

DODICESIMA DIRETTIVA 93/117/CE DELLA COMMISSIONE

del 17 dicembre 1993

che fissa i metodi d'analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per animali

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

vista la direttiva 70/373/CEE del Consiglio, del 20 luglio 1970, relativa all'introduzione di modi di prelievo di campioni e di metodi di analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per animali ⁽¹⁾, modificata da ultimo dal regolamento (CEE) n. 3768/85 ⁽²⁾, in particolare l'articolo 2,

considerando che la direttiva 70/373/CEE prevede che i controlli ufficiali degli alimenti per animali destinati ad accertare l'osservanza dei requisiti previsti da disposizioni legislative, regolamentari o amministrative, in materia di qualità e composizione degli alimenti per animali, siano effettuati secondo modi di prelievo di campioni e metodi di analisi comunitari;

considerando che, per controllare il rispetto delle condizioni di impiego della robenidina e del metil-benzoato nell'alimentazione animale, è opportuno stabilire un metodo di analisi comunitario per tale additivo;

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

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Gli Stati membri prescrivono che le analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per animali, per quanto riguarda il

loro contenuto in robenidina e metil-benzoato, siano effettuate secondo i metodi descritti nell'allegato della presente direttiva.

Articolo 2

Gli Stati membri mettono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alle disposizioni della presente direttiva entro il 30 novembre 1994. Essi ne informano immediatamente la Commissione.

Quando gli Stati membri adottano tali disposizioni, queste contengono un riferimento alla presente direttiva o sono corredate da siffatto riferimento all'atto della pubblicazione ufficiale. Le modalità del riferimento sono decise dagli Stati membri.

Articolo 3

La presente direttiva entra in vigore il terzo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*.

Fatto a Bruxelles, il 17 dicembre 1993.

Per la Commissione

René STEICHEN

Membro della Commissione

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

⁽²⁾ GU n. L 362 del 31. 12. 1985, pag. 8.

ALLEGATO

1. DETERMINAZIONE DELLA ROBENIDINA

1,3-bis [(4-clorobenziliden) ammino] guanidina cloridrato

1. Scopo e campo d'applicazione

Il metodo serve a determinare la robenidina nei mangimi. Il limite inferiore di determinazione è 5 mg/kg.

2. Principio

Il campione viene estratto con metanolo acidificato. Un'aliquota dell'estratto viene sottoposta a purificazione su una colonna di allumina. La robenidina, eluita dalla colonna con metanolo, concentrata a piccolo volume, viene ripresa con la soluzione della fase mobile fino ad un preciso volume. Il tenore di robenidina viene determinato mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) su fase inversa, utilizzando un rivelatore UV.

3. Reattivi

3.1. Metanolo

3.2. Metanolo acidificato

Trasferire 4,0 ml di acido cloridrico ($P_{20} = 1,18$) in un pallone tarato da 500 ml, portare a volume con metanolo (3.1) e agitare. Questa soluzione deve essere preparata al momento dell'uso.

3.3. Acetonitrile, per HPLC

3.4. Setacci molecolari

Tipo 3A, sferette 8-12 mesh (1,6-2,5 mm, alluminosilicato cristallino, diametro dei pori 0,3 nm).

3.5. Allumina acida, attività I per cromatografia su colonna

Trasferire 100 g di allumina acida in adatto contenitore e aggiungere 2,0 ml di acqua. Tappare e agitare per circa 20 minuti. Conservare in un contenitore ben chiuso.

3.6. Soluzione di fosfato di potassio monobasico, 0,025 M:

sciogliere 3,40 g di fosfato di potassio monobasico anidro in acqua per HPLC in un pallone tarato da 1 000 ml, portare a volume e agitare.

3.7. Soluzione di fosfato di sodio bibasico, 0,025 M:

sciogliere 3,55 g di fosfato di sodio bibasico anidro (o 4,45 g di diidrato, o 8,95 di dodecaidrato) in acqua per HPLC in un pallone tarato da 1 000 ml, portare a volume e agitare.

