



PTs dell'EURL-FA: partecipazione dei laboratori italiani per il controllo ufficiale nell'anno 2019 circuito FAC 19/01

Fabrizia Forghieri
ICQRF Laboratorio di Modena
Roma 28/11/2019



CIRCUITO FAC 19/01

- The proficiency test "FAC-19/01", è stato organizzato dal Laboratorio dell'Unione Europea per gli additivi nei mangimi (EURL-FA Control) ospitato dal JRC (Joint Research Centre) della Commissione Europea per verificare la capacità dei laboratori partecipanti a determinare correttamente alcuni carotenoidi autorizzati ai livelli autorizzati in mangimi composti per pesci e polli.
- Il PT era parte del programma di lavoro di EURL-FA per il periodo 2019-2020 ed era aperto ai LNR (laboratori nazionali di riferimento) e agli OCLs (Laboratori di controllo Ufficiale) e ICQRF Laboratorio di Modena ha partecipato in questa veste.
- Ai partecipanti è stato richiesto, oltre la quantificazione dei carotenoidi presenti in n.2 mangimi, anche di valutare la conformità dei mangimi investigati in relazione ai massimi livelli consentiti nei Regolamenti UE 721/2008 e 1486/2015.



CIRCUITO FAC 19/01

- **Misurando:** AXN, CXN e ADR in mangime per pesci e CXN in mangime per polli
- **Metodo da utilizzare :** ogni laboratorio poteva applicare il metodo impiegato usualmente per il controllo ufficiale, determinando il contenuto degli analiti sopra riportati associando la propria incertezza estesa di misura, il fattore di copertura K e le indicazioni relative alla metodologia utilizzata.
- **Risultati** da esprimere in mg/Kg al 12% di umidità.

CIRCUITO FAC 19/01

- **Precedenti partecipazioni**
- **20/07/2017** richiesta ai LNR e OCLs da parte di JRC-EURL di partecipare ad uno studio collaborativo per la validazione di un metodo analitico HPLC-UV o HPLC-DAD per la determinazione di carotenoidi autorizzati nei mangimi.
- **Obiettivo:** assicurare il «fit for purpose» del metodo analitico proposto per la determinazione simultanea dei carotenoidi ai livelli autorizzati dalla legislazione europea, effettuando un PT in cui i laboratori erano tenuti alla stretta applicazione del metodo inviato.
- **Programmazione:** Lo studio era programmato in due fasi: una a fine 2017 di training per l'acquisizione dei materiali/reattivi necessari, l'avvicinamento e la prima applicazione del metodo, e una seconda (fase di validazione) nell'aprile del 2018 con l'invio di n.18 campioni tra mangimi e premiscele da analizzare e rendicontare.

CIRCUITO FAC 19/01

➤ **N.10 Carotenoidi da separare**

- Astaxantina (AXN)
- Cantaxantina (CXN)
- Adonirubina (ADR)
- Astaxantina dimetilsuccinato (AXN-DMDS)
- Capsantina (CSN)
- Estere etilico dell'acido beta apo 8 carotenoico (BACARE)
- Luteina (LUT)
- Citranaxantina (CIXN)
- zeaxantina (ZEA)
- Beta carotene (BCAR)

CIRCUITO FAC 19/01

► **Preparazione del campione:**

Estrazione dei carotenoidi dal campione in presenza di enzima proteolitico con acetone per tre volte, centrifugazione finale ed iniezione nel sistema HPLC. Il metodo prevede anche l'utilizzo dell'estrattore ASE.

► **Sistema HPLC:**

Pompa a gradiente binario con Colonna Supelco Suplex pKB-100 5um 250x4.6mm e precolonna

Rivelatore UV-VIS lunghezza d'onda 410 nm

Forno per colonna a 20°C

CIRCUITO FAC 19/01

► Fase mobile:

Fase A miscela acetonitrile, metil terbutil etere, acqua 70:20:10

Fase B: miscela acetonitrile, metil terbutil etere 70:30

► Gradiente

0-10 min A 100%

10-14 min A 40% B 60%

14-28 min A 40% B 60%

28-29 min A 100%

29-45 min A 100%

CIRCUITO FAC 19/01

► **Standardizzazione** : Punto saliente nell'intero procedimento

Ogni carotenoide viene standardizzato singolarmente con la seguente procedura

Circa 1 mg di ciascun colorante viene disciolto in 5 ml di una miscela THF/BHT (soluzione che può essere conservata in congelatore). Dopo ulteriore diluizione ad un valore nominale di circa 2 mg/l si misura l'assorbanza dello std contro il solvente in cui si è effettuata la ultima diluizione, specifico per ciascun analita, alla lunghezza d'onda tabulata.

