 1-2 ml/min |
| Rivelatore (4.5.2): | Rivelatore UV (325 nm) o a fluorescenza (eccitazione: 325 nm, emissione: 475 nm) |

5.6. Taratura

5.6.1. Preparazione delle soluzioni madre di lavoro

Pipettare 20 ml della soluzione di riserva di acetato di vitamina A (3.11.1) o 20 ml della soluzione di riserva di palmitato di vitamina A (3.12.1) in un matraccio a fondo piatto o in una beuta da 500 ml (4.2.1) e idrolizzare come indicato in 5.2, ma senza aggiunta di BHT. Successivamente, estrarre con etere di petrolio (3.2) secondo 5.3 e portare a 500 ml con etere di petrolio (3.2.). Fare evaporare 100 ml di questo estratto nell'evaporatore (cfr. 5.4) sin quasi all'essiccazione, togliere il solvente rimanente con una corrente di azoto (3.10) e ridisciogliere il residuo in 10,0 ml di metanolo (3.3). La concentrazione nominale di questa soluzione è di 560 UI di vitamina A/ml. Il contenuto esatto dovrà essere determinato secondo 5.6.3.3. La soluzione madre di lavoro deve essere preparata estemporaneamente prima dell'uso.

Pipettare 2,0 ml di questa soluzione madre di lavoro in un matraccio tarato da 20 ml, portare a volume con metanolo (3.3) e mescolare. La concentrazione nominale di questa soluzione madre di lavoro diluita è 56 UI di vitamina A/ml.

5.6.2. Preparazione delle soluzioni di taratura e della curva di taratura

In una serie di matracci tarati da 20 ml trasferire 1,0 ml, 2,0 ml, 5,0 ml e 10,0 ml di soluzione madre di lavoro diluita; portare a volume con metanolo (3.3) e mescolare. Le concentrazioni nominali di queste soluzioni sono 2,8; 5,6; 14,0 e 28,0 UI di vitamina A/ml.

Iniettare varie volte 20 µl di ogni soluzione di taratura e determinare le altezze medie di picco (aree). Utilizzando le altezze medie di picco tracciare una curva di taratura tenendo presente i risultati del controllo UV (5.6.3.3).

5.6.3. Standardizzazione UV delle soluzioni madre

5.6.3.1. Soluzione di riserva di acetato di vitamina A

Pipettare 2,0 ml della soluzione di riserva di acetato di vitamina A (3.11.1) in un matraccio tarato da 50 ml (4.2.2) e portare a volume con 2-propanolo (3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è 56 UI di vitamina A/ml. Pipettare 3,0 ml di questa soluzione di acetato di vitamina A diluita in un matraccio graduato da 25 ml e portare a volume con 2-propanolo (3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è 6,72 UI di vitamina A/ml. Misurare lo spettro UV di questa soluzione su 2-propanolo (3.8) nello spettrofotometro (4.6) tra 300 e 400 nm. Il massimo di estinzione deve situarsi tra 325 e 327 nm.

Calcolo del contenuto di vitamina A:

$$\text{UI di vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$\left(E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ per acetato di vitamina A} = 1530 \text{ a } 326 \text{ nm in } 2\text{-propanolo} \right)$$

5.6.3.2. Soluzione di riserva di palmitato di vitamina A

Pipettare 2,0 ml della soluzione madre di palmitato di vitamina A (3.12.1) in un matraccio tarato da 50 ml (4.2.2) e portare a volume con 2-propanolo (3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è 56 UI di vitamina A/ml. Pipettare 3,0 ml di questa soluzione di palmitato di vitamina A diluita in un matraccio tarato da 25 ml e portare a volume con 2-propanolo (3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è 6,72 UI di vitamina A/ml. Misurare lo spettro UV di questa soluzione su 2-propanolo (3.8) nello spettrofotometro (4.6) tra 300 e 400 nm. Il massimo di estinzione deve situarsi tra 325 e 327 nm.

Calcolo del contenuto di vitamina A:

$$\text{UI di vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$\left(E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ per palmitato di vitamina A} = 957 \text{ a } 326 \text{ nm in } 2\text{-propanolo} \right)$$

5.6.3.3. Soluzione madre di lavoro di vitamina A

Pipettare 3,0 ml della soluzione madre di lavoro di vitamina A non diluita, preparata secondo 5.6.1, in un matraccio tarato da 50 ml (4.2.2) e portare a volume con 2-propanolo (3.8). Pipettare 5,0 ml di questa soluzione in un matraccio tarato da 25 ml e portare a volume con 2-propanolo (3.8). La concentrazione nominale di questa soluzione è di 6,72 UI di vitamina A/ml. Misurare lo spettro UV di questa soluzione su 2-propanolo (3.8) nello spettrofotometro (4.6) tra 300 nm e 400 nm. Il massimo di estinzione deve situarsi tra 325 nm e 327 nm.

Calcolo del contenuto di vitamina A:

$$\text{UI di vitamina A/ml} = E_{325} \times 18,3$$

$$\left(E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ per vitamina A alcole} = 1821 \text{ a } 325 \text{ nm in } 2\text{-propanolo} \right)$$

6. Calcolo dei risultati

Partendo dall'altezza (area) media dei picchi della vitamina A della soluzione campione, determinare la concentrazione della soluzione campione in UI/ml riportandosi alla curva di taratura (5.6.2).

Il contenuto w di vitamina A (in UI/kg) del campione è dato dalla seguente formula:

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V_2 \cdot 1000}{V_1 \cdot m} \text{ [UI/kg]}$$

dove:

β = concentrazione di vitamina A nella soluzione campione (5.4.), in UI/ml

V_1 = volume della soluzione campione (5.4) in ml

V_2 = volume dell'aliquota prelevata come al punto 5.4, in ml

m = massa dell'aliquota analizzata, in g

7. Osservazioni

- 7.1. Per campioni con debole concentrazione di vitamina A può essere utile riunire gli estratti di etere di petrolio delle due cariche di saponificazione (quantità pesata: 25 g) in una soluzione campione, per la determinazione HPLC.
- 7.2. Il peso del campione prelevato per l'analisi non deve contenere più di 2 g di grassi.
- 7.3. Se non ha luogo la separazione delle fasi, aggiungere circa 10 ml di etanolo (3.1) affinché l'emulsione si rompa.
- 7.4. Con olio di fegato di merluzzo ed altri grassi puri, il tempo di saponificazione deve essere portato a 45-60 minuti.
- 7.5. In sostituzione del BHT si può utilizzare idrochinone.
- 7.6. Utilizzando una colonna a fase normale, è possibile la separazione degli isomeri del retinolo.
- 7.7. In sostituzione della soluzione di ascorbato di sodio si possono utilizzare circa 150 mg di acido ascorbico.
- 7.8. In sostituzione della soluzione di solfuro di sodio possono essere utilizzati circa 50 mg di EDTA.

8. Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare il 15% del risultato più elevato.

9. Risultati di uno studio collaborativo (1)

| | Premiscela | Premiscela alimento | Concentrato minerale | Alimento proteico | Alimento per suinetti |
|------------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|
| L | 13 | 12 | 13 | 12 | 13 |
| n | 48 | 45 | 47 | 46 | 49 |
| media [UI/kg] | $17,02 \times 10^6$ | $1,21 \times 10^6$ | 537.100 | 151.800 | 18.070 |
| s _r [UI/kg] | $0,51 \times 10^6$ | $0,039 \times 10^6$ | 22.080 | 12.280 | 682 |
| r [UI/kg] | $1,43 \times 10^6$ | $0,109 \times 10^6$ | 61.824 | 34.384 | 1.910 |
| CV _r [%] | 3,0 | 3,5 | 4,1 | 8,1 | 3,8 |
| s _R [UI/kg] | $1,36 \times 10^6$ | $0,069 \times 10^6$ | 46.300 | 23.060 | 3.614 |
| R [UI/kg] | $3,81 \times 10^6$ | $0,193 \times 10^6$ | 129.640 | 64.568 | 10.119 |
| CV _R [%] | 8,0 | 6,2 | 8,6 | 15 | 20 |

L: numero di laboratori

n: numero di valori singoli

s_r: deviazione standard della ripetibilità

s_R: deviazione standard riproducibilità

r: ripetibilità

R: riproducibilità

CV_r: coefficiente di variazione della ripetibilità

CV_R: coefficiente di variazione della riproducibilità

¹ Studio effettuato dal gruppo di lavoro Alimenti per animali del Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

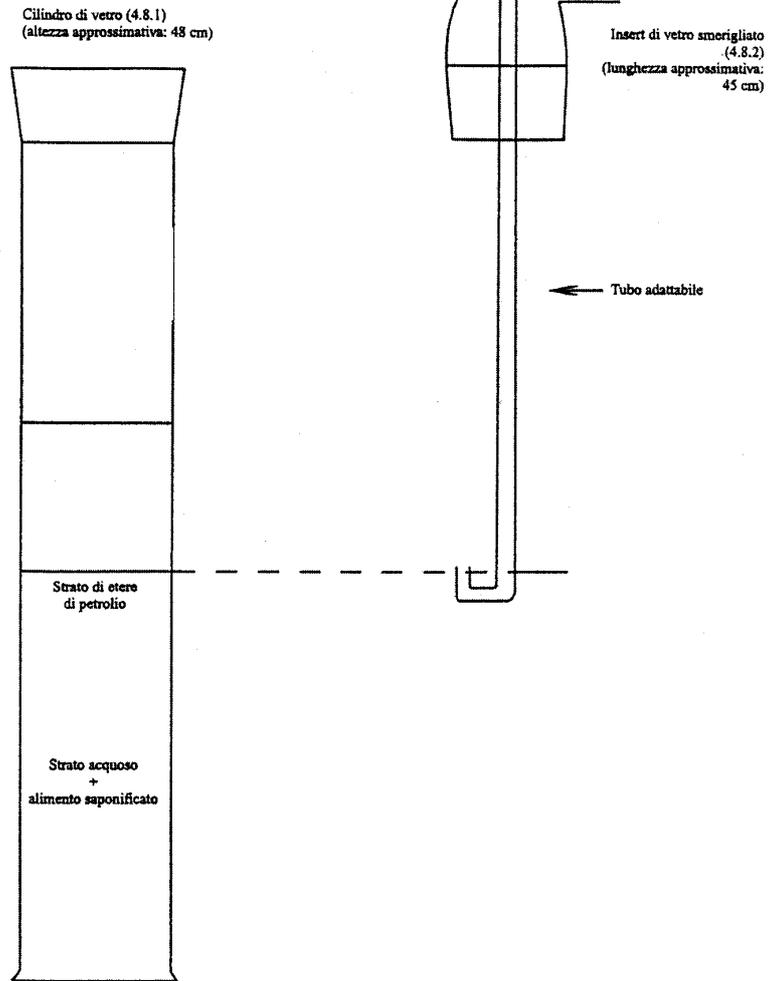


Figura 1: Apparecchiatura per estrazione (4.8)

DETERMINAZIONE DELLA VITAMINA E

1. Finalità e campo d'applicazione

Il metodo serve per la determinazione della vitamina E negli alimenti per animali e nelle premiscele. Il contenuto di vitamina E viene espresso in mg di acetato di DL- α -tocoferolo per kg. 1 mg di acetato di DL- α -tocoferolo corrisponde a 0,91 mg di DL- α -tocoferolo (vitamina E).

Il limite di determinazione è di 2 mg di vitamina E/kg.

2. Principio

Il campione viene idrolizzato con una soluzione etanolica di idrossido di potassio e la vitamina E viene estratta in etere di petrolio. Il solvente viene rimosso per evaporazione ed il residuo viene disciolto in metanolo e, se necessario, diluito alla concentrazione richiesta. Il contenuto di vitamina E viene determinato per cromatografia liquida ad alta risoluzione a fase inversa (RP-HPLC) utilizzando un rivelatore UV o a fluorescenza.

3. Reattivi

- 3.1. Etanolo, $\sigma = 96\%$
- 3.2. Etere di petrolio, intervallo di ebollizione: 40°C-60°C
- 3.3. Metanolo
- 3.4. Soluzione di idrossido di potassio, $\beta = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- 3.5. Soluzione di ascorbato di sodio, $\beta = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (cfr. osservazioni 7.7)
- 3.6. Solfuro di sodio, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
 - 3.6.1. Soluzione di solfuro di sodio, $c = 0,5 \text{ mol}/\text{l}$ in glicerolo, $\beta = 120 \text{ g}/\text{l}$ (per $x = 9$) (cfr. osservazioni 7.8)
- 3.7. Soluzione di fenoltaleina, $\beta = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ in etanolo (3.1)
- 3.8. Fase mobile per HPLC: miscela di metanolo (3.3) e acqua, ad esempio 980 + 20 (v + v). Il rapporto esatto sarà determinato dalle caratteristiche della colonna utilizzata.
- 3.9. Azoto, senza ossigeno
- 3.10. Acetato di DL- α -tocoferolo, purissimo, di attività certificata
 - 3.10.1. Soluzione di riserva di acetato di DL- α -tocoferolo: in un matraccio tarato da 100 ml, pesare (a meno di 0,1 mg) 100 mg di acetato di DL- α -tocoferolo (3.10). Sciogliere in etanolo (3.1) e portare a volume con lo stesso solvente. 1 ml di questa soluzione contiene 1 mg di acetato di DL- α -tocoferolo. (Per il controllo UV, cfr. punto 5.6.1.3; per la stabilizzazione cfr. osservazioni, punto 7.4).
- 3.11. DL- α -tocoferolo, purissimo, di attività certificata
 - 3.11.1. In un matraccio tarato da 100 ml pesare (a meno di 0,1 mg) 100 mg di DL- α -tocoferolo (3.10). Sciogliere in etanolo (3.1) e portare a volume con lo