3.8. Fase mobile per HPLC

Miscelare i seguenti reagenti:

650 ml di acetonitrile (3.3),

250 ml di acqua per HPLC,

50 ml di soluzione di fosfato di potassio monobasico (3.6),

50 ml di soluzione di fosfato di sodio bibasico (3.7).

Filtrare attraverso un filtro da 0,22 μm (4.6) e degassare la soluzione (per esempio, mediante trattamento in bagno ultrasuoni).

3.9. Standard analitico:

Robenidina pura, 1,3-bis [(4-clorobenziliden) ammino] guanidina cloridrato.

3.9.1. Robenidina, soluzione standard madre : 300 µg/ml.

Pesare $30 \pm 0,1$ mg di robenidina standard (3.9). Sciogliere con metanolo acidificato (3.2) in un pallone tarato da 100 ml, portare a volume con lo stesso solvente e agitare. Avvolgere il pallone in un foglio di alluminio e conservarlo al buio.

3.9.2. Robenidina, soluzione standard intermedia : 12 µg/ml.

Trasferire 10,0 ml della soluzione standard madre (3.9.1) in un pallone tarato da 250 ml, portare a volume con la fase mobile (3.8) e agitare. Avvolgere il pallone in foglio di alluminio e conservarlo al buio.

3.9.3. Soluzioni standard di calibrazione

In una serie di palloni graduati da 50 ml trasferire 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 e 25,0 ml di soluzione standard intermedia (3.9.2). Portare a volume con la fase mobile (3.8) e agitare. Queste soluzioni corrispondono rispettivamente a 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 e 6,0 µg/ml di robenidina. Queste soluzioni devono essere preparate al momento dell'uso.

4. **Apparecchiatura**

4.1. *Colonna di vetro :*

in vetro ambra, dotata di rubinetto e serbatoio da circa 150 ml, diametro interno 10-15 mm, lunghezza 250 mm ;

4.2. *Agitatore con piattaforma rotante ;*

4.3. *Evaporatore rotante ;*

4.4. *Apparecchiatura per HPLC con rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile oppure con rivelatore a diodi in serie, lunghezza d'onda 250-400 µm ;*

4.4.1. *Colonna per cromatografia liquida, 300 mm × 4 mm, C₁₈, con fase stazionaria 0,10 µm, o colonna equivalente ;*

4.5. *Carta da filtro in fibra di vetro (Whatman GF/A o equivalente) ;*

4.6. *Filtri a membrana, 0,22 µm ;*

4.7. *Filtri a membrana, 0,45 µm.*

5. **Procedimento**

Nota : La robenidina è sensibile alla luce. Usare vetreria ambrata in tutte le operazioni, oppure coprire la vetreria con fogli di alluminio.

5.1. *Fattore di recupero*

5.1.1. *Analizzare un campione di mangime in bianco, per accertare l'assenza di robenidina o di altre sostanze che possono interferire.*

5.1.2. *Procedere a una prova di recupero, analizzando un campione del mangime in bianco addizionato di una quantità di robenidina simile a quella presente nel campione. Per raggiungere il livello di 60 mg/kg, trasferire 3,0 ml della soluzione standard madre (3.9.1) in una beuta da 250 ml. Evaporare la soluzione fino a circa 0,5 ml in corrente d'azoto. Aggiungere 15 g del mangime in bianco, mescolare per 10 minuti prima di procedere all'estrazione (5.2).*

Nota : Il mangime in bianco deve avere una composizione simile a quella del campione.

5.2. *Estrazione*

Introdurre in una beuta da 250 ml $\pm 0,1$ g del campione, aggiungere 100,0 ml di metanolo acidificato (3.2), tappare e agitare per un'ora sull'agitatore (4.2). Filtrare la soluzione attraverso un filtro in fibra di vetro (4.5) e raccogliere tutto il filtrato in una beuta da 150 ml. Aggiungere e raccogliere tutto il filtrato in una beuta da 150 ml. Aggiungere 7,5 g di setacci molecolari (3.4), tappare e agitare per cinque minuti. Filtrare immediatamente attraverso un filtro in fibra di vetro. Conservare questa soluzione per la fase di purificazione (5.3).

