

# **AGGIORNAMENTI DA EURL-FA**

**CINZIA CIVITAREALE & MAURIZIO FIORI**

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE



LABORATORIO NAZIONALE DI RIFERIMENTO PER GLI ADDITIVI NEI MANGIMI

VIII WORKSHOP

LABORATORI NAZIONALI DI RIFERIMENTO PER METALLI PESANTI NEGLI  
ALIMENTI E NEI MANGIMI E ADDITIVI NEI MANGIMI

Torino, 13-14 dicembre 2018

# Attività dell'LNR 2018

- ✓ Valutazione dossier
- ✓ Approvvigionamento di materiali di riferimento (non in commercio: bis-diclazuril, semduramicina sodica)
- ✓ Supporto agli IIZZSS
- ✓ Supporto al Ministero della Salute
- ✓ Partecipazione Workshop e Corsi EURL
- ✓ Organizzazione Workshop LNR

# Workshops 2018



European Commission

Agenda

## 18<sup>th</sup> Workshop of the European Union Reference Laboratory for Feed Additive Authorisation

Congress Center A. Borschette (CCAB)  
Rue Froissart 36  
Brussels

17-18 October 2018

The European Commission's science and knowledge service  
Joint Research Centre



Joint Research Centre



European Commission

Agenda

## 7<sup>th</sup> EURL-FA Control Workshop

Congress Centre A. Borschette (CCAB)  
Rue Froissart 36  
Brussels

18-19 October 2018

The European Commission's science and knowledge service  
Joint Research Centre



Joint Research Centre



13-14 dicembre 2018

# EURL-FA Control

✓ Metodi CEN

✓ PTs & Corsi



Torino, 13-14 dicembre 2018

# Aggiornamento sui metodi CEN

Metodi	Stato
Determination of organic acid by Ion exclusion chromatography with conductivity detection (ICCD)	Current CEN Enquiry
Determination of benzoic and sorbic acid by high pressure liquid chromatography (HPLC-UV)	Current CEN Enquiry
Determination of authorized coccidiostats by LC-UV	Current CEN Enquiry
Determination of carotenoids with LC-UV	Implementation results of collaborative trial in draft for ENQ
Simultaneous determination of vitamins with LC-UV	Implementation results of collaborative trial in draft for ENQ

# Aggiornamento sui metodi CEN

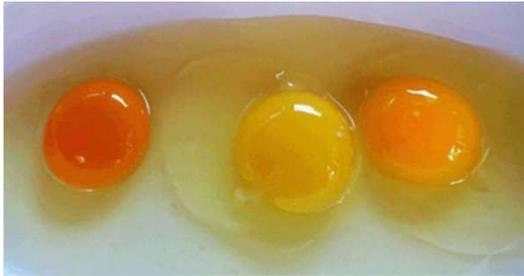
CEN TC\327 WG 3 (Feed additives and drugs)

- EN standard per la determinazione di **coccidiostatici** autorizzati (livello di carry over e autorizzazione) e **vietati** in mangimi

Completato l'iter di validazione mediante collaborative trial → invio al CEN → scadenza prevista per la pubblicazione (?)

# Aggiornamento sui metodi CEN

- Standardizzazione del metodo multi-analita per la determinazione di **carotenoidi** nei mangimi
- Il metodo è in grado di determinare 10 analiti a livello di autorizzazione
- Inviato al CEN per la valutazione
- Scadenza prevista per la pubblicazione: dicembre 2020 (?)



# Carotenoidi



## Determinazione di carotenoidi in premiscele e mangimi composti

Apart from the nutritional importance in human and animal health as metabolic precursors of vitamin A and antioxidants, carotenoids are used for the direct colouring of foodstuffs as well as for pigmentation of animal products via their addition to complete feedingstuffs. These feed additives are classified in the category "sensory additives" and functional group "colourants": substances which, when fed to animals, add colours to food of animal origin". For instance, astaxanthin and canthaxanthin are added to salmon and trout feed for flesh colouration, whereas lutein is widely used in poultry farming for egg yolk coloration. In addition, authorisation of these substances includes values for the maximum content in complete feedingstuffs as specified in respective Commission Regulations. Legal limits of carotenoids when utilised as feed additives are expressed in terms of the sum of the Z-and all-E-forms, consequently analytical methods that are fit for the intended purpose need to address the presence of the various E/Z isomers of the target carotenoid.

