

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE ALIMENTARI E FORESTALI

DECRETO 17 luglio 2012.

Approvazione del metodo ufficiale di analisi per la determinazione del contenuto di vitamina D3 negli alimenti per gli animali.

IL DIRETTORE GENERALE
DELLA EX DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE
E REPRESSIONE FRODI
DEL MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE
ALIMENTARI E FORESTALI

DI CONCERTO CON

IL DIRETTORE GENERALE
DELLA SANITÀ ANIMALE E DEI FARMACI VETERINARI
DEL MINISTERO DELLA SALUTE

IL DIRETTORE
DELL'AGENZIA DELLE DOGANE

E

IL DIRETTORE GENERALE
PER LA POLITICA INDUSTRIALE E LA COMPETITIVITÀ
DEL MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO

Visti gli articoli 43 del regio decreto-legge 15 ottobre 1925, n. 2033, convertito nella legge 18 marzo 1926, n. 562, recante disposizioni su «Repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari» e 108 del Regio decreto 1° luglio 1926, n. 1361, recante il regolamento di esecuzione del citato Regio decreto-legge n. 2033/1925, i quali stabiliscono che le analisi dei prodotti e delle sostanze di cui al decreto-legge sono eseguite dai laboratori incaricati con i metodi ufficiali prescritti e adottati da questo Ministero di concerto con il Ministero delle finanze, della sanità e dell'industria commercio e artigianato;

Visto il decreto-legge 18 giugno 1986, n. 282 convertito, con modificazioni, nella legge 7 agosto 1986, n. 462, che all'art. 10 ha previsto l'istituzione dell'Ispettorato centrale repressione frodi presso il Ministero dell'agricoltura e foreste per l'esercizio, tra l'altro, delle funzioni inerenti alla prevenzione e repressione delle infrazioni nella preparazione e nel commercio dei prodotti agroalimentari e delle sostanze di uso agrario e forestale;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 14 febbraio 2012, n. 41, recante «Riorganizzazione del Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali, (*omissis*)», che all'art. 4 ha previsto per l'Ispettorato centrale l'attuale denominazione di «Dipartimento dell'Ispettorato centrale della tutela della qualità e repressione frodi dei prodotti agro-alimentari» con acronimo ICQRF, riconfermando, tra le competenze allo stesso demandate, le funzioni in materia di aggiornamento delle metodiche ufficiali di analisi dei prodotti agroalimentari e delle sostanze di uso agrario e forestali;

Visto l'art. 2, comma 1, del decreto legislativo 30 luglio 1999, n. 300, così come modificato dal decreto-legge 16 maggio 2008, n. 85 convertito con modificazioni in legge 14 luglio 2008, n. 121, recante «Disposizioni urgenti per l'adeguamento delle strutture di governo in applicazione dell'art. 1, commi 376 e 377, della legge 24 dicembre 2007, n. 244» che stabilisce il numero e la denominazione dei Ministeri;

Visti gli articoli 57, 63 e 68, commi 1, del citato decreto legislativo n. 300/1999, in materia di istituzione delle agenzie fiscali, tra cui «l'Agenzia delle Dogane» e per quest'ultima, l'attribuzione delle competenze nonché l'individuazione delle funzioni di Direttore cui spetta la rappresentanza e la direzione dell'Agenzia delle Dogane medesima;

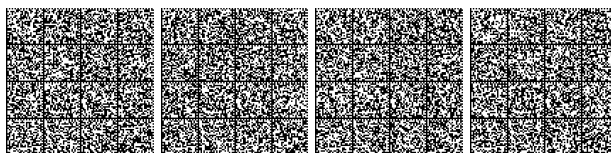
Vista la legge 13 novembre 2009, n. 172 recante, tra l'altro, l'istituzione del «Ministero della salute» entrata in vigore il 13 dicembre 2009;

Visto il decreto legislativo 30 marzo 2001, n. 165, e successive modificazioni;

Visto il decreto ministeriale 5 maggio 2006 del Ministro delle politiche agricole e forestali pro-tempore, concernente a norma dell'art. 44 della legge 20 febbraio 2006, n. 82, l'istituzione della Commissione consultiva per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi dei prodotti agroalimentari e delle sostanze di uso agrario e forestale, articolata in dieci sottocommissioni con competenze settoriali;