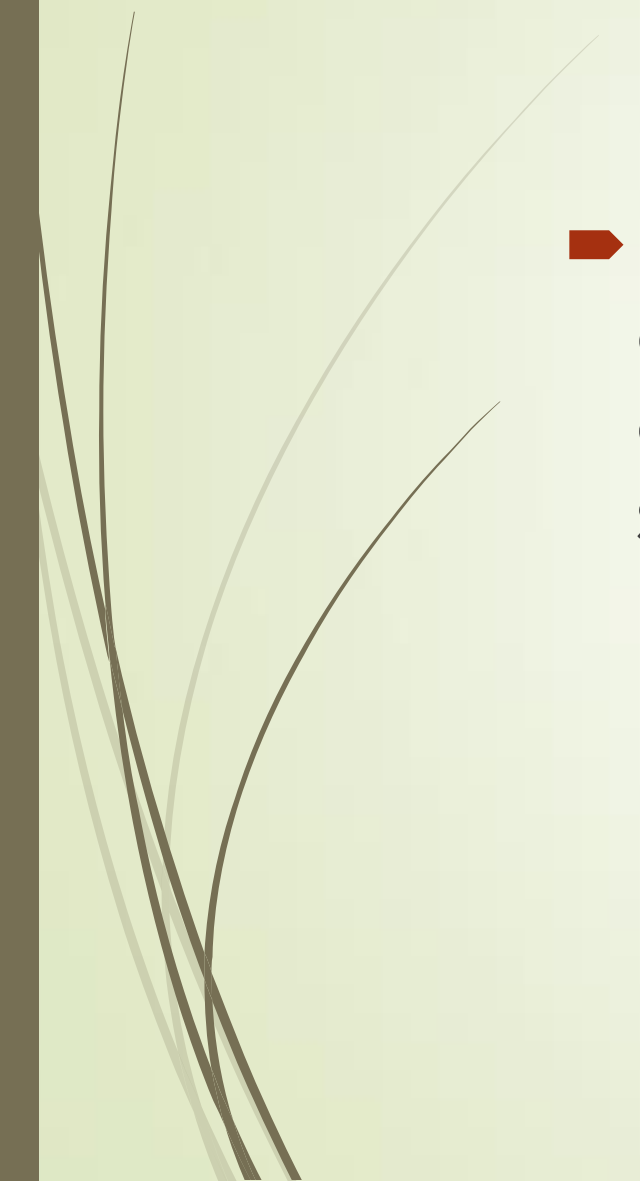
La stessa concentrazione di colorante, ottenuta per medesima diluizione in acetone, viene contemporaneamente iniettata nel sistema HPLC e ne viene rilevata l'area.

A quest'area si associa la concentrazione effettiva calcolata dal valore di estinzione secondo la seguente formula

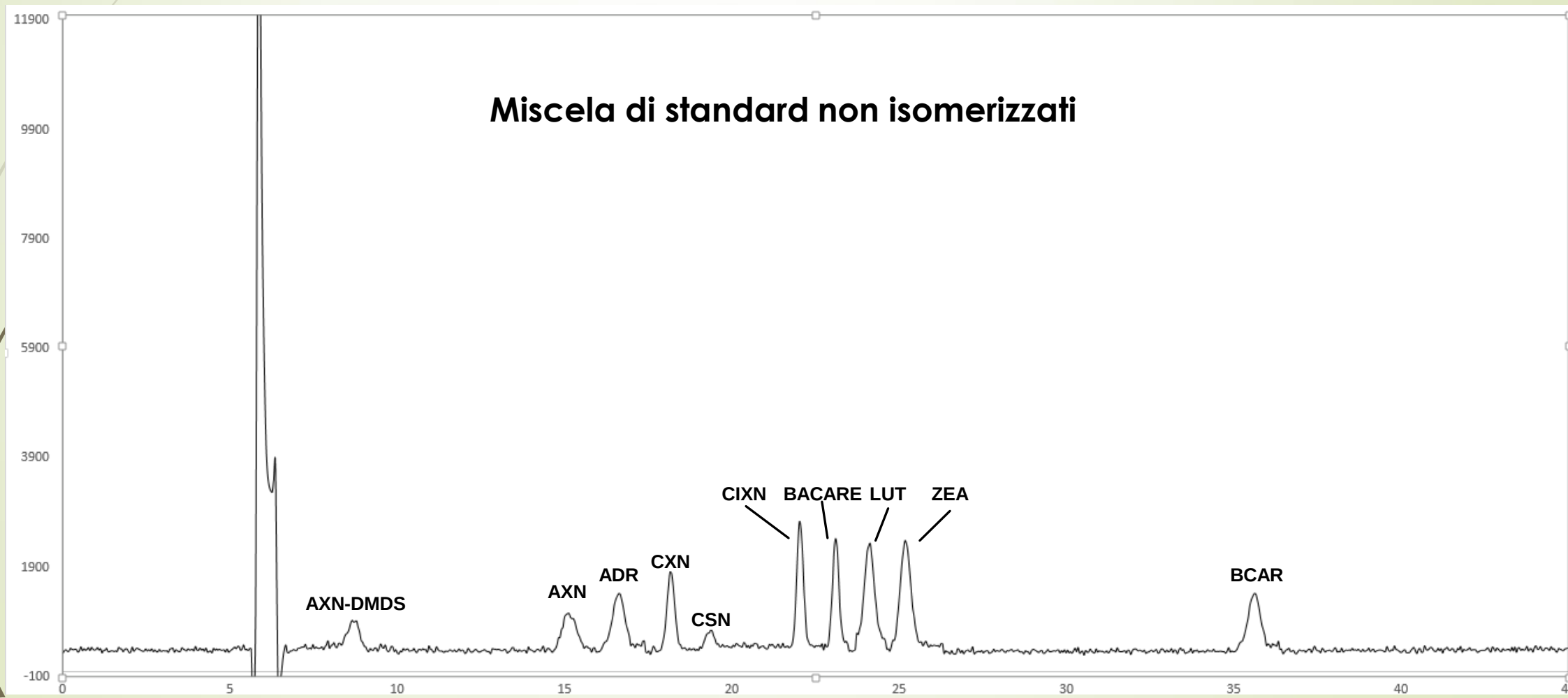
Carotenoide in mg/l = $E_{\text{tabulata}} \times 10000 / \text{estinzione}$



CIRCUITO FAC 19/01

- per ogni carotenoide la concentrazione viene determinata per confronto diretto tra l'area nel campione e lo standard quantificato come sopra.
- 

CIRCUITO FAC 19/01





CIRCUITO FAC 19/01

- Dalla trattazione statistica delle prove di validazione del 2018, l'esito del PT è risultato soddisfacente. Una terna di coloranti che vengono eluiti in maniera sequenziale in un breve lasso di tempo (AXN ADR e CXN) è stato ritenuto da JRC-EURL meritevole di ulteriore indagini.



- Organizzazione del circuito FAC 19/01 nella primavera del 2019



CIRCUITO FAC 19/01

- **Preparazione dei campioni da parte di JRC-EURL**
- I mangimi bianchi utilizzati erano disponibili da studi precedenti e sono stati addizionati con additivi contenenti i carotenoidi di interesse per ottenere i due campioni finali, che sono stati conservati a 4°C:

Test item 1: mangime completo per pesci;

Test item 2: mangime completo per polli.