# Carotenoidi

## Metodi analitici - disponibilità

Tratto da



EUROPEAN COMMISSION  
JOINT RESEARCH CENTRE  
Institute for Reference Materials and Measurements  
European Union Reference Laboratory for Feed Additives



**EURL Evaluation Report on the Analytical Methods  
submitted in connection with the Application for the  
Authorisation of Feed Additives according to  
Regulation (EC) No 1831/2003**

Dossier related to: **FAD-2010-0372  
CRL/100140**  
Feed Additive: **Lutein (E161b)**  
Active Substance(s): **Lutein**

### ***Recommended text for the register entry (analytical method)***

For the determination of *lutein (all-trans-lutein isomer only)*, *zeaxanthin* and *total carotenoids & xanthophylls* in the *feed additive*:

- High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with spectrophotometry - Commission Directive 2008/128/EC referring to FAO JECFA monograph '*lutein from tagetes erecta*' monograph No. 3 (2006), Combined Compendium for Food Additive Specifications

For the determination of *total carotenoids & xanthophylls* in *premixtures* and *feedingstuffs*:

- Liquid chromatography with visible detection (LC-Vis) - AOAC official method 970.64

For the determination of *lutein (all-trans-lutein isomer only)* in *premixtures* and *feedingstuffs*:

- High Performance Liquid Chromatography with visible detection (HPLC-Vis)

# Carotenoidi

## EURL-FA

- Sviluppato, validato metodo RP-HPLC-Vis in mangimi per pesci, polli e premiscele (10 analiti)

## Development and validation of a multi-analyte method for the regulatory control of carotenoids used as feed additives in fish and poultry feed

Ursula Vincent, Federica Serano and Christoph von Holst

European Commission, Joint Research Centre, Directorate F - Health, Consumers & Reference Materials, Geel, Belgium

### ABSTRACT

Carotenoids are used in animal nutrition mainly as sensory additives that favourably affect the colour of fish, birds and food of animal origin. Various analytical methods exist for their quantification in compound feed, reflecting the different physico-chemical characteristics of the carotenoid and the corresponding feed additives. They may be natural products or specific formulations containing the target carotenoids produced by chemical synthesis. In this study a multi-analyte method was developed that can be applied to the determination of all 10 carotenoids currently authorised within the European Union for compound feedingstuffs. The method functions regardless of whether the carotenoids have been added to the compound feed via natural products or specific formulations. It is comprised of three steps: (1) digestion of the feed sample with an enzyme; (2) pressurised liquid extraction; and (3) quantification of the analytes by reversed-phase HPLC coupled to a photodiode array detector in the visible range. The method was single-laboratory validated for poultry and fish feed covering a mass fraction range of the target analyte from 2.5 to 300 mg kg<sup>-1</sup>. The following method performance characteristics were obtained: the recovery rate varied from 82% to 129% and precision expressed as the relative standard deviation of intermediate precision varied from 1.6% to 15%. Based on the acceptable performance obtained in the validation study, the multi-analyte method is considered fit for the intended purpose.

# Carotenoidi

Molecole: astaxantina (AXN), cantaxantina (CXN), adonirubina (ADR), astaxantina dimetilsuccinato (AXN DMDS), capsantina (CSN), etil estere di b-apo-8'-acido carotenoico (BACARE), luteina (LUT), citranaxantina (CIXN), zeaxantina (ZYN), beta-carotene (BCAR)

Principio del metodo:

- digestione enzimatica (alcalasi/proteasi PROTEX) (l'additivo è incapsulato)
- estrazione accelerata con solvente (ASE) o estrazione convenzionale solido/liquido,
- RP-HPLC-Vis  $\lambda$  410 nm

