

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

**Metodi di analisi utilizzati
per il controllo chimico
degli alimenti**

Raccolta a cura di
Massimo Baldini, Fabio Fabietti, Stefania Giammarioli,
Roberta Onori, Leucio Orefice e Angelo Stacchini

Laboratorio Alimenti

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN
96/34**

Istituto Superiore di Sanità

Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti.

Raccolta a cura di Massimo Baldini, Fabio Fabietti, Stefania Giammarioli, Roberta Onori, Leucio Orefice e Angelo Stacchini
1996, v. 265 p. Rapporti ISTISAN 96/34

Il manuale raccoglie i metodi di analisi correntemente utilizzati per il controllo chimico degli alimenti presso l'Istituto Superiore di Sanità. Esso viene a proporsi quale guida per le strutture sanitarie periferiche interessate sia per l'applicazione pratica che per la redazione di più specifici manuali idonei alle diverse esigenze. Si compone di una piccola sezione introduttiva generale nella quale vengono enunciate raccomandazioni e disposizioni di utilizzo comune nell'applicazione di gran parte dei metodi chimici e di una parte speciale, che riporta i metodi ordinati per tipo di parametro ricercato. Un aspetto importante da considerare è la necessità, per alcuni tra i metodi proposti, di attendere il responso derivante dall'utilizzo corrente o dall'impiego in circuiti di validazione e la previsione di edizioni successive che accolgano gli aggiornamenti intervenuti, eventuali integrazioni e le correzioni derivanti dalle esperienze applicative.

Parole chiave: Chimica degli alimenti, Metodi di analisi

Istituto Superiore di Sanità

Analytical methods used in food chemical control.

Collection edited by Massimo Baldini, Fabio Fabietti, Stefania Giammarioli, Roberta Onori, Leucio Orefice and Angelo Stacchini
1996, v. 265 p. Rapporti ISTISAN 96/34 (in Italian)

The main analytical methods used by the Istituto Superiore di Sanità for food chemical control are given. This handbook may be used by local health authorities both for practical application and for the publication of more specific manuals based on local needs. The report consists of two parts: a short general introduction explaining the commonly used recommendations and procedures applied in most chemical methods and a section devoted to a description of methods according to the parameters utilized. For some of the methods adopted, it is necessary to wait for the reaction deriving from their actual usage and implementation. Future editions of the work will contain up-to-date corrections and revisions based on the application and validation of the methods proposed.

Key words: Analytical methods. Food chemistry

Si ringraziano i Direttori di reparto e il personale del Laboratorio Alimenti per il lavoro bibliografico, sperimentale e di revisione che ha permesso la compilazione dei metodi riportati.

Si ringrazia il Sig. Claudio Riccetti per l'opera prestata nella redazione del testo.

A piè di pagina dei singoli metodi sono riportati i nominativi degli esperti cui far riferimento per eventuali precisazioni.

INDICE

INTRODUZIONE.....	p. 1
RACCOMANDAZIONI GENERALI PER L'EFFETTUAZIONE DI ANALISI CHIMICHE.....	p. 3
Reattivi.....	p. 3
Apparecchiatura.....	p. 3
Vetreteria.....	p. 4
Sicurezza in laboratorio.....	p. 4
Preparazione del campione di analisi.....	p. 4
UMIDITA'/RESIDUO SECCO.....	p. 7
SOSTANZE AZOTATE.....	p. 11
Sostanze azotate totali	
Metodo Kjeldahl.....	p. 13
Azoto basico volatile (TVN)	
Metodo titrimetrico.....	p. 15
Sieroproteine solubili	
Metodo Kjeldahl.....	p. 17
Rapporto caseina/sieroproteine nei lattini formulati per l'infanzia	
Metodo elettroforetico.....	p. 21
Grano tenero nelle paste e negli sfarinati di grano duro	
Metodo per focalizzazione ionica.....	p. 24
Ricerca della caseina di latte bovino in formaggi prodotti con latte di pecora	
Metodo elettroforetico.....	p. 29
Ricerca del latte vaccino nella mozzarella di bufala	
Metodo elettroforetico.....	p. 30
Aminoacidi liberi	
Metodo per HPLC.....	p. 31
Furosina	
Metodo per HPLC.....	p. 35
LIPIDI.....	p. 37
Sostanze grasse totali	
Metodo Soxhlet.....	p. 39
Sostanze grasse totali	
Metodo con idrolisi acida.....	p. 41

Sostanze grasse totali	
Metodo Röse-Gottlieb.....	p. 44
Acidi grassi	
Metodo gascromatografico.....	p. 47
A1. - Acidi grassi nel burro.....	p. 49
A2. - Acido linoleico nei prodotti destinati ad una alimentazione particolare.....	p. 51
B. - Acidi grassi negli oli (Metodo rapido).....	p. 54
Steroli	
Metodo gascromatografico (A)-Metodo gravimetrico (B).....	p. 55
Composti polari	
Metodo cromatografico-gravimetrico.....	p. 56
CARBOIDRATI.....	p. 61
Carboidrati singoli o in miscela	
Metodo per cromatografia ionica.....	p. 63
Carboidrati singoli o in miscela	
Metodo per HPLC.....	p. 66
Fibra alimentare totale	
Metodo enzimatico-gravimetrico.....	p. 68
Cellulosa	
Metodo gravimetrico.....	p. 73
CENERI.....	p. 75
Ceneri	
Metodo gravimetrico.....	p. 77
Ceneri esenti da cloruro di sodio	
Metodo titrimetrico-gravimetrico.....	p. 79
METALLI.....	p. 83
Metalli raccomandazioni generali (M.R.G.).....	p. 85
Arsenico	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 89
Cadmio	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 92
Calcio	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 95
Cromo	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 97
Ferro	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 101

Litio	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 103
Magnesio	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 105
Manganese	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 107
Mercurio	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 109
Piombo	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 113
Potassio	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 117
Rame	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 119
Selenio	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 121
Sodio	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 124
Stagno	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 126
Stronzio	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 130
Zinco	
Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico.....	p. 132
VITAMINE.....	p. 135
Vitamina A - Vitamina E	
Metodo per HPLC.....	p. 137
Vitamina B ₁	
Metodo spettrofluorimetrico.....	p. 141
Vitamina B ₂	
Metodo spettrofluorimetrico.....	p. 144
Vitamina C	
Metodo enzimatico-spettrofotometrico.....	p. 147
ADDITIVI.....	p. 151
Acesulfame	
Metodo per HPLC.....	p. 153
Acidi acetico, formico, lattico, malico, propionico, succinico e tartarico	
Metodo per HPLC.....	p. 155
Acidi ascorbico e citrico	
Metodo per HPLC.....	p. 157