5.3. Purificazione

5.3.1. Preparazione della colonna di allumina :

introdurre un piccolo batuffolo di lana di vetro all'estremità inferiore della colonna (4.1) e comprimerlo con un'asta di vetro. Prelevare 11,0 g di allumina (3.5) e trasferirli nella colonna. In questa operazione fare attenzione a minimizzare l'esposizione all'atmosfera. Battere delicatamente la colonna caricata alla sua estremità inferiore per compattare l'allumina.

5.3.2. Purificazione del campione :

trasferire sulla colonna, mediante pipetta, 5,0 ml dell'estratto del campione preparato in 5.2. Posizionare la punta della pipetta in prossimità della parete della colonna e far assorbire la soluzione sull'allumina. Eluire la robenidina con 100 ml di metanolo (3.1) alla velocità di 2-3 ml/min raccogliendo l'eluato in un pallone da 250 ml. Evaporare a secchezza a pressione ridotta e a 40 °C mediante l'evaporatore rotante (4.3). Ridisciogliere il residuo in 3-4 ml di fase mobile (3.8) e trasferirlo quantitativamente in un pallone graduato da 10 ml. Lavare il pallone con più porzioni da 1-2 ml di fase mobile e trasferire i lavaggi nel pallone graduato. Portare a volume con lo stesso solvente e agitare. Un'aliquota viene filtrata attraverso un filtro da 0,45 µm (4.7). Riservare questa soluzione per la determinazione in HPLC (5.4).

5.4. Determinazione mediante HPLC

5.4.1. Condizioni di lavoro :

i parametri qui riportati sono di riferimento. Possono essere tuttavia utilizzate altre condizioni cromatografiche in grado di dare risultati equivalenti.

Conna : (4.4.1)

Fase mobile : (3.8)

Flusso : 1,5 — 2 ml/min

Lunghezza d'onda di rivelazione : 317 nm

Volume iniettato : 20-50 µl

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando parecchie volte la soluzione di calibrazione (3.9.3) contenente 3,6 µg/ml fino a ottenimento di altezze dei picchi e tempi di ritenzione costanti.

5.4.2. Curva di calibrazione :

iniettare ciascuna soluzione di calibrazione (3.9.3) parecchie volte e misurare le altezze (aree) dei picchi per ciascuna concentrazione. Tracciare una curva di calibrazione riportando le altezze medie dei picchi o le aree medie delle soluzioni di calibrazione sulle ordinate e le corrispondenti concentrazioni in µg/ml sulle ascisse.

5.4.3. Soluzione del campione in esame :

iniettare parecchie volte l'estratto del campione (5.3.2) usando lo stesso volume delle soluzioni di calibrazione e determinare l'altezza (area) media dei picchi di robenidina.

6. Calcolo dei risultati

Dall'altezza (area) media dei picchi di robenidina della soluzione campione calcolare la concentrazione della soluzione campione in µg/ml per confronto con la curva di calibrazione (5.4.2).

Il contenuto di robenidina, p (mg/kg) del campione è dato dalla formula seguente :

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

dove :

c = concentrazione di robenidina della soluzione campione in µg/ml.

m = massa della porzione di sostanza analizzata, in grammi.

7. Convalida dei risultati

7.1. Identità

L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia oppure usando un rivelatore di diodi in serie in cui vengono confrontati gli spettri dell'estratto di campione e della soluzione di calibrazione (3.9.3) contenente 6 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografia

Un estratto di campione viene « rinforzato » mediante aggiunta di un quantitativo adeguato di soluzione di calibrazione (3.9.3). Il quantitativo di robenidina aggiunto deve essere analogo a quello stimato di robenidina trovato nell'estratto di campione.

Solo l'altezza del picco della robenidina dovrebbe risultare aumentato dopo aver tenuto conto sia della quantità di robenidina aggiunta che della diluizione dell'estratto. La larghezza del picco, a metà della sua altezza massima, deve discostarsi al massimo del $\pm 15\%$ dalla larghezza originale.