Vista la Direttiva della Presidenza del Consiglio dei Ministri 4 agosto 2010, relativa ad indirizzi interpretativi in materia di riordino degli organismi collegiali e di riduzione dei costi degli apparati amministrativi;

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



Visto il Regolamento (CE) n. 767/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio che disciplina l'immissione e l'uso sul mercato dei mangimi, che prescrive, tra l'altro, specifiche disposizioni di etichettatura in merito al tenore di additivi, soggette a verifica di conformità nell'ambito dei controlli ufficiali;

Visto il Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio in materia di controlli ufficiali nei mangimi e negli alimenti, che dispone all'art. 11 Capo III: «Campionamento ed analisi», che i «metodi di analisi utilizzati nel contesto dei controlli ufficiali sono conformi alle pertinenti norme comunitarie o se tali norme non esistono, a norme o protocolli riconosciuti internazionalmente, (*omissis*), o quelli accettati dalla legislazione nazionale;» e che «i metodi di analisi devono essere caratterizzati, quando possibile, da opportuni criteri di precisione»;

Visto il Regolamento (CE) n. 152/2009 della Commissione che fissa i metodi campionamento e di analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali, tra i quali non è presente il metodo di dosaggio della vitamina D₃;

Visto il Regolamento (CE) n. 887/2009 della Commissione concernente l'autorizzazione di una forma stabilizzata di 25-idrossicolecalciferolo, come additivo per mangimi, che nell'Allegato alla voce «Metodo analitico» riporta, per la determinazione della vitamina D₃ nell'alimento completo, l'indicazione della norma EN 12821:2000;

Ritenuto necessario stabilire un metodo di analisi per il controllo di detta sostanza anche negli alimenti complementari e nelle premiscele;

Sentito il parere della precitata Commissione consultiva per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi dei prodotti agroalimentari e delle sostanze di uso agrario e forestale - Sottocommissione alimenti per animali, istituita e nominata con decreto ministeriale 19 dicembre 2008 n. 1790, da ultimo modificata nella composizione con decreto ministeriale 16 dicembre 2011, operativa in regime di proroga ai sensi della precitata Direttiva 4 agosto 2010;

Vista la direttiva 98/34/CE e successive modifiche, che prevede una procedura d'informazione nel settore delle norme e regolamentazioni tecniche;

Decreta:

Art. 1.

1. È approvato il metodo ufficiale di analisi per la determinazione del contenuto di vitamina D₃ negli alimenti per animali, descritto in allegato al presente decreto.

2. Il campo di applicazione del metodo di cui al comma 1 è riferito a: mangimi composti complementari e premiscele.

Art. 2.

Il metodo di analisi di cui al presente decreto si applica al controllo dei prodotti nazionali.

Il presente decreto, che sarà trasmesso al competente organo di controllo, entra in vigore il giorno successivo alla sua pubblicazione nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

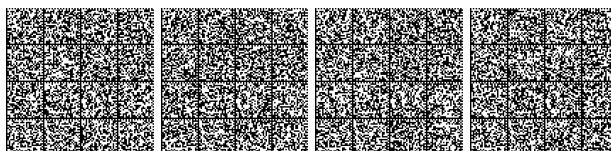
Roma, 17 luglio 2012

*Il direttore generale
della ex direzione generale della prevenzione
e repressione frodi
del Ministero delle politiche agricole
alimentari e forestali*
GATTO

*Il direttore generale
della sanità animale e dei farmaci veterinari
del Ministero della salute*
FERRI

*Il direttore
dell'Agenzia delle dogane*
PELEGGI

*Il direttore generale per la politica
industriale e la competitività
del Ministero dello sviluppo economico*
BIANCHI



ALLEGATO : METODO DI ANALISI

Alimenti per animali - Determinazione della VITAMINA D₃- Metodo RP-HPLC-UV**1 Scopo e campo di applicazione**

Il metodo consente di determinare il contenuto di vitamina D₃ (colecalfiferolo) negli alimenti per gli animali.

Il metodo si applica a mangimi composti complementari e premiscele.

Il contenuto in vitamina D₃ viene espresso in UI/kg (1 UI = 0,025 µg di vitamina D₃).

Il limite di quantificazione (LOQ) è di 2000 UI/kg.