Acido benzoico	
Metodo per HPLC.....	p. 159
Acido propionico e propionati	
Metodo gascromatografico.....	p. 161
Acido sorbico	
Metodo spettrofotometrico.....	p. 163
Acido sorbico	
Metodo per HPLC.....	p. 165
Alcool etilico	
Metodo gascromatografico.....	p. 167
Aldeide formica	
Metodo spettrofotometrico.....	p. 169
Aspartame	
Metodo per HPLC.....	p. 170
Glutammato monosodico	
Metodo per HPLC.....	p. 172
Mono e digliceridi degli acidi grassi	
Metodo gascromatografico.....	p. 173
Nitrati e nitriti	
Metodo spettrofotometrico.....	p. 176
Polifosfati	
Metodo spettrofotometrico.....	p. 179
Saccarina	
Metodo per HPLC.....	p. 184
RESIDUI.....	p. 187
Aldeide formica	
Metodo spettrofotometrico.....	p. 189
Cloramfenicolo e nitrofurani	
Metodo per HPLC.....	p. 191
Solventi organoalogenati	
Metodo gascromatografico.....	p. 194
Sulfamidici	
Metodo per HPLC.....	p. 197
MICOTOSSINE.....	p. 201
Metodi di campionamento per la determinazione delle aflatossine.....	p. 203
Aflatossine totali (AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂)	
Metodo per HPLC.....	p. 206
Aflatossine totali nei pistacchi (AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂)	
Metodo per HPLC.....	p. 212

Aflatossine totali nell'olio di oliva (AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂)	
Metodo per HPLC.....	p. 215
Aflatossina M ₁ (AFM ₁) nel latte	
Metodo per HPLC.....	p. 218
Ocratossina A (OA)	
Metodo per HPLC.....	p. 220
METODICHE SPECIFICHE.....	p. 225
Acidità in pasta e sfarinati	
Metodo titrimetrico.....	p. 227
Acidità nel latte	
Metodo titrimetrico.....	p. 229
Analisi spettrofotometrica nell' UV dello strutto	
Metodo spettrofotometrico.....	p. 230
Azoto ammoniacale nelle acque minerali	
Metodo spettrofotometrico.....	p. 232
Caffeina nel caffè	
Metodo per HPLC.....	p. 234
Cloruri, nitriti, nitrati, solfati nelle acque minerali	
Metodo per cromatografia ionica.....	p. 236
Dimetilnitrosoammina nella birra	
Metodo gascromatografico.....	p. 238
Fosforo nelle acque minerali	
Metodo spettrofotometrico.....	p. 241
Fosforo nei prodotti destinati ad una alimentazione particolare	
Metodo spettrofotometrico.....	p. 247
Gliadina nei prodotti dichiarati privi di glutine	
Metodo per immunodiffusione.....	p. 249
Grassi estranei nel grasso di latte	
Metodo gascromatografico.....	p. 252
Iodio nel sale	
Metodo titrimetrico.....	p. 253
Nitrati nelle acque minerali	
Metodo spettrofotometrico diretto.....	p. 256
Nitriti nelle acque minerali	
Metodo spettrofotometrico.....	p. 258
ALLEGATO I	
Elenco delle raccolte di metodi ufficiali.....	p. 261

Introduzione

La presente raccolta di metodi nasce in un periodo di rapida e complessa evoluzione nel settore dell'*Igiene e della Sicurezza d'uso degli Alimenti*, considerata la necessità di elaborare e codificare in modo omogeneo le numerose acquisizioni tecnico-scientifiche ottenute in anni molto recenti.

Il richiamo delle norme europee all'applicazione dei principi che disciplinano le buone pratiche di laboratorio, settore nel quale l'ISS ha recentemente emanato specifiche linee guida, presuppone anche la dotazione degli strumenti necessari a realizzarli.

In tal senso, per quanto nel nostro paese la normativa nazionale relativa alle procedure analitiche del settore risulti incompleta, nell'ambito dell'analisi chimica e microbiologica applicata al controllo sanitario degli alimenti sono oggi a disposizione degli operatori del settore sia metodi di analisi ufficiali che metodi raccomandati o comunque validati in circuiti nazionali od internazionali, oltre a metodi non validati ma ampiamente utilizzati e collaudati.

In particolare, le metodiche internazionali codificate dall'ISO, grazie all'esperienza in essi trasferita, alle edizioni continuamente aggiornate, al consenso unanimemente riscosso, costituiscono un punto di riferimento di estrema validità per chi opera in questo settore.

Nonostante tale disponibilità, un incentivo particolare a realizzare un primo tentativo di raccolta omogenea di metodi chimici e microbiologici è stato fornito dall'utilità di riportare in modo preferenziale metodologie operative di uso corrente o comunque coerenti con le aspettative in questo settore della Sanità Pubblica, tenendo anche conto dell'esigenza di avere a disposizione un supporto di agile e pratica consultazione per il laboratorista addetto alla vigilanza ed al controllo degli alimenti.

Sono stati così realizzati due manuali, rispettivamente relativi ai metodi chimici e microbiologici. Le basi sulle quali sono stati elaborati sono le stesse metodiche ISO-UNI, quelle ufficiali nazionali e CEE, oltre a lavori pubblicati da ricercatori italiani od esteri ed alle esperienze dirette dei ricercatori dell'I.S.S. nell'applicazione delle stesse metodiche. L'impostazione descrittiva è stata in parte semplificata, rispetto ai protocolli ISO, allo scopo di favorire un utilizzo pratico più agevole, senza per questo far mancare gli elementi essenziali.

Benchè la gran parte delle metodiche sia stata ampiamente sperimentata e quindi da ritenersi di provata affidabilità, in alcuni casi invece si reputa necessario attendere il responso derivante dall'impiego in circuiti di validazione e dall'utilizzo corrente prima che possano stabilmente affermarsi rispetto a eventuali metodiche alternative.

Questo lavoro nasce infatti come uno degli atti concreti del rapporto collaborativo che l'ISS intende stabilire in modo continuativo con le strutture periferiche coinvolte, e, proprio perchè non costituisce un riferimento invariabile, è aperto ai possibili contributi migliorativi derivanti dall'esperienza.

I manuali si compongono di una *parte introduttiva generale* nella quale vengono enunciate raccomandazioni e procedure di utilizzo comune nell'applicazione di gran parte dei metodi e di una *parte speciale*, che riporta i metodi ordinati per tipo di parametro analitico ricercato.

Nel manuale dei metodi microbiologici viene anche riportato un *elenco di terreni colturali e reagenti* impiegati nei metodi illustrati. Nello stesso è stato fatto un cenno anche ai metodi analitici rapidi, ad es. per la *Salmonella*, poiché di impiego sempre più frequente e diffuso. Per quanto in linea di massima tali metodi non possano essere impiegati da soli nel corso di analisi ufficiali, essi possono risultare utili nel caso di screening conoscitivi sottoponendo in ogni caso i risultati positivi a prove di conferma con le metodiche tradizionali.

Le strutture sanitarie periferiche interessate al controllo chimico e microbiologico degli alimenti oltre ad utilizzare direttamente i manuali come uno strumento applicativo, potranno considerarli, in vista della pianificazione ed uniformazione delle procedure adottate nelle strutture stesse, un contributo per la compilazione degli specifici manuali di qualità idonei alle diverse esigenze locali.