stesso solvente. 1 ml di questa soluzione contiene 1 mg di DL- α -tocoferolo. (Per il controllo UV, cfr. punto 5.6.2.3; per la stabilizzazione cfr. osservazioni, punto 7.4).

3.12. 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenolo (BHT) (cfr. osservazioni 7.5).

4. *Apparecchiatura*

- 4.1. Evaporatore rotante sotto vuoto
- 4.2. Vetreria in vetro ambra
 - 4.2.1. Matracci a fondo piatto o beute, da 500 ml, con base di vetro smerigliato
 - 4.2.2. Matracci tarati con tappi di vetro smerigliato, a collo piccolo, da 10, 25, 100 e 500 ml
 - 4.2.3. Imbuti separatori, conici, da 1000 ml, con tappi di vetro smerigliato
 - 4.2.4. Matracci a pera, da 250 ml, con base di vetro smerigliato
- 4.3. Condensatore Allihn, lunghezza tubo di raffreddamento 300 mm, con giunzione di vetro smerigliato, con adattatore per tubo di alimentazione gas
- 4.4. Carta filtro pieghettata per separazione di fase; diametro 185 mm (ad esempio Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. Apparecchiatura HPLC, con dispositivo di iniezione
 - 4.5.1. Colonna analitica da 250 mm \times 4 mm, C₁₈, riempimento 5 o 10 μ m, o equivalente
 - 4.5.2. Rivelatore UV o a fluorescenza, con regolazione lunghezza d'onda variabile
- 4.6. Spettrofotometro con celle al quarzo da 10 mm
- 4.7. Bagno in acqua con agitatore magnetico
- 4.8. Il dispositivo di estrazione (cfr. figura 1) è costituito da:
 - 4.8.1. Cilindro di vetro della capacità di 1 l, con collo e tappo di vetro smerigliato
 - 4.8.2. Insert di vetro smerigliato con braccio laterale e tubo adattabile che attraversa la parte centrale. Il tubo adattabile deve avere la terminazione inferiore ad U ed un beccuccio alla terminazione opposta, in modo che lo strato liquido superiore nel cilindro possa essere trasferito in un imbuto separatore.

5. *Modo di operare*

Nota: La vitamina E è sensibile alla luce ultravioletta e all'ossidazione. Tutte le operazioni devono essere effettuate in assenza di luce (utilizzando vetreria di vetro ambra o vetreria protetta con foglio di alluminio) e di ossigeno (con un getto di azoto). Durante l'estrazione, l'aria presente sopra il liquido deve essere sostituita con azoto (evitare una pressione eccessiva alzando ogni tanto il tappo).

- 5.1. Preparazione del campione
Frantumare il campione affinché passi attraverso un vaglio da 1 mm, facendo attenzione che non venga prodotto calore. La frantumazione deve essere effettuata immediatamente prima della pesatura e della saponificazione, altrimenti si possono verificare perdite di vitamina E.

5.2. Saponificazione

A seconda del contenuto di vitamina E, pesare (a meno di 0,01 g) da 2 g a 25 g di campione in un matraccio o beuta da 500 ml (4.2.1). Aggiungere, rimestando ogni volta, 130 ml di etanolo (3.1), circa 100 mg di BHT (3.12), 2 ml di soluzione di ascorbato di sodio (3.5) e 2 ml di soluzione di solfuro di sodio (3.6). Inserire il condensatore (4.3) nel matraccio ed immergere quest'ultimo in un bagno d'acqua con agitatore magnetico (4.7). Portare ad ebollizione e consentire il riflusso per 5 minuti. Aggiungere 25 ml di soluzione di idrossido di potassio (3.4) attraverso il condensatore (4.3) e consentire il riflusso per altri 25 minuti, agitando con una lenta corrente di azoto. Risciacquare il condensatore con circa 20 ml di acqua e lasciare raffreddare il contenuto del matraccio a temperatura ambiente.

5.3. Estrazione

Trasferire quantitativamente per decantazione la soluzione di saponificazione risciacquando con un volume totale di 250 ml di acqua in un imbuto separatore da 1000 ml (4.2.3) o nel dispositivo di estrazione (4.8). Risciacquare il matraccio di saponificazione più volte con 25 ml di etanolo (3.1) e 100 ml di etere di petrolio (3.2) e trasferire i residui nell'imbuto separatore o nel dispositivo di estrazione. Il rapporto di acqua ed etanolo nelle soluzioni combinate deve essere di circa 2:1. Agitare energicamente per 2 minuti e lasciare riposare per 2 minuti.

5.3.1. Estrazione con imbuto separatore (4.2.3)

Quando gli strati sono separati (cfr. osservazione 7.3) trasferire lo strato dell'etere di petrolio in un altro separatore (4.2.3). Ripetere questa estrazione due volte, con 100 ml di etere di petrolio (3.2) ed altre due volte con 50 ml di etere di petrolio (3.2).

Lavare due volte gli estratti combinati nell'imbuto separatore rimestando delicatamente (per evitare la formazione di emulsione) con aliquote di 100 ml di acqua e quindi agitando ripetutamente con altre aliquote di 100 ml di acqua finché l'acqua risulti incolore con l'aggiunta di soluzione di fenoltaleina (3.7) (di norma sono sufficienti quattro successivi lavaggi). Filtrare l'estratto, lavato attraverso un filtro asciutto per separazione di fase (4.4) per rimuovere eventuale acqua sospesa, in un matraccio tarato da 500 ml (4.2.2). Risciacquare l'imbuto separatore ed il filtro con 50 ml di etere di petrolio (3.2), portare a volume con etere di petrolio (3.2) e mescolare bene.