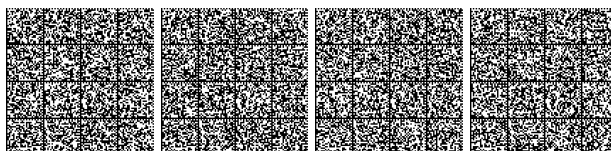
AVVERTENZA - l'utilizzo del presente metodo può richiedere l'uso di sostanze pericolose o l'esecuzione di operazioni che comportano un certo rischio. Il presente metodo non ha lo scopo di affrontare tutti i problemi di sicurezza connessi col suo impiego, l'utilizzatore è responsabile della definizione di procedure di sicurezza appropriate e del rispetto della legislazione vigente.

2. Principio

La vitamina D₃ viene determinata per cromatografia liquida ad alta risoluzione in fase inversa (RP-HPLC) utilizzando un rilevatore spettrofotometrico UV, previa idrolisi in soluzione etanolica, estrazione in esano e purificazione su colonnina per estrazione in fase solida.

3. Reagenti e materiali

- 3.1 Etanolo assoluto
- 3.2 Etanolo 96%
- 3.3 Miscela antiossidanti:
Vitamina C: EDTA: BHT p.a. (10:1:1)
oppure: 100 mg di BHT p.a.
- 3.4 Soluzione acquosa di potassio idrossido al 50%
- 3.5 Acido acetico soluzione acquosa al 10%
- 3.6 Soluzione alcolica di fenoltaleina al 1%
- 3.7 Sodio solfato anidro p.a.



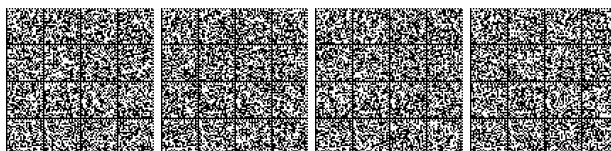
- 3.8 Esano p.a.
- 3.9 Isopropanolo per HPLC
- 3.10 Diclorometano per HPLC
- 3.11 Etil acetato per HPLC
- 3.12 Metanolo per HPLC
- 3.13 Miscela diclorometano:isopropanolo:
a= (80:20), **b**= (99,8:0,2)
- 3.14 Acetonitrile per HPLC
- 3.15 Fase mobile per HPLC: metanolo (3.12):acetonitrile (3.14) 15:85 v/v
- 3.16 Colecalciferolo purissimo
 - 3.16.1 Soluzione madre di vitamina D₃ in etanolo concentrazione nominale 250 µg/ml (10.000 UI/ml):
pesare accuratamente 25,0 mg di vitamina D₃(coleciferolo), scioglierli in etanolo assoluto (3.1) e portare a volume finale di 100 ml in matraccio tarato di vetro ambrato o coperto da carta stagnola
- 3.17 Olio di semi.

4 Attrezzature

- 4.1 Vetreria tarata e graduata da laboratorio (per la misura dei volumi utilizzare pipette e matracci tarati di classe A o equivalente)
- 4.2 Bagnomaria o mantello riscaldante termoregolabile
- 4.3 Evaporatore rotante
- 4.4 Palloni a fondo tondo da 250 ml con cono smerigliato
- 4.5 Imbuti separatori da 500 ml
- 4.6 Refrigerante a ricadere con accessorio per flusso di azoto
- 4.7 Apparecchiatura HPLC con rivelatore spettrofotometrico UV/Vis
- 4.8 Colonna semipolimerica (tipo Vydac) 201 TP54 C₁₈ 250x4,6/5µm con relativa precolonna o C₁₈ equivalenti
- 4.9 Colonnina per estrazione in fase solida a base silice: 500 mg con reservoir da 5 ml, attivata con 4 ml della miscela diclorometano:isopropanolo (80:20) (3.13a) e poi con 5 ml della miscela diclorometano:isopropanolo (99,8:0,2) (3.13b)
- 4.10 Bilancia analitica

5 Modo di operare

- 5.1 Preparazione del campione
Per la preparazione dell'aliquota da sottoporre ad analisi procedere come indicato nei metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per



animali descritti nel Regolamento (CE) 152/2009 – ALLEGATO II lettera “A. preparazione dei campioni per analisi”.