CIRCUITO FAC 19/01

- **Valori assegnati e σ_{PT}**
- Il valore assegnato X_{PT} (al 12% di umidità) delle frazioni di massa dei 3 carotenoidi nei rispettivi mangimi sono stati calcolati dalla formulazione e corretti per la purezza della sostanza attiva nei rispettivi additivi.
- L'incertezza associata $u(X_{PT})(K=1)$ al valore assegnato è stata calcolata seguendo la legge della propagazione dell'incertezza tenendo conto dei contributi legati alla preparazione e formulazione (u_{char}), dell'omogeneità (u_{hom}) e della stabilità (u_{st}) in accordo con ISO 13528:2015.
- La deviazione standard del circuito σ_{PT} è stata calcolata come il 25% del valore assegnato; questa scelta è derivata dalla deviazione standard di riproducibilità determinata durante la precedente fase di validazione del 2018.

CIRCUITO FAC 19/01

Table 1: valore assegnato (x_{pt}) e deviazione standard assegnata per il PT (σ_{pt}). Tutti i valori sono espressi in mg/Kg

* $u(x_{pt})$ = incertezza del PT espressa con fattore di copertura pari a K.

AXN: *astaxantina*; CXN: *canthaxantina*; ADR: *adonirubina*

Campione	Misurando	Valore assegnato $x_{pt} \pm U(x_{pt})^*$ k = 1	σ_{pt}
1 Mangime completo per pesci	AXN	50,204 ± 0,494	12,551
	CXN	5,020 ± 0,174	1,255
	ADR	19,365 ± 0,382	4,841
2 Mangime completo per polli	CXN	10.106 ± 0,540	2.527



CIRCUITO FAC 19/01

- **Laboratori partecipanti**

- N. 34 laboratori invitati a partecipare
- N.18 laboratori partecipanti
- N. 16 laboratori che hanno inviato i risultati di cui
 - 12 NRLs
 - 4 OCLs



CIRCUITO FAC 19/01

- **Organizzazione:** invio dei campioni il 25/03/2019
 - 1 bottiglia di ciascun campione contenete circa 25 g
 - Istruzioni per i partecipanti
 - Trattamento dei dati e questionario
 - Invio risultati entro il 26/04/2019
 - Istruzioni per il report online
 - I risultati riferiti al 12% di umidità
 - frazioni di massa dei singoli analiti e della loro somma in mg/Kg
 - incertezza estesa indicando il fattore di copertura in mg/Kg
 - Tecnica utilizzata
 - Cromatogrammi dei due campioni

CIRCUITO FAC 19/01

► Scopo del PT

- 1) Assicurare la capacità dei laboratori partecipanti a determinare correttamente i contenuti di carotenoidi nei mangimi, esprimendo un risultato in un definito range di tempo e con un numero limitato di ripetizioni (con 25g massimo 2 prove in doppio).

- criteri utilizzati per la valutazione della performance

- **z score** $z = \frac{x_i - x_{pt}}{\sigma_{pt}}$

- **ζ score** $\zeta = \frac{x_i - x_{pt}}{\sqrt{u^2(x_i) + u^2(x_{pt})}}$

- Score ≤ 2 soddisfacente 2 < score ≤ 3 discutibile score > 3 insoddisfacente



CIRCUITO FAC 19/01



Scopo del PT

- 
- 2) Assicurare la capacità dei laboratori ad assegnare il giudizio di conformità o non conformità ai valori riscontrati in relazione ai massimi livelli autorizzati dalla normativa.



CIRCUITO FAC 19/01

- Risultati
- N. 16 laboratori partecipanti
 - Astaxantina n.16
 - Cantaxantina (pesce) n.15
 - Adonirubina n.14
 - Cantaxantina (pollo) n.15

CIRCUITO FAC 19/01

➤ Z score ≤ 2

➤ Astaxantina n.16	100% dei laboratori
➤ Cantaxantina (pesce) n.14	93% dei laboratori
➤ Adonirubina n.13	93% dei laboratori
➤ Cantaxantina (pollo) n.13	87% dei laboratori

➤ ζ score ≤ 2

➤ Astaxantina n.6	38% dei laboratori
➤ Cantaxantina (pesce) n.7	47% dei laboratori
➤ Adonirubina n.2	14% dei laboratori
➤ Cantaxantina (pollo) n.6	40% dei laboratori