5.3.2. Estrazione con apparecchiatura per estrazione (4.8)

Quando gli strati si sono separati (cfr. osservazione 7.3) sostituire il tappo del cilindro di vetro (4.8.1) con l'insert di vetro smerigliato (4.8.2) e disporre la terminazione inferiore ad U del tubo adattabile in modo che risulti appena al di sopra del livello dell'interfaccia. Applicando una pressione con getto d'azoto nel braccio laterale, trasferire lo strato superiore dell'etere di petrolio in un imbuto separatore da 1000 ml (4.2.3). Aggiungere 100 ml di etere di petrolio (3.2) nel cilindro di vetro, tappare e scuotere bene. Lasciare che gli strati si separino e trasferire lo strato

superiore nell'imbuto separatore come prima. Ripetere la procedura di estrazione con altri 100 ml di etere di petrolio (3.2), ed altre due volte con aliquote di 50 ml di etere di petrolio (3.2); aggiungere gli strati di etere di petrolio nell'imbuto separatore.

Lavare gli estratti di etere di petrolio combinati come descritto al punto 5.3.1 e procedere come ivi indicato.

5.4. Preparazione della soluzione campione per HPLC

Pipettare un'aliquota della soluzione di etere di petrolio (da 5.3.1 o da 5.3.2) in un matraccio a pera da 250 ml (4.2.4). Far evaporare il solvente sin quasi all'essiccazione nell'evaporatore rotante (4.1), a pressione ridotta, ad una temperatura del bagno non superiore a 40°C. Ripristinare la pressione atmosferica facendovi fluire azoto (3.9) e togliere il matraccio dall'evaporatore. Togliere il solvente rimanente con un flusso di azoto (3.9) e disciogliere il residuo immediatamente in un volume noto (10-100 ml) di metanolo (3.3) (la concentrazione di DL- α -tocoferolo deve situarsi nell'intervallo da 5 μ g/ml a 30 μ g/ml).

5.5. Determinazione HPLC

La vitamina E viene separata su una colonna a fase inversa C₁₈ (4.5.1) e la concentrazione viene misurata mediante rivelatore a fluorescenza (eccitazione: 295 nm, emissione: 330 nm) (4.5.2) o un rivelatore UV (292 nm) (4.5.2).

Iniettare un'aliquota (ad esempio 20 μ l) della soluzione di metanolo ottenuta secondo 5.4 ed eluire con la fase mobile (3.8). Calcolare le altezze (aree) di picco di diverse iniezioni della stessa soluzione campione e le altezze (aree) medie di picco di diverse iniezioni delle soluzioni di taratura (5.6.2).

Condizioni HPLC

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

Colonna analitica (4.5.1): 250 mm \times 4 mm, C₁₈, riempimento 5 o 10 μ m, o equivalente

Fase mobile (3.8): Miscela di metanolo (3.3) ed acqua ad esempio 980 + 20 (v + v)

Velocità di flusso: 1-2 ml/min

Rivelatore (4.5.2): Rivelatore a fluorescenza (eccitazione: 295 nm, emissione: 330 nm) o rivelatore UV (292 nm)

5.6. Taratura (acetato di DL- α -tocoferolo o DL- α -tocoferolo)

5.6.1. Standard di acetato di DL- α -tocoferolo

5.6.1.1. Preparazione della soluzione madre di lavoro

Pipettare 25 ml della soluzione di riserva di acetato di DL- α -tocoferolo (3.10.1) in un matraccio a fondo piatto o in una beuta da 500 ml (4.2.1) e idrolizzare come indicato in 5.2. Successivamente, estrarre con etere di petrolio (3.2) secondo 5.3 e portare a 500 ml con etere di petrolio. Far evaporare 25 ml di questo estratto nell'evaporatore (cfr. 5.4) sin quasi

all'essiccazione, togliere il solvente rimanente con una corrente di azoto (3.9) e ridisciogliere il residuo in 25,0 ml di metanolo (3.3). La concentrazione nominale di questa soluzione è di 45,5 µg di DL-α-tocoferolo/ml, equivalente a 50 µg di acetato di DL-α-tocoferolo/ml. La soluzione madre di lavoro deve essere preparata estemporaneamente prima dell'uso.

5.6.1.2. Preparazione delle soluzioni di taratura e della curva di taratura

In una serie di matracci tarati da 20 µl trasferire 1,0, 2,0, 4,0 e 10,0 ml di soluzione madre di lavoro; portare a volume con metanolo (3.3) e mescolare. Le concentrazioni nominali di queste soluzioni sono 2,5, 5,0, 10,0 e 25,0 µg/ml di acetato di DL-α-tocoferolo e cioè 2,28, 4,55, 9,10 e 22,8 µg/ml di DL-α-tocoferolo.

Iniettare varie volte 20 µl di ogni soluzione di taratura e determinare le altezze medie di picco (aree). Utilizzando le altezze medie di picco tracciare una curva di taratura.

5.6.1.3. Standardizzazione UV della soluzione di riserva di acetato di DL-α-tocoferolo (3.10.1)

Diluire 5,0 ml della soluzione di riserva di acetato di DL-α-tocoferolo (3.10.1) sino a 25,0 ml con etanolo e misurare lo spettro UV di questa soluzione su etanolo (3.1), nello spettrofotometro (4.6) tra 250 e 320 nm.

Il massimo di assorbimento deve situarsi a 284 nm:

$$E_{1cm}^{1\%} = 43,6 \text{ a } 284 \text{ nm in etanolo}$$

A questa diluizione si deve ottenere un valore di estinzione compreso tra 0,84 e 0,88.

5.6.2. Standard di DL-α-tocoferolo

5.6.2.1. Preparazione della soluzione madre di lavoro

Trasferire con pipetta 2 ml della soluzione di riserva di DL-α-tocoferolo (3.11.1) in un matraccio tarato da 50 ml, sciogliere in metanolo (3.3) e portare a volume con metanolo. La concentrazione nominale di questa soluzione è 40 µg di DL-α-tocoferolo/ml, equivalente a 44,0 µg di acetato di DL-α-tocoferolo/ml. La soluzione madre di lavoro deve essere preparata estemporaneamente prima dell'uso.