Eventuali possibili carenze qualitative e quantitative verranno comunque corrette in successive edizioni, nelle quali verrà tenuto conto anche delle esperienze applicative e di validazione nel frattempo intervenute.

Si ringraziano tutti i colleghi che vorranno, con i loro suggerimenti, contribuire al miglioramento ed all'aggiornamento tecnico-scientifico dei manuali.

A. Stacchini

RACCOMANDAZIONI GENERALI PER L' EFFETTUAZIONE DI ANALISI CHIMICHE

Nel presente capitolo sono descritte le raccomandazioni generali concernenti i reattivi, le apparecchiature e la vetreria.

Reattivi

Acqua. - Tutte le volte che venga fatto riferimento all'acqua ai fini della dissoluzione, della diluizione o del lavaggio con acqua, salvo diverse indicazioni, deve essere impiegata acqua distillata, acqua deionizzata o acqua demineralizzata di purezza almeno equivalente.

Ove si parli senza ulteriori precisazioni, di "soluzione" o di "diluizione", si intende "soluzione in acqua" o "diluizione con acqua".

Sostanze chimiche. - Salvo altra indicazione, tutte le sostanze chimiche impiegate devono essere di purezza analitica.

Per determinazioni particolari, ove siano richieste caratteristiche specifiche per i reagenti utilizzati, queste sono riportate nei relativi metodi.

Apparecchiatura

Si riportano di seguito i requisiti minimi relativi ad alcune delle apparecchiature di uso più comune in laboratorio, mentre quelle relative alle strumentazioni destinate a particolari impieghi sono riportate nell' elenco delle apparecchiature di ciascun metodo.

Bagno termostatico. - Fornito di un accurato controllo della temperatura (± 1.0 °C).

Bilancia analitica. - Per bilancia analitica si intende una bilancia con sensibilità di 0.0001 g.

Bilancia tecnica. - Per bilancia tecnica si intende una bilancia con sensibilità di 0.01 g.

Forno elettrico a muffola. - Costruito con materiale refrattario non soggetto a perdite di particelle alla temperatura di esercizio.

- In grado di consentire un' adeguata circolazione d' aria.

- Fornito di un controllo della temperatura con precisione (± 10 °C);

Mulino da laboratorio. - Costruito con materiale refrattario all' umidità.

- Di facile pulizia.

- In grado di consentire una macinazione rapida ed uniforme.

Omogeneizzatore. - Tipo Ultra Turrax o tipo Blender.

pH - metro. - Con sensibilità non inferiore a 0.01 unità di pH.

Piastra riscaldante. - Munita di regolatore di potenza con temperatura massima non inferiore a 400°C.

Stufa ad aria. - Fornita di accurato controllo della temperatura (± 2 °C).

- In grado di consentire un' adeguata circolazione d' aria;

Stufa da vuoto. - Fornita di un accurato controllo della temperatura (± 2 °C).

- Fornita di un dispositivo per il vuoto in grado di mantenere una pressione 3.4 kPa (34 mbar).

- Fornita di un dispositivo per l' introduzione di aria calda disidratata o di un disidratante.

Trituratore. - Munito di accessori per la triturazione dei diversi tipi di alimenti.

Vetreteria

L' elenco della vetreteria dei vari metodi comprende soltanto quella che esula dalla normale vetreteria da laboratorio o che richiede determinate specifiche.

La vetreteria impiegata deve essere preventivamente lavata con detergenti idonei e accuratamente risciacquata con acqua distillata.

Nel caso di determinazioni che richiedono trattamenti specifici della vetreteria, questi sono riportati nei metodi relativi.

Sicurezza in laboratorio

Apparecchiature. - L'operatore deve utilizzare la strumentazione di laboratorio seguendo scrupolosamente tutte le norme di sicurezza riportate nel manuale di istruzione che la ditta costruttrice fornisce con l' apparecchiatura.

Reattivi. - Tutte le operazioni che precedono le manipolazioni di acidi, di basi e solventi organici e altre sostanze tossiche o irritanti, debbono essere condotte sotto cappa di aspirazione.

Nel caso di sostanze pericolose per contatto o altro, è necessario l' uso di guanti e occhiali di sicurezza.

Smaltimento dei rifiuti di laboratorio. - I materiali di scarto del laboratorio possono essere classificati secondo le seguenti tre categorie di rifiuti: urbani, speciali, tossici e nocivi, secondo la tipologia del prodotto.

Ciascun tipo di rifiuto è soggetto ad una precisa e rigorosa procedura di smaltimento, secondo quanto indicato nella normativa attualmente in vigore (DPR 915/1982, Delibera interministeriale del 27/07/1984, Legge 441/1987, Legge 475/1988).

Preparazione del campione di analisi

Per ottenere risultati accurati e ripetibili l' aliquota di campione da sottoporre ad analisi (aliquota da saggio) deve essere rappresentativa di tutto il campione in esame; a tale scopo è quindi necessario assicurare l' omogeneità dell' intero campione da cui viene prelevata tale aliquota.

I campioni solidi debbono essere sottoposti ad opportuno sminuzzamento, triturazione o macinazione ed accurata omogeneizzazione utilizzando sistemi meccanici diversi a seconda della consistenza del prodotto (mortai, mulini da laboratorio, omogenizzatori a lame, omogenizzatori tipo Ultra Turrax ecc.); dal campione omogeneizzato, accuratamente mescolato, si preleva l'aliquota da saggio. Per i campioni in polvere è sufficiente procedere ad un accurato mescolamento del campione e quindi al prelievo.

I campioni liquidi debbono essere accuratamente rimescolati manualmente o mediante sistemi meccanici di agitazione o bagno ad ultrasuoni e portati a 20°C se il prelievo dell'aliquota da saggio viene effettuato mediante pipette o recipienti tarati. Le bevande contenenti gas debbono essere accuratamente degassate prima del prelievo.

E' necessario inoltre che il campione venga conservato e manipolato in modo idoneo allo scopo di evitare modifiche delle sue caratteristiche chimico-fisiche, ad es. a causa di perdita o acquisto di umidità, deterioramento e contaminazione.

In aggiunta a queste norme di carattere generale di seguito vengono riportate indicazioni particolari riguardanti alcune categorie specifiche di alimenti.

Prodotti in granella. - La macinazione di una aliquota rappresentativa del prodotto deve essere effettuata con un mulino da laboratorio in modo da produrre particelle delle dimensioni necessarie ad una corretta esecuzione dell'analisi. Le dimensioni delle particelle ottenute devono essere tali che il 90% del macinato passi attraverso un setaccio con maglie di 0.85 mm se non è diversamente specificato nel metodo. Gli sfarinati con granulometria maggiore devono essere rimacinati.

Miele liquido o filtrato. - Se il campione è esente da granuli, mescolare accuratamente mediante agitazione o scuotimento; se il miele è granuloso, riscaldare in recipiente chiuso per circa 30 minuti a 60 °C su bagnomaria; quindi riscaldare, se necessario, a 65 °C, fino a liquefazione. E' necessario agitare il recipiente di tanto in tanto.