7.1.2. Rivelazione di diodi in serie

I risultati sono valutati con i seguenti criteri:

- le lunghezze d'onda del massimo di assorbimento degli spettri relativi al campione ed allo standard, registrate all'apice del picco, devono essere le stesse entro un margine determinato dal potere di risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione mediante diodi in serie, questo è tipicamente ± 2 nm;
- tra 250 e 400 nm, gli spettri relativi al campione ed allo standard, registrati all'apice del picco cromatografico, non devono essere differenti per le parti dello spettro comprese tra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio viene soddisfatto quando sono presenti gli stessi massimi e quando in nessun punto osservato la deviazione tra i due spettri supera il 10 % dell'assorbanza dell'analita standard;
- tra 250 e 400 nm, gli spettri relativi all'estratto del campione, registrati nel tratto ascendente, all'apice e nel tratto discendente del picco cromatografico, non devono essere differenti per quelle parti dello spettro comprese tra il 10 ed il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi massimi e quando in nessun punto osservato la deviazione tra gli spettri supera il 10 % dell'assorbanza dello spettro dell'apice.

Se uno di questi criteri non è soddisfatto, la presenza dell'analita non è confermata.

7.2. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve superare il 10 % del valore più elevato dei due risultati, per contenuti di robenidina superiori a 15 mg/kg.

7.3. Recupero

Per il campione in bianco addizionato il recupero deve essere pari ad almeno l'85 %.

8. Risultati di uno studio collaborativo

La CEE ha organizzato uno studio collaborativo in cui quattro campioni di alimenti per polli e per conigli, in forma di farina o di pellet, sono stati analizzati da 12 laboratori. Per ogni campione sono state eseguite analisi in doppio.

Risultati

	Polli		Conigli	
	Farina	Pellet	Farina	Pellet
media mg/kg	27,00	27,99	43,6	40,1
S_r (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
Recupero (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

S_r = deviazione standard della ripetibilità,

CV_r = coefficiente di variazione della ripetibilità,

S_R = deviazione standard della riproducibilità,

CV_R = coefficiente di variazione della riproducibilità.

2. DETERMINAZIONE DEL METIL-BENZOQUATO

7-benzilossi-6-butil-3-metossicarbonil-4-chinolone

1. Finalità e campo di applicazione

Il metodo serve a determinare il metil-benzoquato nei mangimi. Il limite inferiore di determinazione è 1 mg/kg.

2. Principio

Il metil-benzoquato viene estratto dal campione con una soluzione metanolica di acido metansulfonico. L'estratto viene purificato con diclorometano, mediante cromatografia a scambio ionico e poi nuovamente con diclorometano. Il tenore di metil-benzoquato viene determinato mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) su fase inversa utilizzando un rivelatore UV.

3. Reattivi

3.1. Diclorometano

3.2. Metanolo per HPLC

3.3. Fase mobile per HPLC:

miscela di metanolo (3.2) e acqua per HPLC 75 + 25 (V + V).

Filtrare attraverso un filtro da 0,22 µm (4.5) e degassare la soluzione (per esempio mediante trattamento con ultrasuoni per 10 minuti).

3.4. Soluzione di acido metansulfonico, $\sigma = 2\%$

Diluire 20,0 ml di acido metansulfonico a 1 000 ml con metanolo (3.2).

3.5. Soluzione di acido cloridrico, $\sigma = 10\%$

Diluire 100 ml di acido cloridrico (P₂₀ ca. 1,18 g/ml) a 1 000 ml con acqua.

3.6. Resina scambiatrice di cationi Amberlite CG-120 (Na), 100-200 mesh

La resina viene pretrattata prima dell'uso: sospendere 100 g di resina con 500 ml di soluzione di acido cloridrico (3.5) e portare ad ebollizione su piastra calda continuando ad agitare. Lasciare raffreddare e decantare l'acido. Filtrare attraverso carta da filtro sotto vuoto. Lavare due volte la resina con porzioni da 500 ml di acqua e poi con 250 ml di metanolo (3.2). Risciacquare la resina con un'ulteriore porzione da 250 ml di metanolo ed essiccarla facendo passare aria attraverso il pannello del filtro. Conservare la resina essiccata in una bottiglia tappata.