5.6.2.2. Preparazione delle soluzioni di taratura e della curva di taratura

In una serie di matracci tarati da 20 ml trasferire 1,0, 2,0, 4,0 e 10,0 ml della soluzione madre di lavoro, portare a volume con metanolo (3.3) e miscelare. Le concentrazioni nominali di queste soluzioni sono 2,0; 4,0; 8,0 e 20,0 µg/ml di DL-α-tocoferolo e cioè 2,20; 4,40; 8,79 µg/ml e 22,0 µg/ml di acetato di DL-α-tocoferolo. Iniettare varie volte 20 µl di ogni soluzione di taratura e determinare le altezze medie di picco (aree). Utilizzando le altezze medie di picco tracciare una curva di taratura.

5.6.2.3. Standardizzazione UV della soluzione di riserva di DL- α -tocoferolo (3.11.1)

Diluire 2,0 ml della soluzione di riserva di DL- α -tocoferolo (3.11.1) sino a 25,0 ml con etanolo e misurare lo spettro UV di questa soluzione su etanolo (3.1) nello spettrofotometro (4.6) tra 250 nm e 320 nm. Il massimo di assorbimento dovrebbe situarsi a 292 nm:

$$E_{1cm}^{1\%} = 75,8 \text{ a } 292 \text{ nm in etanolo}$$

A questa diluizione si dovrebbe ottenere un valore di estinzione di 0,6.

6. Calcolo dei risultati

Partendo dall'altezza media dei picchi (area) della vitamina E della soluzione campione, determinare la concentrazione della soluzione campione in $\mu\text{g/ml}$ (calcolata come acetato di α -tocoferolo) riportandosi alla curva di taratura (5.6.1.2 o 5.6.2.2).

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

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V_2}{V_1 \cdot m} [\text{mg} / \text{kg}]$$

dove:

β = concentrazione di vitamina E nella soluzione campione (5.4.), in $\mu\text{g/ml}$

V_1 = volume della soluzione (5.4) in ml

V_2 = volume dell'aliquota prelevata come al punto 5.4, in ml

m = massa dell'aliquota analizzata, in g

7. Osservazioni

7.1. Per campioni con debole concentrazione di vitamina E può essere utile riunire gli estratti di etere di petrolio delle due cariche di saponificazione (quantità pesata: 25 g) in una soluzione campione, per la determinazione HPLC.

7.2. Il peso del campione prelevato per l'analisi non deve contenere più di 2 g di grassi.

7.3. Se non ha luogo la separazione delle fasi, aggiungere circa 10 ml di etanolo (3.1) affinché l'emulsione si rompa.

7.4. Dopo la misurazione spettrofotometrica dell'acetato di DL- α -tocoferolo o della soluzione di DL- α -tocoferolo secondo 5.6.1.3 o, rispettivamente, 5.6.2.3, aggiungere circa 10 mg di BHT (3.12) nella soluzione (3.10.1 o 3.10.2) e conservare la soluzione in frigorifero (tempo massimo di conservazione: 4 settimane).

7.5. In sostituzione del BHT si può utilizzare idrochinone.

- 7.6. Utilizzando una colonna a fase normale, è possibile la separazione tra α -, β -, χ - e δ -tocoferolo.
- 7.7. In sostituzione della soluzione di ascorbato di sodio si possono utilizzare circa 150 mg di acido ascorbico.
- 7.8. In sostituzione della soluzione di solfuro di sodio possono essere utilizzati circa 50 mg di EDTA.

8. Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare il 15% del risultato più elevato.

9. Risultati di uno studio collaborativo (1)

| | Premiscela | Premiscela alimento | Concentrato minerale | Alimento proteico | Alimento per suinetti |
|---------------------|------------|---------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|
| L | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| n | 48 | 48 | 48 | 48 | 48 |
| media [mg/kg] | 17.380 | 1.187 | 926 | 315 | 61,3 |
| s_r [mg/kg] | 384 | 45,3 | 25,2 | 13,0 | 2,3 |
| r [mg/kg] | 1.075 | 126,8 | 70,6 | 36,4 | 6,4 |
| CV _r [%] | 2,2 | 3,8 | 2,7 | 4,1 | 3,8 |
| s_R [mg/kg] | 830 | 65,0 | 55,5 | 18,9 | 7,8 |
| R [mg/kg] | 2.324 | 182,0 | 155,4 | 52,9 | 21,8 |
| CV _R [%] | 4,8 | 5,5 | 6,0 | 6,0 | 12,7 |

- L: numero di laboratori
n: numero di valori singoli
 s_r : deviazione standard della ripetibilità
 s_R : deviazione standard riproducibilità
r: ripetibilità
R: riproducibilità
CV_r: coefficiente di variazione della ripetibilità
CV_R: coefficiente di variazione della riproducibilità

¹ Studio effettuato dal gruppo di lavoro Alimenti per animali del Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

