

Edizione
in lingua italiana

Legislazione

Sommario

I Atti per i quali la pubblicazione è una condizione di applicabilità

.....

II Atti per i quali la pubblicazione non è una condizione di applicabilità

Commissione

81/712/CEE:

- ★ **Prima direttiva della Commissione, del 28 luglio 1981, che fissa metodi d'analisi comunitari per il controllo dei criteri di purezza di taluni additivi alimentari** 1

81/713/CEE:

- ★ **Decisione della Commissione, del 28 luglio 1981, recante l'elenco degli stabilimenti della Repubblica federativa del Brasile in provenienza dai quali è autorizzata l'importazione nella Comunità di carni fresche di bovini e di solipedi domestici** 28

81/714/CEE:

- ★ **Decisione della Commissione, del 28 luglio 1981, recante modifiche delle liste degli stabilimenti della Repubblica argentina e della Repubblica dell'Uruguay in provenienza dai quali è autorizzata l'importazione nella Comunità di carni fresche di bovini, di ovini e di solipedi domestici** 32

81/715/CEE:

- ★ **Nona direttiva della Commissione, del 31 luglio 1981, che fissa i metodi d'analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per animali** 38

II

(Atti per i quali la pubblicazione non è una condizione di applicabilità)

COMMISSIONE

PRIMA DIRETTIVA DELLA COMMISSIONE

del 28 luglio 1981

che fissa metodi d'analisi comunitari per il controllo dei criteri di purezza di taluni additivi alimentari

(81/712/CEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

vista la direttiva del Consiglio, del 23 ottobre 1962, relativa al riavvicinamento delle regolamentazioni degli Stati membri sulle sostanze coloranti che possono essere impiegate nei prodotti destinati all'alimentazione umana ⁽¹⁾, modificata da ultimo dalla direttiva 78/144/CEE ⁽²⁾, in particolare l'articolo 11, paragrafo 2,

vista la direttiva 64/54/CEE del Consiglio, del 5 novembre 1963, relativa al riavvicinamento delle legislazioni degli Stati membri sui conservativi che possono essere impiegati nelle derrate destinate all'alimentazione umana ⁽³⁾, modificata da ultimo dalla direttiva 79/40/CEE ⁽⁴⁾, in particolare l'articolo 8, paragrafo 2,

vista la direttiva 70/357/CEE del Consiglio, del 13 luglio 1970, relativa al riavvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti le sostanze che hanno effetti antiossidanti e che possono essere impiegate nei prodotti destinati all'ali-

mentazione umana ⁽⁵⁾, modificata da ultimo dalla direttiva 78/143/CEE ⁽⁶⁾, in particolare l'articolo 5, paragrafo 2,

considerando che tali disposizioni prevedono che i criteri di purezza generali e specifici degli additivi di cui trattasi siano controllati secondo metodi d'analisi comunitari;

considerando che è necessario adottare una prima serie di metodi per i quali gli studi hanno potuto essere condotti a termine;

considerando che i metodi d'analisi descritti nella presente direttiva sono conformi al parere del comitato permanente delle derrate alimentari,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Gli Stati membri prescrivono che le analisi necessarie al controllo dei criteri di purezza generali o specifici di taluni additivi alimentari siano effettuate

⁽¹⁾ GU n. 115 dell'11. 11. 1962, pag. 2645/62.

⁽²⁾ GU n. L 44 del 15. 2. 1978, pag. 20.

⁽³⁾ GU n. 12 del 27. 1. 1964, pag. 161/64.

⁽⁴⁾ GU n. L 13 del 19. 1. 1979, pag. 50.

⁽⁵⁾ GU n. L 157 del 18. 7. 1970, pag. 31.

⁽⁶⁾ GU n. L 44 del 15. 2. 1978, pag. 18.

secondo i metodi descritti all'allegato II, il cui campo d'applicazione è descritto all'allegato I.

Articolo 2

Gli Stati membri adottano le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva al più tardi il 20 febbraio 1983 e ne informano immediatamente la Commissione.

Articolo 3

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 28 luglio 1981.

Per la Commissione

Karl-Heinz NARJES

Membro della Commissione

ALLEGATO I

CAMPO D'APPLICAZIONE DEI METODI D'ANALISI COMUNITARI PER IL CONTROLLO DEI CRITERI DI PUREZZA DI CERTI ADDITIVI ALIMENTARI

I. INTRODUZIONE

II. SOSTANZE COLORANTI

- II.1. Determinazione delle sostanze estraibili con etere etilico dai coloranti organosolfonati idrosolubili che possono essere impiegati nei prodotti destinati all'alimentazione umana. Allegato II, metodo 1.

III. CONSERVATIVI

- III.1. Determinazione dell'acido formico, dei formiati e delle altre impurezze ossidabili presenti nell'acido acetico (E 260), nell'acetato di potassio (E 261) e di calcio (E 263) e nel diacetato di sodio (E 262). Allegato II, metodo 2.
- III.2. Determinazione delle sostanze non volatili presenti nell'acido propionico (E 280). Allegato II, metodo 3.
- III.3. Determinazione della perdita di massa all'essiccazione del nitrito di sodio (E 250). Allegato II, metodo 4.
- III.4. Prova limite per la presenza di acido salicilico nel *p*-idrossibenzoato di etile (E 214), nel sale sodico di quest'ultimo (E 215), nel *p*-idrossibenzoato di *n*-propile (E 216), nel sale sodico del *p*-idrossibenzoato di *n*-propile (E 217), nel *p*-idrossibenzoato di metile (E 218) e nel sale sodico del *p*-idrossibenzoato di metile (E 219). Allegato II, metodo 5.
- III.5. Determinazione dell'acido acetico libero presente nel diacetato di sodio (E 262). Allegato II, metodo 6.
- III.6. Determinazione dell'acetato di sodio presente nel diacetato di sodio (E 262). Allegato II, metodo 7.
- III.7. Prova limite per la presenza di aldeidi nell'acido sorbico (E 200), nei sorbati di sodio, di potassio e di calcio (E 201, E 202, E 203) e nell'acido propionico (E 280). Allegato II, metodo 8.

IV. ANTIOSSIDANTI

- IV.1. Determinazione del numero di perossidi nelle lecitine (E 322). Allegato II, metodo 9.
- IV.2. Determinazione delle sostanze insolubili nel toluolo presenti nelle lecitine (E 322). Allegato II, metodo 10.
- IV.3. Prova limite per la presenza di sostanze riducenti nei lattati di sodio, potassio e calcio (E 325, E 326, E 327). Allegato II, metodo 11.
- IV.4. Determinazione degli acidi volatili nell'acido fosforico (E 338). Allegato II, metodo 12.

IV.5. Prova limite per la presenza di nitrati nell'acido fosforico (E 338). Allegato II, metodo 13.

IV.6. Determinazione delle sostanze insolubili in acqua presenti nei fosfati mono-, di-, trisodico e nei fosfati mono-, di- e tripotassico [E 339 i), E 339 ii), E 339 iii), E 340 i), E 340 ii), E 340 iii)]. Allegato II, metodo 14.

V. GENERALITÀ

V.1. Determinazione del pH negli additivi alimentari. Allegato II, metodo 15.

*ALLEGATO II***METODI D'ANALISI RELATIVI AI CRITERI DI PUREZZA DEGLI ADDITIVI ALIMENTARI**

INTRODUZIONE

1. Preparazione del campione*1.1. Generalità*

La massa del campione di laboratorio destinato all'analisi deve essere normalmente di 50 g, a meno che non sia necessario un quantitativo maggiore per una determinazione specifica.

1.2. Preparazione del campione

Il campione deve essere omogeneizzato prima dell'analisi.

1.3. Conservazione

Il campione così preparato deve essere sempre conservato in un recipiente a chiusura ermetica.

2. Reattivi*2.1. Acqua*

2.1.1. Quando si fa riferimento all'acqua per le soluzioni, per le diluizioni o per i lavaggi, si intende sempre acqua distillata o acqua di purezza almeno equivalente.

2.1.2. Quando si fa riferimento ad una «soluzione» o ad una «diluizione» del reattivo senza altra indicazione, si intende una soluzione acquosa.

2.2. Prodotti chimici

Tutti i prodotti chimici devono essere di purezza analitica, salvo specificazioni diverse.

3. Apparecchiatura*3.1. Elenco dell'apparecchiatura*

L'elenco del materiale comprende solo le apparecchiature specializzate e con requisiti particolari.

3.2. Bilancia analitica

L'espressione «bilancia analitica» indica una bilancia avente una sensibilità non inferiore a 0,1 mg.

4. Espressione dei risultati*4.1. Risultati*

Il risultato indicato sul bollettino di analisi rappresenta il valore medio ottenuto da almeno due determinazioni la cui ripetibilità sia soddisfacente.

4.2. *Calcolo della percentuale*

Salvo disposizioni particolari, i risultati sono espressi come percentuale (m/m) del campione originale nello stato in cui esso è giunto al laboratorio.

4.3. *Numero di cifre significative*

Il risultato non deve essere espresso con un numero di cifre significative superiore a quanto la precisione del metodo permetta.

METODO 1

SOSTANZE ESTRAIBILI CON ETERE ETILICO DAI COLORANTI ORGANOSOLFONATI IDROSOLUBILI DESTINATI ALL'ALIMENTAZIONE UMANA

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

Il metodo permette di determinare le sostanze estraibili con etere presenti nei coloranti organosolfonati idrosolubili non mescolati ad un supporto.

2. **Definizione**

Sostanze estraibili con etere etilico: contenuto dei prodotti determinati con il metodo descritto.

3. **Principio**

Si estrae il colorante con etere etilico e si pesa il residuo secco dopo evaporazione dell'etere.

4. **Reattivi**

- 4.1. Etere etilico anidro (essiccato mediante cloruro di calcio calcinato di recente), esente da perossidi.

5. **Apparecchiatura**

- 5.1. Apparecchio Soxhlet.
- 5.2. Essiccatore contenente gel di silice di recente attivazione, o sostanze essiccanti analoghe, e munito di un indicatore di umidità.
- 5.3. Bilancia analitica.
- 5.4. Stufa regolata a 85 ± 2 °C.

6. **Modo di operare**

Pesare con esattezza su carta da filtro con l'approssimazione di 10 mg, una quantità di colorante dell'ordine di 10 g. Piegare la carta, introdurla in un ditale da estrazione ed otturare quest'ultimo con un batuffolo di cotone sgrassato. Estrarre per sei ore con etere etilico (4.1) in estrattore Soxhlet (5.1). Evaporare l'etere alla più bassa temperatura possi-

bile. Porre nella stufa (5.4) il pallone dell'apparecchio Soxhlet previamente tarato e contenente il residuo. Essiccare ad $85 \pm 2^\circ\text{C}$ per 20 minuti. Lasciar raffreddare il residuo, coperto da un vetrino da orologio, in essiccatore (5.2); pesare poi il palloncino e il residuo.

Ripetere l'essiccazione e la pesata finché la differenza fra due pesate successive sia inferiore a 0,5 mg. In caso di aumento di massa si considera valida, ai fini del calcolo, la cifra più bassa ottenuta nelle pesate.

7. **Espressione dei risultati**

7.1. *Formula e modo di calcolo*

Il tenore in sostanze estraibili con etere, espresso come percentuale del campione, è dato dalla formula seguente:

$$\frac{m_1 \times 100}{m_0}$$

dove:

m_1 = massa del residuo dell'evaporazione, espressa in grammi,

m_0 = massa iniziale del campione, espressa in grammi.

7.2. *Ripetibilità*

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, non deve oltrepassare 20 mg per 100 g di campione.

METODO 2

DETERMINAZIONE DELL'ACIDO FORMICO, DEI FORMIATI E DELLE ALTRE IMPUREZZE OSSIDABILI PRESENTI NELL'ACIDO ACETICO (E 260), NEGLI ACETATI DI POTASSIO (E 261) E DI CALCIO (E 263) E NEL DIACETATO DI SODIO (E 262)

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

Il presente metodo permette di determinare l'acido formico, i formiati e le altre impurezze ossidabili, espresse come acido formico, nelle seguenti sostanze:

- acido acetico (E 260)
- acetato di potassio (E 261)
- diacetato di sodio (E 262)
- acetato di calcio (E 263).

2. **Definizione**

Contenuto in acido formico, formiati e altre impurezze ossidabili: contenuto di acido formico, formiati e altre impurezze ossidabili determinato col metodo indicato.

3. **Principio**

Il campione da analizzare viene trattato con un eccesso di permanganato di potassio in ambiente alcalino per formare biossido di manganese. Quest'ultimo e l'eccesso di permanganato di potassio sono titolati mediante iodometria previa acidificazione; la concentrazione in impurezze ossidabili viene espressa in acido formico.

