

COMMISSIONE

QUARTA DIRETTIVA DELLA COMMISSIONE

del 5 dicembre 1972

che fissa i metodi d'analisi comunitari per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali

(73/46/CEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

vista la direttiva del Consiglio, del 20 luglio 1970, concernente l'introduzione di modi di prelevamento dei campioni e di metodi d'analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per gli animali ⁽¹⁾, modificata dalla direttiva n. 72/275/CEE del 20 luglio 1972 ⁽²⁾, in particolare l'articolo 2,

considerando che la suddetta direttiva prevede che i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali destinati a constatare l'osservanza delle condizioni prescritte in virtù delle disposizioni legislative, regolamentari o amministrative concernenti le qualità e la composizione degli alimenti per gli animali, siano effettuati secondo i modi di prelevamento di campioni ed i metodi di analisi comunitari;

considerando che le direttive n. 71/250/CEE, n. 71/393/CEE e n. 72/199/CEE della Commissione, del 15 giugno 1971 ⁽³⁾, del 18 novembre 1971 ⁽⁴⁾ e del 27 aprile 1972 ⁽⁵⁾ hanno già fissato un certo numero di metodi di analisi comunitari; che, tenuto conto dello stato d'avanzamento dei lavori sin qui effettuati, è necessario adottare una quarta serie di metodi;

considerando che le misure previste dalla presente direttiva sono conformi al parere del Comitato permanente degli alimenti per gli animali,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Gli Stati membri prescrivono che le analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali, per quanto riguarda il contenuto in umidità dei grassi e degli oli animali e vegetali e per quanto riguarda i

contenuti in magnesio e con cellulosa grezza degli alimenti, siano effettuate secondo i metodi descritti all'allegato I della presente direttiva.

Le disposizioni generali di cui alla prima parte (introduzione) dell'allegato della prima direttiva n. 71/250/CEE della Commissione, del 15 giugno 1971, si applicano ai metodi descritti all'allegato I della presente direttiva.

Articolo 2

Gli Stati membri prescrivono che le analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali, per quanto riguarda il loro contenuto in retinolo (vitamina A), tiamina (aneurina, vitamina B₁), acidi ascorbico e deidroascorbico (vitamina C), siano effettuate secondo i metodi descritti all'allegato II della presente direttiva.

Le disposizioni generali di cui alla prima parte (introduzione) dell'allegato della prima direttiva n. 71/250/CEE della Commissione, del 15 giugno 1971, eccetto la parte relativa alla preparazione del campione da analizzare, si applicano ai metodi descritti all'allegato II della presente direttiva.

Articolo 3

Gli Stati membri mettono in vigore, non oltre il 1° gennaio 1974, le disposizioni legislative, regolamentari o amministrative necessarie per conformarsi alle disposizioni della presente direttiva e ne informano immediatamente la Commissione.

Articolo 4

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 5 dicembre 1972.

Per la Commissione

Il Presidente

S. L. MANSHOLT

⁽¹⁾ GU n. L 170 del 3. 8. 1970, pag. 2.

⁽²⁾ GU n. L 171 del 29. 7. 1972, pag. 39.

⁽³⁾ GU n. L 155 del 12. 7. 1971, pag. 13.

⁽⁴⁾ GU n. L 279 del 20. 12. 1971, pag. 7.

⁽⁵⁾ GU n. L 123 del 29. 5. 1972, pag. 6.

ALLEGATO I

1. DETERMINAZIONE DELL'UMIDITÀ NEI GRASSI E NEGLI OLI ANIMALI E VEGETALI**1. Scopo e campo d'applicazione**

Il metodo permette di determinare il contenuto in umidità (acqua ed altre materie volatili) dei grassi e degli oli animali e vegetali.

2. Principio

Il campione viene sottoposto ad essiccazione a 103°C fino a cessazione della diminuzione di massa. La perdita di massa viene determinata per pesata.

3. Apparecchiatura

- 3.1. Recipiente a fondo piano, di materiale resistente alla corrosione, diametro: da cm 8 a 9, altezza: circa cm 3
- 3.2. Termometro a mercurio con bulbo rinforzato e camera di espansione all'estremità superiore, graduato da circa 80°C ad almeno 110°C, lunghezza: circa cm 10.
- 3.3. Bagno di sabbia o piastra elettrica riscaldante
- 3.4. Essiccatore, contenente un efficace disidratante
- 3.5. Bilancia analitica

4. Modo di operare

Pesare, con l'approssimazione di mg 1, circa g 20 del campione omogeneizzato nel recipiente (3.1), essiccato e tarato, contenente il termometro (3.2). Riscaldare sul bagno di sabbia o sulla piastra riscaldante (3.3), agitando continuamente con il termometro, in modo da far salire la temperatura a 90°C in circa 7 minuti.

Ridurre l'intensità del riscaldamento secondo la frequenza con la quale le bolle risalgono dal fondo del recipiente. La temperatura non deve superare i 105°C. Continuare ad agitare raschiando il fondo del recipiente sino a quando non si formano più bolle.

Per assicurare l'eliminazione completa dell'umidità, riscaldare più volte a 103°C ± 2°C, raffreddando a 93°C tra i riscaldamenti successivi. Lasciar quindi raffreddare nell'essiccatore (3.4), sino a temperatura ambiente e pesare. Ripetere l'operazione fino a quando la perdita di massa tra due pesate successive non supera mg 2.

N.B. Un aumento della massa del campione dopo i ripetuti riscaldamenti indica un'ossidazione del grasso. In questo caso, calcolare il risultato basandosi sulla pesata effettuata immediatamente prima che la massa abbia incominciato ad aumentare.

5. Calcolo dei risultati

Il contenuto in umidità, in per cento del campione, è dato dalla seguente formula:

$$(M_1 - M_2) \cdot \frac{100}{M_0}$$

in cui:

M_0 = massa, in grammi, della quantità di prodotto sottoposta all'analisi

M_1 = massa, in grammi, del recipiente con il suo contenuto prima del riscaldamento

M_2 = massa, in grammi, del recipiente con il suo contenuto dopo il riscaldamento.

I risultati inferiori a 0,05 % debbono essere riportati con la dizione «meno di 0,05 %».

Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate sullo stesso campione, non deve oltrepassare 0,05 % in valore assoluto.

2. DETERMINAZIONE DEL MAGNESIO

— per spettrofotometria d'assorbimento atomico —

1. Scopo e campo di applicazione

Il metodo permette di determinare il magnesio nei mangimi. Esso è particolarmente adatto per determinare i contenuti di magnesio inferiori al 5 %.

2. Principio

Il campione viene incenerito e sciolto nell'acido cloridrico diluito. Se non contiene sostanze organiche, viene sciolto direttamente all'acido cloridrico diluito. La soluzione viene diluita e il contenuto di magnesio viene determinato con la spettrofotometria d'assorbimento atomico a 285,2 nm, per raffronto con soluzioni tipo.

3. Reattivi

3.1. Acido cloridrico p.a., d: 1,16

3.2. Acido cloridrico p.a., d: 1,19

3.3. Magnesio, in nastro o filo, o solfato di magnesio $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ p.a. essiccato nel vuoto a temperatura ambiente

3.4. Soluzione di sale di stronzio (cloruro o nitrato) al 2,5 % (p/v) di stronzio (= 76,08 g di $SrCl_2 \cdot 6 H_2O$ p.a./1 o 60,38 g di $Sr(NO_3)_2$ p.a./1).

3.5. Soluzione tipo di magnesio: pesare, con la precisione di mg 1, g 1 di magnesio (3.3) liberato con cura della pellicola di ossido od una quantità corrispondente di solfato di magnesio (3.3), introdurlo in un pallone tarato da ml 1 000, aggiungere ml 80 di acido cloridrico (3.1), lasciare sciogliere e portare a ml 1 000 aggiungendo acqua; ml 1 di tale soluzione contiene mg 1,000 di magnesio.

4. Apparecchiatura

4.1. Crogiolo da incenerimento di platino, quarzo o porcellana

4.2. Forno elettrico a muffola, provvisto di termostato

4.3. Spettrofotometro d'assorbimento atomico

5. Modo di operare

5.1 Preparazione della soluzione

5.1.1. Alimenti costituiti esclusivamente da sostanze minerali

Pesare, con l'approssimazione di mg 1, g 5 del campione, introdurli in un pallone tarato da ml 500 con ml 250 a 300 d'acqua. Aggiungere ml 40 di acido cloridrico (3.1). Portare ad ebollizione e lasciare bollire lentamente il liquido per 30 minuti. Lasciare raffreddare, portare a volume con acqua, mescolare e filtrare su filtro di carta a pieghe asciutto. Scartare i primi ml 30 di filtrato.

In presenza di silice trattare g 5 di campione con una quantità sufficiente (ml 15 a 30) di acido cloridrico (3.2) ed evaporare a secco a bagnomaria. Proseguire come indicato in 5.1.2 a partire dal 3° periodo.

5.1.2. Alimenti costituiti essenzialmente da sostanze minerale

Pesare, con l'approssimazione di mg 1, g 5 del campione in un crogiolo da incenerimento ed incenerire a 550°C in un forno a muffola, sino ad ottenere ceneri esenti da particelle carboniose.

Per eliminare la silice, aggiungere alle ceneri una quantità sufficiente (ml 15 a 30) di acido cloridrico (3.2), ed evaporare a secco su bagnomaria. Essiccare poi per un'ora in stufa a 105°C. Riprendere il residuo con ml 10 di acido cloridrico (3.1) e trasferire, mediante acqua calda, in pallone tarato da ml 500. Portare all'ebollizione, lasciar raffreddare e portare a volume con acqua. Mescolare e filtrare su filtro di carta asciutto in un bicchiere asciutto. Scartare i primi ml 30 di filtrato.

5.1.3. *Alimenti costituiti essenzialmente da sostanze organiche*

Pesare, con l'approssimazione di mg 1, g 5 del campione in un crogiolo da incenerimento e incenerire a 550°C in un forno a muffola, sino a ottenere ceneri esenti da particelle carboniose. Riprendere le ceneri con ml 5 di acido cloridrico (3.2), evaporare a secco in bagno maria ed essiccare quindi per un'ora in una stufa a 105°C per insolubilizzare la silice. Riprendere il residuo con ml 5 di acido cloridrico (3.1), trasferire, con l'ausilio di acqua calda, in un pallone tarato da ml 250, portare all'ebollizione, lasciar raffreddare e portare a volume con acqua. Mescolare e filtrare su filtro di carta asciutto in un bicchiere asciutto. Scartare i primi ml 30 di filtrato.

5.2 *Misura dell'assorbimento atomico*

Preparare almeno 5 soluzioni di riferimento a concentrazioni crescenti, scelte in funzione della zona di misurazione optimum dello spettrofotometro, diluendo con acqua la soluzione campione (3.5). Aggiungere a ciascuna soluzione ml 10 di soluzione di sale di stronzio (3.4) e completare quindi il volume a ml 100 mediante aggiunta d'acqua.

Diluire con acqua una parte del filtrato ottenuto in 5.1.1, 5.1.2 o in 5.1.3 in modo da ottenere una concentrazione di magnesio compresa fra i limiti di concentrazione delle soluzioni di riferimento. La concentrazione di acido cloridrico di questa soluzione non deve essere superiore a 0,4 N. Aggiungere ml 10 di soluzione di sale di stronzio (3.4) e completare quindi il volume a ml 100 mediante aggiunta d'acqua.

Misurare l'assorbimento della soluzione da determinare e delle soluzioni di riferimento alla lunghezza d'onda di 285,2 nm.

6. **Calcolo dei risultati**

Determinare la quantità di magnesio del campione riferendosi alle soluzioni campione. Esprimere il risultato in percento del campione.

Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele effettuate su di uno stesso campione non deve essere superiore al 5 %, in valore relativo.

3. DETERMINAZIONE DELLA CELLULOSA GREZZA

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

Il metodo permette di determinare nei mangimi le materie organiche, esenti da grasso, insolubili in ambiente acido e in ambiente alcalino, convenzionalmente designate con il nome di cellulosa grezza.