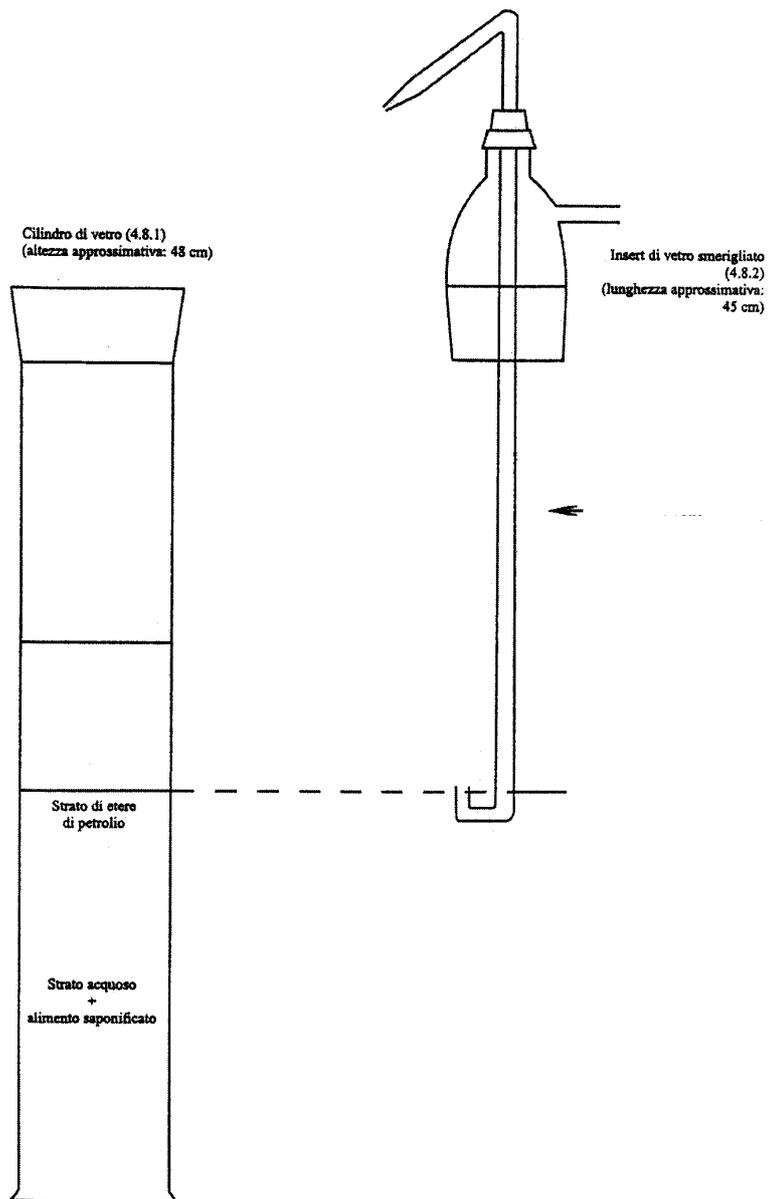


Figura 1: Apparecchiatura per estrazione (4.8)

DETERMINAZIONE DEL TRIPTOFANO

1. Finalità e campo d'applicazione

Il metodo serve per la determinazione del triptofano totale e libero negli alimenti per animali. Non vengono distinte le forme D- e L-.

2. Principio

Per la determinazione del triptofano totale, il campione viene idrolizzato in condizioni alcaline con una soluzione satura di idrossido di bario e viene riscaldato a 110°C per 20 ore. Ad idrolisi avvenuta, viene aggiunto lo standard interno.

Per la determinazione del triptofano libero, il campione viene estratto in condizioni moderatamente acide in presenza dello standard interno.

Il triptofano e lo standard interno nell'idrolizzato e nell'estratto sono determinati per HPLC con rivelatore a fluorescenza.

3. Reattivi

- 3.1. Acqua bidistillata o di qualità equivalente (conduttività < 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$)
- 3.2. Sostanza di riferimento (standard): triptofano (purezza/contenuto $\geq 99\%$) essiccato sotto vuoto su pentossido di fosforo
- 3.3. Standard interno: α -metil-triptofano (purezza/contenuto $\geq 99\%$), essiccato sotto vuoto su pentossido di fosforo
- 3.4. Ottaidrato di idrossido di bario (prestare attenzione a non esporre eccessivamente il $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ all'aria, per evitare la formazione di BaCO_3 che potrebbe disturbare la determinazione) (cfr. osservazione 9.3)
- 3.5. Idrossido di sodio
- 3.6. Acido ortofosforico, w = 85%
- 3.7. Acido cloridrico, $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$
- 3.8. Metanolo, qualità HPLC
- 3.9. Etere di petrolio, intervallo di ebollizione: 40-60°C
- 3.10. Soluzione di idrossido di sodio, c = 1 mol/l:
disciogliere 40,0 g di NaOH (3.5) in acqua e portare ad 1 litro con acqua (3.1)
- 3.11. Acido cloridrico, c = 6 mol/l:
prelevare 492 ml di HCl (3.7) e portare ad 1 litro con acqua
- 3.12. Acido cloridrico, c = 1 mol/l:
prelevare 82 ml di HCl (3.7) e portare ad 1 litro con acqua
- 3.13. Acido cloridrico, c = 0,1 mol/l:
prelevare 8,2 ml di HCl (3.7) e portare ad 1 litro con acqua
- 3.14. Acido ortofosforico, c = 0,5 mol/l:
Prelevare 34 ml di acido ortofosforico (3.6) e portare ad 1 litro con acqua (3.1)
- 3.15. Soluzione concentrata di triptofano (3.2), c = 2,50 $\mu\text{mol}/\text{ml}$:
in un matraccio tarato da 500 ml sciogliere 0,2553 g di triptofano (3.2) in acido cloridrico (3.13) e portare a volume con acido cloridrico (3.13). Conservare a -18°C per 4 settimane al massimo

- 3.16. Soluzione concentrata di standard interno, $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:
in un matraccio tarato da 500 ml sciogliere 0,2728 g di α -metil-triptofano (3.3) in acido cloridrico (3.13) e portare a volume con acido cloridrico (3.13). Conservare a -18°C per 4 settimane al massimo
- 3.17. Soluzione madre di taratura di triptofano e di standard interno:
prelevare 2,00 ml di soluzione concentrata di triptofano (3.15) e 2,00 ml di soluzione concentrata di standard interno (α -metil-triptofano) (3.16). Diluire con acqua (3.1) e metanolo (3.8) a circa lo stesso volume ed a circa la stessa concentrazione di metanolo (10-30%) dell'idrolizzato finito.
Questa soluzione deve essere preparata estemporaneamente prima dell'uso.
Proteggere dalla luce solare diretta durante la preparazione.
- 3.18. Acido acetico
- 3.19. 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanolo
- 3.20. Etanolamina > 98%
- 3.21. Soluzione di 1 g di 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanolo (3.19) in 100 ml di metanolo (3.8)
- 3.22. Fase mobile per HPLC: 3,00 g di acido acetico (3.18) + 900 ml di acqua (3.1) + 50,0 ml di soluzione (3.21) di 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanolo (3.19) in metanolo (3.8) (1 g/100 ml); regolare il pH a 5,00 utilizzando etanolamina (3.20); portare a 1000 ml con acqua (3.1).

4. *Apparecchiatura*

- 4.1. Apparecchiatura HPLC con rilevatore spettrofluorimetrico
- 4.2. Colonna analitica, 125 mm \times 4 mm, C_{18} riempimento 3 μm , o equivalente
- 4.3. pH-metro
- 4.4. Matraccio di polipropilene, capacit  125 ml, a collo largo e coperchio a vite
- 4.5. Filtro a membrana, da 0,45 μm
- 4.6. Autoclave, 110 (± 2) $^\circ\text{C}$, 1,4 ($\pm 0,1$) bar
- 4.7. Agitatore meccanico o magnetico
- 4.8. Miscelatore Vortex

5. *Modo di operare*

- 5.1. Preparazione dei campioni
Il campione viene tritato in modo che possa passare attraverso un vaglio da 0,5 mm. I campioni molto umidi devono essere essiccati all'aria ad una temperatura non superiore a 50°C o liofilizzati prima di essere tritati. I campioni ad alto tenore di grassi devono essere estratti con etere di petrolio (3.9) prima di essere tritati.