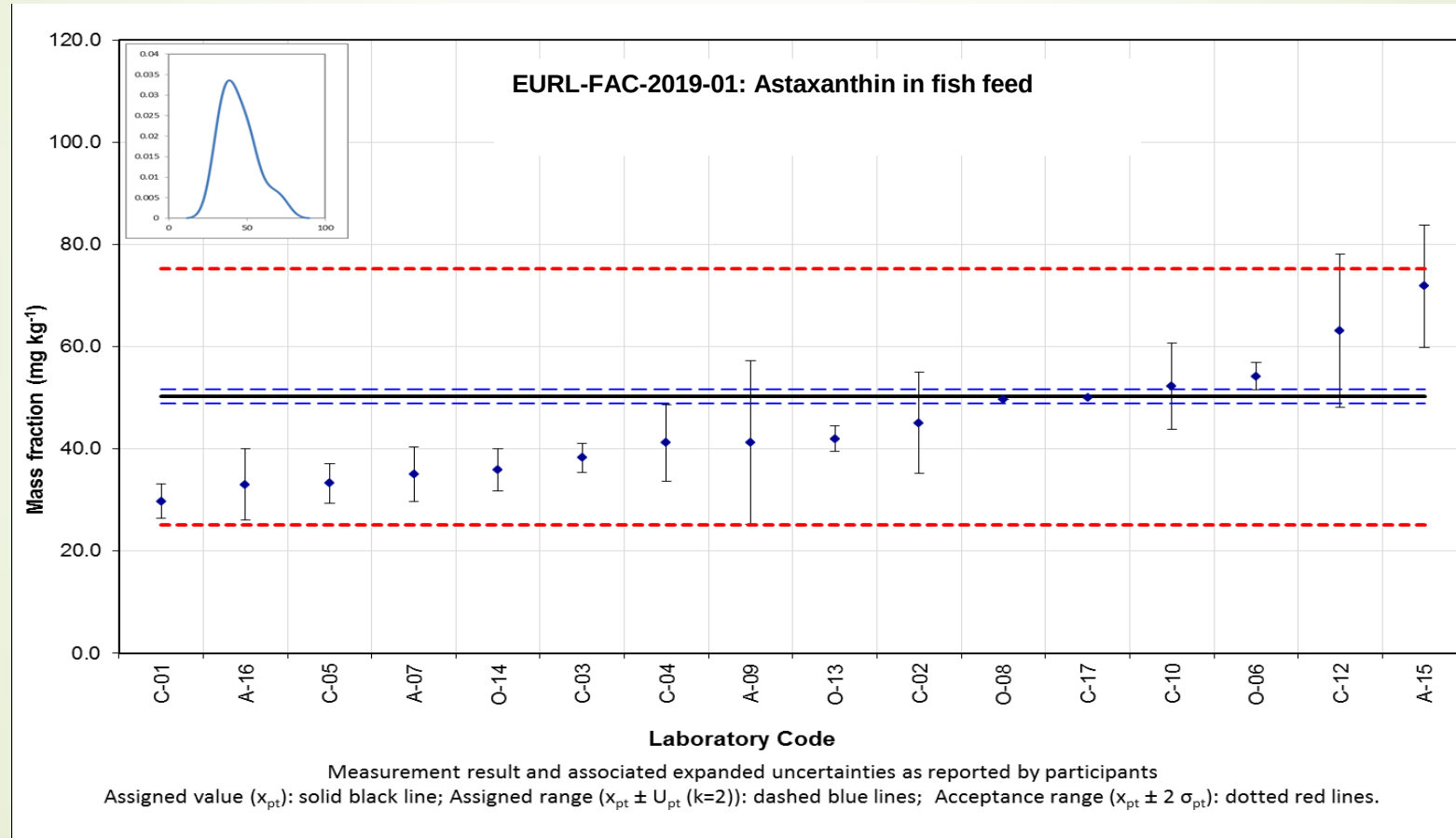
CIRCUITO FAC 19/01

AXN

Valore assegnato: $x_{pt} = 50.204 \pm 0.988 U(x_{pt})$, ($k = 2.0$); $\sigma_{pt} = 12.551$ (tutti i valori in mg kg^{-1})
(*),

Lab Code	x_i	$\pm$	k	Technique	$u(x_i)$	z score *	z score *
A-07	35.000	5.300	2	HPLC-UV	2.650	-1.2	-5.6
A-09	41.240	16.000	2	HPLC-UV	8.000	-0.7	-1.1
A-15	71.800	12.000	2	HPLC-DAD	6.000	1.7	3.6
A-16	33.000	7.000	2	HPLC-DAD	3.500	-1.4	-4.8
C-01	29.700	3.400	2	HPLC-UV	1.700	-1.6	-11.2
C-02	45.000	9.900	2	HPLC-DAD	4.950	-0.4	-1.0
C-03	38.207	2.880	2	HPLC-UV	1.440	-1.0	-7.5
C-04	41.170	7.500	2	HPLC-UV	3.750	-0.7	-2.4
C-05	33.249	3.866	2	HPLC-DAD	1.933	-1.4	-8.3
C-10	52.200	8.400	2	HPLC-UV	4.200	0.2	0.5
C-12	63.100	15.000	2	HPLC-DAD	7.500	1.0	1.7
C-17	50.000	-	-	HPLC-DAD	0.000	0.0	-0.3
O-06	54.200	2.650	2	photometry	1.325	0.3	2.7
O-08	49.720	-	-	HPLC-DAD	0.000	0.0	-0.7
O-13	41.950	2.440	2	HPLC-DAD	1.220	-0.7	-5.9
O-14	35.840	4.110	2	HPLC-UV	2.055	-1.1	-6.6