4. Reattivi

- 4.1. Ioduro di potassio.
- 4.2. Permanganato di potassio 0,02 mol/l.
- 4.3. Carbonato di sodio (anidro).
- 4.4. Tiosolfato di sodio 0,1 mol/l.
- 4.5. Salda d'amido (all'1 % circa m/v).
- 4.6. Acido solforico diluito: versare in acqua 90 ml di acido solforico ($\rho_{20} = 1,84$ g/ml) e portare al volume di 1 litro.

5. Apparecchiatura

- 5.1. Bagnomaria bollente.
- 5.2. Bilancia analitica.

6. Modo di operare

Se il campione da analizzare è costituito da acido allo stato libero, diluirne 10 g pesati con l'approssimazione di 10 mg, con 70 ml d'acqua ed aggiungervi una soluzione contenente 10 g di carbonato di sodio anidro (4.3) sciolti in 30 ml d'acqua. Se il campione è un sale, scioglierne 10 g, pesati con l'approssimazione di 10 mg, in 100 ml d'acqua ed aggiungervi 1 g di carbonato di sodio anidro (4.3), agitando per solubilizzare. Aggiungere ancora 20,0 ml di permanganato di potassio 0,02 mol/l (4.2) e riscaldare per 15 minuti su bagnomaria bollente. Lasciar raffreddare la miscela. Aggiungere 50 ml di acido solforico diluito (4.6) e 0,5 g di ioduro di potassio (4.1). Agitare la miscela fino a dissoluzione completa del precipitato di biossido di manganese. Titolare la soluzione con tiosolfato sodico 0,1 mol/l (4.4) fino a colorazione giallo pallido. Aggiungere qualche goccia di salda d'amido (4.5) e proseguire la titolazione fino a scomparsa del colore.

7. Espressione dei risultati**7.1. Formula e modo di calcolo**

La percentuale di acido formico, di formiati e di altre impurezze ossidabili, espressa come acido formico, è data dalla seguente formula:

$$\frac{2,3b}{m_0} \times \left(\frac{100a}{b} - V \right)$$

dove:

- a = molarità del permanganato di potassio
- b = molarità del tiosolfato di sodio
- m_0 = massa iniziale del campione, espressa in grammi
- V = volume in ml del tiosolfato sodico 0,1 mol/l impiegato per la titolazione.

7.2. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, non deve oltrepassare 5 mg per 100 g di campione.

8. Osservazioni

- 8.1. Un volume di 11,3 ml di tiosolfato di sodio 0,1 mol/l equivale allo 0,2 % di acido formico in 10 g di campione.
- 8.2. In assenza di formiati, il volume impiegato sarà di 20 ml; se invece la quantità di acido formico presente supera lo 0,27 % (m/m), l'eccesso di KMnO_4 aggiunto sarà insufficiente e si otterrà un volume minimo fisso di 8 ml.

In questo caso, ripetere la determinazione su una più piccola quantità di campione.

METODO 3**DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE NON VOLATILI PRESENTI NELL'ACIDO PROPIONICO (E 280)****1. Oggetto e campo d'applicazione**

Il metodo permette di dosare le sostanze non volatili presenti nell'acido propionico (E 280).

2. Definizione

Il tenore in sostanze non volatili nell'acido propionico si determina col metodo descritto qui di seguito.

3. Principio

Il campione è evaporato ed essiccato a 103 ± 2 °C ed il residuo è determinato per gravimetria.

4. Apparecchiatura

- 4.1. Capsula, in silice od in platino, sufficientemente grande per contenere 100 g di campione.
- 4.2. Stufa elettrica, regolata a 103 ± 2 °C.
- 4.3. Bilancia analitica.
- 4.4. Bagnomaria bollente.
- 4.5. Essiccatore contenente gel di silice attivata di recente o sostanze essiccanti analoghe, e munito di un indicatore di umidità.

5. Modo di operare

Pesare, con l'approssimazione di 0,1 g, 100 g circa di acido propionico in una capsula (4.1) precedentemente essiccata e tarata. Evaporare sotto cappa su bagnomaria bollente (4.4) fino ad allontanamento di tutto l'acido propionico. Essiccare in stufa (4.2) a 103 ± 2 °C per un'ora. Trasferire la capsula nell'essiccatore e lasciar raffreddare. Pesare. Ripetere l'operazione finché la differenza fra due pesate successive non sia inferiore a 0,5 mg. In caso di aumento di peso si considera valida, ai fini del calcolo, la cifra più bassa ottenuta nelle pesate.

6. Espressione dei risultati**6.1. Formula e modo di calcolo**

Il tenore in sostanze non volatili espresso in percentuale del campione è dato dalla seguente formula:

$$\frac{100 \times m_1}{m_0}$$

dove

m_1 = massa, in grammi, del residuo di evaporazione

m_0 = massa iniziale, in grammi, del campione.

6.2. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, non deve oltrepassare 5 mg per 100 g di campione.

METODO 4**DETERMINAZIONE DELLA PERDITA DI MASSA ALL'ESSICCAZIONE DEL NITRITO DI SODIO (E 250)****1. Oggetto e campo d'applicazione**

Il presente metodo permette di determinare la perdita di massa all'essiccazione nel nitrito di sodio (E 250).

2. Definizione

Il tenore in umidità del nitrito di sodio è la perdita di massa all'essiccazione ottenuta col metodo descritto qui di seguito.

3. Principio

Determinazione della perdita di massa dopo riscaldamento a $103 \pm 2^\circ\text{C}$.

4. Apparecchiatura

- 4.1. Stufa elettrica regolata a $103 \pm 2^\circ\text{C}$.
- 4.2. Capsula di vetro a fondo piatto, avente un diametro di 60-80 mm, una profondità di almeno 25 mm e provvista di coperchio.
- 4.3. Essiccatore contenente gel di silice attivata di recente o altre sostanze essiccanti equivalenti e munito di un indicatore di umidità.
- 4.4. Bilancia analitica.

5. Modo di operare

Togliere il coperchio dalla capsula di vetro (4.2) e riscaldare per un'ora capsula e coperchio nella stufa (4.1) alla temperatura di $103 \pm 2^\circ\text{C}$. Rimettere il coperchio sulla capsula (4.2) e lasciarla raffreddare fino a temperatura ambiente nell'essiccatore (4.3). Pesare con l'approssimazione di 10 mg la capsula (4.2) ed il suo coperchio. Pesare, nella

capsula, munita di coperchio, con l'approssimazione di 10 mg, 10 g circa di campione. Togliere il coperchio e riscaldare per un'ora la capsula ed il coperchio nella stufa (4.1) a 103 ± 2 °C. Rimettere il coperchio sulla capsula e lasciarla raffreddare nell'essiccatore (4.3) a temperatura ambiente. Pesarla quindi con l'approssimazione di 10 mg. Ripetere le ultime tre operazioni (riscaldamento, raffreddamento e pesata) finché la differenza fra due pesate successive non sia inferiore a 10 mg. In caso di aumento di peso si considera valida, ai fini del calcolo, la cifra più bassa ottenuta nelle pesate.

6. Espressione dei risultati

6.1. Formula e modo di calcolo

La perdita di massa all'essiccazione, espressa in percentuale (m/m) del campione, è data dalla seguente formula:

$$\frac{100 \times (m_2 - m_3)}{(m_2 - m_1)}$$

dove

m_1 = massa in grammi della capsula

m_2 = massa in grammi della capsula e del campione, prima dell'essiccazione

m_3 = massa in grammi della capsula e del campione, dopo l'essiccazione.

6.2. Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, non deve oltrepassare 100 mg per 100 g di campione.

METODO 5

PROVA LIMITE PER LA PRESENZA DI ACIDO SALICILICO NEL *p*-IDROSSIBENZOATO DI ETILE (E 214), NEL SALE SODICO DEL *p*-IDROSSIBENZOATO DI ETILE (E 215), NEL *p*-IDROSSIBENZOATO DI *n*-PROPILE (E 216), NEL SALE SODICO DEL *p*-IDROSSIBENZOATO DI *n*-PROPILE (E 217), NEL *p*-IDROSSIBENZOATO DI METILE (E 218) E NEL SALE SODICO DEL *p*-IDROSSIBENZOATO DI METILE (E 219)

1. Oggetto e campo di applicazione

Il metodo permette di rivelare l'acido salicilico nel *p*-idrossibenzoato di etile (E 214), nel *p*-idrossibenzoato di *n*-propile (E 216), nel *p*-idrossibenzoato di metile (E 218) e nei loro sali sodici (E 215, E 217 ed E 219).

2. Definizione

Rivelazione della concentrazione limite di acido salicilico: risultato della prova limite effettuata secondo il metodo descritto.

3. Principio

La soluzione contenente l'acido salicilico assume, in presenza di solfato ferrico-ammonico (III), una colorazione violetta, la cui intensità viene confrontata con quella ottenuta con una soluzione di riferimento.

4. Reattivi

- 4.1. Soluzione allo 0,2 % (m/v) di solfato ferrico-ammonico (III): 0,2 g di solfato ferrico-ammonico (III) con 12 molecole di acqua di cristallizzazione vengono sciolti in 50 ml di acqua. Dopo aggiunta di 10 ml di acido nitrico diluito al 10 % (v/v), la soluzione viene portata a 100 ml con acqua.
- 4.2. Etanolo al 95 % (v/v).
- 4.3. Soluzione di acido salicilico alla concentrazione di 0,1 g/l.
- 4.4. Acido solforico 1 mol/l.

5. Apparecchiatura

- 5.1. Cilindro di Nessler graduato a 50 ml, della capacità di circa 60 ml.

6. Modo di operare

- 6.1. *Campioni di p-idrossibenzoato di etile, di p-idrossibenzoato di n-propile e di p-idrossibenzoato di metile*
 - 6.1.1. Sciogliere 0,1 g del campione da analizzare, pesato con l'approssimazione di 1 mg, in 10 ml di etanolo al 95 % (v/v) (4.2). Trasferire la soluzione così ottenuta in un cilindro di Nessler graduato (5.1) e portare a 50 ml con acqua. Agitare la miscela ed aggiungervi 1 ml della soluzione di solfato ferrico-ammonico (III) (4.1). Agitare di nuovo e lasciar riposare per un minuto.
 - 6.1.2. Allo stesso modo preparare una soluzione di riferimento, come descritta al 6.1.1, facendo uso di 1 ml della soluzione di acido salicilico (4.3) invece del campione.
 - 6.1.3. Confrontare la colorazione del cilindro che contiene il campione da analizzare con quella della soluzione di riferimento.
- 6.2. *Campioni dei sali sodici del p-idrossibenzoato di metile, di etile e di n-propile*
 - 6.2.1. Ripetere l'operazione di cui al paragrafo 6.1.1 acidificando, prima di diluire a 50 ml, con acido solforico 1 mol/l (4.4) fino a raggiungimento di un pH 5.
 - 6.2.2. Ripetere l'operazione 6.1.2.
 - 6.2.3. Ripetere l'operazione 6.1.3.

7. Espressione dei risultati**7.1. Interpretazione della prova limite**

Se la colorazione violetta nel cilindro che contiene il campione da analizzare è più intensa di quella della soluzione di riferimento, la prova è positiva ed il campione contiene più di 0,1 % d'acido salicilico.

7.2. Sensibilità

Il limite di rivelazione della prova è di 30 mg di acido salicilico per 100 g di campione.

7.3. Osservazioni

I risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, devono essere identici.

METODO 6**DETERMINAZIONE DELL'ACIDO ACETICO LIBERO PRESENTE NEL DIACETATO SODICO (E 262)****1. Oggetto e campo d'applicazione**

Il metodo permette di verificare la presenza di acido acetico nel diacetato sodico (E 262).

2. Definizione

Il tenore in acido acetico: contenuto di acido acetico determinato col metodo descritto.

3. Principio

Neutralizzazione dell'acido acetico con idrossido di sodio in presenza di fenolftaleina.

4. Reattivi

4.1. Soluzioni all'1 % (m/v) di fenolftaleina in etanolo.

4.2. Idrossido di sodio 1 mol/l.

5. Apparecchiatura

5.1. Bilancia analitica.

6. Modo di operare

Pesare con l'approssimazione di 1 mg circa 3 g del campione da analizzare e scioglierlo in 50 ml d'acqua. Aggiungere 2 o 3 gocce di soluzione di fenolftaleina (4.1) e titolare con idrossido di sodio 1 mol/l (4.2) fino a colorazione rossa persistente per 5 secondi.

7. Espressione dei risultati**7.1. Formula e metodo di calcolo**

Il tenore in acido acetico, espresso in percentuale (m/m) del campione, è dato dalla seguente formula:

$$\frac{6,005 \times V \times c}{m_0}$$

dove

V = volume in ml della soluzione di idrossido di sodio adoperata per la titolazione

c = molarità della soluzione di idrossido di sodio (4.2)

m₀ = massa iniziale in grammi del campione.