3.7. Sostanza standard: metil-benzoquato (7-benzilossi-6-butil-3-metossicarbonil-4-chinolone).

3.7.1. Metil-benzoquato, soluzione madre standard, 500 µg/ml

Pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 50 mg di sostanza standard (3.7), scioglierli nella soluzione di acido metansulfonico (3.4) in un pallone graduato da 100 ml, portare a volume e miscelare.

3.7.2. Metil-benzoquato, soluzione standard intermedia, 50 µg/ml

Trasferire 5,0 ml della soluzione madre standard di metil-benzoquato (3.7.1) in un pallone graduato da 50 ml, portare a volume con metanolo (3.2) e miscelare.

3.7.3. Soluzioni di taratura

In una serie di palloni graduati da 25 ml, trasferire 1,0 - 2,0 - 3,0 - 4,0 - 5,0 ml di metil-benzoquato soluzione standard intermedia (3.7.2). Portare a volume con la fase mobile (3.3) e miscelare. Queste soluzioni hanno concentrazioni di 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 - 10,0 µg/ml di metil-benzoquato rispettivamente. Queste soluzioni devono essere preparate al momento dell'uso.

4. Apparecchiature

4.1. Agitatore da laboratorio

- 4.2. *Evaporatore rotante a film*
- 4.3. *Colonna di vetro (250 mm × 15 mm) dotata di rubinetto e serbatoio della capacità di circa 200 ml*
- 4.4. *Apparecchiatura per HPLC con rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile oppure con rivelatore a serie di diodi*
- 4.4.1. *Colonna per cromatografia liquida : 300 mm × 4 mm, C₁₈, con riempimento da 10 µm, o colonna equivalente*
- 4.5. *Filtri a membrana, 0,22 µm*
- 4.6. *Filtri a membrana, 0,45 µm*
5. **Procedimento**
- 5.1. *Generalità*
- 5.1.1. *Analizzare un campione di mangime in bianco, per accertare l'assenza del metil-benzoato o di altre sostanze che possono interferire.*
- 5.1.2. *Procedere a una prova di recupero, analizzando un campione bianco del mangime addizionato con una quantità di metil-benzoato simile a quella presente nel campione. Per aumentare il livello a 15 mg/kg, aggiungere 600 µl della soluzione madre standard (3.7.1) a 20 g del bianco del mangime, mescolare per 10 minuti prima di procedere all'estrazione (5.2).*

Nota : ai fini del presente metodo, il bianco del mangime deve avere una composizione simile a quella del campione, ed all'analisi il metil-benzoato non deve risultare presente.
- 5.2. *Estrazione*

Pesare circa 20 g del campione preparato con un'approssimazione di 0,01 g e trasferirli in una beuta da 250 ml. Aggiungere 100,0 ml di soluzione di acido metansulfonico (3.4) e agitare in agitatore meccanico (4.1) per 30 minuti. Filtrare la soluzione attraverso carta da filtro e conservare il filtrato per la fase di ripartizione liquido-liquido (5.3).
- 5.3. *Ripartizione liquido-liquido*

In un imbuto separatore da 500 ml contenente 100 ml di soluzione di acido cloridrico (3.5), trasferire 25,0 ml di filtrato ottenuto in (5.2). Aggiungere 100 ml di diclorometano (3.1) all'imbuto e agitare per 1 minuto. Lasciare separare gli strati e versare lo strato inferiore (diclorometano) in un pallone da 500 ml. Ripetere l'estrazione della fase acquosa con due ulteriori porzioni da 40 ml diclorometano e combinare queste porzioni con il primo estratto nel pallone. Evaporare a secchezza l'estratto in diclorometano sull'evaporatore rotante (4.2) a 40 °C sotto pressione ridotta. Sciogliere il residuo in 20 - 25 ml di metanolo (3.2), tappare il pallone e conservare tutto l'estratto per la cromatografia a scambio ionico (5.4).
- 5.4. *Cromatografia a scambio ionico*
- 5.4.1. *Preparazione della colonna a scambio cationico*