# Carotenoidi

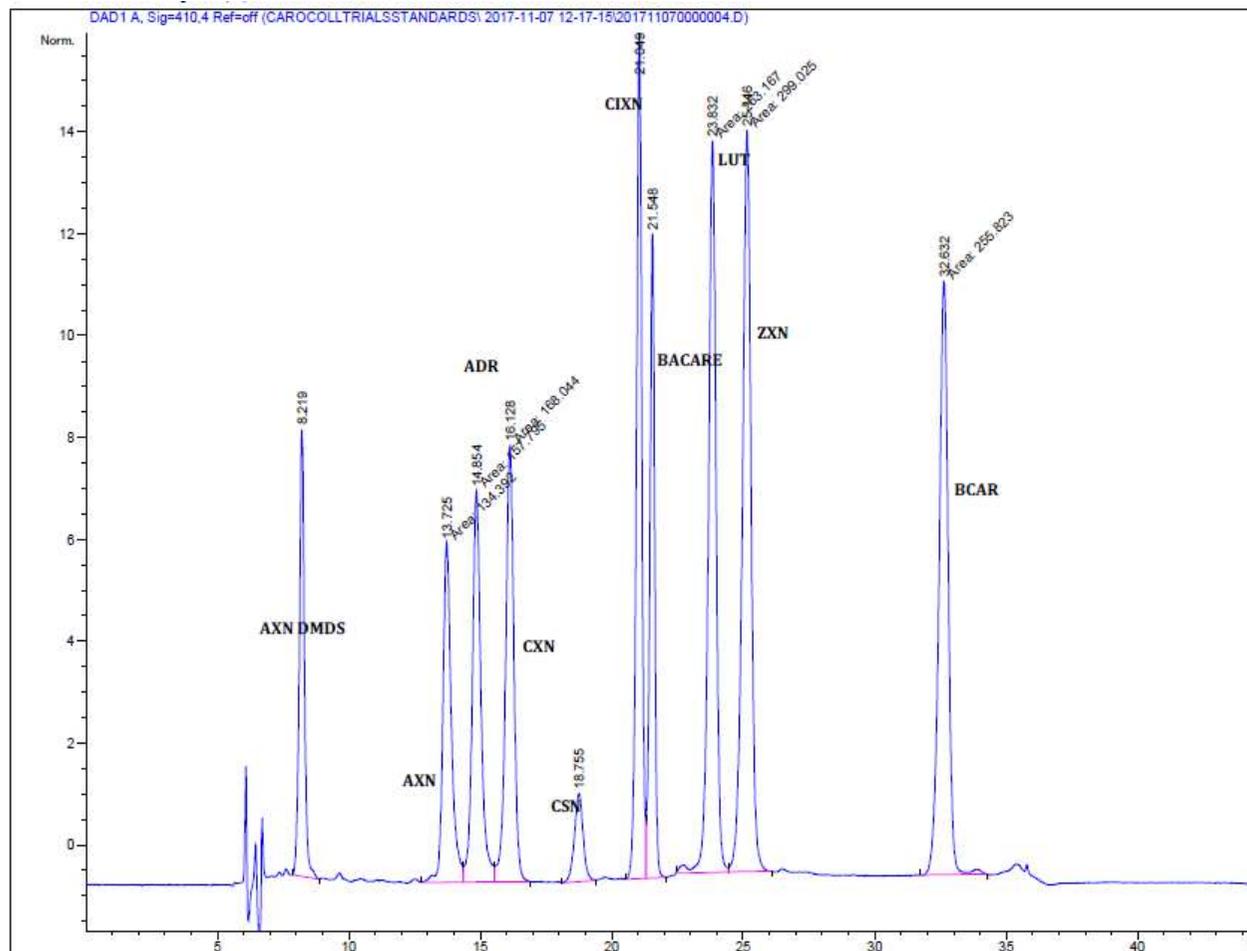
- Problema isomeri - i carotenoidi si ritrovano in forme isomeriche difficoltà nella quantificazione

Carotenoids' analysis is a challenge due to the nature of the analytes and specifically to the process of their production as well as to the presence of the cis- and trans- forms while the trans- form is the one mainly used in the standards used for quantification.

- Soluzione:  $\lambda$  410 nm - punto isosbestico

Specifica  $\lambda$  a cui il coefficiente di assorbimento è identico per tutti gli isomeri geometrici

The chromatogram of the injection of one vial containing the 10 carotenoids  
NOT isomerised



# Carotenoidi

- Organizzato collaborative trial (2015)

Risultati non accettabili

# Carotenoidi

Tratto dal Report del collaborative trial

On the whole and more in detail, the proficiency of laboratories was not satisfactory; only 7 laboratories participated in the study and between 0% and 43 % of the laboratories reported satisfactory results, expressed as z-scores, depending on the target carotenoid and its concentration in one or the other feed material. The variability of the results obtained for a target carotenoid in two similar materials was high.