Miele in favo. - Tagliare la parte superiore dei favi, se sono chiusi, e separare interamente il miele dalla cera, passandolo su un setaccio a maglie quadrate (0.5 mm di lato).

Se una parte della cera attraversa il setaccio, scaldare il campione come indicato e passarlo su garza.

Se il miele in favo è granuloso, riscaldare fino a liquefazione della cera, agitare, lasciare raffreddare e asportare la cera.

Prodotti destinati ad una alimentazione particolare e prodotti confezionati.

Prodotti solidi. - Unire il contenuto di più confezioni dello stesso lotto e omogeneizzare accuratamente il campione con un idoneo sistema secondo le norme generali precedentemente riportate.

Prodotti in polvere. - Miscelare accuratamente il contenuto di più confezioni dello stesso lotto.

Prodotti liquidi. - Miscelare il contenuto di più confezioni dello stesso lotto, preliminarmente mescolate mediante agitatore magnetico o ultrasuoni (verificare che non si osservino sedimenti sul fondo nè film lipidici aderenti alle pareti del contenitore).

Per prodotti altamente igroscopici (es. liofilizzati) o che cedono rapidamente umidità (es. omogeneizzati) mescolare il prodotto e pesare rapidamente l' aliquota da saggio. Effettuare l' analisi su più confezioni.

Per prodotti inscatolati composti da parti solide e liquide, se solo la parte solida è richiesta per l'analisi, separarla da quella liquida utilizzando opportuni setacci e omogeneizzarla accuratamente secondo le norme generali precedentemente riportate.

Quando è necessario procedere sull'intero prodotto, nel caso di scatole di piccola pezzatura omogeneizzare l'intero contenuto della scatola; per scatole di maggiori dimensioni separare le due porzioni raccogliendo tutto il liquido, determinare il peso della parte solida e ed il volume del liquido, ricombinare una opportuna aliquota di ciascuna delle due parti in quantità proporzionali e procedere a omogenizzare.

Prodotti lattiero-caseari. - In prodotti di consistenza dura o semidura bisogna operare la pulizia esterna della parte non edibile allontanando polvere, materiale estraneo, residui di vernice o etichettature e successivamente sminuzzare il campione in parti di piccole dimensioni tramite grattugia o macinino elettrico.

In prodotti di consistenza molle l'omogenizzazione del campione viene effettuata rimescolando il campione, tramite un pestello, in un mortaio o utilizzando un omogenizzatore a lame.

Nel caso di determinazioni analitiche per le quali siano richieste norme particolari per la preparazione dell'aliquota da saggio queste vengono riportate nei metodi corrispondenti.

UMIDITÀ / RESIDUO SECCO

1. Campo di applicazione

Metodo A. - Il metodo è applicabile a tutti i prodotti alimentari, in particolare a quelli termolabili o ad alto tenore zuccherino.

Metodo B. - Il metodo è applicabile a tutti quei prodotti alimentari che non contengono sostanze termolabili a 103°C.

Metodo C. - Il metodo è applicabile ai cereali in granella, ai loro sfarinati e alle paste alimentari.

Metodo D. - Il metodo è applicabile ai prodotti carnei.

2. Principio del metodo

Il campione è essiccato in stufa e le sostanze volatili presenti vengono determinate gravimetricamente.

Metodo A. - I campioni sono essiccati in stufa a vuoto, termostata a 80 °C

Metodo B. - I campioni sono essiccati in stufa ad aria, termostata a 103 °C

Metodo C. - I campioni sono essiccati in stufa ad aria, termostata a 130 °C

Metodo D. - La porzione di campione è miscelata con sabbia ed etanolo, preessicata su bagnomaria ed essiccata fino a peso costante a 103°C

3. Reattivi

3.1 *Etanolo al 95% (v/v)* (Metodo D).

3.2 *Acido cloridrico diluito (1:1).* - Miscelare un volume di acido cloridrico concentrato (d.1.19) con un ugual volume di acqua (Metodo D).

3.3 *Sabbia, le cui particelle abbiano dimensioni comprese tra 1.4 mm e 250 µm.* (4.9). - Lavare la sabbia sotto acqua corrente. Bollire la sabbia con acido cloridrico diluito (3.2) per 30 minuti sotto agitazione. Ripetere l'operazione di lavaggio a caldo con altre porzioni di acido cloridrico diluito (3.2) finchè il liquido di lavaggio non presenti più colorazione gialla. Lavare la sabbia con acqua distillata finchè il test di ricerca dei cloruri non risulti negativo. Seccare la sabbia a 150°C e conservare in bottiglia chiusa (Metodo D).

4. Apparecchiatura

4.1 *Bilancia analitica*

4.2 *Stufa ad aria termostata*

- 4.3 *Stufa a vuoto termostata*
- 4.4 *Essiccatore*
- 4.5 *Pesafiltri*
- 4.6 *Capsule di porcellana*
- 4.7 *Bagno maria*
- 4.8 *Scatole di alluminio.* - Diametro 12 cm, altezza 6 cm.
- 4.9 *Setacci con apertura di diametro compreso tra 1.4 mm e 250 µm.*

5. Procedimento

Metodi A e B. - La quantità di campione da sottoporre all'analisi varia in base all'umidità presunta, come descritto nella tab.1 .

Per campioni solidi pesare su bilancia analitica, direttamente nel pesafiltro tarato, l'aliquota di campione ricavata dalla tabella 1.

In particolare per il pane la determinazione deve essere eseguita su di una aliquota di campione non inferiore a 100 g tagliata in piccoli pezzi ed essiccata in scatole di alluminio (4.8).

Per i formaggi vedi riferimento bibliografico.

Tabella 1. - Aliquote di campione da sottoporre ad analisi in base all'umidità presunta.

UMIDITA' PRESUNTA	ALiquota DI CAMPIONE
> 6%	circa 5 g
dal 3% al 6%	circa 10 g
< 3%	> 10 g

Per campioni liquidi o semifluidi, generalmente è determinato il residuo secco, ed è necessario un trattamento preliminare di concentrazione/essiccazione su bagno maria bollente: pesare su bilancia analitica o pipettare mediante pipetta tarata, almeno 10 g o 10 ml di campione direttamente nella capsula tarata, e porre su bagno maria bollente affinché evapori la maggior parte dell'acqua contenuta.

Porre i pesafiltri o la capsula o la scatola di alluminio contenente il campione in stufa per 4-6 ore, per il pane sono necessarie 12 ore. Togliere i campioni dalla stufa, lasciare raffreddare in essiccatore e pesare, ripetere tali operazioni fino al peso costante.

Metodo C. - Operare come descritto nella Gazzetta Ufficiale n. 145 del 21/06/1985 - Metodo ufficiale per la determinazione del tenore di umidità nei cereali in granella, nei loro sfarinati e nelle paste alimentari -.