7.2. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, non deve oltrepassare 500 mg per 100 g di campione.

8. **Osservazioni**

20,0 ml di idrossido di sodio mol/l sono necessari per titolare 3,0 g di campione quando quest'ultimo contiene il 40 % di acido acetico.

METODO 7**DETERMINAZIONE DELL'ACETATO DI SODIO PRESENTE NEL DIACETATO SODICO (E 262)**1. **Oggetto e campo d'applicazione**

Il metodo permette di determinare l'acetato di sodio e l'acqua, espressi in acetato, nel diacetato sodico (E 262).

2. **Definizione**

Tenore in acetato di sodio: contenuto in acetato di sodio, ovvero in acetato di sodio ed acqua, espresso in acetato di sodio, determinato col metodo descritto.

3. **Principio**

Dissoluzione preliminare del campione in acido acetico glaciale e titolazione con una soluzione di riferimento di acido perclorico, in presenza di cristallvioletto come indicatore.

4. **Reattivi**

4.1. Acido acetico glaciale ($\rho_{20^\circ\text{C}} = 1,049 \text{ g/ml}$) (per titolazione in ambiente non acquoso).

4.2. Cristallvioletto C.I. 42555, soluzione allo 0,2 % (m/v) in acido acetico glaciale.

4.3. Ftalato acido di potassio $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$.

4.4. Anidride acetica $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$.

4.5. Acido perclorico 0,1 mol/l in acido acetico glaciale. Prepararlo e standardizzarlo nel modo seguente:

Pesare P_g di una soluzione di acido perclorico in pallone tarato da 1 000 ml munito di tappo smeriglio. I P sono dati dalla formula:

$$P = \frac{1\,004,6}{m}$$

dove

m = concentrazione dell'acido perclorico in % (m/m), determinata per titolazione (la concentrazione più adeguata è 70-72 % (m/m)).

Aggiungere circa 100 ml di acido acetico glaciale e quindi, a piccole porzioni, Q_g di anidride acetica. Agitare e raffreddare la miscela senza interruzione durante le addizioni. I Q sono dati dalla formula:

$$Q = \frac{(567 \times P) - 5\,695}{a}$$

dove

P = quantità pesata di acido perclorico in grammi

a = concentrazione in % (m/m) dell'anidride acetica.

Chiudere il pallone e lasciare in riposo per 24 ore al riparo dalla luce. Aggiungere quindi la quantità sufficiente di acido acetico glaciale fino al volume di 1 000 ml. La soluzione così preparata è in pratica anidra.

Standardizzare la soluzione con ftalato acido di potassio operando nel modo seguente.

Pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 0,2 g di ftalato acido di potassio, seccato in precedenza per 2 h a 110 °C, e sciogliere in 25 ml di acido acetico glaciale, in pallone conico, scaldando dolcemente.

Raffreddare. Aggiungere alla soluzione di acido acetico glaciale 2 gocce della soluzione allo 0,2 % (m/v) di cristalvioletto (4.2) e titolare con la soluzione di acido perclorico fino a viraggio dell'indicatore al colore verde pallido. Effettuare una titolazione in bianco con lo stesso volume di solvente e detrarre il valore della prova in bianco dal valore trovato nella determinazione.

20,42 mg di ftalato acido di potassio corrispondono ad 1 ml di acido perclorico 0,1 mol/l.

5. **Apparecchiatura**

5.1. Bilancia analitica

6. **Modo di operare**

Pesare, con l'approssimazione di 0,5 mg, circa 0,2 g del campione e scioglierli in 50 ml di acido acetico glaciale (4.1). Aggiungere qualche goccia dell'indicatore cristalvioletto (4.2) e titolare con una soluzione di acido perclorico 0,1 mol/l (4.5) fino a viraggio dell'indicatore caratterizzato dalla comparsa di una colorazione verde pallido.

7. **Espressione dei risultati**

7.1. *Formula e modo di calcolo*

Il tenore in acetato di sodio come definito al punto 2, espresso in percentuale (m/m) del campione, è dato dalla formula seguente:

$$\frac{8,023 \times V \times c}{m_0}$$

dove:

V = volume in ml dell'acido perclorico (4.5) usato per la titolazione

c = molarità dell'acido perclorico (4.5)

m₀ = massa iniziale del campione espressa in grammi.

7.2. *Ripetibilità*

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, non deve oltrepassare 1,5 g per 100 g di campione.

8. **Osservazioni**

I reattivi impiegati per questo metodo sono tossici ed esplosivi, pertanto è necessario usarli con le dovute precauzioni.

METODO 8

PROVA LIMITE PER LA PRESENZA DI ALDEIDI NELL'ACIDO SORBICO (E 200),
NEI SORBATI DI SODIO, DI POTASSIO E DI CALCIO (E 201, E 202, E 203) E
NELL'ACIDO PROPIONICO (E 280)

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

Il metodo permette di valutare la presenza di aldeidi, espresse in formaldeide, nelle seguenti sostanze:

- acido sorbico (E 200)
- sorbati di sodio, di potassio e di calcio (E 201, E 202, E 203)
- acido propionico (E 280).

2. Definizione

Prova limite di concentrazione: la concentrazione in aldeidi, espressa in formaldeide e ottenuta col metodo descritto qui di seguito.

3. Principio

Reazione delle aldeidi con il reattivo di Schiff e confronto dell'intensità del colore rosso con quella di una soluzione di riferimento di formaldeide contenente il reattivo di Schiff.

4. Reattivi

4.1. Soluzione di riferimento contenente 0,01 mg/ml di formaldeide, ottenuta diluendo una soluzione concentrata di formaldeide (400 mg/ml).

4.2. Reattivo di Schiff.

5. Modo di operare

5.1. Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 1 g di campione. Aggiungere 100 ml d'acqua. Agitare, se necessario filtrare la soluzione ed aggiungere ad 1 ml del filtrato o della soluzione 1 ml di reattivo di Schiff (4.2). Parallelamente, aggiungere ad 1 ml della soluzione di riferimento contenente il formaldeide (4.1) 1 ml del reattivo di Schiff (4.2).

5.2. Confrontare la colorazione della soluzione del campione da analizzare con quella della soluzione di riferimento.

6. Espressione dei risultati**6.1. Interpretazione della prova limite**

Se il colore rosso della soluzione del campione è più intenso del colore della soluzione di riferimento, la prova è positiva, ed il campione contiene più dello 0,1 % di aldeidi, espressi in formaldeide.

6.2. Sensibilità

Il limite di rivelazione della prova è di 30 mg di formaldeide per 100 g di campione.

6.3. Osservazione

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, deve dare lo stesso risultato della prova limite.

METODO 9**DETERMINAZIONE DEL NUMERO DI PEROSSIDI NELLE LECITINE (E 322)****1. Oggetto e campo d'applicazione**

Il metodo permette di determinare il numero di perossidi nelle lecitine (E 322).

2. Definizione

Numero di perossidi delle lecitine: valore determinato secondo il metodo descritto.

3. Principio

Ossidazione dello ioduro di potassio ad opera dei perossidi delle lecitine e titolazione dello iodio liberato con tiosolfato sodico.

4. Reattivi

- 4.1. Acido acetico glaciale.
- 4.2. Cloroformio.
- 4.3. Ioduro di potassio.
- 4.4. Tiosolfato sodico 0,1 mol/l oppure 0,01 mol/l.
- 4.5. Salsa di amido (all'1 % circa m/v).

5. Apparecchiatura

- 5.1. Bilancia analitica.
- 5.2. Apparecchio (vedi figura) costituito da:
 - 5.2.1. matraccio a fondo sferico da 100 ml
 - 5.2.2. refrigerante a ricadere
 - 5.2.3. tubo di vetro della lunghezza di 250 mm e del diametro interno di 22 mm, provvisto di giunti in vetro smerigliato
 - 5.2.4. microbicchiere (dimensioni esterne: 35-50 mm di altezza e 20 mm di diametro).

6. Modo di operare

- 6.1. Trasferire 10 ml di acido acetico glaciale (4.1) e 10 ml di cloroformio (4.2) nel matraccio da 100 ml (5.2.1). Innestare il tubo di vetro (5.2.3) ed il refrigerante a ricadere (5.2.2). Eliminare l'aria disciolta facendo bollire dolcemente la miscela per 2 minuti. Sciogliere 1 g di ioduro di potassio (4.3) in 1,3 ml d'acqua ed aggiungere questa soluzione nel matraccio (5.2.1) avendo cura di non interrompere l'ebollizione. Se a questo punto si manifesta una colorazione gialla nel matraccio l'analisi non è valida e deve essere ripetuta con reattivi di recente preparazione.
- 6.2. Dopo altri due minuti di ebollizione, aggiungere al contenuto del matraccio (5.2.1) 1 g del campione da analizzare, pesato con l'approssimazione di 1 mg, facendo attenzione a non interrompere l'ebollizione. A tal fine, porre il campione in un microbicchiere (5.2.4) che può essere fatto scendere nel matraccio attraverso il tubo di vetro (5.2.3) mediante una bacchetta di vetro la cui estremità inferiore si adatti al microbicchiere (vedi figura). Il refrigerante (5.2.2) può essere staccato durante questa rapida operazione. Far proseguire l'ebollizione per 3-4 minuti. Sospendere il riscaldamento, togliere immediatamente il refrigerante (5.2.2) ed aggiungere rapidamente 50 ml d'acqua attraverso il tubo di vetro (5.2.3). Togliere il tubo di vetro (5.2.3) e raffreddare il matraccio (5.2.1) a temperatura ambiente sotto un getto d'acqua. Titolare con tiosolfato sodico (0,1 oppure 0,01 mol/l) (4.4) fino a decolorazione dello strato acquoso. Aggiungere 1 ml di salsa d'amido (4.5) immediatamente prima della fine della titolazione e titolare fino a scomparsa della colorazione blu. Agitare bene il pallone (5.2.1) durante la titolazione per estrarre lo iodio dallo strato acquoso.

- 6.3. Procedere ad una titolazione in bianco secondo le modalità descritte in 6.1 e 6.2.

7. **Espressione dei risultati**

7.1. *Formula e modo di calcolo*

Il numero di perossidi del campione, espresso in milliequivalenti/kg, è dato dalla seguente formula:

$$\frac{1\,000 \times a \times (V_1 - V_2)}{m_0}$$

dove

V_1 = volume in ml della soluzione di tiosolfato adoperata per la titolazione del campione secondo il punto 6.2

V_2 = volume in ml della soluzione di tiosolfato adoperata per la prova in bianco secondo il punto 6.3

a = concentrazione della soluzione del tiosolfato sodico in mol/l

m_0 = massa iniziale del campione espressa in grammi.

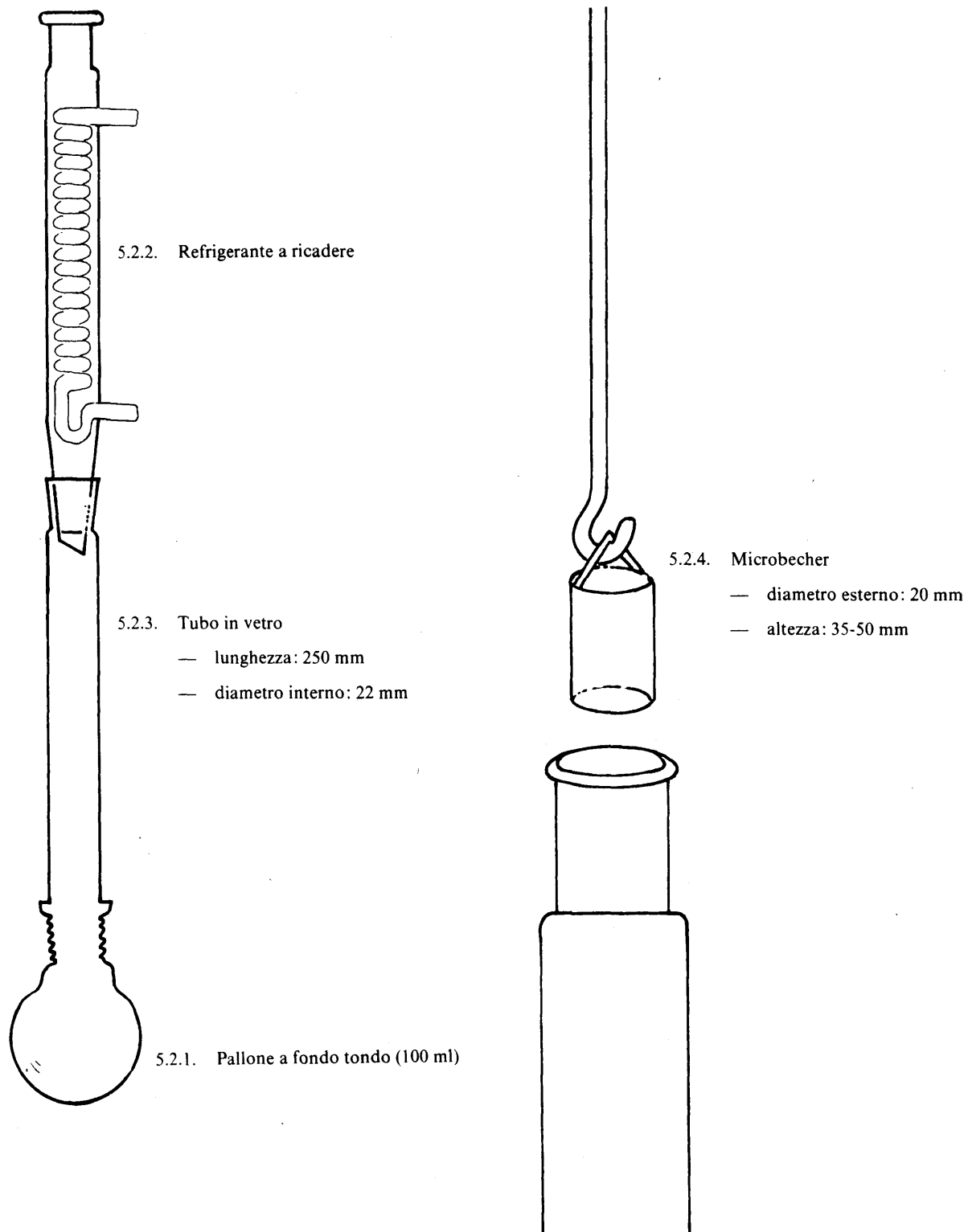
7.2. *Ripetibilità*

La differenza fra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, non deve oltrepassare 0,5 espresso in milliequivalenti per kg.