2. **Principio**

Il campione, eventualmente sgrassato, è trattato successivamente con soluzioni bollenti di acido solforico e di idrossido di potassio di concentrazioni determinate. Il residuo è separato per filtrazione su amianto, lavato, essiccato, pesato e calcinato a 900°C. La perdita di peso conseguente alla calcinazione corrisponde alla cellulosa grezza della quantità di prodotto sottoposta all'analisi.

3. **Reattivi**

3.1. Acido solforico p.a. 0,26 N

3.2. Amianto trattato: aggiungere ad amianto per crogiolo di Gooch circa cinque volte il suo peso di acido cloridrico diluito (un volume di acido cloridrico, d: 1,19, più tre volumi d'acqua). Far bollire la miscela per circa 45 minuti, lasciar raffreddare, filtrare su imbuto di Büchner. Lavare il residuo prima con acqua, fino all'eliminazione dell'acido cloridrico nelle acque di lavaggio, e poi con acetone (3.6). Essiccare l'amianto nella stufa e calcinarlo quindi per due ore a 900°C. Lasciar raffreddare e conservare in bottiglia chiusa. L'amianto così trattato può essere utilizzato più di una volta. Esso deve essere conforme alle prescrizioni di cui al punto 5.1 per quanto riguarda la prova in bianco.

- 3.3. Emulsione antischiuma (per esempio silicone)
- 3.4. Soluzione d'idrossido di potassio p.a. 0,23 N
- 3.5. Acido cloridrico 0,5 N
- 3.6. Acetone puro
- 3.7. Etere dietilico puro

4. Apparecchiatura

- 4.1. Becher da almeno ml 600, graduato a ml 200
- 4.2. Dischi di porcellana del diametro di circa mm 80 e dello spessore di circa mm 4, con circa 32 fori dal diametro di circa mm 4 ciascuno.
- 4.3. Beute da vuoto da circa l 2, con tappo di gomma, graduate in corrispondenza di ml 800 e provviste di un imbuto di vetro del diametro di mm 120.
- 4.4. Piastre filtranti del diametro di circa mm 40 e dello spessore di circa mm 4, con bordo obliquo adattato al cono dell'imbuto (4.3), con 16 fori di circa mm 4 di diametro ciascuno e ricoperte da una griglia metallica a maglio di circa mm 1 di lato. Le piastre e le griglie metalliche non debbono alterarsi per azione degli acidi o degli alcali.
- 4.5. Crogioli di platino o di quarzo per incenerimento
- 4.6. Forno elettrico a muffola, con termostato.
- 4.7. Essiccatore
- 4.8. *Filtro di amianto*

Mettere in sospensione g 2,0 di amianto (3.2) in ml 100 d'acqua. Filtrare sotto vuoto su una piastra filtrante ricoperta da una griglia metallica (4.4) posta nell'imbuto di una beuta da vuoto (4.3). Raccogliere il filtrato e filtrarlo nuovamente con lo stesso filtro. Eliminare il filtrato.

5. Modo di operare

Pesare, con l'approssimazione di mg 1, g 3 di campione e g 2 di amianto trattato (3.2) in un becher (4.1), aggiungere ml 200 di acido solforico (3.1) e qualche goccia di emulsione antischiuma (3.3). Portare rapidamente all'ebollizione e lasciare bollire per 30 minuti esatti. Per mantenere costante il volume, coprire il becher con un dispositivo raffreddante, per esempio un pallone a fondo rotondo da ml 500 a circolazione di acqua fredda. Interrompere l'ebollizione aggiungendo circa ml 50 d'acqua fredda e filtrare immediatamente sotto vuoto su un filtro di amianto già preparato come indicato in 4.8.

Lavare il residuo con 5 parti da circa ml 100 di acqua molto calda per ottenere un volume finale di filtrato di ml 800. Travasare tutto il residuo nel becher (4.1), nel quale è già stato collocato un disco di porcellana (4.2) per rendere regolare l'ebollizione. Aggiungere ml 200 di soluzione di idrossido di potassio (3.4). Portare rapidamente all'ebollizione e lasciar bollire per 30 minuti esatti. Aggiungere circa ml 50 d'acqua fredda e filtrare immediatamente sotto vuoto su un nuovo filtro di amianto già preparato come indicato sub 4.8. Lavare il residuo con acqua molto calda fino a neutralità delle acque di lavaggio (saggio su tornasole); lavare quindi tre volte con acetone (3.6) (complessivamente, circa ml 100).

Trasferire quantitativamente il residuo in un crogiuolo per incenerimento (4.5), sminuzzarlo — se necessario — ed essiccare nella stufa a 130°C fino a peso costante.

Far raffreddare in essiccatore e pesare rapidamente. Introdurre quindi il crogiolo nel forno a muffola (4.6) e lasciar calcinare per 30 minuti a 900°C. Far raffreddare nell'essiccatore e pesare rapidamente.

Eseguire con lo stesso procedimento *una prova in bianco* con l'amianto trattato (3.2), senza campione. La perdita di peso conseguente alla calcinazione dei g 6 d'amianto non deve essere superiore a mg 10.

6. Calcolo dei risultati

Il contenuto in cellulosa grezza, in percento del campione, è dato dalla formula:

$$\frac{(a - b) \cdot 100}{3}$$

in cui:

a = perdita di peso conseguente alla calcinazione, nella determinazione,

b = perdita di peso conseguente alla calcinazione, nella prova in bianco.

Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele eseguite sullo stesso campione non deve superare:

0,3 in valore assoluto, per i contenuti di cellulosa grezza inferiori al 10 %; 3 % in valore relativo per i contenuti di cellulosa grezze uguali o superiori al 10 %.

7. Osservazioni

7.1. Gli alimenti che contengono più del 10 % di materie grasse debbono essere sgrassati prima dell'analisi con etere dietilico. A tale scopo, collocare il saggio (g 3 pesati con l'approssimazione di mg 1) su un filtro d'amianto (4.8). Coprire 3 volte con circa ml 50 di etere dietilico (3.7) e filtrare ogni volta sotto vuoto con precauzione. Travasare tutto il saggio e l'amianto in un becher (4.1) e proseguire l'analisi come indicato in 5.