Metodo D. - Triturare accuratamente il campione in tritatore elettrico. Trasferire in capsula di porcellana una quantità di sabbia (3.3) pari a tre o quattro volte la massa della porzione test del campione, porre nella capsula una bacchetta di vetro e portare in stufa a 103 °C per 3 minuti. Raffreddare fino a temperatura ambiente in

essiccatore. Pesare la capsula con la sabbia e la bacchetta con la precisione di 0.0001 g. Trasferire nella capsula una quantità compresa tra 5 e 10 g del campione preparato e pesare con la precisione di 0.0001 g. Aggiungere da 5 a 10 ml di etanolo (3.1), in funzione della massa della porzione test del campione e miscelare la massa con la bacchetta di vetro.

Porre la capsula su bagnomaria regolato ad una temperatura di 70 °C fino ad evaporazione dell'alcool. Porre la capsula ed il suo contenuto in stufa regolata alla temperatura di 103 °C. Quindi raffreddare fino a temperatura ambiente in essiccatore e pesare la capsula con la precisione di 0.0001 g.

Ripetere le operazioni di riscaldamento, di raffreddamento e di pesata fino a che la differenza in peso tra due successive pesate sia inferiore allo 0.1% della porzione test del campione.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di umidità del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Umidità (g / 100 g)} = (E - m) \times 100 / E$$

Il valore del residuo secco del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Residuo secco (g/100 g o 100 ml)} = 100xm / E$$

dove:

E = massa iniziale in grammi del campione

m = massa in grammi del campione secco.

Per il pane il calcolo del contenuto in umidità va riferito al peso del pane all'atto del prelevamento.

Riferimenti bibliografici

Metodi di analisi comunitari per controlli ufficiali degli alimenti per animali. Determinazione dell'umidità. *G.U. CEE* I. 279/8 del 20/12/71.

Approvazione dei metodi ufficiali di analisi per i formaggi. Determinazione della materia secca nel formaggio e nel formaggio fuso. *G.U.* supplemento al n. 229 del 2/10/1986.

Metodo ufficiale per la determinazione del tenore di umidità nei cereali in granella, nei loro sfarinati e nelle paste alimentari. *G.U.* supplemento al n. 145 del 21/6/1985.

Metodo di analisi di frumento, farine, pane e pasta. Pane: determinazione dell'umidità. *Annali Istituto Superiore di Sanità* 1967, 3: 251-252.

Metodi di analisi e di prova nel latte trattato termicamente, destinato al consumo umano diretto. Determinazione del tenore di materia secca nel latte. *G.U. CEE* L 407/29 del 31/12/92.

Meat and meat products - Determination of moisture content (reference method). Revisione della prima edizione (ISO 1442:1973). Metodo ISO/TC 34/SC6.

SOSTANZE AZOTATE

SOSTANZE AZOTATE TOTALI

Metodo Kjeldahl

1. Campo di applicazione

Il metodo Kjeldahl è applicabile a tutti gli alimenti compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo e definizione

2.1 *Principio del metodo.* - Le sostanze organiche presenti nel campione sono ossidate con acidi concentrati in presenza di catalizzatori; il sale di ammonio che si forma nella reazione è trattato con alcali e l'ammoniaca che si libera viene distillata e titolata.

2.2 *Definizione.* - Con il termine "sostanze azotate totali" si intende il contenuto di composti azotati nel prodotto analizzato. Moltiplicando il contenuto di azoto ottenuto per un fattore convenzionale che varia in base alla matrice alimentare analizzata, si ottiene il contenuto in proteine del prodotto. I fattori relativi agli alimenti vengono riportati nella seguente tabella.

Tabella 1. - Fattori di conversione da azoto a proteine totali

ALIMENTO	FATTORE CONVENZIONALE
Grano e segale	5.70
Riso	5.95
Mais e orzo	6.25
Latte e prodotti lattiero caseari	6.38
Etichetta nutrizionale ed altri alimenti	6.25

3. Procedimento

Relativamente al metodo Kjeldahl sono riportate in letteratura numerose versioni operative che utilizzano, singolarmente o in miscela, sia acidi sia catalizzatori differenti.

Sono riportati nei riferimenti bibliografici i metodi ufficiali basati su questa metodica generale.

Riferimenti bibliografici

Determinazione delle sostanze azotate nei cereali e derivati. *G.U.* supplemento n. 4 al n. 86 del 10/08/1994.

Determinazione delle sostanze azotate totali nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta. *G.U.* supplemento al n. 229 del 02/10/1986.

AZOTO BASICO VOLATILE (TVN)**Metodo titrimetrico *****1. Campo di applicazione**

Il metodo è applicabile agli alimenti ittici e carnei.

2. Principio del metodo

Le sostanze basiche volatili sono distillate e titolate con acido solforico a titolo noto.

3. Reattivi

- 3.1 *Ossido di magnesio.*
- 3.2 *Soluzione di acido borico al 2% (m/v)*
- 3.3 *Indicatore rosso di metile allo 0.2 % in etanolo*
- 3.4 *Acido solforico 0.1 N*

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Trituratore*
- 4.2 *Bilancia tecnica*

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione e determinazione.* - Far macerare 10 g di campione finemente macinato con 50 ml di acqua bidistillata. Porre il tutto in un pallone da distillazione da 1 l con 250 ml di acqua e 1-2 g di ossido di magnesio (3.1). Il recipiente di raccolta contiene 25 ml di acido borico (3.2) con 2 - 3 gocce di indicatore di rosso metile (3.3). Collegare il pallone ad un refrigerante e quest' ultimo al recipiente di raccolta, in modo che il distillato gorgogli nella soluzione di acido borico. Portare a ebollizione il contenuto del pallone in 10 minuti e distillare per 25 minuti. Lavare l' interno del refrigerante con acqua raccogliendola nel recipiente di raccolta. Titolare l' azoto basico volatile con acido solforico (3.4)

* Massimo Baldini

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di azoto basico volatile (TVN) del campione, espresso in milligrammi per 100 grammi, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Azoto basico volatile (mg / 100 g)} = \text{ml di acido impiegato} \times 14$$

SIEROPROTEINE SOLUBILI

Metodo Kjeldahl *

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile al latte pastorizzato intero, parzialmente o totalmente scremato per la determinazione del contenuto in sieroproteine solubili non denaturate, espresso sulle proteine totali .

2. Principio del metodo

L'azoto totale è determinato su un'aliquota di campione pesata; su una seconda aliquota è determinato l'azoto non caseinico dopo precipitazione della caseina con acido acetico ed infine su una terza aliquota l'azoto non proteico dopo aver addizionato acido tricloroacetico al campione.

Per ottenere il valore percentuale delle sieroproteine solubili, sottrarre al valore dell'azoto non caseinico quello dell'azoto non proteico, dividere per il valore dell'azoto totale e moltiplicare per 100.