5.2 Estrazione del campione

Pesare (con l'approssimazione di 0,01 g) da 5 a 20 grammi di campione in un pallone a fondo tondo (4.4), aggiungere 100 ml di etanolo (3.2), 10 ml della soluzione di potassio idrossido (3.4) e una punta di spatola di miscela antiossidanti Vit. C:EDTA:BHT 10:1:1 o 100 mg di BHT (3.3). Inserire il pallone sotto al refrigerante a ricadere (4.6) e riscaldare all'ebollizione in atmosfera di azoto per 30 minuti agitando frequentemente (*l'atmosfera di azoto è consigliabile solo in questo passaggio dell'analisi in quanto è la fase più stressante per il campione*). Al termine della saponificazione lavare il refrigerante con 50 ml di acqua e quindi raffreddare il pallone in bagno di acqua e ghiaccio.

Trasferire quantitativamente il contenuto del pallone in un imbuto separatore, aggiungere 100 ml di esano (3.8). Agitare per 90", lasciare separare le fasi e trasferire quella acquosa in un secondo imbuto separatore. Ripetere l'estrazione della fase acquosa con altri 100 ml di esano (3.8).

Riunire nel primo imbuto separatore gli estratti in esano e lavare con 2 porzioni da 100 ml di acqua, più qualche goccia di acido acetico (3.5) fino a scomparsa della reazione alcalina con saggio alla fenoltaleina (3.6).

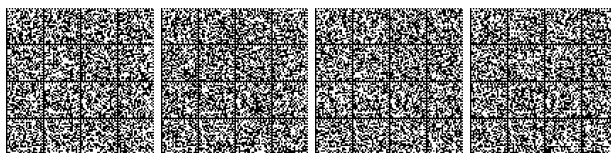
Filtrare l'estratto su sodio solfato anidro (3.7) e lavare l'imbuto separatore ed il filtro con esano portando ad un volume di 250 ml (V_1). Evaporare a secchezza un'aliquota nota dell'estratto; il volume dell'aliquota (V_2) deve essere tale da contenere al massimo 200 UI di vitamina (5,0 μg) (*si usa l'evaporatore rotante nei casi in cui ci siano grossi volumi, per piccole quantità è consigliabile utilizzare l'azoto*). Riprendere il residuo con 2 ml di miscela diclorometano:isopropanolo (3.13b).

5.3 Purificazione del campione su colonnina SPE

Versare la soluzione preparata, contenente il campione, nella colonnina SPE (4.9) attivata come descritto. Lavare il contenitore della soluzione di vitamina con 1 ml di miscela (3.13b) e trasferire anch'esso in colonnina.

Lavare poi la colonnina con 1 ml della miscela (3.13b) e scartare queste frazioni.

Eluire con 7 ml della miscela (3.13b). Evaporare l'eluato a secchezza e riprendere il residuo con 1 ml di fase mobile (3.15) (V_3).



6 Preparazione delle soluzioni di taratura

6.1 Preparazione delle Soluzioni standard di lavoro:

Trasferire un'aliquota da 5 ml della soluzione madre (3.16.1) in un pallone a fondo tondo (4.4), aggiungere alcune gocce (0,5 ml) di olio di semi (3.17) e procedere come per il campione in 5.2 " Estrazione ", fino ad ottenere i 250 ml di estratto in esano. Prelevare 4 aliquote di volume rispettivamente pari a 2 – 4 – 8 – 16 ml evaporare sotto azoto e riprendere ciascun residuo con 10 ml di fase mobile (3.15) in modo da ottenere 4 soluzioni standard di lavoro di concentrazione rispettivamente 1- 2- 4 - 8 µg/ml di vitamina D₃.

In alternativa: pesare accuratamente 25,0 mg di colecalciferolo purissimo (3.16) aggiungere 0,5 ml di olio di semi (3.17) e procedere alla saponificazione e all'estrazione in esano come per il campione in 5.2 " Estrazione". Prelevare 5 ml dell'estratto, evaporare e portare a 100 ml con la fase mobile (3.15). Da questa soluzione approntare direttamente le soluzioni di lavoro per diluizione.

7 Determinazione HPLC

La vitamina D₃ viene separata mediante una colonna a fase inversa C₁₈ e la determinazione avviene misurando – tramite un rivelatore UV-Vis - l'area del picco di assorbimento a 265 nm, ottenuto iniettando 50 µl dell'estratto purificato del campione. La determinazione si effettua con il metodo della standardizzazione esterna; la curva di taratura viene costruita misurando i segnali prodotti iniettando 50 µl delle soluzioni standard di lavoro (6.1) nell'HPLC.