5.2. Determinazione del triptofano libero (estratto)

In una beuta pesare (a meno di 1 mg) una quantità adeguata (1-5 g) del campione preparato (5.1), aggiungere 100,0 ml di acido cloridrico, $c = 0,1 \text{ mol/l}$ (3.13) e 5,00 ml di soluzione concentrata di standard interno (3.16). Agitare o miscelare per 60 minuti con un agitatore meccanico o magnetico (4.7). Lasciare che si depositi il sedimento e pipettare 10,0 ml della soluzione supernatante in un becher. Aggiungere 5 ml di acido ortofosforico, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ (3.14). Portare il pH al valore 3 utilizzando idrossido di sodio, $c = 1,0 \text{ mol/l}$ (3.10). Aggiungere sufficiente metanolo (3.8) per ottenere una concentrazione compresa tra il 10 e il 30% di metanolo nel volume finale. Trasferire in un matraccio tarato di volume adeguato e diluire con acqua sino al volume necessario per la cromatografia [approssimativamente lo stesso volume della soluzione madre di taratura (3.17)]. Filtrare alcuni ml della soluzione con un filtro a membrana da $0,45 \mu\text{m}$ (4.5) prima dell'iniezione nella colonna HPLC. Procedere alla fase cromatografica con i parametri di 5.4.

Proteggere la soluzione madre e gli estratti dalla luce solare diretta. Se non è possibile analizzare gli estratti nello stesso giorno, questi devono essere conservati a 5°C , al massimo per 3 giorni.

5.3. Determinazione del triptofano totale (idrolizzato)

Pesare (a meno di 0,2 mg) da 0,1 ad 1 g del campione preparato (5.1) nel matraccio di polipropilene (4.4). L'aliquota di campione pesato deve avere un tenore di azoto di circa 10 mg. Aggiungere 8,4 g di idrossido di bario (ottaidrato) (3.4) e 10 ml di acqua. Miscelare con un miscelatore Vortex (4.8) o con agitatore magnetico (4.7). Lasciare il magnete rivestito di teflon nella miscela. Sciacquare le pareti del recipiente con 4 ml di acqua. Porre il coperchio a vite e chiudere senza stringere. Trasferire in una autoclave (4.6) con acqua bollente e vapore per 30-60 minuti. Chiudere l'autoclave e porla in funzione a $110 (\pm 2)^\circ\text{C}$ per 20 ore. Prima di aprire l'autoclave ridurre la temperatura poco al di sotto di 100°C . Per evitare la cristallizzazione del $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$, aggiungere alla miscela calda 30 ml di acqua a temperatura ambiente. Scuotere o agitare non violentemente. Aggiungere 2,00 ml di soluzione concentrata di standard interno (α -metil-triptofano) (3.16). Lasciare raffreddare i recipienti in un bagno di acqua ghiaccio per 15 minuti.

Aggiungere 5 ml di acido ortofosforico, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ (3.14). Tenere il recipiente nel bagno di refrigerazione e neutralizzare con HCl, $c = 6 \text{ mol/l}$ (3.11), agitando nel frattempo e regolare il pH a 3,0 utilizzando HCl, $c = 1 \text{ mol/l}$ (3.12). Aggiungere sufficiente metanolo per ottenere una concentrazione compresa tra 10 e 30% di metanolo nel volume finale. Trasferire in un matraccio tarato di volume adeguato e diluire con acqua sino al volume necessario per la cromatografia (ad esempio, 100 ml). L'aggiunta di metanolo non deve provocare precipitazione. Filtrare alcuni ml della soluzione con un filtro membrana da $0,45 \mu\text{m}$ (4.5) prima dell'iniezione nella colonna HPLC. Procedere alla fase cromatografica con i parametri indicati al punto 5.4.

Proteggere la soluzione madre e gli idrolizzati dalla luce solare diretta. Se non è possibile analizzare gli idrolizzati il giorno stesso, questi devono essere conservati a 5°C per 3 giorni al massimo.

5.4. Determinazione HPLC

Le seguenti condizioni di eluizione isocratica sono proposte a titolo di orientamento; è possibile operare in condizioni diverse, purché si ottengano risultati equivalenti (cfr. anche osservazioni 9.1 e 9.2):

| | |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Colonna analitica (4.2): | 125 mm × 4 mm, C ₁₈ , riempimento 3 μm, o equivalente |
| Temperatura della colonna: | temperatura ambiente |
| Fase mobile (3.22): | 3,00 g di acido acetico (3.18) + 900 ml di acqua (3.1)+ 50,0 ml di soluzione (3.21) di 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanolo (3.19) in metanolo (3.8) (1 g/100 ml); regolare il pH a 5,00 utilizzando etanolamina (3.20); portare a 1000 ml con acqua (3.1) |
| Velocità di flusso: | 1 ml/min |
| Durata totale eluizione: | circa 34 min |
| Lunghezza d'onda di rivelazione: | eccitazione: 280 nm, emissione: 356 nm |
| Volume di iniezione: | 20 μl |

6. Calcolo dei risultati

$$\frac{A \times B \times C \times D \times E \times MW}{F \times G \times H \times 10000 \times W} = \text{g di triptofano/100 g di campione}$$

dove:

- A = area del picco dello standard interno, soluzione madre di taratura (3.17)
- B = area del picco del triptofano, estratto (5.2) o idrolizzato (5.3)
- C = volume in ml (2 ml) di soluzione concentrata di triptofano (3.15) aggiunta alla soluzione di taratura (3.17)
- D = concentrazione in μmol/ml (= 2,50) di soluzione concentrata di triptofano (3.15) aggiunta alla soluzione di taratura (3.17)
- E = volume in ml della soluzione concentrata di standard interno (3.16) aggiunta all'estrazione (5.2) (= 5,00 ml) o all'idrolizzato (5.3) (= 2,00 ml)
- F = area del picco dello standard interno, dell'estratto (5.2) o dell'idrolizzato (5.3)
- G = area del picco del triptofano, soluzione madre di taratura (3.17)
- H = volume in ml (= 2,00 ml) della soluzione concentrata dello standard interno (3.16) aggiunto alla soluzione madre di taratura (3.17)
- W = peso del campione in g (corretto in riferimento al peso iniziale se essiccato e/o sgrassato)
- MW = peso molecolare del triptofano (= 204,23)

7. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni in parallelo, effettuate sullo stesso campione, non deve superare il 10% del valore ottenuto più elevato.