8. **Osservazioni**

- 8.1. La scelta della concentrazione del tiosolfato sodico usato dipende dal risultato che si prevede. Se vengono adoperati meno di 0,5 ml di tiosolfato 0,1 mol/l, ripetere la determinazione usando tiosolfato 0,01 mol/l.

- 8.2. La determinazione deve essere effettuata al riparo dalla luce intensa.



Apparecchio per la determinazione dell'indice di perossidi nelle lecitine

METODO 10**DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE INSOLUBILI IN TOLUENE CONTENUTE NELLA LECITINA (E 322)****1. Oggetto e campo d'applicazione**

Il metodo permette di dosare le sostanze insolubili in toluene contenute nella lecitina (E 322).

2. Definizione

Contenuto in sostanze insolubili in toluene: contenuto in sostanze insolubili in toluene determinato col metodo descritto.

3. Principio

Filtrazione delle impurezze insolubili nel toluene ed essiccazione del residuo.

4. Reattivo

4.1. Toluene.

5. Apparecchiatura

5.1. Crogiolo in vetro sinterizzato G 3 o equivalente, da 30 ml.

5.2. Stufa elettrica, termoregolata a $103 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.3. Bagnomaria, termoregolato a temperatura non superiore a 60°C .

5.4. Essiccatore contenente gel di silice attivato di recente, o sostanze essiccanti equivalenti, e munito di un indicatore di umidità.

5.5. Beuta conica da 500 ml.

5.6. Pompa da vuoto.

5.7. Bilancia analitica.

6. Modo di operare

6.1. Essiccare un crogiolo in vetro sinterizzato da 30 ml (5.1) in stufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ (5.2). Lasciar raffreddare il crogiolo in un essiccatore (5.4) e pesarlo.

6.2. Rimescolare accuratamente il campione di lecitina, dopo averlo riscaldato in un bagnomaria (5.3) se necessario. Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 10 g circa del campione in una beuta (5.5).

Aggiungere 100 ml di toluene (4.1) ed agitare la miscela fino a solubilizzazione completa della lecitina. Filtrare la soluzione attraverso il crogiolo di vetro sinterizzato (5.1). Lavare la beuta (5.5) con 25 ml di toluene (4.1) e filtrare il liquido di lavaggio attraverso il crogiolo (5.1). Ripetere l'operazione con altri 25 ml di toluene (4.1). Eliminare l'eccesso di toluene dal crogiolo (5.1) per aspirazione sotto vuoto.

- 6.3. Trasferire il crogiolo (5.1) in stufa e lasciare essiccare il suo residuo a 103 ± 2 °C per due ore nella stufa. Lasciar raffreddare il crogiolo nell'essiccatore (5.4) e quindi pesarlo.
- 6.4. Ripetere l'operazione di cui al punto 6.3 finché lo scarto fra due pesate successive non diventa inferiore a 0,5 mg. In caso di aumento di peso si considera valida, ai fini del calcolo, la cifra più bassa ottenuta nelle pesate.

7. Espressione dei risultati

7.1. Formula e modo di calcolo

Il contenuto di sostanze insolubili nel toluene è dato dalla seguente formula:

$$\frac{100 (m_2 - m_1)}{m_0}$$

dove

m_1 = massa in grammi del crogiolo vuoto (6.1)

m_2 = massa in grammi del crogiolo contenente i residui (6.4)

m_0 = massa iniziale del campione espressa in grammi.

7.2. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, non deve oltrepassare 30 mg per 100 g di campione.

METODO 11

PROVA LIMITE PER LA PRESENZA DI SOSTANZE RIDUCENTI NEI LATTATI DI SODIO, DI POTASSIO E DI CALCIO (E 325, E 326, E 327)

1. Oggetto e campo d'applicazione

Il metodo permette di rivelare la presenza di riducenti nel lattato di sodio (E 325), nel lattato di potassio (E 326) e nel lattato di calcio (E 327).

2. Definizione

Prova limite di riduzione del reattivo di Fehling: reazione del campione con il reattivo di Fehling nelle condizioni descritte qui di seguito.

3. Principio

Riduzione del reattivo di Fehling ad opera delle sostanze riducenti; dette sostanze sono generalmente costituite da zuccheri riducenti.

4. Reattivi

- 4.1. Reattivo di Fehling, soluzione A (sciogliere 6,93 g di solfato di rame pentaidrato in acqua e portare a 100 ml).
- 4.2. Reattivo di Fehling, soluzione B (sciogliere 34,6 g di tartrato doppio di sodio e di potassio e 10 g di idrossido di sodio in acqua e portare a 100 ml).

5. Modo di operare

Sciogliere 1 g di campione, pesato con l'approssimazione di 1 mg, in 10 ml d'acqua calda. Aggiungere 2 ml di Fehling A (4.1) e 2 ml di Fehling B (4.2). Fare bollire la miscela per 1 minuto ed osservare se si verifica una variazione di colore. La precipitazione del solfato di calcio, che talora si verifica, non interferisce.

6. Espressione dei risultati**6.1. Interpretazione della prova limite**

Se c'è variazione di colore dopo l'ebollizione (5), la prova è positiva ed indica la presenza di sostanze riducenti nel campione.

6.2. Sensibilità

Il limite di rivelabilità delle sostanze riducenti è di 100 mg di glucosio per 100 g di campione.

6.3. Osservazione

6.3.1. I risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, devono essere identici.

6.3.2. Se il campione contiene il 2% di glucosio si ha completa riduzione del reattivo di Fehling.

METODO 12**DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO IN ACIDI VOLATILI DELL'ACIDO FOSFORICO (E 338)****1. Oggetto e campo d'applicazione**

Il metodo permette di determinare la quantità di acidi volatili contenuti nell'acido fosforico (E 338), espressa in acido acetico.

2. Definizione

Contenuto in acidi volatili dell'acido fosforico: contenuto in acidi volatili determinato col metodo descritto ed espresso in acido acetico.

3. Principio

Diluizione del campione e distillazione della soluzione. Titolazione del distillato mediante idrossido di sodio e calcolo dell'acidità espressa in acido acetico.

4. Reattivi

4.1. Soluzione di fenoltaleina all'1% (m/v) in etanolo.

4.2. Idrossido di sodio 0,01 mol/l.

5. Apparecchiatura

5.1. Pallone da distillazione provvisto di dispositivo per evitare gli spruzzi.

6. Modo di operare

In un pallone da distillazione provvisto di dispositivo per evitare gli spruzzi (5.1), pesare, con l'approssimazione di 50 mg, 60 g di campione. Aggiungere 75 ml di acqua recentemente bollita e raffreddata. Mescolare e distillare 50 ml di soluzione. Aggiungere al distillato qualche goccia della soluzione di fenoltaleina (4.1) e titolare con idrossido di sodio 0,01 mol/l (4.2) fino ad incipiente colorazione rossa persistente per 10 secondi.

7. Espressione dei risultati**7.1. Formula e modo di calcolo**

Il tenore di acidi volatili, espresso in mg/kg di acido acetico è dato dalla formula:

$$\frac{600 \times V}{m_0}$$

dove

V = volume in ml di soluzione di idrossido di sodio 0,01 mol/l impiegato per la neutralizzazione

m_0 = massa del campione di acido fosforico espressa in grammi.

7.2. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, non deve oltrepassare 1 mg per 100 g di campione.

METODO 13**PROVA LIMITE PER LA PRESENZA DI NITRATI NELL'ACIDO FOSFORICO
(E 338)****1. Oggetto e campo d'applicazione**

Il metodo permette di rivelare la presenza di nitrati nell'acido fosforico (E 338).

2. Definizione

Prova limite di concentrazione dei nitrati: concentrazione dei nitrati determinata col metodo descritto ed espressa in nitrato di sodio.

3. Principio

Aggiunta di carminio d'indaco al campione in ambiente acido per H_2SO_4 concentrato. Decolorazione del carminio d'indaco per ossidazione dovuta alle sostanze ossidanti compresi i nitrati.

4. Reattivi

- 4.1. Soluzione di carminio d'indaco allo 0,18 % (m/v): sciogliere 0,18 g di indigotindisolfonato di sodio in 100 ml d'acqua.
- 4.2. Soluzione di cloruro di sodio allo 0,05 % (m/v).
- 4.3. Acido solforico concentrato ($\rho_{20} = 1,84$ g/ml).

5. Modo di operare

Diluire 2,0 ml del campione da analizzare fino al volume di 10 ml con la soluzione di cloruro sodico (4.2). Aggiungere 0,1 ml della soluzione di carminio di indaco (4.1) e 10 ml di acido solforico concentrato (4.3), a goccia a goccia e raffreddando. Notare se la colorazione blu della soluzione persiste per 5 minuti.

6. Espressione dei risultati**6.1. Interpretazione della prova limite**

Se la colorazione blu sparisce completamente in cinque minuti, la prova è positiva ed il contenuto in sostanza ossidante, espresso in nitrato di sodio, è superiore a 5 mg/kg.

6.2. Osservazioni

6.2.1. Eseguire contemporaneamente una prova in bianco con gli stessi reattivi.

6.2.2. I risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, devono essere identici.

6.2.3. La soluzione di carminio d'indaco non deve essere preparata da più di 60 giorni.

6.2.4. Un risultato positivo indica che il campione può contenere nitrati e altre sostanze ossidanti, e la prova deve essere ripetuta usando il metodo ISO 3709-1976 «acido fosforico ad uso industriale (industrie alimentari comprese). Determinazione degli ossidi di azoto col metodo spettrofotometrico al 3,4-xilenolo».

METODO 14

DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE INSOLUBILI IN ACQUA PRESENTI NEI FOSFATI MONOSODICO, DISODICO E TRISODICO ED IN QUELLI MONOPOTASSICO, DIPOTASSICO E TRIPOTASSICO [E 339i), E 339ii), E 339iii), E 340i), E 340ii), E 340iii)]

1. Oggetto e campo d'applicazione

Il metodo permette la determinazione delle sostanze insolubili in acqua presenti nei seguenti prodotti:

- ortofosfato monosodico E 339i)
- ortofosfato disodico E 339ii)
- ortofosfato trisodico E 339iii)
- ortofosfato monopotassico E 340i)
- ortofosfato bipotassico E 340ii)
- ortofosfato tripotassico E 340iii).

2. Definizione

Contenuto in sostanze insolubili in acqua: contenuto in sostanze insolubili in acqua determinato col metodo descritto qui di seguito.

3. Principio

Dissoluzione del campione in acqua e filtrazione delle sostanze insolubili. Il residuo è essiccato ed espresso in sostanze insolubili nell'acqua.

4. Apparecchiatura

- 4.1. Crogiolo filtrante tarato in porcellana sinterizzata di porosità C 3 o equivalente.
- 4.2. Essiccatore munito di gel di silice attivato di recente o di sostanze essiccanti equivalenti e munito di un indicatore di umidità.
- 4.3. Stufa elettrica termostata a $103 \pm 2^\circ\text{C}$.
- 4.4. Becher in polipropilene da 400 ml.
- 4.5. Bagnomaria.