Inserire un tappo di lana di vetro nell'estremità inferiore di una colonna di vetro (4.3). Preparare una sospensione di 5,0 g della resina a scambio di cationi trattata (3.6) con 50 ml di acido cloridrico (3.5), versare nella colonna di vetro e far decantare. Scaricare l'eccesso di acido fino ad appena sopra la superficie della resina e lavare la colonna con acqua fino a quando l'effluente è neutro al tornasole. Trasferire 50 ml di metanolo (3.2) sulla colonna e drenare fino alla superficie della resina.
- 5.4.2. *Cromatografia in colonna*

Mediante una pipetta, trasferire accuratamente l'estratto ottenuto in (5.3) sulla colonna. Risciacquare il pallone con due porzioni da 5 - 10 ml di metanolo (3.2) e trasferire questi lavaggi nella colonna. Scaricare l'estratto fino alla superficie della resina e lavare la colonna con 50 ml di metanolo facendo attenzione che la portata non superi i 5 ml al minuto. Scartare l'effluente. Eluire il metil-benzoato dalla colonna con l'utilizzo di 150 ml di soluzione di acido metansulfonico (3.4) e raccogliere l'eluato della colonna in una beuta da 250 ml.

5.5. Ripartizione liquido-liquido

Trasferire l'eluato ottenuto in (5.4.2) in un imbuto separatore da 1 litro. Risciacquare la beuta con 5 - 10 ml di metanolo (3.2) e combinare i lavaggi con il contenuto dell'imbuto separatore. Aggiungere 300 ml di soluzione di acido cloridrico (3.5) e 130 ml di diclorometano (3.1). Agitare per 1 minuto e lasciar separare le fasi. Versare lo strato inferiore (diclorometano) in un pallone da 500 ml. Ripetere l'estrazione della fase acquosa con due ulteriori porzioni da 70 ml di diclorometano e combinare questi estratti con il primo nel pallone.

Evaporare a secchezza in evaporatore rotante (4.2) l'estratto di diclorometano a 40 °C a pressione ridotta. Sciogliere il residuo contenuto nel pallone con circa 5 ml di metanolo (3.2) e trasferire quantitativamente questa soluzione in un matraccio graduato da 10 ml. Risciacquare il pallone con ulteriori 2 porzioni da 1-2 ml di metanolo e trasferire anche queste nel matraccio graduato. Portare a volume con il metanolo e miscelare. Un'aliquota viene filtrata attraverso un filtro a membrana (4.6). Conservare questa soluzione per la determinazione mediante HPLC (5.6).

5.6. Determinazione mediante HPLC

5.6.1. Parametri

I parametri qui riportati sono di riferimento, ma possono venire applicate altre condizioni purché producano risultati equivalenti.

Colonna per cromatografia liquida (4.4.1)

Fase mobile per HPLC: miscela metanolo-acqua (3.3)

Portata: 1 - 1,5 ml/min

Lunghezza d'onda di rivelazione: 265 nm

Volume iniettato: 20 - 50 µl

Verificare la stabilità del sistema cromatografico iniettando parecchie volte la soluzione di calibrazione (3.7.3) contenente 3,6 µg/ml fino a ottenimento di altezze o aree dei picchi e tempi di ritenzione costanti.

5.6.2. Curva di calibrazione

Iniettare ciascuna soluzione di calibrazione (3.7.3) parecchie volte e misurare le altezze (aree) dei picchi per ciascuna concentrazione. Tracciare una curva di calibrazione riportando in ordinate l'altezza media o l'area media dei picchi delle soluzioni di calibrazione e in ascisse le corrispondenti concentrazioni in µg/ml.