Condizioni HPLC

Colonna analitica: Colonna semipolimerica (tipo Vydac) 201 TP54 C18 250x4,6/5µm con relativa precolonna o C18 equivalenti;

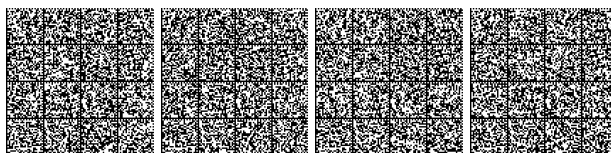
Temperatura della colonna: 27 °C;

Fase mobile: miscela di metanolo (3.12):acetonitrile (3.14) 15:85 v/v

Velocità di efflusso: 1,0 ml/min

Rivelatore: UV-Vis (265 nm)

Lavare la colonna con etil acetato (3.11) dopo ciascuna iniezione (il tempo di ritenzione della vitamina D₃ determina l'inizio del tempo di lavaggio) avendo cura di effettuare un breve gradiente di velocità di flusso fino a raggiungere un flusso massimo di 2,5 ml/min per 4 minuti.



Condizionare la colonna con la fase mobile prima dell'iniezione successiva, operando anche in questo passaggio un breve gradiente di velocità di flusso fino al flusso di 1,0 ml/min per 4 minuti.

8 Calcolo ed Espressione dei risultati

Costruire la curva di taratura riportando sull'asse delle ordinate i valori delle aree dei picchi ottenuti iniettando le soluzioni standard di lavoro e sull'asse delle ascisse le concentrazioni corrispondenti. Dalla misura dell'area del picco ottenuto iniettando la soluzione campione, si calcola la concentrazione di vitamina D₃ per interpolazione sulla curva di taratura.

Nel caso in cui la concentrazione di vitamina D₃ nel campione risulti maggiore del limite del campo di lavoro (1÷8 µg/ml) è necessario diluire un volume noto di campione con un volume noto di fase mobile (3.15). Il contenuto di vitamina D₃, nel campione, si calcola a partire dalla concentrazione di vitamina D₃ misurata nella soluzione campione applicando la seguente equazione:

$$\text{Contenuto di vitamina D}_3 \text{ UI/kg} = c \times V_3 \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{1000}{m \times 0,025}$$

dove :

- c = concentrazione di vitamina D₃ nella soluzione campione espressa in µg/ml
- m = massa in grammi dell'aliquota del campione sottoposta ad analisi
- V₁ = volume in ml dell'estratto in esano *di cui al punto 5.2*
- V₂ = volume in ml dell'aliquota da purificare *di cui al punto 5.2.1*
- V₃ = volume in ml dell'estratto purificato ripreso con la fase mobile *di cui al punto 5.3*

Il risultato si esprime in UI /kg (1 UI = 0,025 µg)

9 Precisione

9.1 Risultati statistici di uno studio collaborativo

È stato organizzato uno studio collaborativo (anno 2007) nel quale (8-10) laboratori esperti hanno analizzato due premiscele e tre mangimi composti complementari contenenti diversi livelli di vitamina D₃.

Su ciascuna delle cinque matrici di prodotti sono state eseguite tre determinazioni in condizioni di ripetibilità stretta.



I risultati riportati in tabella, sono stati ottenuti secondo criteri di analisi statistica conformi alla norma 5725:2004.

MATRICE	MANGIME COMPLEMENTARE	MANGIME COMPLEMENTARE	MANGIME COMPLEMENTARE	PREMISCELA	PREMISCELA
valore riferimento (UI/kg)	20.000	77.000	200.000	400.000	1.400.000
MEDIA (UI/kg)	21.400	71.000	185.000	385.000	1.390.000
recupero	107,00%	92,21%	92,50%	96,25%	99,29%
N LABORATORI	8	8	10	9	9
N MISURE	24	24	30	27	27
sigma r (UI/kg)	1.600	6.100	11.000	27.000	79.000
sigma R (UI/kg)	3.800	9.500	26.000	38.000	231.000
r (UI/kg)	4.500	17.300	31.000	76.000	223.000
R (UI/kg)	10.700	26.900	74.000	107.000	653.000
CV% r	7,48%	8,59%	5,95%	7,01%	5,68%
CV% R	17,76%	13,38%	14,05%	9,87%	16,62%

Legenda

- sigma r = scarto tipo di ripetibilità
- sigma R = scarto tipo di riproducibilità
- r = limite di ripetibilità
- R = limite di riproducibilità
- CV % r = coefficiente di variazione percentuale di ripetibilità.
- CV % R = coefficiente di variazione percentuale di riproducibilità.