5. Modo di operare

Sciogliere 10 g di campione del fosfato, pesato con l'approssimazione di 10 mg, in 100 ml d'acqua calda, in un becher di polipropilene (4.4) preventivamente lavato, pesato ed essiccato e mantenere su bagnomaria bollente (4.5) per 15 minuti. Filtrare la soluzione attraverso il crogiolo filtrante (4.1). Lavare il residuo insolubile con acqua calda ed essiccare in stufa (4.3) a $103 \pm 2^\circ\text{C}$. Dopo essiccazione completa per 2 ore lasciare raffreddare in un essiccatore e pesare. L'essiccazione è completa quando la differenza tra 2 pesate successive non supera 0,5 mg. Nell'ipotesi di un aumento di massa si ritiene valida, ai fini del calcolo, la cifra più bassa ottenuta nelle pesate.

6. Espressione dei risultati**6.1. Formula e modo di calcolo**

Il tenore in sostanze insolubili in acqua del campione è dato dalla formula seguente:

$$\frac{m_1}{m_0} \times 100$$

dove:

m_1 = massa in grammi del residuo dopo essiccazione

m_0 = massa in grammi del campione.

6.2. Ripetibilità

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, non deve oltrepassare 10 mg per 100 g di campione.

METODO 15**DETERMINAZIONE DEL pH DEGLI ADDITIVI ALIMENTARI****1. Oggetto e campo d'applicazione**

Il metodo prescrive le indicazioni generali per determinare il pH degli additivi alimentari.

2. Definizione

pH di un additivo: pH misurato secondo il metodo descritto.

3. Principio

Il pH di una soluzione acquosa o di una diluizione acquosa è determinato, convenzionalmente, per mezzo di un elettrodo di vetro, di un elettrodo di riferimento e di un pH-metro.

4. Reattivi

4.1. Tarare gli strumenti utilizzando le seguenti soluzioni tampone.

4.1.1. Soluzione tampone a pH 6,88 a 20 °C costituita da volumi uguali di fosfato monopotassico (KH_2PO_4) 0,05 mol/l e di ortofosfato disodico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,05 mol/l.

4.1.2. Soluzione tampone a pH 4,00 a 20 °C, costituita da ftalato acido di potassio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$) 0,05 mol/l.

4.1.3. Soluzione tampone a pH 9,22 a 20 °C, costituita da borato di sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 0,05 mol/l.

4.2. Soluzione di cloruro di potassio (KCl), 3 mol/l o satura, per il riempimento degli elettrodi di riferimento o altra soluzione appropriata prescritta dal fabbricante degli elettrodi.

4.3. Acqua distillata, esente da CO_2 , con pH 5-6.

5. Apparecchiatura

5.1. pH-metro, che permetta un'esattezza di lettura di 0,01 unità di pH.

5.2. Catena di elettrodi di vetro (a corpo unico) combinati o elettrodo di vetro singolo ed elettrodi di riferimento con pinze appropriate.

5.3. Agitatore magnetico munito di dispositivo di riscaldamento.

5.4. Termometro graduato da 0 a 100 °C.

6. Modo di operare**6.1. Taratura del pH-metro**

Gli elettrodi di vetro devono essere montati seguendo le indicazioni del fabbricante. La taratura degli elettrodi di vetro dev'essere regolarmente registrata con la scala del pH-metro mediante soluzioni tampone a pH esattamente noto.

Lavare gli elettrodi con acqua e asciugarli accuratamente con un panno morbido, o meglio ancora lavare gli elettrodi con acqua e poi sciacquarli due volte di seguito con la soluzione da misurare o con la soluzione standard e sistamarli successivamente nella soluzione da misurare o nella soluzione standard.

Se la soluzione da misurare ha un pH acido, le soluzioni tampone adoperate per controllare il pH devono essere quelle a pH 4 (4.1.2) ed a pH 6,88 (4.1.1).

Se la soluzione da misurare ha un pH basico, le soluzioni tampone adoperate per controllare il pH devono essere quelle a pH 9,22 (4.1.3) ed a pH 6,88 (4.1.1).

6.2. Determinazione della soluzione da misurare

La concentrazione della soluzione da misurare o la preparazione della soluzione da scegliere devono essere conformi alla direttiva comunitaria relativa agli additivi alimentari.

Preparare la soluzione da misurare come prescritto utilizzando l'acqua distillata (4.3) e portare a 20 °C agitando. Non agitare più e sistemare gli elettrodi di vetro (5.2) nella soluzione. Dopo 2 minuti leggere il pH sul pH-metro (5.1).

7. Espressione dei risultati**7.1. Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni parallele, effettuate simultaneamente nelle stesse condizioni, sullo stesso campione, dallo stesso analista, non deve oltrepassare 0,05 unità di pH.

8. Osservazioni

Questo metodo è applicabile unicamente ai criteri di pH prescelti nelle direttive comunitarie degli additivi alimentari in cui gli additivi sono in soluzione o diluiti in acqua.

DECISIONE DELLA COMMISSIONE**del 28 luglio 1981****recante l'elenco degli stabilimenti della Repubblica federativa del Brasile in provenienza dai quali è autorizzata l'importazione nella Comunità di carni fresche di bovini e di solipedi domestici**

(81/713/CEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

vista la direttiva 72/462/CEE del Consiglio, del 12 dicembre 1972, relativa a problemi sanitari e di polizia sanitaria all'importazione di animali delle specie bovina e suina e di carni fresche in provenienza dai paesi terzi ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 4, paragrafo 1, e l'articolo 18, paragrafo 1, lettere a) e b),

considerando che, per poter essere autorizzati ad esportare carni fresche verso la Comunità, gli stabilimenti dei paesi terzi devono rispondere alle condizioni generali e ai requisiti particolari stabiliti dalla direttiva 72/462/CEE;

considerando che, conformemente all'articolo 4, paragrafo 3, della direttiva 72/462/CEE, la Repubblica federativa del Brasile ha trasmesso un elenco degli stabilimenti autorizzati all'esportazione verso la Comunità;

considerando che per gran parte di tali stabilimenti è stato accertato, mediante missione comunitaria in loco, che essi offrono sufficienti garanzie igieniche e possono pertanto essere inclusi nel primo elenco, stabilito conformemente all'articolo 4, paragrafo 1, della suddetta direttiva, degli stabilimenti in provenienza dai quali può essere autorizzata l'importazione di carni fresche;

considerando che il caso degli altri stabilimenti proposti dal Brasile deve essere riesaminato sulla base di dati complementari relativi al loro livello igienico ed alle loro possibilità di rapido adattamento alla normativa comunitaria;

considerando che nel frattempo, per non interrompere bruscamente le correnti di scambio in atto, tali stabilimenti possono essere autorizzati temporaneamente a proseguire l'esportazione di carni fresche verso gli Stati membri disposti ad accettarle;

considerando che la presente decisione dovrà essere pertanto riesaminata e, se del caso, modificata, in

funzione dei provvedimenti adottati a tal fine o dei miglioramenti apportati;

considerando che occorre tener presente che le importazioni di carni fresche sono soggette anche ad altre disposizioni comunitarie adottate in campo veterinario, particolarmente in materia di polizia sanitaria, ivi comprese le disposizioni speciali emanate in favore della Danimarca, dell'Irlanda e del Regno Unito;

considerando che le condizioni d'importazione delle carni fresche in provenienza dagli stabilimenti che figurano nell'elenco allegato restano sottoposte alle disposizioni di altre direttive nonché al rispetto delle disposizioni generali del trattato; che in particolare, l'importazione di certe categorie di carni in provenienza dai paesi terzi, quali le carni in pezzi inferiori ai 3 kg o le carni che contengono i residui di alcune sostanze che devono ancora essere oggetto di una particolare normativa comunitaria armonizzata, resta soggetta alla legislazione dello Stato membro destinatario;

considerando che le misure previste dalla presente decisione sono conformi al parere del comitato veterinario permanente,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DECISIONE:

Articolo 1

1. È autorizzata l'importazione nella Comunità di carni fresche di bovini e di solipedi domestici in provenienza dagli stabilimenti della Repubblica federativa del Brasile elencati nell'allegato.

2. Le importazioni in provenienza da tali stabilimenti restano soggette anche alle altre disposizioni comunitarie adottate in campo veterinario, particolarmente in materia di polizia sanitaria.

Articolo 2

1. Gli Stati membri vietano l'importazione delle carni fresche di cui al paragrafo 1 dell'articolo 1 in

(1) GU n. L 302 del 31. 12. 1972, pag. 28.

provenienza da stabilimenti che non figurano nell'allegato.

2. Il divieto non si applica tuttavia se non a decorrere dal 1° maggio 1982 agli stabilimenti che non figurano nell'allegato, ma che sono riconosciuti e proposti ufficialmente dalle autorità brasiliane alla data del 1° luglio 1982 ai sensi dell'articolo 4, paragrafo 3, della direttiva 72/462/CEE salvo decisione contraria adottata al loro riguardo, ai sensi dell'articolo 4, paragrafo 1, della predetta direttiva, anteriormente al 1° maggio 1982.

La Commissione trasmetterà agli Stati membri la lista di detti stabilimenti.

Articolo 3

La presente decisione entra in vigore il 1° ottobre 1981.

Articolo 4

La presente decisione verrà riesaminata e, se del caso, modificata anteriormente al 1° marzo 1982.

Articolo 5

Gli Stati membri sono destinatari della presente decisione.

Fatto a Bruxelles, il 28 luglio 1981.

Per la Commissione

Il Presidente

Gaston THORN

ALLEGATO

LISTA DEGLI STABILIMENTI

I. CARNE BOVINA

A. Macelli e laboratori di sezionamento

| Numero stabilimento | Indirizzo |
|---------------------|--|
| 0005 | Cooperativa Rural Serrana Ltda, Tupanciretã, Rio Grande do Sul |
| 0226 | Frigorífico Bordon SA, Bagé, Rio Grande do Sul |
| 0385 | Frigorífico Mouran SA, Andradina, São Paulo |
| 0458 | Frigorífico União SA, Presidente Epitácio, São Paulo |
| 0834 | Frigorífico Kaiowa SA, Presidente Venceslau, São Paulo |
| 0906 | Frigorífico T. Maia SA, Governador Valadares, Minas Gerais |
| 1602 | Bon Beef Indústria e Comércio de Carnes SA, Vinhedo, São Paulo |
| 1651 | Frigorífico Extremo Sul SA, Pelotas, Rio Grande do Sul |
| 1926 | Frigorífico Anselmi SA, Indústria de Carnes, Derivados e Conservas, Pelotas, Rio Grande do Sul |

B. Macelli

| Numero stabilimento | Indirizzo |
|---------------------|--|
| 0076 | SA Frigorífico Anglo-Barretos, São Paulo |

C. Laboratori di sezionamento

| Numero stabilimento | Indirizzo |
|---------------------|--|
| 0001 | Cia de Alimentos do Brasil SA (COMABRA), Osasco, São Paulo |

II. CARNE EQUINA

Macelli e laboratori di sezionamento

| Numero stabilimento | Indirizzo |
|---------------------|---|
| 0003 | Frigorífico Yukijirushi do Paraná SA, Curitiba, Paraná |
| 0924 | Matadouro e Frigorífico Industrial SA (MAFISA), Belo Jardim, Pernambuco |

III. DEPOSITI FRIGORIFERI

| Numero stabilimento | Indirizzo |
|---------------------|---|
| 0072 | Cefri Centrais de Estocagem Frigorificada Ltda, Mairinque, São Paulo |
| 0078 | Interfrio SA Comercial e Industrial, Pelotas, Rio Grande do Sul |
| 0535 | Matadouro e Frigorífico Industrial SA (MAFISA), Recife, Pernambuco |
| 0933 | Companhia Brasileira de Armazenamento (CIBRAZEM), Rio de Janeiro |
| 0966 | C. Sola, Comércio e Exportação SA, Três Rios, Rio de Janeiro |
| 1075 | Frigorífico de Cotia SA, Santos, São Paulo |
| 1127 | Companhia Brasileira de Armazenamento (CIBRAZEM), Curitiba, Paraná |
| 1599 | Martini Meat SA, Comércio, Importação e Exportação de Carnes, Paranaguá, Paraná |
| 1945 | Departamento Estadual de Portos Riós e Canais, Rio Grande, Rio Grande do Sul |
| 1958 | Avante SA Produtos Alimentícios, Santos, São Paulo |
| 2176 | Frimorite Frigorífico Ltda, São Gonçalo, Rio de Janeiro |

DECISIONE DELLA COMMISSIONE**del 28 luglio 1981****recante modifiche delle liste degli stabilimenti della Repubblica argentina e della Repubblica dell'Uruguay in provenienza dai quali è autorizzata l'importazione nella Comunità di carni fresche di bovini, di ovini e di solipedi domestici**

(81/714/CEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

vista la direttiva 72/462/CEE del Consiglio, del 12 dicembre 1972, relativa a problemi sanitari e di polizia sanitaria all'importazione di animali della specie bovina e suina in provenienza dai paesi terzi ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 4, paragrafo 1, e l'articolo 18, paragrafo 1, lettere a) e b),considerando che l'elenco degli stabilimenti in Argentina ed Uruguay, in provenienza dai quali è autorizzata l'importazione nella Comunità di carni fresche di bovini e vitelli, di ovini e di solipedi domestici, sono state stabilite inizialmente nelle decisioni della Commissione del 25 novembre 1980 modificate dalle decisioni 81/91/CEE ⁽²⁾ e 81/92/CEE ⁽³⁾, modificate da ultimo dalla decisione del 15 luglio 1981;

considerando inoltre che ulteriori ispezioni effettuate in loco hanno dimostrato che il livello igienico degli altri stabilimenti proposti dall'Argentina e dall'Uruguay è migliorato e può ora essere considerato soddisfacente; che questi stabilimenti possono pertanto essere inclusi nell'elenco stabilito conformemente all'articolo 4, paragrafo 1, della direttiva 72/462/CEE;

considerando che è inoltre necessario aggiungere altri stabilimenti all'elenco;

considerando che le misure previste dalla presente decisione sono conformi al parere del comitato veterinario permanente,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DECISIONE:

Articolo 1

L'allegato della decisione 81/91/CEE è sostituito dall'allegato A della presente decisione.

