

AGGIORNAMENTI DALL'EURL- FA

CINZIA CIVITAREALE & MAURIZIO FIORI

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ



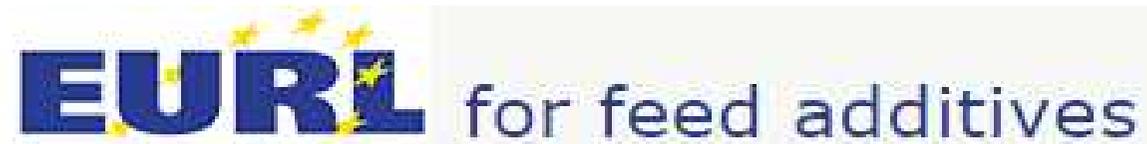
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E SICUREZZA ALIMENTARE
LABORATORIO NAZIONALE DI RIFERIMENTO PER GLI ADDITIVI NEI MANGIMI

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

VI WORKSHOP

TORINO, 1-2 DICEMBRE 2016

LE DUE UNITA' DELL'EURL-FA



Joint Research Centre (JRC) della Commissione Europea – Geel, Belgio

Authorisation

Official Controls

EURL-FA AUTHORISATION

Come previsto dall' Allegato II del Regolamento (CE) N. 1831/2003, l'EURL-FA **Authorisation** ha il compito di eseguire:

Valutazione scientifica dei dossiers:

valutazione del metodo analitico, proposto dall'*Applicant*, per determinare la sostanza attiva/agente presente nell'additivo per mangimi, nelle premiscele, nei mangimi e in acqua (se applicabile)

Quando sia stato stabilito un LMR:

valutazione del metodo per la determinazione dei residui e/o metaboliti negli alimenti di OA

EURL-FA AUTHORISATION

L'EURL valuta il metodo per gradi:

- ❑ Valuta i documenti forniti dai richiedenti;

La documentazione presentata dal richiedente deve essere in conformità con il capitolo 2.6 dell'Allegato II del Regolamento (CE) n 429/2008.

- ❑ Se la documentazione presentata è esaustiva, l'EURL redige un rapporto iniziale di valutazione senza eseguire esperimenti;

- ❑ L'EURL può concludere che sia necessario verificare il metodo (coinvolgimento di uno o più laboratori) per completare la valutazione;

- ❑ Chiede il parere sul proprio giudizio ai LNRs appartenenti al Consorzio;

- ❑ Sottopone il parere all'EFSA.

L'EURL-FA mantiene una banca di campioni di riferimento di tutti gli additivi autorizzati.

EURL-FA

OFFICIAL CONTROLS

Come previsto dall' Articolo 32 del Regolamento (CE) N. 882/2004, l'EURL-FA **Official controls** ha il compito di:

- ✓ Fornire ai LNRs dettagli sui metodi di analisi, compresi i metodi di riferimento;
- ✓ Coordinare l'applicazione, ad opera dei LNRs dei metodi di analisi, in particolare organizzando test comparativi e assicurando un appropriato follow-up di questi ultimi conformemente a protocolli internazionalmente accettati, se disponibili;

EURL-FA

OFFICIAL CONTROLS

- ✓ Coordinare, nel loro ambito di competenza, le disposizioni pratiche necessarie per applicare nuovi metodi di analisi e informare i LNRs dei progressi in tale ambito;
- ✓ Organizzare corsi di formazione e perfezionamento per il personale dei LNRs e per esperti dei paesi in via di sviluppo;
- ✓ Fornire assistenza scientifica e tecnica alla Commissione, in particolare nei casi in cui gli Stati membri contestino i risultati delle analisi;
- ✓ Collaborare con i laboratori responsabili delle analisi dei mangimi (e degli alimenti) nei paesi terzi.

EURL-FA OFFICIAL CONTROLS

Metodi di analisi

Verifica



METODO DICLAZURIL

Sviluppo



NUOVO METODO EN

DICLAZURIL

- ❑ Diclazuril è un **additivo per mangimi** autorizzato come coccidiostatico ai sensi del Reg. (CE) N. 1831/2003
- ❑ Regolamento (CE) N. 1831/2003 richiede la disponibilità di **metodi analitici** per il controllo ufficiale