10 Appendice informativa

- La colonnina (4.9) posta su sostegno e lasciata fluire a caduta ha una velocità di eluizione di circa 1 ml/min. Attenzione a non mandare a secco .
- Durante l'estrazione con esano, se si verifica il formarsi di emulsione, aggiungere alcuni ml di etanolo per romperla.
- Quando è necessario evaporare tutto l'estratto: evaporare fino a secchezza, riprendere con 10 ml di esano. Prelevare 5 ml di questa soluzione, evaporare e riprendere con 2 ml di miscela diclorometano:isopropanolo (3.13b). Non viene usato tutto l'estratto in quanto il carico di frazioni che interferiscono è superiore alla tenuta della colonnina.
- Il carico massimo della SPE è 5 µg di vitamina .



- Il lavaggio della colonna C₁₈ con etil-acetato è necessario sempre.
- La purificazione su SPE è utile farla anche su campioni a concentrazione alta di vitamina D₃, a meno che non si tratti di mangimi con contenuti > 10.000.000 UI/kg.
- Le soluzioni standard si controllano con una misura spettrofotometrica in etanolo a 265nm - E 1% 1cm 450

11 Riferimenti bibliografici

- Staffas & Nyman : Journal of AOAC International Vol. 86, No.2, 2003
- AOAC Method 2002.05 Determination of Cholecalciferol in Selected Food
- Euro FIR guidelines for assessment of methods of Analysis – Nutrient – vitamin D₃, vitamina D₂
- Sliva et Al : Journal of AOAC International vol.75, No.3, 1992

12A08560

PRESIDENZA DEL CONSIGLIO DEI MINISTRI

DIPARTIMENTO DELLA PROTEZIONE CIVILE

ORDINANZA DEL CAPO DIPARTIMENTO DELLA
PROTEZIONE CIVILE 26 luglio 2012.

**Interventi urgenti di protezione civile volti a fronteggiare
l'emergenza idrica nel territorio della regione Umbria.** (Or-
dinanza n. 0014).

IL CAPO DEL DIPARTIMENTO
DELLA PROTEZIONE CIVILE

Visto l'articolo 5 della legge 24 febbraio 1992, n. 225;

Visto l'articolo 107 del decreto legislativo 30 marzo
1998, n. 112;

Visto il decreto-legge 7 settembre 2001, n. 343, con-
vertito, con modificazioni, dalla legge 9 novembre 2001,
n. 401;

Visto il decreto-legge del 16 maggio 2012, n. 59, re-
cante «Disposizioni urgenti per il riordino della prote-
zione civile» convertito, con modificazioni, dalla legge
12 luglio 2012, n. 100;

Vista la delibera del Consiglio dei Ministri del 6 luglio
2012 con la quale è stato dichiarato, fino al 4 settembre
2012, lo stato d'emergenza in ordine alla grave crisi idrica
che interessa il territorio della Regione Umbria dal mese
di gennaio 2011 ed è stata disposta la delega al Capo del
Dipartimento della protezione civile ad emanare ordina-
nze in deroga ad ogni disposizione vigente e nel rispetto
dei principi generali dell'ordinamento giuridico;

Visto il Piano degli interventi approvato dalla Giun-
ta della Regione Umbria con deliberazione n. 749 del
25 giugno 2012 contenente l'indicazione degli interventi
urgenti e necessari da realizzare per il superamento della
grave crisi idrica che interessa il territorio della Regione,
nonché delle risorse a ciò destinate;

Vista la nota della Regione Umbria del 10 luglio 2012;

Considerato che il perdurare della situazione di sicci-
tà causata dalla carenza di precipitazioni compromette la
vita sociale ed economica delle zone colpite, determinan-
do una grave situazione di pericolo per la sanità e l'igiene
pubblica;