3. Reattivi

3.1 *Ossido di rame*

3.2 *Solfato di potassio*

3.3 *Acido solforico al 96% (d = 1.84 a 20 °C)*

3.4 *Soluzione di idrossido di sodio al 50 % (m/v)*

3.5 *Acido solforico 0.1 N e 0.05 N*

3.6 *Idrossido di sodio 0.1 e 0.05 N*

3.7 *Indicatore misto. - Sciogliere 2 g di rosso di metile e 1 g di bleu di metilene in 1000 ml di metanolo al 96%*

3.8 *Soluzione di acido acetico al 10% (v/v)*

3.9 *Sodio acetato 1 N.*

3.10 *Acido tricloroacetico (TCA) al 20% (m/v)*

4. Apparecchiatura

4.1 *Palloni Kjeldahl da 250 ml*

4.2 *Apparecchiatura Kjeldahl per la mineralizzazione*

* Luciana Del Giovine

- 4.3 *Apparecchiatura per distillazione in corrente di vapore*
- 4.4 *Filtri SeS 589/1 o Whatman 41*
- 4.5 *Filtri SeS 589/2 o Whatman 40*
- 4.6 *pHmetro*
- 4.7 *Bagnomaria termostato*
- 4.8 *Bilancia analitica*

5. Procedimento

- 5.1 *Azoto totale.* - Introdurre nel pallone, due sferette di vetro (regolatori di ebollizione), 0.2 g di ossido di rame (3.1), 5 g di latte (pesato con la precisione di 0.001 g) e 15 ml di acido solforico (3.3) mescolando dolcemente il contenuto del pallone. Scaldare lentamente il pallone Kjeldahl nell'apparecchiatura di digestione. Quando la schiuma scompare e si formano abbondanti vapori bianchi, aggiungere 2 g di solfato di potassio (3.2) e far bollire energicamente fino a quando il contenuto diventi limpido e di colore verde tenue.

La chiarificazione dovrebbe avvenire entro 1 ora mentre per la digestione sono necessarie almeno 2.5 ore; se per la chiarificazione è necessario un tempo superiore ad un ora bisogna adeguatamente prolungare il tempo di digestione. Se nel collo del pallone restano particelle nere, dopo aver lasciato raffreddare, lavare con molta precauzione con una minima quantità di acqua e far continuare la digestione.

Al termine della digestione, lasciare raffreddare i palloni, aggiungere 50 ml di acqua in ciascuno dei palloni lavandone il collo e mescolando il contenuto. Aggiungere 70 ml della soluzione di idrossido di sodio (3.4) e raccordare all'apparecchiatura per la distillazione in corrente di vapore. Porre all'estremità del tubo di scarico del refrigerante un matraccio contenente 25 ml di acido solforico 0.1 N (3.5) e 6 gocce di indicatore (3.7). Riscaldare portando lentamente ad ebollizione raccogliendo nel matraccio il distillato fino a quando l'ebollizione diventi irregolare. Disinserire ciascun pallone e lavare l'estremità del tubo di condensa con un poco di acqua che verrà raccolta nel pallone.

Inserire nel matraccio l'elettrodo del pH-metro e titolare, in ciascun distillato, tramite buretta con (A ml di) idrossido di sodio (3.6) l'eccesso di acido fino a raggiungimento di pH 4.6.

- 5.2 *Azoto non caseinico (NCN).* - Diluire 20 g di latte, pesati con la precisione di 0.001 g, con 20 g di acqua in un matraccio da 50 ml.

Porre in bagno termostato a 37 °C per 30 minuti ed aggiungere quindi, sotto agitazione, 2 ml di acido acetico (3.8) al 10 %. Lasciare a riposo per 10 minuti.

Aggiungere 2 ml di acetato di sodio (3.9) 1 N, raffreddare a 20 °C e portare a volume con acqua. Filtrare in una beutina tramite filtro SeS 589/1 ripetendo la filtrazione in caso di torbidità del filtrato.

Prelevare 20 ml di filtrato e porli nel pallone da Kjeldahl operando secondo il procedimento descritto nel punto 5.1 omettendo, ovviamente, l'aggiunta di latte e raccogliendo il distillato in 20 ml di acido solforico (3.5) 0.05 N e titolando con idrossido di sodio (3.6) 0.05 N.

- 5.3 *Azoto non proteico (NPN)*. - Pesare 20 g di latte (con la precisione di 0.001 g) in un matraccio da 50 ml e portare a volume aggiungendo una soluzione di TCA al 20% (3.10). Lasciare a riposo per 30 minuti e filtrare, tramite filtro SeS 589/2, in una beutina. Prelevare 20 ml di filtrato e porli nel pallone Kjeldahl operando secondo il procedimento descritto al punto 5.1 omettendo, ovviamente, l'aggiunta di latte e raccogliendo il distillato in 10 ml di acido solforico (3.5) 0.05 N e titolando con idrossido di sodio 0.05 N (3.6).

6. Espressione dei risultati

- 6.1 *Calcolo del contenuto di azoto totale (N totale)*. - Il contenuto di azoto totale del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$N \text{ totale} (g / 100 g) = \frac{(25 - A) \times 0.1 \times 1.4}{m}$$

dove:

25 = millilitri di acido solforico 0.1 N

A = millilitri di idrossido di sodio 0.1 N utilizzati

m = grammi di campione sui quali è stata effettuata la titolazione.

- 6.2 *Calcolo del contenuto di azoto non caseinico (NCN)*. - Il contenuto di azoto non caseinico del campione espresso come percentuale è calcolato in base alla seguente formula:

$$NCN (g / 100 g) = \frac{(20 - B) \times 0.05 \times 1.4}{m}$$

dove:

20 = millilitri di acido solforico 0.05 N

B = millilitri di idrossido di sodio 0.05 N utilizzati

m = grammi di campione sui quali è stata effettuata la titolazione.

- 6.3 *Calcolo del contenuto di azoto non proteico (NPN)*. - Il contenuto di azoto non proteico del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$NPN (g / 100 g) = \frac{(10 - C) \times 0.05 \times 1.4}{m}$$

dove:

10 = millilitri di acido solforico 0.05 N

C = millilitri di idrossido di sodio 0.05 N utilizzati

m = grammi di campione sui quali è stata effettuata la titolazione.

- 6.4 *Calcolo del contenuto di sieroproteine solubili.* - Il contenuto di sieroproteine solubili non denaturate del campione, espresso come percentuale delle proteine totali, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Sieroproteine solubili (g / 100 g proteine)} = \frac{NCN - NPN}{N \text{ totale}} \times 100$$

Riferimenti bibliografici

Metodo in corso di ufficializzazione.

RAPPORTO CASEINA/SIEROPROTEINE NEI LATTI FORMULATI PER L'INFANZIA

Metodo elettroforetico *

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ai lattini formulati per l'infanzia.

2. Principio del metodo

La separazione delle frazioni proteiche è effettuata mediante elettroforesi orizzontale su gel di poliacrilammide in presenza di sodiododecilsolfato (SDS).