CIRCUITO FAC 19/01



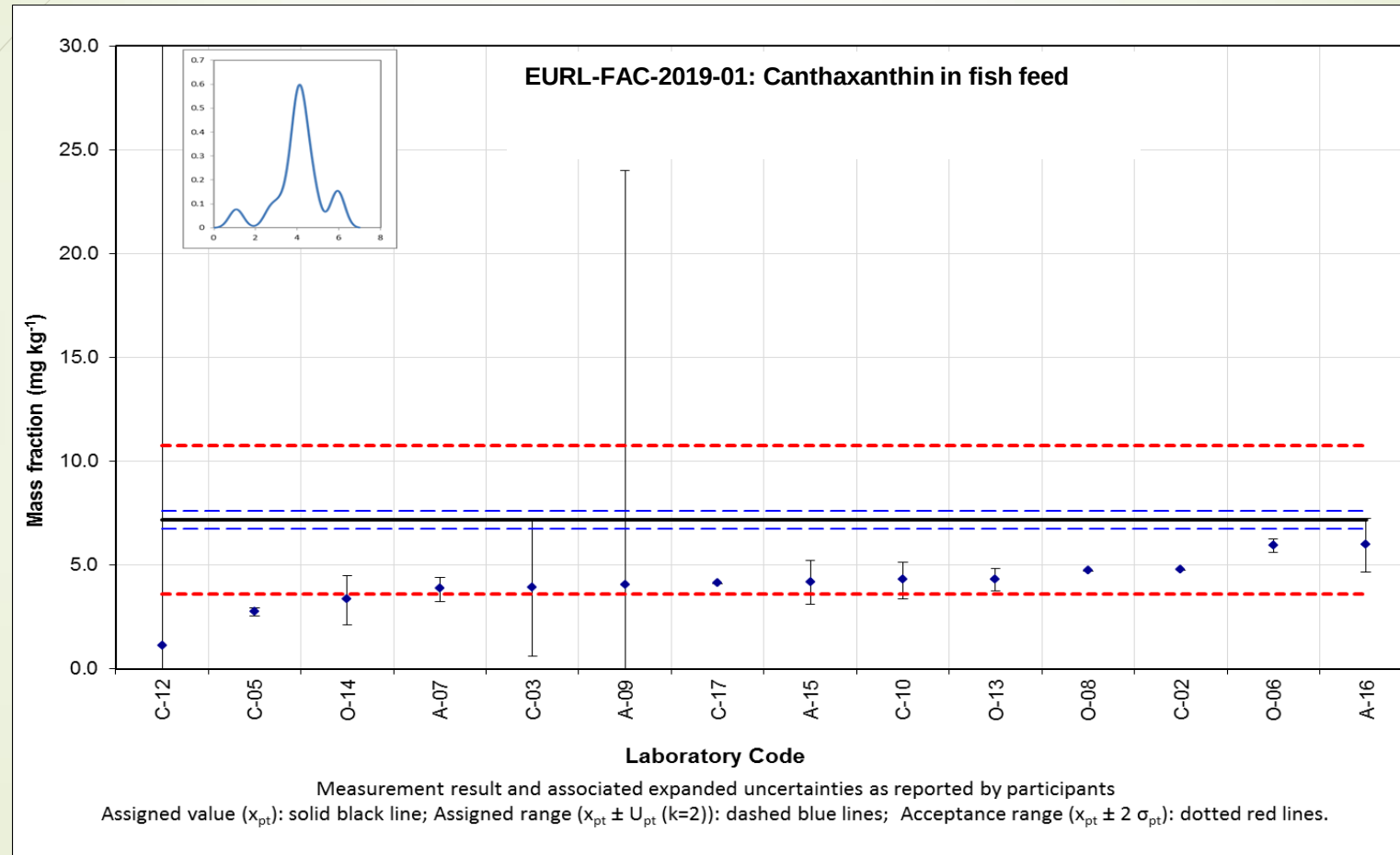
CIRCUITO FAC 19/01

CXN

Valore assegnato: $x_{pt} = 5.020 \pm 0.348 U(x_{pt})$, ($k = 2.0$); $\sigma_{pt} = 1.255$ (tutti i valori in in mg kg⁻¹)

Lab Code	x_i	$\pm$	k	Technique	$u(x_i)$	z score *	z score *
A-07	3.820	0.570	2	HPLC-UV	0.285	-1.0	-3.6
A-09	4.010	20.000	2	HPLC-UV	10.000	-0.8	-0.1
A-15	4.160	1.070	2	HPLC-DAD	0.535	-1.7	-5.2
A-16	5.950	1.300	2	HPLC-DAD	0.650	0.7	1.4
C-02	4.750	-	-	HPLC-DAD	0.000	-0.2	-1.6
C-03	3.901	3.280	2	HPLC-UV	1.640	-0.9	-0.7
C-04	4.075	1.100	2	HPLC-UV	0.550	-0.8	-1.6
C-05	2.734	0.179	2	HPLC-DAD	0.090	-1.8	-11.7
C-10	4.250	0.900	2	HPLC-UV	0.450	-0.6	-1.6
C-12	1.070	30.000	2	HPLC-DAD	15.000	-3.1	-0.3
C-17	4.100	-	-	HPLC-DAD	0.000	-0.7	-5.3
O-06	5.920	0.310	2	photometry	0.155	0.7	3.9
O-08	4.700	-	-	HPLC-DAD	0.000	-0.3	-1.8
O-13	4.290	0.530	2	HPLC-DAD	0.265	-1.6	-2.3
O-14	3.300	1.180	2	HPLC-UV	0.590	-1.4	-2.8