8. Risultati di uno studio collaborativo

È stato organizzato uno studio collaborativo a livello CE (4^a intercomparazione) in cui sono stati analizzati tre campioni da 12 laboratori per la convalida del metodo di idrolisi. Sono state ripetute 5 analisi su ogni campione. I risultati sono stati i seguenti:

| | Campione 1 Alimento per suini | Campione 2 Alimento per suini con aggiunta di L-triptofano | Campione 3 Alimento concentrato per suini |
|-----------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| L | 12 | 12 | 12 |
| n | 50 | 55 | 50 |
| Media [g/kg] | 2,42 | 3,40 | 4,22 |
| s _r [g/kg] | 0,05 | 0,05 | 0,08 |
| r [g/kg] | 0,14 | 0,14 | 0,22 |
| CV _r [%] | 1,9 | 1,6 | 1,9 |
| s _R [g/kg] | 0,15 | 0,20 | 0,09 |
| R [g/kg] | 0,42 | 0,56 | 0,25 |
| CV _R [%] | 6,3 | 6,0 | 2,2 |

- L: numero di laboratori che hanno inviato risultati
n: numero di valori singoli considerati, esclusi i valori erratici (test di Cochran-Dixon)
s_r: deviazione standard della ripetibilità
s_R: deviazione standard della riproducibilità
r: ripetibilità
R: riproducibilità
CV_r: coefficiente di variazione della ripetibilità, %
CV_R: coefficiente di variazione della riproducibilità, %

È stato organizzato un altro studio collaborativo a livello comunitario (3ª intercomparazione), in cui sono stati analizzati due campioni da 13 laboratori per la convalida del metodo di estrazione del triptofano libero. Sono state ripetute 5 analisi su ogni campione. I risultati sono stati i seguenti:

| | Campione 4 Miscela frumento e soia | Campione 5 Miscela frumento e soia (= campione 4) con aggiunta di triptofano (0,457 g/kg) |
|-----------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| L | 12 | 12 |
| n | 55 | 60 |
| Media [g/kg] | 0,391 | 0,931 |
| s _r [g/kg] | 0,005 | 0,012 |
| r [g/kg] | 0,014 | 0,034 |
| CV _r [%] | 1,34 | 1,34 |
| s _R [g/kg] | 0,018 | 0,048 |
| R [g/kg] | 0,050 | 0,134 |
| CV _R [%] | 4,71 | 5,11 |

- L: numero di laboratori che hanno inviato risultati
n: numero di valori singoli considerati, esclusi i valori erratici (test di Cochran-Dixon)
s_r: deviazione standard della ripetibilità
s_R: deviazione standard della riproducibilità
r: ripetibilità
R: riproducibilità
CV_r: coefficiente di variazione della ripetibilità, %
CV_R: coefficiente di variazione della riproducibilità, %

È stato effettuato un altro studio di intercomparazione comunitario in cui sono stati analizzati quattro campioni in 7 laboratori ai fini della validazione del metodo per idrolisi. Più sotto sono riportati i risultati. Su ogni campione sono state replicate analisi (5).

| | Campione 1 Alimento suini- miscela (CRM 117) | Campione 2 Farina di pesce con basso tenore di grassi (CRM 118) | Campione 3 Farina di soia (CRM 119) | Campione 4 Latte scremato in polvere (CRM 120) |
|-----------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| L | 7 | 7 | 7 | 7 |
| n | 25 | 30 | 30 | 30 |
| Media [g/kg] | 2,064 | 8,801 | 6,882 | 5,236 |
| s _r [g/kg] | 0,021 | 0,101 | 0,089 | 0,040 |
| r [g/kg] | 0,059 | 0,283 | 0,249 | 0,112 |
| CV _r [%] | 1,04 | 1,15 | 1,30 | 0,76 |
| s _R [g/kg] | 0,031 | 0,413 | 0,283 | 0,221 |
| R [g/kg] | 0,087 | 1,156 | 0,792 | 0,619 |
| CV _R [%] | 1,48 | 4,69 | 4,11 | 4,22 |

- L: numero di laboratori che hanno inviato risultati
n: numero di valori singoli considerati, esclusi i valori erratici (test di Cochran-Dixon)
s_r: deviazione standard della ripetibilità
s_R: deviazione standard della riproducibilità
r: ripetibilità
R: riproducibilità
CV_r: coefficiente di variazione della ripetibilità, %
CV_R: coefficiente di variazione della riproducibilità, %

9. Osservazioni

9.1. Con speciali condizioni cromatografiche si può ottenere una migliore separazione tra triptofano e α -metil-triptofano.

Eluizione isocratica seguita da pulitura colonna a gradiente:

Colonna analitica: 125 mm × 4 mm, C₁₈, riempimento 5 μ m o equivalente

Temperatura colonna: 32°C

Fase mobile: A: 0,01 mol/l KH₂PO₄/Metanolo, 95 + 5 (V + V)

B: Metanolo

| | | | |
|----------------------|--------|--------|-------|
| Programma gradiente: | 0 min | 100% A | 0% B |
| | 15 min | 100% A | 0% B |
| | 17 min | 60% A | 40% B |
| | 19 min | 60% A | 40% B |
| | 21 min | 100% A | 0% B |
| | 33 min | 100% A | 0% B |

Velocità di flusso: 1,2 ml/min

Durata totale eluizione: circa 33 min

- 9.2. La cromatografia varierà a seconda del tipo di HPLC e di materiale di riempimento utilizzati. Il sistema scelto deve produrre la separazione della linea di base tra il triptofano e lo standard interno. Inoltre è importante che i prodotti di degradazione siano nettamente separati dal triptofano e dallo standard interno. Occorre far passare idrolizzati senza standard interno in modo da verificare la linea di base sotto lo standard interno, per le impurità. È importante che il tempo di eluizione sia sufficientemente lungo per l'eluizione di tutti i prodotti di degradazione, altrimenti gli ultimi picchi di eluizione possono interferire con le esecuzioni cromatografiche successive.

Nell'intervallo operativo, il sistema cromatografico deve dare una risposta lineare. La risposta lineare deve essere misurata con una concentrazione costante (concentrazione normale) dello standard interno e concentrazioni variabili di triptofano. È importante che le altezze dei picchi del triptofano e dello standard interno risultino entro l'intervallo lineare del sistema HPLC/fluorescenza. Se il picco o i picchi del triptofano e/o dello standard interno sono troppo bassi o troppo alti, l'analisi deve essere ripetuta con altre dimensioni del campione e/o un volume finale differente.

- 9.3. Idrossido di bario

Con il tempo, l'idrossido di bario si discioglie con maggiore difficoltà. Ciò causa una soluzione torbida per la determinazione HPLC, che può produrre bassi valori per il triptofano.