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione madre di acrilammide.* - In un matraccio tarato da 100 ml solubilizzare 22.2 g di acrilammide e 0.6 g di N,N' metilene-bis-acrilammide e portare a volume. La soluzione si conserva in bottiglia di vetro scuro a + 4 °C per due settimane
- 3.2 *Soluzione di ammonio persolfato all'1.5%.* - Preparare al momento dell'uso.
- 3.3 *TEMED (NNN'N'-tetrametiletildiammina)*
- 3.4 *Tampone pH 8.8, 1.5M Tris-HCl 0.4% SDS.* - In un matraccio tarato da 1000 ml solubilizzare 181.71 g di Tris (idrossimetil) aminometano, 4 g di SDS e 100 mg di sodio azide. Aggiustare il pH con HCl 4N e portare a volume.
- 3.5 *Tampone elettrodoico pH 8.3.* - In un matraccio tarato da 1000 ml solubilizzare 30.28 g di Tris (idrossimetil) aminometano, 144 g di glicina, 10 g di SDS e 10 mg di sodio azide e portare a volume. Mescolare 200 ml della soluzione così preparata con 1800 ml di acqua. Prima di portare a volume aggiustare il pH con NaOH 4N.
- 3.6 *Tampone pH 6.8 per la preparazione della soluzione per l'estrazione delle proteine.*- In un matraccio tarato da 1000 ml solubilizzare 7.57 g di Tris (idrossimetil) aminometano, aggiustare il pH con HCl 5N e portare a volume.
- 3.7 *Soluzione per l'estrazione delle proteine.* - In un matraccio tarato da 100 ml solubilizzare con il tampone a pH 6.8 (3.6) 3 g di SDS, aggiungere 1 ml di β -mercaptoetanolo e portare a volume con lo stesso tampone.
- 3.8 *Tracciante blu di bromofenolo.* - In un matraccio tarato da 10 ml solubilizzare 25 mg di blu di bromofenolo con il tampone a pH 6.8 (3.6) e portare a volume con lo stesso tampone.
- 3.9 *Soluzione fissante al 20% di acido tricloroacetico.*

* Concetta Boniglia

- 3.10 *Soluzione colorante Blu di Coomassie.* - Solubilizzare 1.25 g di Blu di Coomassie R-250 in 230 ml di metanolo e 230 ml di acqua, agitare la soluzione per circa 1 ora e aggiungere quindi 40 ml di acido acetico.
- 3.11 *Soluzione decolorante al 10% di acido acetico*
- 3.12 *Standards di riferimento.* - Standards di caseina e β -lattoalbumina purificate a titolo noto (Sigma o equivalente)
- 3.13 *β -mercaptoetanolo*

4. **Apparecchiatura**

- 4.1 *Cella per elettroforesi orizzontale munita di sistema refrigerante*
- 4.2 *Alimentatore*
- 4.3 *Essiccatore per lastre elettroforetiche*
- 4.4 *Densitometro*
- 4.5 *Bilancia analitica*

5. **Procedimento**

- 5.1 *Preparazione del campione.* - Solubilizzare una aliquota del campione nella soluzione tampone per l'estrazione delle proteine (3.7) in modo da ottenere una concentrazione finale di circa 1mg di proteine/ml ed incubare a 37 °C per 3 ore. Dopo l'incubazione aggiungere a 250 μ l della soluzione campione 10 μ l della soluzione di bromofenolo (3.8) e 10 μ l di β -mercaptoetanolo. Eseguire la stessa procedura per la preparazione delle soluzioni standards.
- 5.2 *Preparazione del gel.* - Preparare una soluzione di acrilammide al 7.5% mescolando al momento dell'uso 22.2 ml della soluzione madre di acrilammide (3.1), 33 ml di tampone Tris pH 8.8 (3.4) e 7.5 ml di acqua distillata; dopo aver degasato per alcuni minuti, aggiungere 50 μ l di TEMED (3.3) e 3.2 ml della soluzione di ammonio persolfato (3.2). Mescolare delicatamente e versare la soluzione di acrilammide tra le 2 lastre appositamente preparate. Per la polimerizzazione attendere circa 40 minuti.
- 5.3 *Separazione elettroforetica.* - Prima della deposizione dei campioni sottoporre il gel ad una pre-elettroforesi condotta alla corrente costante di 50 mA per 30 minuti. Quindi depositare 10 μ l delle soluzioni standards e delle soluzioni campione addizionate di bromofenolo e β -mercaptoetanolo preparate come descritto in 5.1. Eseguire la corsa elettroforetica dapprima a 20 mA per 10 minuti e quindi a 50 mA fino a che il tracciante ha raggiunto il fronte.
- 5.4 *Sviluppo ed essiccamento della lastra e lettura densitometrica.* - Terminata la corsa elettroforetica sviluppare la lastra fissando dapprima le frazioni proteiche con la soluzione fissante (3.9) per circa 1 ora e procedere quindi alla colorazione con la soluzione Blu di Coomassie (3.10) per circa 30 minuti. Effettuare la decolorazione con la soluzione di acido acetico al 10% (3.11) per circa 24 ore sotto agitazione

cambiando 2 o 3 volte la soluzione stessa. Essiccare la lastra con l'apposita apparecchiatura e quindi leggere mediante densitometro.

6. Espressione dei risultati

Il profilo ottenuto mediante lettura densitometrica permette la valutazione quantitativa del rapporto percentuale delle diverse frazioni proteiche.

Riferimenti bibliografici

WEBER, K. OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J.Biological Chem.* 1969, 244: 4406-4410.

BONIGLIA, C. CARRATÙ, B. FILESI, C. BELLOMONTE, G. Determinazione del rapporto caseina e lattealbumina nei latti per l'infanzia mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in sodiododecilsolfato. *Riv.Pediatr.Prev.Soc.* 1993, 43: 59-65.

GRANO TENERO NELLE PASTE E NEGLI SFARINATI DI GRANO DURO

Metodo per focalizzazione ionica *

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile agli sfarinati di frumento duro e alle relative paste alimentari per il dosaggio ed il riconoscimento degli sfarinati di frumento tenero.

2. Principio del metodo

Estraendo opportunamente un gruppo di proteine solubili e sottoponendolo a separazione elettroforetica per focalizzazione ionica su lastre di gel di poliacrilammide, si ottengono tracciati diversi a seconda che l'estratto deriva da *Triticum Durum* (frumento duro) o *Triticum Aestivum* (frumento tenero). Tali differenze permettono il riconoscimento delle due specie di cereali sia separatamente che in loro eventuali miscele.

La determinazione quantitativa è condotta confrontando il tracciato del campione sottoposto ad analisi con i tracciati di miscele di sfarinati o di paste standard ottenuti sullo stesso supporto.

3. Reattivi

- 3.1 *Solfato ammonico*. - Preparare al momento dell'uso una soluzione acquosa di solfato ammonico 3 M e correggere il pH a 4.6 con alcune gocce di acido cloridrico 2 M.
- 3.2 *Solfato di magnesio 0.13 M*
- 3.3 *Soluzione di estrazione*. - Preparare la soluzione al momento dell'uso miscelando 200 ml della soluzione di solfato di magnesio (3.2) con 73 ml della soluzione di solfato ammonico (3.1); aggiustare il pH finale a 3.25 con acido cloridrico 2 M.
- 3.4 *Idrato di sodio 1 M*
- 3.5 *Acido fosforico 1 M*
- 3.6 *Acido cloridrico 2 M*
- 3.7 *Urea 3 M*
- 3.8 *Acido tricloroacetico al 12% (p/v)*
- 3.9 *Lastre di gel di poliacrilammide*. - Dimensioni del gel: 245 x 110 x 1 mm. Questi gel sono reperibili già pronti in commercio, ma possono essere ottenuti in laboratorio partendo da reattivi per elettroforesi 5% acrilammide (p/v); 0.15% N,N' metilenbisacrilammide; 2.4% anfoliti (v/v) in gradiente di pH da 3.5 a 9.5; catalizzatore; acqua distillata a 100 ml.