7.2. Gli alimenti che contengono materie grasse non direttamente estraibili debbono essere sgrassati una prima volta come indicato sub 7.1 ed una seconda volta dopo il lavaggio del residuo dell'attacco acido.

A questo scopo, lavare tre volte il residuo di questo attacco con acetone (3.6) (complessivamente ml 100), quindi altre tre volte con ml 50 di etere dietilico (3.7). Versare quindi tutti i residui in un becher (4.1) e proseguire l'analisi come indicato in 5, secondo capoverso (trattamento con la soluzione di idrossido di potassio).

7.3. Nel caso di alimenti ricchi di calcio (più del 2 % di calcio) versare il saggio (g 3 pesati con l'approssimazione di mg 1) in un becher (4.1) contenente ml 100 di acido cloridrico 0,5 N (3.5) e lasciare riposare a freddo per 5 minuti. Filtrare immediatamente e lavare con acqua fredda. Utilizzare come adiuvante di filtrazione i g 2,0 di amianto previsti per l'ebollizione con l'acido solforico. Se la filtrazione risulta difficile, diluire la sospensione con acetone. Procedere quindi come indicato in 5.

ALLEGATO II

1. DETERMINAZIONE DEL RETINOLO (VITAMINA A)

1. Scopo e campo di applicazione

Il metodo permette di determinare il contenuto di retinolo (vitamina A) nei mangimi, nei concentrati e nelle premiscele. Il limite inferiore di determinazione è 10 000 UI/kg per gli alimenti fortemente pigmentati, e di 4 000 UI/kg per gli altri prodotti ⁽¹⁾. I prodotti sono suddivisi in due gruppi a seconda del loro presunto contenuto in retinolo:

Gruppo A: contenuto inferiore a 200 000 UI/kg

Gruppo B: contenuto uguale o superiore a 200 000 UI/kg

2. Principio

Il campione viene idrolizzato a caldo con una soluzione di idrossido di potassio in mezzo etanolico ed in presenza di una sostanza antiossidante o in atmosfera di azoto. La miscela è estratta con 1,2-dicloroetano. L'estratto è evaporato a secco e ripreso con etere di petrolio. La soluzione viene cromatografata su colonna di ossido di alluminio (per i prodotti di cui al grup-

⁽¹⁾ 1 UI = 0,3 µg di retinolo.

po B la cromatografia è necessaria solo in alcuni casi). Il retinolo è determinato per spettrofotometria a 610 nm dopo la formazione di un complesso colorato con la reazione di Carr-Price, nel caso dei prodotti di cui al gruppo A; per spettrofotometria nell'UV a 325 nm per quelli del gruppo B.

3. Reattivi

a) impiegati per l'analisi dei prodotti di cui ai gruppi A e B

- 3.1. Etanolo al 96 % (v/v)
- 3.2. Soluzione al 10 % (p/v) di ascorbato di sodio p.a. oppure
- 3.3. Azoto, purificato
- 3.4. Soluzione al 50 % (p/v) di idrossido di potassio p.a.
- 3.5. Soluzione di idrossido di potassio 1 N
- 3.6. Soluzione di idrossido di potassio 0,5 N
- 3.7. 1,2-dicloroetano p.a.
- 3.8. Etere di petrolio, puro, punto di ebollizione 30—50°C. Se del caso, purificarlo nel seguente modo. Sbattere ml 1 000 di etere di petrolio ogni volta con ml 20 di acido solforico concentrato, fino a che l'acido resta incolore. Eliminare l'acido e lavare l'etere successivamente con ml 500 di acqua, due volte con ml 250 di una soluzione al 10 % di idrossido di sodio e tre volte con ml 500 di acqua. Eliminare la fase acquosa, essiccare l'etere per un'ora su carbone attivo e solfato di sodio anidro, filtrare e distillare.
- 3.9. Ossido di alluminio standardizzato secondo Brockmann: calcinare per 8 ore a 750°C, raffreddare in essiccatore e conservare in flacone di vetro scuro, con tappo smerigliato. Prima di utilizzarlo per la cromatografia, inumidirlo nel seguente modo: si introducono in una beuta di vetro scuro g 10 di ossido di alluminio e ml 0,7 di acqua, si chiude ermeticamente e si scalda per 5 minuti a bagnomaria bollente agitando di tanto in tanto energicamente. Lasciare raffreddare, agitando. Verificare l'attività dell'ossido di alluminio così preparato sottoponendo all'analisi secondo 5.3 e 5.4 una quantità nota (500 UI) di retinolo tipo (3.17).
- 3.10. Ossido di alluminio basico, I grado di attività.
- 3.11. Etere etilico, puro. Eliminare i perossidi e le tracce di acqua a mezzo di cromatografia su colonna di ossido di alluminio basico (3.10) (g 25 di ossido di alluminio per ml 250 di etere etilico).
- 3.12. Soluzioni di etere di petrolio (3.8) al 4 %, 8 %, 12 %, 16 % e 20 % di etere etilico (3.11).
- 3.13. Soluzione di solfuro di sodio 0,5 M in glicerina al 70 % (v/v), preparata a partire da solfuro di sodio p.a.

b) impiegati esclusivamente per l'analisi dei prodotti del gruppo A

- 3.14. Benzene p.a., cristallizzabile
- 3.15. Cloroformio p.a. Eliminare l'etanolo, il fosgene e le tracce di acqua a mezzo di cromatografia su colonna di ossido di alluminio basico (3.10) (g 50 di ossido di alluminio per ml 200 di cloroformio; conviene cromatografare una seconda volta i primi ml 50 di eluato).
- 3.16. Reattivo di Carr-Price: agitare g 25 circa di tricloruro di antimonio p.a. (conservato in essiccatore) con ml 100 di cloroformio (3.15) fino a saturazione della soluzione. Un modico deposito di tricloruro di antimonio non disturba. Aggiungere ml 2 di anidride acetica p.a. Conservare in una bottiglia di vetro scuro con tappo smerigliato, in frigorifero. Si conserva per parecchie settimane.
- 3.17. Retinolo tipo controllato spettrofotometricamente.