CIRCUITO FAC 19/01



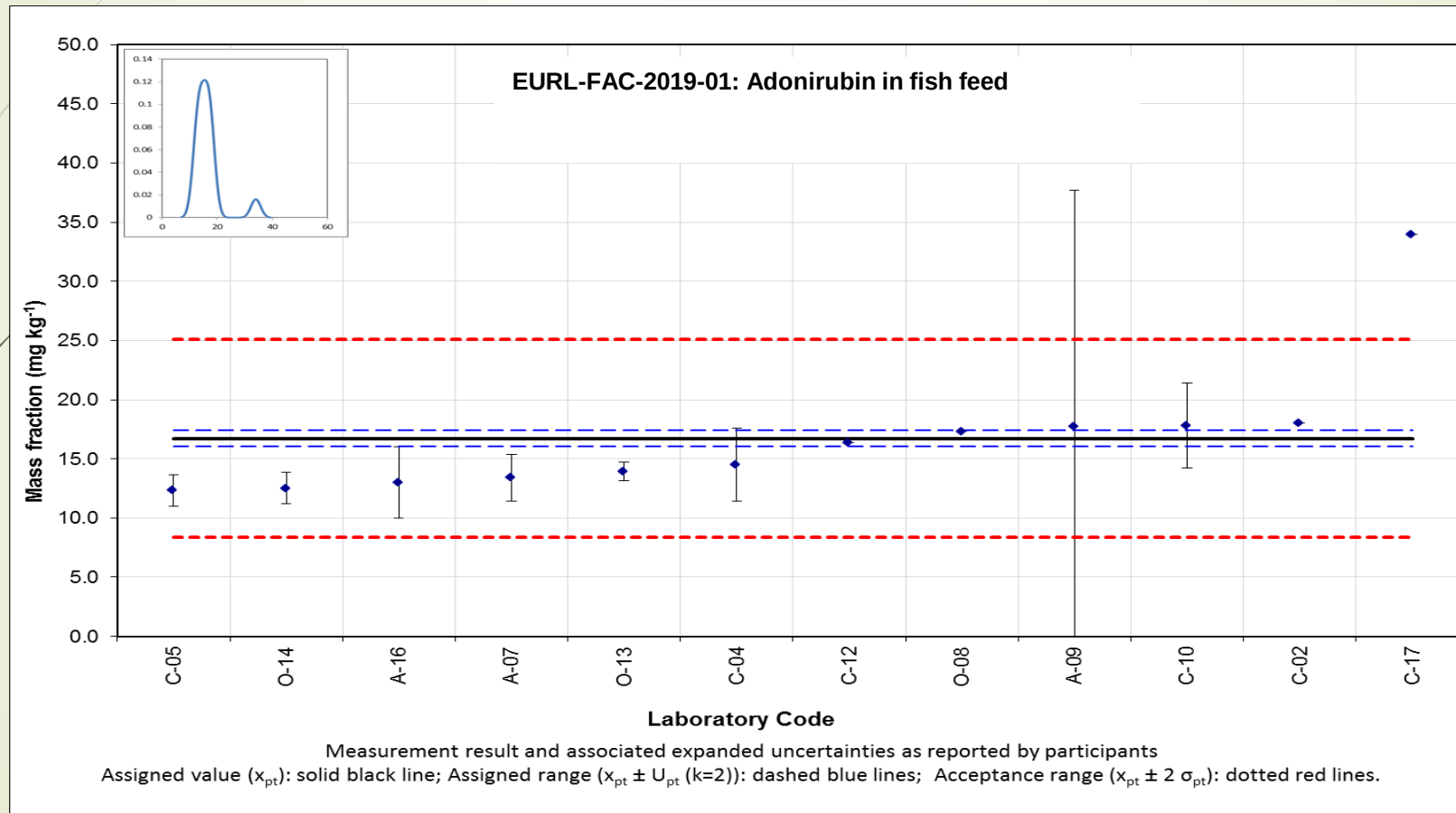
CIRCUITO FAC 19/01

ADR

Valore assegnato: $x_{pt} = 19,365 \pm 0.327 \, u(x_{pt})$, ($k=1$); $\sigma_{pt} = 4.841$ (tutti i valori in mg kg^{-1})

Lab Code	x_i	$\pm$	k	Technique	$u(x_i)$	z score *	z score *
A-07	13.400	2.000	2	HPLC-UV	1.000	-1,2	-5,6
A-09	17.710	20.000	2	HPLC-UV	10.000	-0,3	-0,2
A-16	13.000	3.000	2	HPLC-DAD	1.500	-1,3	-4,1
C-02	18.000	-	-	HPLC-DAD	0.000	-0,3	-3,6
C-03	16.022	1.350	2	HPLC-UV	0.675	-0,7	-4,3
C-04	14.510	3.100	2	HPLC-UV	1.550	-1,0	-3,0
C-05	12.342	1.325	2	HPLC-DAD	0.663	-1,5	-9,2
C-10	17.800	3.600	2	HPLC-UV	1.800	-0,3	-0,9
C-12	16.350	-	2	HPLC-DAD	0.000	-0,6	-7,9
C-17	34.000	-	-	HPLC-DAD	0.000	3,0	38,3
O-06	15.450	3.720	2	photometry	1.860	-0,8	-2,1
O-08	17.300	-	-	HPLC-DAD	0.000	-0,4	-5,4
O-13	13.950	0.810	2	HPLC-DAD	0.405	-1,1	-9,7
O-14	12.525	1.320	2	HPLC-UV	0.660	-1,4	-9,0