Articolo 2

L'allegato della decisione 81/92/CEE è sostituito dall'allegato B della presente decisione.

Articolo 3

Gli Stati membri sono destinatari della presente decisione.

Fatto a Bruxelles, il 28 luglio 1981.

*Per la Commissione**Il Presidente*

Gaston THORN

⁽¹⁾ GU n. L 302 del 31. 12. 1972, pag. 28.⁽²⁾ GU n. L 58 del 5. 3. 1981, pag. 39.⁽³⁾ GU n. L 58 del 5. 3. 1981, pag. 43.

ALLEGATO A

LISTA DEGLI STABILIMENTI

I. CARNE BOVINA

A. Macelli e laboratori di sezionamento

| Numero stabilimento | Indirizzo |
|---------------------|---|
| 8 | Corporación argentina de productores de carnes (CAP) cuatrerros, Daniel Cerri, Buenos Aires |
| 9 | Corporación argentina de productores de carnes (CAP) yuqueri, Concordia, Entre Ríos |
| 13 | Cia Swift de la Plata SA, Rosarie, Santa Fé |
| 15 | Frigorífico Colón SA, Colon, Entre Ríos |
| 16 | Frigorífico regional Santa Elena SA, Santa Elena, Entre Ríos |
| 20 | SA Frigorífico Monte Grande Ltda, Monte Grande, Buenos Aires |
| 89 | Frigorífico Carcarana SACI, Carcarana, Santa Fé |
| 249 | Industrias frigoríficas Nelson SACIA, Nelson, Santa Fé |
| 1113 | La Morocha SAAICF, Villa Mercedes, San Luis |
| 1333 | Frigorífico argentino San Antonio (FASA), Parana, Entre Ríos |
| 1344 | Vizental y Cia SACIA, Ramirez, Entre Ríos |
| 1352 | Frigorífico Meatex Ciafiiesa, Alejandro Korn, Buenos Aires |
| 1373 | Frigorífico el Gentenario SA, Venado Tuerto, Santa Fé |
| 1383 | Barreca Hnos, Vivorata, Buenos Aires |
| 1399 | Frigorífico regional industria argentina SAIC (FRIA), Casilda, Santa Fé |
| 1404 | Pedro Hnos SAICIFA, Monte Chingolo, Buenos Aires |
| 1408 | Subpga SACIEI, Berazategui, Buenos Aires |
| 1905 | Frigorífico Yaguune SACIFA, Gonzalez Catan, Buenos Aires |
| 1918 | Cocarsa Cia de carneros SAICAI, San Fernando, Buenos Aires |
| 1920 | Frigorífico rioplatense SAICIF, General Pacheco, Buenos Aires |
| 1921 | San Telmo SACIAFIF, Mar de Plata, Buenos Aires |
| 1930 | Vizental y Cia SACIA, San José, Entre Ríos |
| 1970 | Frigorífico regional industrias alimenticias reconquista SA, Reconquista, Santa Fé |
| 1984 | Matadero y Frigorífico regional de Azul SAGIC, Azul, Buenos Aires |
| 1989 | Corporación argentina de productores de carnes (CAP), Rosario, Santa Fé |
| 2012 | Frigorífico el Duranzillo IFCA SAIFCA, Río Segundo, Córdoba |
| 2019 | Abastecedora delfino SACI, Tres Lomas, Buenos Aires |
| 2052 | Matadero y Frigorífico Antartico SAIC, Gonzalez Catan, Buenos Aires |
| 2064 | Frigorífico Siracusa SAACIIF, Bahía Blanca, Buenos Aires |
| 2065 | Frigorífico mediterraneos SAICIFA, Pajas Blancas |
| 2067 | Cia elaboradora de productos animales SAI CAGT, Pontevedra, Buenos Aires |
| 2072 | Frigorífico ganadero SACIA FIGMS, Curuzu Cuatia, Corrientes |
| 2080 | Caucan SA, Ezeiza, Buenos Aires |

B. Laboratori di sezionamento

| Numero stabilimento | Indirizzo |
|---------------------|--|
| 18 | Quickfood, Buenos Aires |
| 273 | Frigorífico guardia nacional SA, Guardia Nacional 1166, Cap. Federal |
| 1122 | Frigorífico Lafayette SAICAG, Lafayette 1740, Cap. Federal |
| 1311 | Frymat SAICFA, Buenos Aires 3680, Santa Fé |
| 1920 a. | Frigorífico rioplatense SAICIF, General Pacheco, Buenos Aires |

II. CARNE OVINA**Macelli e laboratori di sezionamento**

| Numero stabilimento | Indirizzo |
|---------------------|--|
| 8 | Corporación argentina de productores de carnes (CAP) cuatros, Daniel Cerri, Buenos Aires |
| 9 | Corporación argentina de productores de carnes (CAP) yuqueri, Concordia, Entre Ríos |
| 14 | Corporación argentina de productores de carnes (CAP) Rio Grande, Tierra del fuego |
| 97 | Corporación argentina de productores de carnes (CAP), Pto. deseado, Santa Cruz |
| 286 | Frigorífico San Jorge SAIC, Bo Industrial, Comodoro Rivadavia |
| 1352 | Frigorífico Meatex Ciafiiesa, Alejandro Korn, Buenos Aires |
| 1408 | Subpga SACIEI, Berazategui, Buenos Aires |
| 2006 | Vizental y Cia SACIA, General Pico, La Pampa |
| 2044 | Frigorífico Siracusa SAACIIF, Comodoro Rivadavia, Chubut |
| 2062 | Finexcor, Pernal, Buenos Aires |
| 2072 | Frigorífico ganadero SACIA FIGMS, Curuzu Cuatia, Corrientes |

III. CARNE EQUINA**Macelli e laboratori di sezionamento**

| Numero stabilimento | Indirizzo |
|---------------------|--|
| 351 | SA Indio Pampa ICAG, Trenque Lauquen, Buenos Aires |
| 1369 | Frigorífico Felmar SA, San Francisco, Buenos Aires |
| 1400 | Frigorífico Juchco SCA, Gialeguay, Entre Ríos |
| 1451 | Lamar SRL, Mercedes, Buenos Aires |
| 2028 | Lamar SRL, Resistencia, Chaco |

IV. DEPOSITI FRIGORIFERI

| Numero stabilimento | Indirizzo |
|---------------------|---|
| 152 | Comalfri, Pilar, Buenos Aires |
| 267 | Frymat SACIFA, Santa Fè |
| 308 | Frigorifico americano de morris Neremberg Ltda SA, Boulogne sur mer 260/2, Cap. Federal |
| 391 | Frigorifico Siracusa SAACIIF, Avellaneda, Buenos Aires |
| 1326 | Establecimiento azul SRL, Azul, Buenos Aires |
| 1838 | Guaicos SAIIF, Osvaldo Cruz 3047, Cap. Federal |

ALLEGATO B

I. CARNE BOVINA

Macelli e laboratori di sezionamento

| Numero stabilimento | Indirizzo |
|---------------------|---|
| 1 | Codadesa, Ruta 39, km 143, departamento de Maldonado |
| 2 | Colonia, Tarariras, departamento de Colonia |
| 3 | Carrasco, Camino Carrasco 5, departamento de Canelones |
| 7 | Infrinsa, Ruta Brigadier-General Juan A. Lavalleja, km 391, Ciudad de Melo, departamento de Cerro Largo |
| 8 | Canelones, Ciudad de Canelones, departamento de Canelones |
| 12 | Tacuarembó, Rutas 5 y 26, departamento de Tacuarembó |
| 14 | Efcsa (durazno), Santa Bernardina, departamento de Durazno |
| 20 | Comargen, Ruta 67 y Elias Regules, las Piedras, departamento de Canelones |
| 106 | Improgan, Camino Santos Lugares, km 4, la Pas, departamento de Canelones |
| 344 | San Jacinto, Ruta 7, km 59,5, San Jacinto, departamento de Canelones |
| 394 | Cybaran, La Caballada, departamento de Salto |

II. CARNE OVINA

| Numero stabilimento | Indirizzo |
|---------------------|---|
| 1 | Codadesa, Ruta 39, km 143, departamento de Maldonado |
| 2 | Colonia, Tarariras, departamento de Colonia |
| 3 | Carrasco, Camino Carrasco 5, departamento de Canelones |
| 7 | Infrinsa, Ruta Brigadier-General Juan A. Lavalleja, km 391, Ciudad de Melo, departamento de Cerro Largo |
| 8 | Canelones, Ciudad de Canelones, departamento de Canelones |
| 12 | Tacuarembó, Rutas 5 y 25, departamento de Tacuarembó |
| 14 | Efcsa (durazno), Santa Bernardina, departamento de Durazno |
| 20 | Comargen, Ruta 67 y Elias Regules, las Piedras, departamento de Canelones |
| 106 | Improgan, Camino Santos Lugares, km 4, la Pas, departamento de Canelones |
| 344 | San Jacinto, Ruta 7, km 59,5, San Jacinto, departamento de Canelones |
| 394 | Cybaran, La Caballada, departamento de Salto |

III. CARNE EQUINA

| Numero stabilimento | Indirizzo |
|---------------------|---|
| 303 | Clay Ruta 7, km 40, departamento de Canelones |

IV. DEPOSITI FRIGORIFERI

| Numero stabilimento | Indirizzo |
|---------------------|---|
| 10 | Frigorífico Modelo SA (Planta Propios), Br. Batten Ordones 3029, departamento de Montevideo |
| 87 | Santos Arbiza, Colombia 1257, departamento de Montevideo |
| 175 | Corfrisa, Las Piedras, departamento de Canelones |
| 903 | Acer, Rambla Baltasar Brum 3653, departamento de Montevideo |

NONA DIRETTIVA DELLA COMMISSIONE

del 31 luglio 1981

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

(81/715/CEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

Articolo 1

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 dall'atto di adesione della Grecia, in particolare l'articolo 2,

Gli Stati membri prescrivono che le analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per animali, per quanto riguarda il loro contenuto in avoparcina e monensin sodio siano effettuate secondo i metodi descritti nell'allegato.

considerando che la suddetta direttiva prevede che i controlli ufficiali degli alimenti per 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 animali, siano effettuati secondo i modi di prelievo di campioni ed i metodi di analisi comunitari;

Articolo 2

Gli Stati membri mettono in vigore il 1° dicembre 1981 disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alle disposizioni della presente direttiva e ne informano immediatamente la Commissione.

considerando che le direttive della Commissione 71/250/CEE ⁽²⁾, 71/393/CEE ⁽³⁾, 72/199/CEE ⁽⁴⁾, 73/46/CEE ⁽⁵⁾, 74/203/CEE ⁽⁶⁾, 75/84/CEE ⁽⁷⁾, 76/372/CEE ⁽⁸⁾ e 78/633/CEE ⁽⁹⁾, modificate da ultimo dalla direttiva del 30 luglio 1981, hanno già fissato un certo numero di metodi di analisi comunitari; che, tenuto conto dello stato di avanzamento dei lavori sin qui effettuati, è necessario adottare una nona serie di metodi;

Articolo 3

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

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

Fatto a Bruxelles, il 31 luglio 1981.