c) impiegati esclusivamente per l'analisi dei prodotti del gruppo B

- 3.18. Isopropanolo, per cromatografia

4. Apparecchiatura

- 4.1. Bagnomaria
- 4.2. Apparecchio rotativo per evaporazione sotto vuoto provvisto di palloni di differenti capacità
- 4.3. Colonne da cromatografia, in vetro (lunghezza: mm 300, diametro interno: circa mm 13)
- 4.4. Spettrofotometro con vaschette da mm 10 (di quarzo nel caso di misure nell'UV)
- 4.5. Lampada UV; 365 nm

5. Modo di operare

N.B. Tutte le operazioni debbono essere fatte in assenza di luce diretta ed impiegando vetreria scura

5.1. Entità del campione

Prelevare una quantità di campione finemente macinato proporzionale al presunto contenuto in vitamina A, e cioè:

- g 0,1-1,0 per i concentrati (contenuti superiori a 20 000 UI/g);
- g 3,0-5,0 per le premiscele (contenuti compresi tra 400 e 20 000 UI/g);
- g 10-20 per le miscele minerali;
- g 30 per i prodotti di cui al gruppo A.

Introdurre immediatamente la quantità di sostanze da sottoporre ad analisi in un pallone da ml 500 a collo smerigliato.

5.2. Idrolisi ed estrazione ⁽¹⁾

Aggiungere successivamente alla quantità di sostanza da sottoporre ad analisi ml 40 di etanolo (3.1), ml 2 della soluzione di ascorbato di sodio (3.2) ⁽²⁾, ml 10 della soluzione di idrossido di potassio (3.4) e ml 2 della soluzione di solfuro di sodio (3.13). Scaldare il pallone, innestato su un refrigerante a ricadere, per 30 min a 70-80 °C, raffreddandolo poi sotto acqua corrente. Aggiungere ml 50 di etanolo (3.1) e ml 100 (prelevato con pipetta tarata) di 1,2-dicloroetano (3.7). Agitare energicamente e travasare poi il supernatante in un imbuto separatore. Aggiungere, nell'imbuto separatore, ml 150 della soluzione di idrossido di potassio (3.5), agitare per 10 secondi e lasciare riposare fino alla separazione delle fasi. Raccogliere la fase dicloroetanica (fase inferiore) in un altro imbuto separatore, aggiungere ml 40 della soluzione di idrossido di potassio (3.6), agitare per 10 secondi e lasciare riposare fino alla separazione delle fasi. Raccogliere la fase dicloroetanica in imbuto separatore e lavarla 6-8 volte con ml 40 di acqua per volta, fino alla scomparsa della reazione alcalina (saggio alla fenoltaleina). Raccogliere la fase dicloroetanica ed eliminare le ultime tracce di acqua a mezzo di strisce di carta da filtro.

Evaporare a secco una parte aliquota della soluzione, su bagnomaria alla temperatura di 40 °C e sotto vuoto. Riprendere rapidamente il residuo con ml 5 di etere di petrolio (3.8).

Per i prodotti di cui al gruppo A cromatografare come descritto al punto 5.3.1.

Per i prodotti di cui al gruppo B, trasferire la soluzione in un pallone tarato da ml 50, portare a volume con etere di petrolio (3.8), omogeneizzare e misurare la densità ottica come indicato al punto 5.4.2.

5.3. Cromatografia

5.3.1. Prodotti appartenenti al gruppo A

Riempire un tubo per cromatografia (4.3), fino all'altezza di mm 200, di g 10 di ossido di alluminio, preparato secondo (3.9), precedentemente impregnato con etere di petrolio (3.8). Introdurre nella colonna la soluzione ottenuta in 5.2 e aggiungere immediatamente ml 20 di etere di petrolio (3.8). Eluire successivamente con aliquote di ml 10 delle soluzioni di etere di petrolio al 4 %, 8 %, 12 %, 16 % e 20 % di

⁽¹⁾ Per gli alimenti d'allattamento e per i prodotti che possono agglomerarsi o rigonfiare, raddoppiare la quantità dei reattivi indicati in 5.2, primo e secondo comma.

⁽²⁾ L'aggiunta di ascorbato di sodio non è necessaria quando si esegue l'idrolisi in atmosfera di azoto.

etere etilico (3.12), sotto vuoto parziale o sotto pressione in modo che la velocità di eluizione sia di 2 a 3 gocce al secondo.

Il carotene è eluito per primo ⁽¹⁾. Il retinolo è generalmente eluito a mezzo della soluzione di etere di petrolio al 20 % di etere etilico (3.12). L'eluizione viene controllata in luce ultravioletta (irradiando per brevissimo tempo la colonna con una lampada a mercurio). La banda fluorescente del retinolo è nettamente distinta dalle bande gialle che la seguono e che sono le xantofille. Raccogliere la frazione di eluato che contiene il retinolo in una erlenmeyer.

5.3.2. Prodotti appartenenti al gruppo B

La cromatografia viene effettuata solo se le misure della densità ottica ottenute secondo 5.4.2 non sono conformi alle prescrizioni indicate in 5.4.2.

Se è necessaria la cromatografia, introdurre nella colonna cromatografica una parte aliquota della soluzione in etere di petrolio ottenuta in 5.2, contenente all'incirca 500 UI di retinolo e cromatografare nel modo indicato in 5.3.1.

5.4. Misure della densità ottica

5.4.1. Prodotti appartenenti al gruppo A

Portare a secco sotto vuoto l'eluato contenente il retinolo, ottenuto in 5.3.1. Riprendere il residuo con ml 2 di benzene (3.14). Prelevare ml 0,3 di questa soluzione ed aggiungervi ml 3 del reattivo di Carr-Price (3.16). Si sviluppa una colorazione blu. Misurare la densità ottica allo spettrofotometro a 610 nm, esattamente 30 secondi dopo l'inizio della reazione. Determinare il contenuto in retinolo riferendosi ad una curva di taratura ottenuta a partire da soluzioni benzeniche di retinolo tipo a concentrazioni crescenti trattate con il reattivo di Carr-Price (da 2 a 16 UI di retinolo tipo (3.17) in ml 0,3 di benzene (3.14) + ml 3 di reattivo di Carr-Price (3.16). La curva di taratura deve essere periodicamente ricontrollata sulla scorta dello standard e della soluzione del reattivo di Carr-Price preparato di fresco.