CIRCUITO FAC 19/01



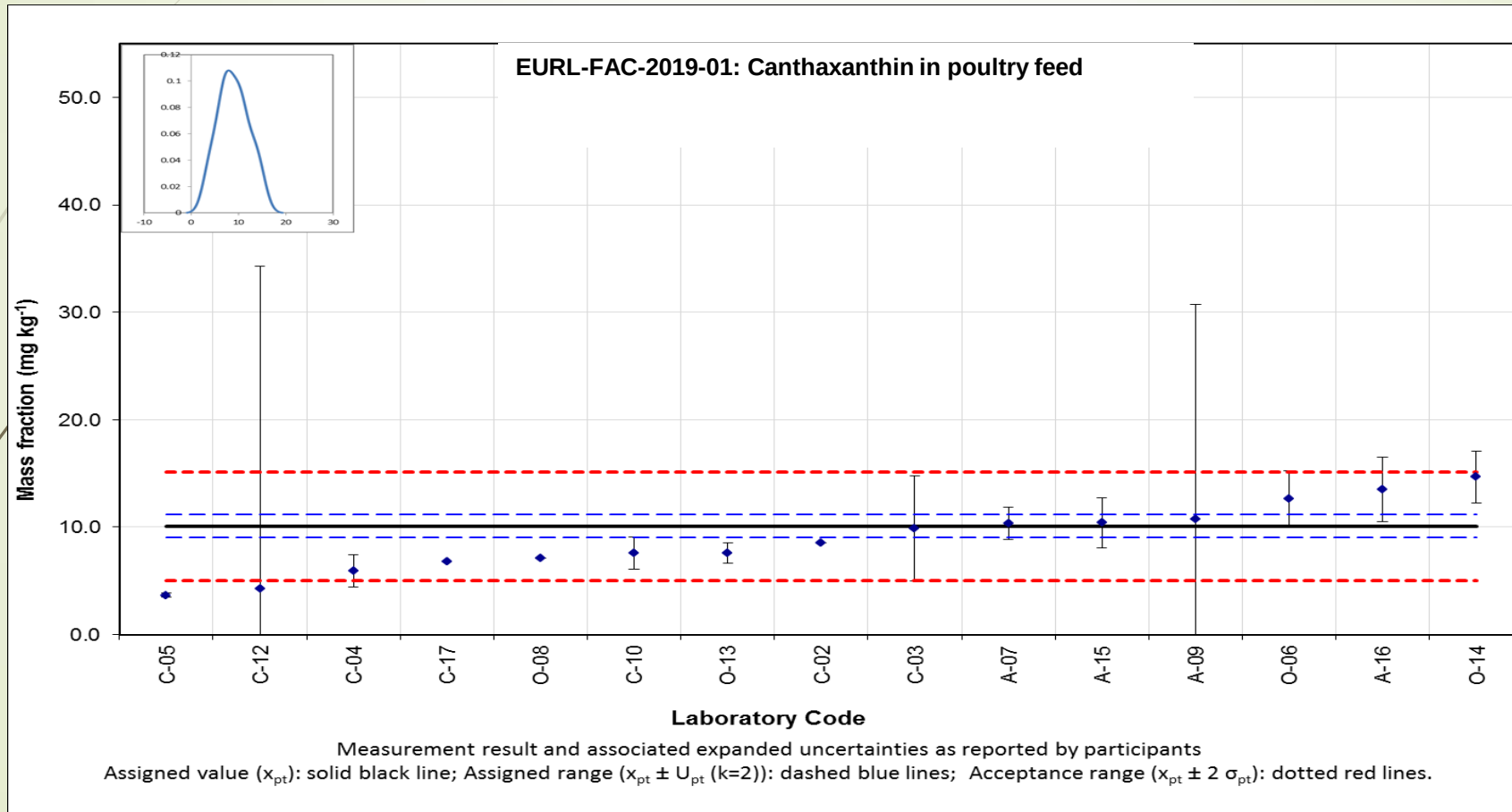
CIRCUITO FAC 19/01

Risultati in mangime completo per polli CXN

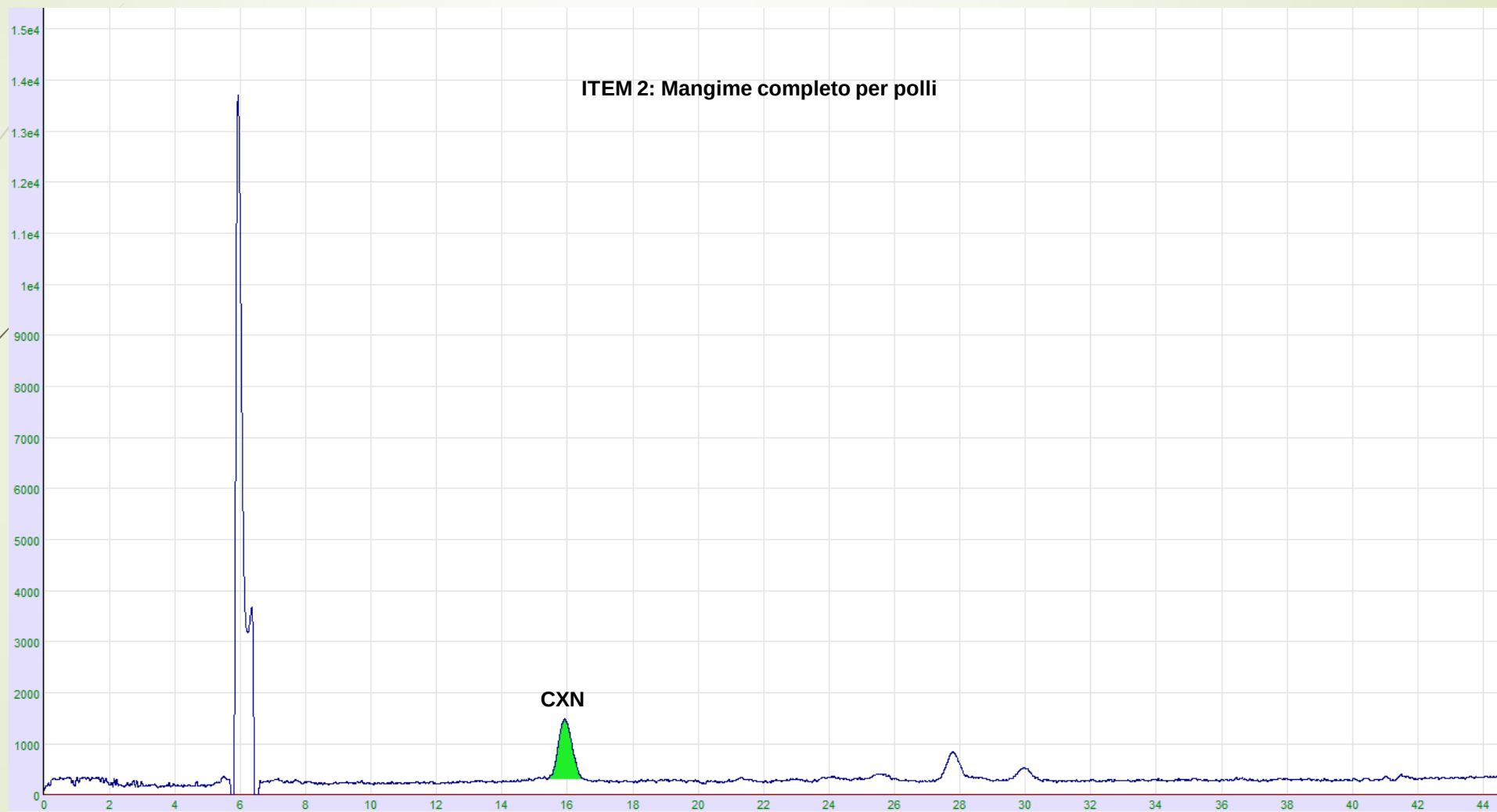
Valore assegnato: $x_{pt} = 10.106 \pm 1,08 \, u(x_{pt})$, ($k = 1$); $\sigma_{pt} = 2.527$ (tutti i valori in mg kg^{-1})