DICLAZURIL

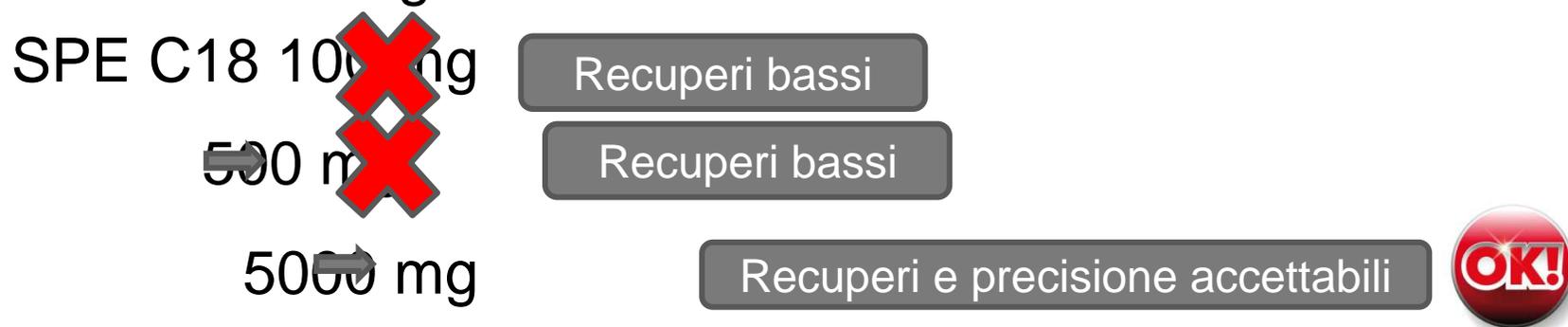
Regolamento (CE) N. 152/2009

Metodo per il controllo ufficiale del diclazuril nei
mangimi



DICLAZURIL

- ✓ **2013** - LNR Germania, Berlino individua il problema - bassi recuperi. Informa l'EURL-FA Official controls
- ✓ **2014** - EURL-FA Official controls verifica in-house il metodo Reg. EC 152/2009:



modifica della SOP del metodo comunitario: SPE C18 da 100 mg a 5000 mg

DICLAZURIL

SOP metodo comunitario modificato

Preparazione campione

- 50 g mangime + 200 ml MeOH acidificato
- Estrazione «overnight»
- Decantare, 20 ml + 20 ml H₂O
- Purificazione (SPE C18, 5000 mg)
+ lavaggio+eluizione+concentrazione

HPLC

Hypersil ODS (C₁₈) (100 mm x 4,6 mm x 3 μm) o equivalente

Gradiente ternario: A) soluzione acquosa - acetato di ammonio e idrogeno solfato di tetrabuttilammonio B) ACN C) MeOH

Loop: 20 μl

Flusso: 1,5 ml/min

Detector: 280 nm

Quantificazione

Calibrazione mediante curva standard con correzione SI (bis-diclazuril)

DICLAZURIL

✓ **2015** - Ring trial (15 labs)

Studio di verifica del metodo modificato

***Obiettivo finale:** esprimere un'opinione congiunta dell'EURL-FA e LNRs networks alla DG SANTE in merito alla revisione del Regolamento CE N.152/2009 relativamente al metodo per la determinazione del diclazuril nei mangimi*

DICLAZURIL

14 dei 15 labs partecipanti hanno fornito i risultati per le analisi dei tre campioni di mangime:

1 negativo

1 + diclazuril 0,9 mg kg⁻¹

1 + diclazuril 1,5 mg kg⁻¹

Ogni lab ha ricevuto 5 campioni 1 blk e 4 add samples

DICLAZURIL

RISULTATI

- No falsi positivi o falsi negativi
- Deviazione standard relativa per la ripetibilità: 4% - 11%
- Deviazione standard relativa per la riproducibilità: 14% - 18%
- Horrat value $< 1,5$ per i due materiali

DICLAZURIL

LOD – 0,1 mg/kg

LOQ – 0,5 mg/kg

	Sample 1 A 100	Sample 2 O 100	MAT 1	MAT 2	MAT 3
L	11	11	10	9	10
n	19	18	20	18	10
Mean	100,8	103,5	1,0	1,5	<LOQ
S_r (mg/kg)	5,88	7,64	0,11	0,07	-
CV_r (%)	5,83	7,38	11,2	4,50	-
S_R (mg/kg)	7,59	7,64	0,18	0,21	-
CV_R (%)	7,53	7,38	18,1	14,3	-
Nominal content (mg/ kg)	100	100	0,9	1,5	-
Reference ¹	First study from 1994	First study from 1994	Second study from 2015	Second study from 2015	Second study from 2015

L = number of laboratories

N = number of single values

S_r = standard deviation of repeatability

CV_r = coefficient of variation of repeatability

S_R = standard deviation of reproducibility

CV_R = coefficient of variation of reproducibility

DICLAZURIL

CONCLUSIONE:

il metodo è *fit for purpose*



l'EURL-FA presenterà alla Commissione europea una raccomandazione per la revisione del Regolamento (CE) N. 152/2009.

DICLAZURIL

Ma i labs hanno segnalato: metodo indaginoso, difficoltà di quantificazione quando interferenze della matrice sono presenti al tempo di ritenzione del diclazuril

Inserimento di opzione nel testo della Modifica

9. **General comments**

The diclazuril response must have been previously demonstrated to be linear over the range of concentrations being measured.

At least for the analysis of diclazuril in feed with a high fat content, the analytical method may be substituted by other HPLC based methods, e.g. a high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) based method, provided that the substituting method would have proven to hold equivalent or better performance characteristics (e.g. recovery rate, precision at repeatability and reproducibility conditions) in comparison with the ones established by the current method.