5.4.2. Prodotti appartenenti al gruppo B

Prelevare una parte aliquota della soluzione in etere di petrolio ottenuta in 5.2 e contenente all'incirca 200 UI di retinolo. Portare a secco sotto vuoto e riprendere il residuo con ml 25 di isopropanolo (3.18). Misurarne la densità ottica allo spettrofotometro a 325, 310 e 334 nm. Il massimo di assorbimento è a 325 nm. Il contenuto in retinolo della soluzione viene calcolato nel seguente modo:

$$E_{325} \cdot 18,30 = \text{UI di vitamina A/ml}$$

I rapporti tra le densità ottiche

$$E_{310} : E_{325} \text{ ed } E_{334} : E_{325}$$

debbono essere di 6:7 = 0,857.

Se uno di questi rapporti si scosta sensibilmente da questo valore (< 0,830 o > 0,880), la determinazione delle densità ottiche deve essere preceduta dalla cromatografia secondo le modalità indicate in 5.3.2. Se la misura delle densità ottiche effettuata dopo cromatografia fa rilevare che i rapporti sopraddetti si scostano ancora sensibilmente dal valore di 0,857 (< 0,830 o > 0,880) la determinazione deve essere effettuata seguendo il procedimento previsto per i prodotti del gruppo A.

6. Calcolo del risultato

Calcolare il contenuto in retinolo del campione tenendo conto del peso della sostanza sottoposta ad analisi e delle diluizioni effettuate nel corso della analisi. Esprimere i risultati in UI di retinolo per kg.

⁽¹⁾ Il contenuto in carotene può essere determinato misurando la densità ottica a 450 nm: $\frac{E^{1\%}}{1 \text{ cm}} = 2\,600$.

Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare:

- 20 %, in valore relativo, per i contenuti inferiori a 75 000 UI/kg;
- 15 000 UI per i contenuti compresi tra 75 000 e 150 000 UI/kg;
- 10 %, in valore relativo, per i contenuti compresi tra 150 000 e 250 000 UI/kg;
- 25 000 UI per i contenuti compresi tra 250 000 e 500 000 UI/kg;
- 5 %, in valore relativo, per i contenuti che superano le 500 000 UI/kg.

2. DETERMINAZIONE DELLA TIAMINA (ANEURINA, VITAMINA B₁)

1. Scopo e campo di applicazione

Il metodo permette di determinare il contenuto in tiamina (aneurina, vitamina B₁) dei mangimi, dei concentrati e delle premiscele. Il limite inferiore della determinazione è di 5 ppm.

2. Principio

Il campione viene trattato a caldo con acido solforico diluito e poi idrolizzato per via enzimatica. La soluzione ottenuta è sottoposta ad ossidazione alcalina. Il tiocromo che così si forma è estratto con isobutanolo e determinato per fluorimetria.

3. Reattivi

- 3.1. Soluzione tipo di tiamina a 100 µg/ml: sciogliere mg 112,3 di cloridrato di tiamina purissimo, precedentemente seccato sotto vuoto fino a peso costante, in ml 1000 di acido solforico 0,2 N (3.2). Al freddo e lontano dalla luce diretta questa soluzione si conserva per un mese.
- 3.2. Acido solforico 0,2 N
- 3.3. Disolfito di sodio, puro
- 3.4. Soluzione al 20 % (p/v) di ferricianuro di potassio p.a.
- 3.5. Soluzione al 25 % (p/v) di idrossido di potassio p.a.
- 3.6. Miscela ossidante: mescolare ml 2 della soluzione di ferricianuro di potassio (3.4) a ml 48 della soluzione di idrossido di potassio (3.5). Questa miscela non si conserva più di 4 ore.
- 3.7. Isobutanolo, p.a.
- 3.8. Soluzione di acetato di sodio p.a. 2,5 N
- 3.9. Preparazione multienzimatica contenente proteasi, fosfatasi e amilasi (per esempio, clarasi)
- 3.10. Etanolo al 96 % (v/v)

4. Apparecchiatura

- 4.1. Bagnomaria
- 4.2. Centrifuga (3 500 giri/min) con tubi di ml 30-50 di capacità, provvisti di tappo smerigliato
- 4.3. Fluorimetro

5. Modo di operare

5.1. Idrolisi enzimatica

Mettere in due palloni tarati da ml 250 e denominati A e B una medesima quantità di materiale prelevato dal campione finemente macinato e contenenti circa µg 100 di tiamina; aggiungere ml 125 di acido solforico (3.2). *Al solo pallone A* aggiungere, inoltre, ml 1 della soluzione tipo (3.1) (tipo interno).

Agitare energicamente, porre i palloni in un bagnomaria bollente e tenerveli per 15 minuti agitandoli di tanto in tanto. Lasciare raffreddare fino a 45 °C circa. Aggiungere in ogni pallone ml 20 della soluzione di acetato di sodio (3.8) e g 0,5 della preparazione multienzimatica (3.9); lasciare riposare per 20 minuti a temperatura ambiente. Aggiungere ml 20 della soluzione di acetato di sodio (3.8), portare a volume con acqua, omogeneizzare e filtrare. Raccogliere i filtrati A e B dopo averne scortato i primi ml 15. Preparare le seguenti soluzioni.

5.1.1. Soluzione tipo T

Porre in un tubo da centrifuga (4.2.) ml 5 del filtrato A e mg 10 circa di disolfito di sodio (3.3.). Immergere il tubo in un bagnomaria bollente per 15 minuti e lasciarlo poi raffreddare fino a temperatura ambiente.

5.1.2. Soluzioni A (tipo interno) e B (campione)

Introdurre in un tubo da centrifuga (4.2) ml 5 del filtrato A ed in altro tubo (4.2) ml 5 del filtrato B.

5.2. Ossidazione

Aggiungere alle soluzioni T, A e B ml 5 della miscela ossidante (3.6), dopo un minuto, ml 10 di isobutanolo (3.7). Tappare i tubi e agitare energicamente per 5 secondi. Lasciare riposare per un minuto e centrifugare per separare le fasi. Prelevare da ogni tubo ml 5 della fase superiore isobutanolica, introdurla rispettivamente in altrettanti palloni tarati da ml 25, portare a volume con etanolo (3.10) ed omogeneizzare (= estratti T, A e B).