Lab Code	x_i	$\pm$	k	Technique	$u(x_i)$	z score *	z score *
A-07	10.385	1.500	2	HPLC-UV	0.750	0.1	0.3
A-09	10.715	20.000	2	HPLC-UV	10.000	0.2	0.1
A-15	10.400	2.300	2	HPLC-DAD	1.150	0.1	0.2
A-16	13.500	3.000	2	HPLC-DAD	1.500	1.3	2.1
C-02	8.500	-	-	HPLC-DAD	0.000	-0.6	-3.0
C-03	9.885	4.890	2	HPLC-UV	2.445	-0.1	-0.1
C-04	5.945	1.500	2	HPLC-UV	0.750	-1.6	-4.5
C-05	3.664	0.183	2	HPLC-DAD	0.092	-2.5	-11.8
C-10	7.550	1.500	2	HPLC-UV	0.750	-1.0	-2.8
C-12	4.290	30.000	2	HPLC-DAD	15.000	-2.3	-0.4
C-17	6.800	-	-	HPLC-DAD	0.000	-1.3	-6.1
O-06	12.650	2.590	2	photometry	1.295	1.0	1.8
O-08	7.150	-	-	HPLC-DAD	0.000	-1.2	-5.5
O-13	7.590	0.940	2	HPLC-DAD	0.470	-1.0	-3.5
O-14	14.690	2.410	2	HPLC-UV	1.205	1.8	3.5

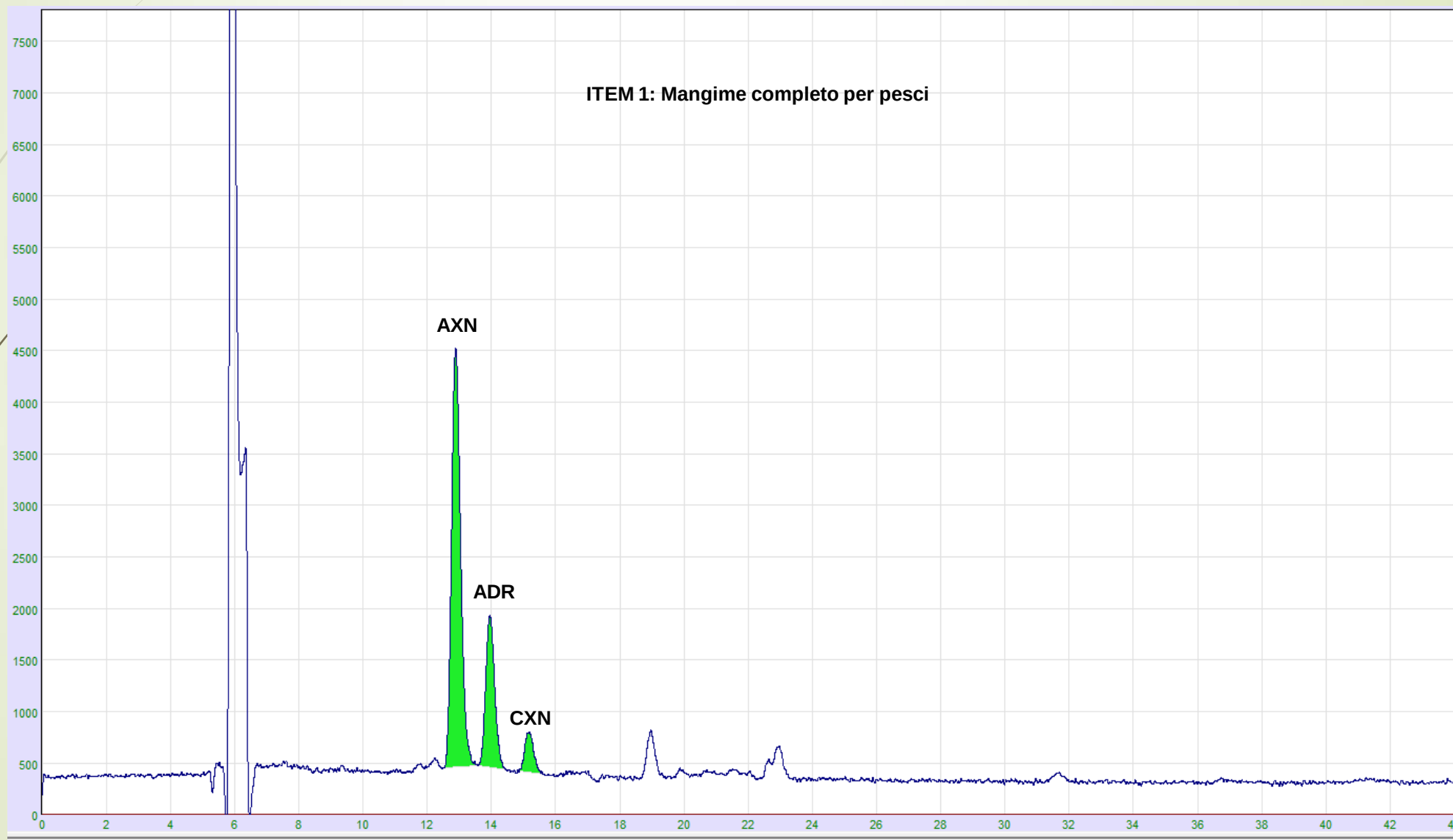
CIRCUITO FAC 19/01



CIRCUITO FAC 19/01



CIRCUITO FAC 19/01



CIRCUITO FAC 19/01

- Solamente sette dei 18 laboratori partecipanti hanno espresso il giudizio di conformità/ non conformità e valutato correttamente la conformità/non conformità dei campioni rispetto ai livelli massimi consentiti ML per ciascun carotenoide e per la somma dei carotenoidi.

		X PT (mg/Kg)	U PT (mg/Kg)	X (mg/Kg)	U (mg/Kg)	Maximum limits (mg/Kg)	Compliance (Y/N)
CAMPIONE 1	AXN	50.204	0.988	35,84	4.11	100	Y
	CXN	7.172	0.264	3.30	1.18	80	Y
	ADR	16.735	0.399	12.52	1.32	---	
	SUM			51.66		100	Y
CAMPIONE 2	CXN	10.106	0.770	14.69	2.41	25	Y



CIRCUITO FAC 19/01



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