The laboratories also reported qualitative results as regards the presence of one or more of other authorised carotenoids. The rate of false positive results was 20% for astaxanthin dimethyl succinate and beta-carotene, 40% for lutein and 50% for adonirubin. It has to be

**DG SANTE → richiesta di organizzare di un training per i LNRs (2 materiali: 1 mangime per pesci, 1 mangime per polli)**

# Corsi & PTs

- ✓ 1° corso pratico per la determinazione dei carotenoidi nei mangimi (LNR/ISS – ICQRF Parma)
- ✓ 1° PT per la determinazione del selenio totale - livello di autorizzazione nel mangime per conigli

# Revisione del Regolamento (EC) 152/2009

- Metodi obsoleti
- Diclazuril
- Coccidiostatici
- Urea
- ....

Tutti i punti che sono stati identificati per un possibile cambiamento sono ancora in fase di discussione!

# Revisione del Regolamento (EC) 152/2009

## ALLEGATO II

### DISPOSIZIONI GENERALI RELATIVE AI METODI DI ANALISI DEGLI ALIMENTI PER ANIMALI

- ✓ Preparazione del campione
- ✓ Espressione del risultato

# Revisione del Regolamento (EC) 152/2009

## Preparazione del campione

- ✓ Oltre la macinazione a secco prevedere anche il metodo dello slurry
- ✓ Indicare che, oltre al campione di controllo e al campione della difesa, venga sempre preso un campione di riferimento
- ✓ ...

# Revisione del Regolamento (EC) 152/2009

## Espressione dei risultati

- ✓ Non è necessario riportare la percentuale di recupero

# Revisione del Regolamento (EC) 152/2009

## ALLEGATO III

METODI DI ANALISI PER IL  
CONTROLLO DELLA COMPOSIZIONE  
DELLE MATERIE PRIME PER ALIMENTI  
PER ANIMALI E DEGLI ALIMENTI  
COMPOSTI

# Revisione del Regolamento (EC) 152/2009

- ✓ Contenuto di umidità ALLEGATO III
- ✓ Contenuto di proteine gregge
- ✓ **Determinazione dell'urea\***
- ✓ Determinazione della cellulosa grezza
- ✓ Determinazione degli zuccheri
- ✓ Determinazione del lattosio
- ✓ Determinazione dell'amido
- ✓ Determinazione dei carbonati
- ✓ Determinazione del fosforo totale

# Revisione del Regolamento (EC) 152/2009

✓ Determinazione dell'urea

ALLEGATO III

Il Reg 152 limita lo scopo del metodo alla determinazione dell'urea nel mangime per ruminanti (specie in cui è autorizzata come additivo)

*Sostituzione del metodo spettro-colorimetrico con il metodo enzimatico (AOAC) o LC-MS/MS applicabile a tutte le tipologie di mangime - nota EURL-FA*

# Revisione del Regolamento (EC) 152/2009

## ALLEGATO IV

METODI DI ANALISI PER IL CONTROLLO  
DEL CONTENUTO DI ADDITIVI  
AUTORIZZATI NEGLI ALIMENTI PER  
ANIMALI

- ✓ Determinazione delle vitamine **A** (problemi determinazione nelle premiscele/allineamento e coerenza terminologia) ed **E** (allineamento e coerenza terminologia)

# Revisione del Regolamento (EC) 152/2009

- ✓ Determinazione degli oligoelementi  
ferro, rame, manganese e zinco

ALLEGATO IV



## Annex IV: Authorised additives in feed

### Determination of the trace elements iron, copper, manganese and zinc

Refer to :

- **EN 15510:2017** Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum and lead by ICP-AES and
  - **EN 15621:2017** Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of calcium, sodium, phosphorus, magnesium, potassium, sulphur, iron, zinc, copper, manganese and cobalt after pressure digestion by ICP-AES, and
  - **EN 17053:2018** Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of trace elements, heavy metals and other elements in feed by ICP-MS (multi-method) , and
- to be used for official control instead of / in addition to the flame AAS method**
- Deletion of the flame AAS method (?)

*metodi obsoleti, ma in uso (AAS); discussione se prevedere l'uso di entrambi (EN e 152)*

# Revisione del Regolamento (EC) 152/2009

## ALLEGATO IV

- ✓ Determinazione di diclazuril  
*deve essere sostituito con il metodo EURL-FA (JRC technical reports - re-validation of a method for the determination of diclazuril in poultry feed by collaborative study - EUR 27954)*
- ✓ *Necessità di un metodo per la determinazione contemporanea di narasin/nicarbazina ?*

# Revisione del Regolamento (EC) 152/2009

- ✓ Commento generale riguardo i metodi di analisi per i coccidiostatici:

*Consentire per il controllo ufficiale l'uso del multimetodo prEN 17299 Animal feedingstuffs: Methods of sampling and analysis - Screening and determination of authorized coccidiostats at additive and 1% and 3% cross-contamination level, and of non-registered coccidiostats and of one antibiotic at sub-additive levels, in compound feed with High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry detection (LC-MS/MS) (prossimo alla finalizzazione).*

# Revisione del Regolamento (EC) 152/2009

## ALLEGATO V

### SOSTANZE INDESIDERABILI

✓ determinazione del gossipolo libero e totale

*eliminare ci sono metodi in via di standardizzazione*

✓ per l'analisi di altre sostanze indesiderabili (metalli, micotossine, tossine vegetali)

*definizione di criteri di prestazione analitica*

# Revisione del Regolamento (EC) 152/2009

## ALLEGATO VIII

METODI DI ANALISI PER IL CONTROLLO  
DELLA PRESENZA ILLEGALE DI ADDITIVI  
PER MANGIMI NON PIÙ AUTORIZZATI

*Allegato da eliminare (si dispone di metodi  
più appropriati per la determinazione di tali  
additivi a bassi livelli)*

# Regolamento (EU) 2017/1145

29.6.2017

EN

Official Journal of the European Union

L 166/1

---

II

*(Non-legislative acts)*

## REGULATIONS

COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2017/1145

of 8 June 2017

on the withdrawal from the market of certain feed additives authorised pursuant to Council Directives 70/524/EEC and 82/471/EEC and repealing the obsolete provisions authorising those feed additives

Torino, 13-14 dicembre 2018

# Regolamento (EU) 2017/1145

## ANNEX II

### Feed additives referred to in Article 1(2)

#### Coccidiostats and other medicinal substances

E 764	Halofuginone hydrobromide 6g/kg (Stenorol)	Chickens reared for laying
E 766	Salinomycin sodium 120 g/kg (Sacox 120) (holder of the authorisation Huvepharma NV)	Rabbits for fattening
E 766	Salinomycin sodium 120 g/kg (Salinomax 120G) (holder of the authorisation Zoetis Belgium SA)	Chickens for fattening

# Regolamento (UE) 2018/353

12.3.2018

IT

Gazzetta ufficiale dell'Unione europea

L 68/3

## REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2018/353 DELLA COMMISSIONE

del 9 marzo 2018

che rettifica il regolamento di esecuzione (UE) 2017/1145, dell'8 giugno 2017, relativo al ritiro dal mercato di alcuni additivi per mangimi autorizzati a norma delle direttive del Consiglio 70/524/CEE e 82/471/CEE e che abroga le disposizioni obsolete che autorizzano tali additivi per mangimi

- (7) Le disposizioni erranee sono state motivo di confusione per gli operatori del settore dei mangimi per quanto concerne l'effettivo status normativo degli additivi in questione. Questa situazione ha creato incertezza giuridica in merito al quadro normativo applicabile. Detti errori hanno quindi determinato perturbazioni del mercato dovute a dubbi riguardo all'autorizzazione di immissione sul mercato e di impiego di alcuni additivi. Le rettifiche del regolamento di esecuzione (UE) 2017/1145 dovrebbero perciò applicarsi con effetto retroattivo dalla data di entrata in vigore di tale regolamento di esecuzione, al fine di ristabilire la certezza giuridica sullo status normativo degli additivi oggetto di errori, evitare conseguenze pregiudizievoli per gli operatori interessati e riportare stabilità sul mercato.

Torino, 13-14 dicembre 2018

# EURL-FA - Programma 2019

- ✓ PT per la determinazione di 1 fino a 3 coccidiostatici, a livello di autorizzazione e/o livello di cross-contaminazione
- ✓ PT per la determinazione di 1 fino a 3 carotenoidi a livello di additivazione
- ✓ Sviluppo del metodo analitico determinazione p-fenetidina - impurità mutagena dell'etossichina additivo antiossidante revocato organizzazione di un interlaboratory study

REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2017/962 DELLA COMMISSIONE  
del 7 giugno 2017  
che sospende l'autorizzazione dell'etossichina come additivo per mangimi destinati a tutte le  
specie e categorie di animali

A blue line-art graphic of a globe. At the top of the globe is a stylized human figure with arms outstretched. On the left side of the globe is an apple. On the right side of the globe is a profile of a human head. The globe is formed by a circle with a gap at the top and bottom, and a curved line at the bottom.

**GRAZIE PER L'ATTENZIONE**

Torino, 13-14 dicembre 2018