*Per la Commissione**Il Presidente*

Gaston THORN

⁽¹⁾ GU n. L 170 del 3. 8. 1970, pag. 2.
⁽²⁾ GU n. L 155 del 12. 7. 1971, pag. 13.
⁽³⁾ GU n. L 279 del 20. 12. 1971, pag. 7.
⁽⁴⁾ GU n. L 123 del 29. 5. 1972, pag. 6.
⁽⁵⁾ GU n. L 83 del 30. 3. 1973, pag. 21.
⁽⁶⁾ GU n. L 108 del 22. 4. 1974, pag. 7.
⁽⁷⁾ GU n. L 32 del 5. 2. 1975, pag. 26.
⁽⁸⁾ GU n. L 102 del 15. 4. 1976, pag. 8.
⁽⁹⁾ GU n. L 206 del 29. 7. 1978, pag. 43.

ALLEGATO

1. DOSAGGIO DELL'AVOPARCINA PER DIFFUSIONE IN AGAR

1. OGGETTO E CAMPO D'APPLICAZIONE

Il presente metodo permette di dosare l'avoparcina nei mangimi e nelle premisce. Il limite inferiore di dosaggio è di 2 mg/kg (2 ppm). La presenza di antibiotici polietere può interferire nel dosaggio.

2. PRINCIPIO

Il campione viene estratto con una miscela acetone-aqua-acido cloridrico. L'estratto è centrifugato: la sua attività antibiotica è determinata misurando la diffusione dell'avoparcina su terreno agarizzato insemato con *Bacillus subtilis*. La diffusione è rivelata dalla formazione di aloni di inibizione del microorganismo. Si ammette che il diametro di tali aloni sia direttamente proporzionale al logaritmo della concentrazione di antibiotico nel campo delle concentrazioni utilizzate.

3. MICROORGANISMO: BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Conservazione del ceppo

Insemare con *Bacillus subtilis* il terreno colturale (4.1), distribuito in provette a becco di clarino. Incubare per una notte a 30 °C, conservare in frigorifero a 4 °C circa e trapiantare ogni mese.

3.2. Preparazione della sospensione di spore ⁽¹⁾

Mediante 2-3 ml di acqua sterilizzata, raccogliere la patina di una agar-coltura (3.1), preparata di recente. Con tale sospensione, insemare una bottiglia di Roux contenente 300 ml del terreno di coltura (4.1); incubare per 3-5 giorni a 30 °C. Dopo controllo della sporulazione al microscopio, raccogliere le spore con 15 ml di etanolo (4.2) e omogenizzare. Questa sospensione può essere conservata per almeno 5 mesi alla temperatura di 4 °C circa.

4. TERRENI COLTURALI E REATTIVI

4.1. Terreno di mantenimento del ceppo ⁽²⁾

| | |
|--------------------------------|----------|
| Peptone | 6,0 g |
| Triptone | 4,0 g |
| Estratto di lievito | 3,0 g |
| Estratto di carne | 1,5 g |
| Glucosio | 1,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Acqua | 1 000 ml |
| pH 6,5 (dopo sterilizzazione). | |

4.2. Etanolo al 20 % (v/v): diluire 200 ml di etanolo con 800 ml di acqua.

4.3. Acido cloridrico, d: 1,18-1,19.

⁽¹⁾ Possono essere impiegati altri metodi, purché sia dimostrato che essi diano sospensioni di spore analoghe.

⁽²⁾ Si può utilizzare qualunque terreno colturale del commercio che dia gli stessi risultati.

- 4.4. Soluzione 2 M di idrossido di sodio.
- 4.5. Tampone fosfato 0,1 M:
Fosfato monopotassico, KH_2PO_4 : 13,6 g.
Acqua q.b. 1 000 ml.
Portare il pH a 4,5.
- 4.6. Miscela acetone-acqua-acido cloridrico (4.3): 65/32,5/2,5 (v/v/v).
- 4.7. Sostanza di riferimento: solfato di avoparcina ad attività nota.

5. SOLUZIONI DI RIFERIMENTO

Sciogliere nel tampone fosfato (4.5) una quantità di sostanza di riferimento (4.7) esattamente pesata e prossima ai 10 mg; diluire col tampone in modo da ottenere una soluzione madre di avoparcina contenente 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se conservata a 4 °C in bottiglia tappata, questa soluzione è stabile per sette giorni.

5.1. Per le premiscele

A partire da questa soluzione, preparare per diluizioni successive col tampone fosfato (4.5) le seguenti soluzioni:

| | |
|-------|-----------------------------|
| S_8 | 4,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |
| S_4 | 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |
| S_2 | 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |
| S_1 | 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |

5.2. Per i mangimi

A partire dalla soluzione madre, preparare per diluizioni successive col tampone fosfato (4.5) le seguenti soluzioni:

| | |
|-------|------------------------------|
| S_8 | 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |
| S_4 | 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |
| S_2 | 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |
| S_1 | 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |

6. PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO E DELLE SOLUZIONI

6.1. Premiscele

Pesare, con l'approssimazione di 10 mg, una quantità di campione contenente da 10 a 100 mg di avoparcina; travasare in pallone tarato da 100 ml, aggiungere 60 ml della miscela (4.6) e sottoporre per 15 minuti ad agitazione meccanica. Verificare il pH e, se necessario, portarlo a 2 con acido cloridrico (4.3). Portare a volume con la miscela (4.6) ed omogenizzare. Filtrare una parte del liquido su carta da filtro adatta (per es. Whatman n. 1), scartando i primi cinque ml di filtrato. Prelevare un'aliquota e portare il pH a 4,5 con la soluzione di idrossido di sodio (4.4). Diluire questa soluzione con tampone fosfato (4.5), fino ad ottenere una concentrazione presunta in avoparcina, pari a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (= U_8).

A partire da questa soluzione, preparare per diluizioni successive (1+1) col tampone fosfato (4.5) le soluzioni U_4 (concentrazione presunta: 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), U_2 (concentrazione presunta: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ed U_1 (concentrazione presunta: 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

6.2. Mangimi

Pesare una quantità di campione da 50,0 g, aggiungere 100 ml della miscela (4.6) e sottoporre per 30 minuti ad agitazione meccanica. Chiarificare l'estratto per centrifugazione (in provette tappate), prelevare un'aliquota dell'estratto limpido (vedi tabella più oltre) e portare il pH a 4,5 con la soluzione di idrossido di sodio (4.4). Diluire la soluzione con tampone fosfato (4.5) per ottenere la soluzione U_8 (vedi tabella più oltre).

A partire da questa soluzione, preparare per diluizioni successive (1 + 1) col tampone fosfato (4.5) le soluzioni U_4 (concentrazione presunta: 1,0 $\mu\text{g/ml}$), U_2 (concentrazione presunta: 0,5 $\mu\text{g/ml}$) ed U_1 (concentrazione presunta: 0,25 $\mu\text{g/ml}$).

| | | | | | | |
|---|-----|---------|-----|---------|-----|-----|
| Tenore presunto in avoparcina (mg/kg) | 5 | 7,5 | 10 | 15 | 20 | 40 |
| Peso del campione in g ($\pm 0,1$ g) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Volume della miscela (4.6) (ml) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Volume dell'estratto limpido (ml) | 20 | 15 | 20 | 15 | 20 | 10 |
| Volume finale (ml): U_8 | 25 | 25 | 50 | 50 | 100 | 100 |
| Concentrazione presunta U_8 in $\mu\text{g/ml}$ | 2 | 2 circa | 2 | 2 circa | 2 | 2 |

7. MODALITÀ DI DOSAGGIO

7.1. Inoculazione del terreno di coltura

Con la sospensione di spore (3.2), inseminare alla temperatura di 50-60 °C il terreno base per il dosaggio (4.1). Mediante saggi preliminari su piastra col terreno (4.1), determinare la quantità d'inoculo che consente di ottenere, per le diverse concentrazioni in avoparcina, aloni d'inibizione che abbiano la maggiore estensione possibile e che siano ancora netti.

7.2. Preparazione delle piastre

La diffusione in agar si effettua su piastre, con le quattro concentrazioni della soluzione di riferimento (S_8, S_4, S_2, S_1) e le quattro concentrazioni dell'estratto (U_8, U_4, U_2, U_1). Ogni piastra deve necessariamente contenere le quattro concentrazioni della sostanza di riferimento e dell'estratto. A tale scopo, impiegare piastre di dimensioni tali che possano contenere nel terreno agarizzato almeno 8 pozzetti del diametro di 10-13 mm, i cui centri non siano distanti fra loro meno di 30 mm. Si possono adoperare come piastre delle lastre di vetro piane, provviste di un anello di alluminio o di materiale plastico del diametro di 200 mm e dell'altezza di 20 mm.

Versare nelle piastre una quantità di terreno (4.1), inseminato come indicato al punto (7.1), che permetta di ottenere uno strato dello spessore di 2 mm circa (60 ml per una piastra di 200 mm di diametro). Lasciar solidificare, praticare i pozzetti e deporvi dei volumi esattamente misurati delle soluzioni della sostanza di riferimento e dell'estratto (da 0,10 a 0,15 ml per pozzetto a seconda del diametro). Le operazioni descritte vanno ripetute almeno quattro volte per ogni concentrazione, in modo da ottenere per ciascuna determinazione 32 aloni di inibizione.

7.3. Incubazione

Incubare le piastre per 16-18 ore, alla temperatura di 30 °C.

8. VALUTAZIONE

Misurare il diametro degli aloni di inibizione con l'approssimazione di 0,1 mm. Per ogni concentrazione, registrare le misure medie su carta semilogaritmica, riportando il logaritmo alle concentrazioni in funzione del diametro dell'alone di inibizione. Tracciare le rette più appropriate per la soluzione di riferimento e per l'estratto, procedendo ad esempio come segue.

Determinare il punto più appropriato per il livello più basso della soluzione di riferimento (SL) mediante la formula:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Determinare il punto più appropriato per il livello più elevato della soluzione di riferimento (SH) mediante la formula:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Determinare allo stesso modo i punti più appropriati per l'estratto al livello più basso (UL) ed al livello più alto (UH) sostituendo nelle formule sopra riportate i valori di S_1, S_2, S_4 e S_8 con quelli di U_1, U_2, U_4 ed U_8 .

Riportare i valori di SL ed SH sullo stesso grafico. Congiungendo i due punti si ottiene la retta più appropriata per la soluzione standard. Procedendo allo stesso modo per UL ed UH si ottiene la retta più appropriata per l'estratto.

In mancanza di interferenze le rette dovrebbero essere parallele. In pratica, esse sono considerate parallele allorché (SH-SL) ed (UH-UL) non differiscono fra loro di più del 10 % della loro media.

Se le rette non sono parallele, è possibile eliminare sia U_1 ed S_1 , sia U_8 e S_8 . I valori SL, SH, UL ed UH che permettono di ottenere le rette più appropriate vanno calcolati mediante le formule seguenti:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{o} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{o} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

e mediante formule analoghe per UL ed UH. Se si utilizza quest'alternativa, bisogna verificare il parallelismo delle rette nel modo sopra descritto. Se il risultato è stato ottenuto a partire da tre punti, ciò va indicato sul certificato di analisi.

Quando le rette sono considerate parallele, calcolare il logaritmo dell'attività relativa (log. A) con una delle formule seguenti:

Per 4 punti

$$(c) \quad \log. A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Per 3 punti

$$(d) \quad \log. A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

o

$$(d') \quad \log. A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Attività reale = attività presunta \times attività relativa.

Se l'attività relativa si trova al di fuori della gamma di valori compresi fra 0,5 e 2,0, ripetere la determinazione procedendo ad opportune regolazioni delle concentrazioni dell'estratto o, eventualmente, delle soluzioni di riferimento. Quando tale attività non può essere ricondotta nella gamma di valori richiesta, il risultato deve essere considerato approssimativo e tale indicazione deve figurare sul certificato di analisi.

Allorché le rette non sono considerate parallele, ripetere la determinazione. Se in base a questa nuova determinazione non è ancora possibile ottenere il parallelismo, la determinazione deve essere considerata insoddisfacente.

9. RIPETIBILITÀ

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate sullo stesso campione dallo stesso analista non dovrebbe eccedere:

- 2 mg/kg, in valore assoluto, per i contenuti in avoparcina da 2 a 10 mg/kg;
- il 20 % del risultato più elevato per i contenuti da 10 a 25 mg/kg;
- 5 mg/kg, in valore assoluto, per i contenuti da 25 a 50 mg/kg;
- il 10 % del risultato più elevato per i contenuti superiori a 50 mg/kg.

2. DOSAGGIO DEL MONENSIN SODIO PER DIFFUSIONE IN AGAR

1. OGGETTO E CAMPO D'APPLICAZIONE

Il presente metodo permette di dosare il monensin sodio nei mangimi e nelle premiscele. Il limite inferiore di dosaggio è di 10 mg/kg (10 ppm) ⁽¹⁾.