5.6.3. Soluzione campione

Iniettare parecchie volte l'estratto del campione (5.5) usando lo stesso volume usato per le soluzioni di calibrazione e determinare l'altezza (area) media dei picchi del metil-benzoquato.

6. Calcolo dei risultati

Dall'altezza (area) media dei picchi del metil-benzoquato della soluzione campione dedurre la concentrazione della soluzione campione in µg/ml per confronto con la curva di calibrazione (5.6.2).

Il contenuto di metil-benzoquato P (mg/kg) del campione è dato dalla formula seguente:

$$P = \frac{c \times 40}{m}$$

dove:

c = concentrazione del metil-benzoquato nella soluzione campione in µg/ml,

m = massa della porzione di sostanza analizzata, in grammi.

7. Convalida dei risultati

7.1. Identità

L'identità dell'analita può essere confermata mediante co-cromatografia oppure usando un rivelatore a serie di diodi in cui vengono confrontati gli spettri dell'estratto del campione e della soluzione di calibrazione (3.7.3) contenente 10 µg/ml.

7.1.1. Co-cromatografia

Un estratto di campione viene rinforzato mediante aggiunta di soluzione standard intermedia (3.7.2). Il quantitativo di metil-benzoato aggiunto deve essere analogo a quello stimato di metil-benzoato trovato nell'estratto del campione. Solo l'altezza del picco del metil-benzoato dovrebbe risultare aumentata dopo aver tenuto conto sia della quantità di metil-benzoato aggiunta che della diluizione dell'estratto. La larghezza del picco, a metà della sua altezza massima, non deve discostarsi più del $\pm 10\%$ dalla larghezza originale.

7.1.2. Rivelazione a serie di diodi

I risultati sono valutati con i seguenti criteri:

- le lunghezze d'onda del massimo di assorbimento degli spettri relativi al campione ed allo standard, registrate all'apice del picco, devono essere le stesse entro una tolleranza determinata dal potere di risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione a serie di diodi, questa è tipicamente ± 2 nm;
- tra 220 e 350 nm, gli spettri relativi al campione ed allo standard, registrati all'apice del picco cromatografico, non devono essere differenti per le parti dello spettro comprese tra il 10 e il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio viene rispettato quando sono presenti gli stessi massimi e quando in nessun punto osservato la deviazione tra i due spettri supera il 15 % dell'assorbanza dell'analita standard;
- tra 220 e 350 nm, gli spettri relativi all'estratto del campione, registrati nel tratto ascendente, all'apice e nel tratto discendente del picco cromatografico, non devono essere differenti per quelle parti dello spettro comprese tra il 10 ed il 100 % dell'assorbanza relativa. Questo criterio è soddisfatto quando sono presenti gli stessi massimi e quando in nessun punto osservato la deviazione tra gli spettri supera il 15 % dell'assorbanza dello spettro dell'apice.

Se uno di questi criteri non è soddisfatto, la presenza dell'analita non è confermata.

7.2. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele effettuate sullo stesso campione non deve superare: 10 % relativo al valore più elevato dei due risultati per contenuti di metil-benzoato compresi tra 4 e 20 mg/kg.

7.3. Recupero

Per il campione in bianco rinforzato, il recupero deve essere pari ad almeno il 90 %.

8. Risultato di uno studio in collaborazione

Cinque campioni sono stati analizzati da 10 laboratori. Su ciascun campione sono state eseguite analisi in doppio.

Risultati

	Bianco	Farina 1	Pellet 1	Farina 2	Pellet 2
media	n.d.	4,50	4,50	8,90	8,70
S _r (mg/kg)	—	0,30	0,20	0,60	0,50
CV _r (%)	—	6,70	4,40	6,70	5,70
S _R (mg/kg)	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV _R (%)	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Rec. (%)	—	92,00	93,00	92,00	89,00

S_r = deviazione standard della ripetibilità,

CV_r = coefficiente di variazione della ripetibilità,

S_R = deviazione standard della riproducibilità,

CV_R = coefficiente di variazione delle riproducibilità.