5.3. Misurazione della fluorescenza

Effettuare le misure alla lunghezza d'onda alla quale il fluorimetro dà una risposta ottimale alla fluorescenza del tiocromo. Irradiare a circa 365 nm. Azzerare lo strumento con l'estratto T. Misurare la intensità della fluorescenza degli estratti A e B.

6. Calcolo del risultato

Il contenuto in µg di tiamina per kg di campione è dato dalla formula:

$$\frac{d \cdot b}{(a-b) c}$$

dove

a = intensità della fluorescenza dell'estratto A (tipo interno)

b = intensità della fluorescenza dell'estratto B (campione)

c = peso in g delle quantità di sostanza sottoposte all'analisi

d = quantità di tiamina, in µg, aggiunta alla quantità di sostanza sottoposta all'analisi (tipo interno)

Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare:

— 10 %, in valore relativo, per i contenuti inferiori a 500 mg/kg

— 5 %, in valore relativo, per i contenuti uguali o superiori a 500 mg/kg.

3. DETERMINAZIONE DELL'ACIDO ASCORBICO E DELL'ACIDO DEIDROASCORBICO (VITAMINA C)

1. Scopo e campo di applicazione

Il metodo permette di determinare la somma degli acidi ascorbico e deidroascorbico (vitamina C) nei mangimi, nei concentrati e nelle premiscele. Il limite inferiore della determinazione è di 5 ppm. I prodotti sono suddivisi in due gruppi a seconda del loro presunto contenuto in vitamina C:

Gruppo A: contenuto inferiore a g 10/kg

Gruppo B: contenuto uguale o superiore a g 10/kg

2. Principio

Il campione, posto in sospensione in una soluzione diluita di acido metafosforico, è estratto con cloroformio. La fase acquosa viene trattata con una soluzione di 2,6-diclorofenol-indofenolo, per trasformare l'acido ascorbico in acido deidroascorbico, e poi con una soluzione di 2,4-dinitrofenilidrazina. L'idrazone che si forma è estratto con una miscela di acetato di etile, acido acetico glaciale e acetone. La soluzione viene cromatografata su colonna di gel di silice, l'eluato è evaporato a secco ed il residuo viene disciolto in acido solforico diluito. La densità ottica della soluzione viene determinata con il fotometro a 509 nm.

Per i prodotti del gruppo A, l'eluato, ottenuto per cromatografia su colonna, viene inoltre cromatografato su strato sottile per isolare l'idrazone.

3. Reattivi

- 3.1. Soluzione tipo allo 0,05 % di acido L-ascorbico: sciogliere mg 50 di acido L-ascorbico p.a. in circa ml 20 della soluzione di acido metafosforico (3.2) e portare a ml 100 con acqua. Da prepararsi al momento dell'uso.
- 3.2. Soluzioni al 10 % (p/v) di acido metafosforico: sciogliere in acqua g 200 di acido metafosforico p.a., sminuzzati in mortaio, e portare a ml 2000 con acqua. Conserva al 4 °C. Stabile per una settimana.
- 3.3. Cloroformio p.a.
- 3.4. Soluzione allo 0,5 % (p/v) di 2,6-diclorofenol-indofenolo p.a. Da prepararsi al momento dell'uso
- 3.5. Coadiuvanti per la filtrazione (S. ed S. n. 121 analoghi)
- 3.6. Soluzione acida al 2 % (p/v) di 2,4-dinitrofenilidrazina: sciogliere g 2 di 2,4-dinitrofenilidrazina in ml 100 di acido solforico diluito (ml 25 di acido solforico p.a., d: 1,84, portati a ml 100 con acqua). A freddo questa soluzione si conserva una settimana.
- 3.7. Azoto oppure
- 3.8. Anidride carbonica, in bombole
- 3.9. Miscela di acetato di etile p.a./acido acetico glaciale/acetone p.a. 96/2/2 in volume
- 3.10. Miscela di diclorometano p.a./acido acetico glaciale: 97/3 in volume
- 3.11. Gel di silice, granulometria: mm 0,05-0,2
- 3.12. Gel di silice H, secondo Stahl, per cromatografia su strato sottile
- 3.13. Acido solforico diluito: porre ml 105 di acqua in un pallone tarato da ml 200 e portare a volume con acido solforico p.a., d: 1,84
- 3.14. Solvente di eluizione per cromatografia su strato sottile: miscelare ml 75 di etere etilico p.a., ml 25 di acetato di etile p.a. e ml 4,0 di acido acetico al 96 % (p/v). Rinnovararlo dopo 2-3 cromatografie.

4. Apparecchiatura

- 4.1. Bagno termostatico regolato a + 20 °C
- 4.2. Centrifuga (g/m 3 500) con tubi di ml 40-50 di capacità, provvisti di tappo smerigliato
- 4.3. Apparecchio rotativo per evaporazione sotto vuoto provvisto di palloni da ml 250.
- 4.4. Colonne da cromatografia, in vetro (altezza: mm 100, diametro interno mm 20) provviste di setto poroso in vetro (ad esempio tubi di Allihn)
- 4.5. Spettrofotometro o colorimetro a filtri, con vaschette di mm 10 di spessore,
- 4.6. Apparecchiatura per cromatografia su strato sottile, con lastre di gel di silice (3.12) spessore dello strato mm 0,5-0,6 (vanno bene le lastre pronte per l'impiego). Seccare le lastre per 2h30-3 ore in stufa a 120-130 °C.

Lasciare raffreddare e conservare poi in essiccatore almeno 24 ore prima di utilizzarle.

- 4.7. Stufa a secco regolata a 120-130 °C.

5. Modo di procedere

5.1. Estrazione

Introdurre in due palloni tarati A e B da ml 250, provvisti di tappo smerigliato, quantità identiche di campione finemente macinato, contenenti circa 200 µg di vitamina C. Aggiungere *solo nel pallone A* ml 0,4 della soluzione tipo di vitamina C (3.1) ed omogeneizzare scuotendo leggermente (tipo interno).