NUOVO METODO *EN*

Commissione CEN/TC 327 - Status: under drafting

Animal Feeding stuffs

Methods of sampling and analysis

«Determination of authorized coccidiostats at additive and 1 and 3% cross-contamination level and of antibiotics at sub-additive levels, in compound feed with high performance LC-MS/MS»

NUOVO METODO *EN*

Marzo 2015 - invito a partecipare al collaborative trial

Giugno 2015 - invio campioni e POS

Gennaio 2016 (slittato marzo 2016)-
completamento validazione (*collaborative trial*)

Dicembre 2017 - completamento della
procedura finalizzata alla definizione dello
standard EN

NUOVO METODO *EN*

Coccidiostatici autorizzati

Alofuginone bromidrato
Decochinato
Diclazuril
Lasalocid sodio
Maduramicina ammonio
Monensin sodio
Narasin
Nicarbazina
Robenidina cloridrato
Salinomicina sodio
Semduramicina sodio

Antimicrobici vietati

Etopabato
Clopidol
Amprolium cloridrato
Furazolidone
Ronidazolo
Dimetridazolo

Standard interni

Robenidina-D8
cloridrato
Dinitrocarbanilide-D8
Bis-diclazuril
Decochinato-D5
Nigericina sodio
Dimetridazolo-D3
Etopabato-D5
Furazolidone-D4
Ronidazolo-D3

NUOVO METODO *EN*

Matrice

Mangime composto - polli, bovini e suini
(target e non target)

Livelli

Coccidiostatici autorizzati:
additivazione/contaminazione crociata

Antimicrobici vietati: sub-terapeutici

NUOVO METODO *EN*

SOP

Preparazione campione

- 5 g mangime + 40 ml ACN:MeOH:H₂O (80:10:10 v:v:v) (solvente estrazione)
- Sonicare 30 min
- Estrarre in agitazione 1 h
- Centrifugare 1850 g
- Filtrare il sovranatante – filtri naylon per siringa 0,2 µm

Coccidiostatici cross-contamination e composti vietati - Quantificazione

Coccidiostatici a livello additivazione

- Diluire 1:100 con solvente di estrazione - Quantificazione

NUOVO METODO *EN*

Quantificazione mediante *standard additions*

2 ml estratto finale - sette aliquote



S0a *S0b* *S1* *S2* *S3* *S4* *S5*

+ 50 μ l di mix SI

+ 0 0 10 20 30 40 50 μ l (spiking solution drugs)

+ 50 50 40 30 20 10 0 μ l ACN



ANALISI HPLC-MS/MS

NUOVO METODO *EN*

8.4 HPLC analysis

8.4.1 Analytical conditions

The following conditions are provided for guidance. Other conditions may be used provided they yield to equivalent results.

8.4.1.1 HPLC column: as in 5.3.

8.4.1.2 guard column: as in 5.2.

8.4.1.3 mobile phase: as in 4.12, flow rate: 0.35 ml min⁻¹

5.2 Guard column, C₁₈, Alltech® or equivalent

5.3 LC analytical column, 5 µm C₁₈, 150 mm x 3.2 mm Alltech® or equivalent

4.12 Mobile phase for HPLC

4.12.1 Water, containing 0.5% (v:v) formic acid – Phase A

4.12.2 Methanol, containing 0.5% (v:v) formic acid – Phase B

Elution programme: step gradient mode. Mobile phases A and B are used to apply the following gradient elution: hold 90% mobile phase A for 2 min, decrease to 10% at 2 min and hold for 9 min. At 11 min, increase mobile phase A to 90% and hold for 4 min. The total run time is 15 min.

8.4.1.4 injection volume: 10 µl.

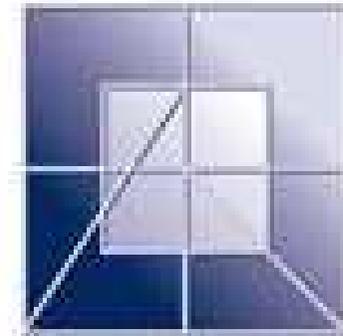
8.4.1.5 column temperature: 35°C.

NUOVO METODO *EN*

8.4.1.8 Mass spectrometry parameters¹:

- Spray voltage: 3.7 kV
- Ionisation mode: positive ESI or negative ESI (from 0 min to 5.9 min and from 7.26 min to 13.2 min: positive ESI; from 5.9 min to 7.26 min: negative ESI).
- Capillary (desolvation) temperature: 370°C.
- acquisition mode: multiple reaction monitoring (MRM); protonated, deprotonated and sodium adducts (depending on the analyte) are used for fragmentation. Two product ions are recorded: one most intensive (in most of the cases) is the quantification ion; another one (at least) is used for confirmation of the identity of the analyte or internal standard. The precursor and daughter ions used for each analyte are given in Annex 1.

¹ All conditions mentioned were optimised for the Thermo Quantum Ultra EMR[®] LC-MS/MS used at EC-JRC-IRMM, EURL-FA Control for the optimisation and validation of this protocol. They are therefore only indicative values and have to be optimised for the used equipment.



**CENTRO DI RIFERENZA
PER LA SORVEGLIANZA
E IL CONTROLLO DEGLI
ALIMENTI PER GLI ANIMALI**

**GRAZIE PER
L'ATTENZIONE**