2. PRINCIPIO

Il campione viene estratto con metanolo al 90 %. L'estratto è sottoposto a trattamenti appropriati al contenuto in monensin sodio del campione. La sua attività antibiotica è determinata misurando la diffusione del monensin sodio su terreno agarizzato insemato con *Bacillus subtilis*. La diffusione è rivelata dalla formazione di aloni di inibizione del microrganismo. Si ammette che il diametro di tali aloni sia direttamente proporzionale al logaritmo della concentrazione di antibiotico nel campo di concentrazioni utilizzate. La sensibilità del metodo è ridotta dalla presenza di ioni sodio.

3. MICRORGANISMO: BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Conservazione del ceppo

Insemare con *Bacillus subtilis* il terreno colturale (4.1), distribuito in provette a becco di clarino. Incubare per una notte a 30 °C, conservare in frigorifero a 4 °C circa e trapiantare ogni mese.

3.2. Preparazione della sospensione di spore ⁽²⁾

Mediante 2-3 ml di acqua sterilizzata, raccogliere la patina di una agar-coltura (3.1), preparata di recente. Con tale sospensione, insemare una bottiglia di Roux contenente 300 ml del terreno di coltura (4.1); incubare per 3-5 giorni a 30 °C. Dopo controllo della sporulazione al microscopio, raccogliere le spore con 15 ml di etanolo al 20 % (4.3) e omogenizzare. Questa sospensione può essere conservata per almeno 5 mesi alla temperatura di 4 °C circa.

4. TERRENI CULTURALI E REATTIVI

4.1. Terreno di mantenimento del ceppo ⁽³⁾

| | |
|--------------------------------|------------------|
| Triptone | 10,0 g |
| Estratto di lievito | 3,0 g |
| Estratto di carne | 1,5 g |
| Glucosio | 1,0 g |
| Agar (secondo la qualità) | da 10,0 a 20,0 g |
| Acqua | 1 000 ml |
| pH 6,5 (dopo sterilizzazione). | |

4.2. Terreno di base per il dosaggio

| | |
|--|------------------|
| Glucosio | 10,0 g |
| Estratto di lievito | 2,5 g |
| Fosfato bipotassico, K ₂ HPO ₄ | 0,69 g |
| Fosfato monopotassico, KH ₂ PO ₄ | 0,45 g |
| Agar (secondo la qualità) | da 10,0 a 20,0 g |
| Acqua | 1 000 ml |
| pH 6,0 (dopo sterilizzazione). | |

⁽¹⁾ 1 mg di monensin sodio equivale a 1 000 unità «UK».

⁽²⁾ Possono essere impiegati altri metodi, purché sia dimostrato che essi diano sospensioni di spore analoghe.

⁽³⁾ Si può utilizzare qualunque terreno colturale del commercio di composizione analoga, purché dia gli stessi risultati.

- 4.3. Etanolo al 20 % (v/v): diluire 200 ml di etanolo con 800 ml di acqua.
- 4.4. Metanolo, anidro.
- 4.5. Metanolo al 90 % (v/v): diluire 900 ml di metanolo (4.4) con 100 ml d'acqua.
- 4.6. Metanolo al 50 % (v/v): diluire 500 ml di metanolo (4.4) con 500 ml d'acqua.
- 4.7. Ossido d'alluminio, granulato (alcoa F, 20 mesh; activated alumina UG1: F. Lancaster and Co., o equivalente).
- 4.8. Sostanza di riferimento: monensin sodio di attività nota (disponibile segnatamente presso, l'International Laboratory for Biological Standards, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Surrey KT15 3NB, Gran Bretagna).

5. APPARECCHIATURA

- 5.1. Evaporatore rotante, provvisto di pallone a fondo rotondo da 250 ml.
- 5.2. Tubo per cromatografia, in vetro (diametro interno: 25 mm, lunghezza: 400 mm), recante ad un'estremità un'apertura affusolata del diametro di 2 mm.
- 5.3. Tubo per cromatografia, in vetro (diametro interno: 11 mm, lunghezza: 300 mm circa), recante ad un'estremità un'apertura affusolata del diametro di 2 mm.

6. SOLUZIONI DI RIFERIMENTO

Sciogliere in metanolo (4.4) una quantità esattamente pesata di sostanza di riferimento (4.8) e diluire in modo da ottenere una soluzione madre di monensin sodio contenente 800 µg. Se conservata a 4 °C in bottiglia tappata, questa soluzione è stabile per due settimane.

A partire da questa soluzione, preparare per diluizioni successive con metanolo al 50 % (4.6) le seguenti soluzioni:

- S₈ 8 µg/ml
- S₄ 4 µg/ml
- S₂ 2 µg/ml
- S₂ 2 µg/ml

7. PREPARAZIONE DELL'ESTRATTO

7.1. Estrazione

7.1.1. Premiscele

Pesare una quantità di campione di 2,0 g, aggiungere 100 ml di metanolo al 90 % (4.5), omogenizzare, poi centrifugare per qualche minuto. Diluire il supernatante con metanolo al 50 % (4.6), fino ad ottenere una concentrazione presunta in monensin pari ad 8 µg/ml (= U₈).

7.1.2. Alimenti con tenore in monensin sodio non inferiore a 50 ppm

Pesare una quantità di campione da 10,0 a 20,0 g, aggiungere 100 ml di metanolo al 90 % (4.5), omogenizzare per 15 minuti e lasciare riposare.

Introdurre un tampone di cotone nell'apertura affusolata del tubo di vetro (5.2), aggiungere ossido di alluminio (4.7), impartendo leggere scosse al tubo, finché la colonna raggiunga l'altezza di 75-80 mm.

Decantare l'estratto sulla colonna di ossido di alluminio e raccogliere il filtrato. Prelevare 30 ml del filtrato e diluirli con acqua a 50 ml. Diluire poi con metanolo al 50 % (4.6) fino ad ottenere una concentrazione presunta in monensin sodio pari a 8 µg/ml (= U₈).

7.1.3. Alimenti con tenore in monensin sodio inferiore a 50 ppm (fino al limite di 10 ppm)

Pesare una quantità di campione da 10,0 a 20,0 g, aggiungere 100 ml di metanolo al 90 % (4.5) ed omogenizzare per 15 minuti. Centrifugare in modo da ottenere un estratto limpido.

Per un campione il cui contenuto in monensin sodio è di 20 ppm, prelevare 40 ml del supernatante; per un campione il cui contenuto è di 10 ppm, prelevarne 80 ml. Portare a secco con l'evaporatore rotante (5.1), a temperatura non superiore a 40 °C. Disciogliere il residuo in 10 ml di metanolo al 90 % (4.5).

Introdurre un tampone di cotone nell'apertura affusolata del tubo di vetro (5.3); aggiungere ossido di alluminio (4.7), impartendo leggere scosse al tubo, finché la colonna raggiunge l'altezza di 75-80 mm.

Decantare la soluzione metanolica del residuo sulla colonna di ossido di alluminio e raccogliere il filtrato. Lavare la colonna con 10 ml di metanolo al 90 % (4.5) ed aggiungere il liquido di risciacquo al filtrato.

Portare la soluzione a secco con l'evaporatore rotante (5.1), a temperatura inferiore a 40 °C. Disciogliere il residuo in 10 ml di metanolo anidro (4.4) e portare a 20 ml con acqua. Centrifugare ad almeno 4 000 g/m per almeno 5 minuti. Diluire poi con metanolo al 50 % (4.6), fino ad ottenere una concentrazione presunta in monensin sodio pari a 8 µg/ml (= U₈).

7.2. Soluzione dell'estratto

A partire dalla soluzione U₈, preparare per diluizioni successive (1+1) con metanolo al 50 % (4.6) le soluzioni U₄ (concentrazione presunta: 4 µg/ml), U₂ (concentrazione presunta: 2 µg/ml) e U₁ (concentrazione presunta: 1 µg/ml).

8. MODALITÀ DI DOSAGGIO**8.1. Inoculazione del terreno di coltura**

Con la sospensione di spore (3.2), inseminare il terreno base per il dosaggio (4.2), alla temperatura di 50-60 °C. Mediante saggi preliminari su piastra col terreno (4.2), determinare la quantità di inoculo che consente di ottenere, per le diverse concentrazioni in monensin sodio, aloni di inibizione che abbiano la maggiore estensione possibile e che siano ancora netti.

8.2. Preparazione delle piastre

La diffusione in agar si effettua su piastre con le quattro concentrazioni della soluzione di riferimento (S₈, S₄, S₂, S₁) e le quattro concentrazioni dell'estratto (U₈, U₄, U₂, U₁). Ogni piastra deve necessariamente contenere le quattro concentrazioni della sostanza di riferimento dell'estratto. A tale scopo, impiegare piastre di dimensioni tali che possano contenere nel terreno agarizzato almeno 8 pozzetti del diametro di 10-13 mm, i cui centri non siano distanti fra loro meno di 30 mm. Si possono adoperare come piastre delle lastre di vetro piane provviste di un anello di alluminio o di materiale plastico del diametro di 200 mm e dell'altezza di 20 mm.

Versare nelle piastre una quantità di terreno (4.2), inseminato come indicato al punto (8.1), che permetta di ottenere uno strato dello spessore di 2 mm circa (60 ml per una piastra di 200 mm di diametro). Lasciar solidificare, praticare i pozzetti e deporvi dei volumi esattamente misurati delle soluzioni della sostanza di riferimento e dell'estratto (da 0,10 a 0,15 ml per pozzetto a seconda del diametro). Le operazioni descritte vanno ripetute almeno quattro volte per ogni concentrazione, in modo da ottenere per ciascuna determinazione 32 aloni di inibizione.

8.3. Incubazione

Incubare le piastre per 18 ore circa, alla temperatura di 35-37 °C.

9. VALUTAZIONE

Misurare il diametro degli aloni di inibizione con l'approssimazione di 0,1 mm. Per ogni concentrazione, registrare le misure medie su carta semilogaritmica riportando il logaritmo delle concentrazioni in funzione del diametro dell'alone di inibizione. Tracciare le rette più appropriate per la soluzione di riferimento e per l'estratto, procedendo ad esempio come segue.

Determinare il punto più appropriato per il livello più basso della soluzione di riferimento (SL) mediante la formula:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Determinare il punto più appropriato per il livello più elevato della soluzione di riferimento (SH) mediante la formula:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Determinare allo stesso modo i punti più appropriati per l'estratto al livello più basso (UL) ed al livello più alto (UH) sostituendo nelle formule sopra riportate i valori di S_1 , S_2 , S_4 e S_8 con quelli di U_1 , U_2 , U_4 ed U_8 .

Riportare i valori di SL ed SH sullo stesso grafico. Congiungendo i due punti si ottiene la retta più appropriata per la soluzione standard. Procedendo allo stesso modo per UL ed UH si ottiene la retta più appropriata per l'estratto.

In mancanza di interferenze le rette dovrebbero essere parallele. In pratica, esse sono considerate parallele allorché (SH-SL) ed (UH-UL) non differiscono fra loro di più del 10 % della loro media.

Se le rette non sono parallele, è possibile eliminare sia U_1 e S_1 , sia U_8 e S_8 . I valori SL, SH, UL ed UH che permettono di ottenere le rette più appropriate vanno calcolati mediante le formule seguenti:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{o} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{o} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

e mediante formule analoghe per UL ed UH. Se si utilizza quest'alternativa, bisogna verificare il parallelismo delle rette nel modo sopra descritto. Se il risultato è stato ottenuto a partire da tre punti, ciò va indicato sul certificato di analisi.

Quando le rette sono considerate parallele, calcolare il logaritmo dell'attività relativa (log. A) con una delle formule seguenti:

Per 4 punti

$$(c) \quad \log. A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Per 3 punti

$$(d) \quad \log. A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1} \quad \text{o}$$

$$(d') \quad \log. A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Attività reale = attività presunta \times attività relativa.

Se l'attività relativa si trova al di fuori della gamma di valori compresi fra 0,5 e 2,0, ripetere la determinazione procedendo ad opportune regolazioni delle concentrazioni dell'estratto o, eventualmente, delle soluzioni di riferimento. Quando tale attività non può essere ricondotta nella gamma di valori richiesta, il risultato deve essere considerato approssimativo e tale indicazione deve figurare sul certificato di analisi.

Allorché le rette non sono considerate parallele, ripetere la determinazione. Se in base a questa nuova determinazione non è ancora possibile ottenere il parallelismo, la determinazione deve essere considerata insoddisfacente.

10. RIPETIBILITÀ

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate sullo stesso campione dallo stesso analista non dovrebbe eccedere:

- il 20 % del risultato più elevato per i contenuti in monensin sodio da 10 a 25 mg/kg;
- 5 mg/kg, in valore assoluto, per i contenuti da 25 a 50 mg/kg;
- il 10 % del risultato più elevato per i contenuti superiori a 50 mg/kg.