Aggiungere in ogni pallone ml 30 di cloroformio (3.3) e ml 25 della soluzione di acido metafosforico (3.2) a 4 °C. Agitare brevemente e lasciare poi riposare per 10-15 minuti. Aggiungere ml 25 di acqua, tappare bene i palloni, agitare energicamente per 10 secondi e lasciare riposare per 10-15 minuti nel bagno termostatico (4.1). Centrifugare per separare la fase acquosa da quella cloroformica. Proseguire le operazioni simultaneamente sugli estratti acquosi A (tipo interno) e B, come descritto qui di seguito.

5.2. Ossidazione

Prelevare con una pipetta tarata ml 40 della soluzione acquosa sovrastante (leggermente torbida) ottenuta in 5.1, introdurla in un provettone a tappo smerigliato, aggiungervi ml 0,5-1 della soluzione di 2,6-diclorofenolindofenolo (3.4) e mescolare. Si forma una colorazione rossa, che deve persistere almeno 15 minuti. Aggiungere poi mg 300 circa di coadiuvante della filtrazione (3.5), agitare e filtrare su un filtro a pieghe asciutto. Il filtrato può non essere limpido.

5.3. Reazione con la 2,4-dinitrofenilidrazina ed estrazione dell'idrazone

Prelevare con una pipetta tarata ml 10 del filtrato ottenuto in 5.2, introdurli in un tubo da centrifuga (4.2), aggiungere ml 2 della soluzione di 2,4-dinitrofenilidrazina (3.6) e mescolare. Fare passare rapidamente nel tubo una corrente di azoto (3.7) o di anidride carbonica (3.8), tappare il tubo ed immergerlo per circa 15 ore (una notte) nel bagno termostatico (4.1).

Aggiungere poi ml 3 di acqua, ml 20 della miscela acetato di etile/acido acetico glaciale/acetone (3.9) e mg 800 circa di coadiuvante della filtrazione (3.5).

Tappare il tubo, agitare energicamente per 30 secondi e centrifugare. Introdurre ml 15 della fase superiore in un pallone da evaporazione ed evaporare a pressione ridotta nell'evaporatore rotativo (4.3), fino ad ottenere un residuo oleoso. Sciogliere il residuo in ml 2 della miscela acetato di etile/acido acetico glaciale/acetone (3.9) riscaldando a 50 °C; lasciare raffreddare, aggiungere ml 10 della miscela diclorometano/acido acetico glaciale (3.10) e mescolare.

5.4. Cromatografia su colonna

Riempire una colonna per cromatografia (4.4), fino all'altezza di mm 30, di miscela diclorometano/acido acetico glaciale (3.10). Mettere in sospensione (agitando energicamente) in ml 30 della miscela diclorometano/acido acetico glaciale (3.10) g 5 di gel di silice (3.11); versare la sospensione nella colonna. Lasciare depositare e assestare poi sotto debole pressione di azoto (3.7).

Versare nella colonna la soluzione ottenuta in 5.3, lavare il pallone con una piccola quantità della miscela diclorometano/acido acetico glaciale (3.10) e versare nella colonna; riempire poi quest'ultima con la miscela (3.10) e proseguire il lavaggio della colonna con la stessa miscela (3-4 aliquote di ml 5 circa) fino ad ottenere un eluato incolore. Eliminare la frazione di eluato colorata in giallo.

Eluire la zona rossastra che sta in testa alla colonna con la miscela acetato di etile/acido acetico glaciale/acetone (3.9), raccogliere l'eluato ed evaporarlo a secco.

5.4.1. *Per i prodotti del gruppo A (contenuti in vitamina C inferiori a g 10/kg)*, sciogliere il residuo in ml 2 della miscela acetato di etile/acido acetico glaciale/acetone (3.9) e procedere immediatamente alla cromatografia su strato sottile come descritto in 5.5.

5.4.2. *Per i prodotti del gruppo B (contenuti in vitamina C uguali o superiori a g 10/kg)*, riprendere il residuo oleoso con ml 4,0 di acido solforico diluito (3.13), agitare energicamente per scioglierlo completamente e provvedere alla misurazione della densità ottica come descritto in 5.6.

5.5. Cromatografia su strato sottile

Effettuare in doppio le operazioni indicate qui appresso. Deposare sulla lastra (4.6) sotto forma lineare ml 0,5 della soluzione ottenuta in 5.4.1. Sviluppare per 20 minuti almeno col solvente di eluizione (3.14), in vaschetta saturata, fino alla separazione netta della zona dell'idrazione colorato in rosa. Lasciare asciugare all'aria. Delimitare la zona rosa, raschiarla con una spatola e trasferire quantitativamente la massa polverulenta in una colonna per cromatografia (4.4).

Eluire successivamente una volta con ml 2 e 2 volte con ml 1,5 della miscela acetato di etile/acido acetico glaciale/acetone (3.9). Raccogliere l'eluato in un piccolo pallone (l'ultima frazione deve essere incolore). Evaporare a secco, riprendere il residuo oleoso con ml 4,0 di acido solforico diluito (3.13), agitare energicamente per sciogliere completamente il residuo e procedere alla misurazione della densità ottica.

5.6. Misura della densità ottica

Misurare la densità ottica con il fotometro a 509 nm, 20-30 minuti dopo aver sciolto il residuo in acido solforico. Effettuare le misure in raffronto con l'acido solforico diluito (3.13).

5.7. Prova in bianco

Eeguire una prova in bianco applicando lo stesso modo di operare, in assenza del campione.

6. Calcolo del risultato

Il contenuto in g di vitamina C per kg di campione è dato dalla formula:

$$\frac{(c-a) \cdot 2}{(b-c) \cdot 10d}$$

dove

a = densità ottica del bianco

b = densità ottica della soluzione del tipo interno

c = densità ottica della soluzione in esame

d = peso in g della quantità di sostanza sottoposta ad analisi.

Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non debbono superare:

- 10 %, in valore relativo, per i contenuti in vitamina C inferiori a g 10 per kg;
- 5 %, in valore relativo, per i contenuti uguali o superiori a g 10/kg.