* Roberta Onori

- 3.10 *Paste alimentari a contenuto noto di frumento tenero (0, 2, 7, 15%).*
3.11 *Sfarinati a contenuto noto di frumento tenero (0, 2, 7, 15%). - Preparati al momento dell'uso.*

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Bilancia analitica.*
4.2 *pHmetro.*
4.3 *Centrifuga refrigerata capace di raggiungere almeno 15.000 giri/min. e con un rotore per provette da 50 ml e da 25 ml.*
4.4 *Apparecchiature per elettroforesi orizzontale con sistema refrigerante ed alimentatore a potenza costante, capace di erogare almeno 1500 volt*
4.5 *Macinello da laboratorio*
4.6 *Agitatore magnetico*
4.7 *Rettangoli di carta Whatman n.3 o equivalente aventi dimensioni di 10 x5 mm.*
4.8 *Strisce di carta bibula aventi dimensioni 250 x 5 x 2 mm.*

5. Procedimento

- 5.1 *Estrazione delle proteine specifiche.* - Aggiungere 10,00 g di prodotto finemente macinato con 35 ml della soluzione di estrazione (3.3) e disperdere uniformemente, verificare dopo l'aggiunta che il pH sia compreso tra 4.5 e 4.9. Mantenere in estrazione per almeno 30 minuti, agitando ogni tanto manualmente. Centrifugare la miscela in provetta da 50 ml a 15.000 giri/min. per 10 min., ad una temperatura di 20 °C.
Trasferire 20 ml del surnatante in un bicchiere da 50 ml ed aggiungere, sotto agitazione mediante agitatore magnetico, 4.50 ml della soluzione di solfato ammonico (3.1).
Lasciare riposare a temperatura ambiente per almeno 30 min. Trasferire in provetta e centrifugare come sopra. Scartare il surnatante; il precipitato che contiene il gruppo delle proteine solubili specifiche, deve essere sottoposto immediatamente a separazione elettroforetica.
- 5.2 *Separazione elettroforetica in focalizzazione ionica.* - Attivare il sistema refrigerante dell'apparecchiatura elettroforetica: la temperatura ottimale della piastra è di 10 °C. Cospargere di qualche goccia di acqua la piastra refrigerante della apparecchiatura e sistemare su di essa il gel di poliacrilammide (3.9) evitando la formazione di bolle d'aria.
Imbibire uniformemente due strisce di carta bibula una con una soluzione di idrato di sodio (3.4) e l'altra con soluzione di acido fosforico (3.5) pressarle tra due fogli di carta da filtro per evitare una eccessiva imbibizione.
Porre le due strisce sul gel come indicato in fig. 1: quella imbibita con idrato di sodio all'estremo catodico, quella imbibita con acido fosforico all'estremo anodico.

Sistemare gli elettrodi della cella in corrispondenza delle strisce di carta. Avviare una precorsa elettroforetica per 40 min. applicando un voltaggio limite di 1400 volt e 0.5 watt per ogni cm di fronte di gel. Disperdere in 20-40 μ l di soluzione di urea 3M il precipitato ottenuto in 5.1. Finita la precorsa, porre sul gel di poliacrilammide i rettangoli di carta come indicato nella fig. 1.

Depositare e far assorbire circa 16 μ l della soluzione del campione, sul rettangolo di carta già posizionato.

Risistemare gli elettrodi della cella in corrispondenza delle strisce di carta. Avviare la corsa elettroforetica applicando 1.0 watt per ogni cm di fronte del gel (per 1 gel intero di 245 mm la potenza sarà pertanto di 24.5 watt ed il voltaggio limite sempre di 1400 volt).

In queste condizioni la corsa elettroforetica e la stabilizzazione delle proteine al loro pH isoelettrico è ultimata in circa 120 min.

- 5.3 *Rivelazione delle frazioni proteiche.* - Asportare con una lametta la parte del gel immediatamente sottostante le strisce di carta e le strisce stesse. Staccare il gel dalla piastra refrigerante ed immergerlo con la parte superiore verso l'alto in una vaschetta contenente la soluzione di acido tricloroacetico.

Dopo 2-5 minuti sono evidenziate le frazioni proteiche che appaiono bianche nel gel rimasto trasparente ed incolore.

Ricoprire la parte superiore del gel con un foglio di celluloido (o altro materiale trasparente) e sigillare i lati perimetrali con nastro adesivo.

Se tenuto al buio, il gel può essere così conservato per alcuni mesi. E' preferibile, per una più lunga conservazione dei risultati, fotografare il gel con luce trasversa e su fondo nero.

6. Espressione dei risultati

Per la valutazione dei risultati è indispensabile condurre, parallelamente ai campioni incogniti e sullo stesso supporto, determinazioni su campioni di riferimento standard. Utilizzare, nel caso di analisi di sfarinati, miscele a contenuto noto (3.11); utilizzare nel caso di analisi di paste alimentari, campioni a contenuto noto (3.10). Nella fig. 2 sono riportati i tracciati relativi a miscele standard di sfarinati di frumento duro e tenero.

La comparsa nel tracciato delle bande A e B è pertanto indice di presenza di frumento tenero: per piccole percentuali in frumento tenero compare solo la banda B, per percentuali maggiori anche la banda A. Esiste anche una terza proteina specifica del frumento tenero, indicata in fig. 2 con C ed a pH isoelettrico notevolmente più acido. La valutazione quantitativa dei risultati è condotta confrontando il tracciato del campione incognito con quelli dei campioni standard evidenziati sullo stesso gel.

La valutazione quantitativa sarà tanto più accurata quanto più l'intensità di queste bande si avvicinerà all'intensità delle bande di uno dei campioni standard fra quelli della serie deposta. Tenere presente che nel caso delle paste alimentari si può avere

lo sdoppiamento della banda B e della banda 1: ciò non modifica il criterio di valutazione quantitativa.

Note:

Il metodo, che sotto il profilo qualitativo, evidenzia con certezza contenuti anche minimi di frumento tenero, dà risultati certi ripetibili dal punto di vista quantitativo per percentuali di frumento tenero, presenti nel campione non inferiori al 2%. Il metodo non consente una corretta valutazione del contenuto in frumento tenero per paste essiccate ad alta temperatura.

Il metodo descritto concorda con quello pubblicato nel supplemento ordinario della Gazzetta Ufficiale n 4 del 5 gennaio 1980 con alcune differenze dovute alle diverse caratteristiche delle piastre elettroforetiche in commercio. Inoltre alcune modifiche consentono una migliore evidenziazione delle bande ed una più rapida esecuzione.

Riferimenti bibliografici

Approvazione di metodi ufficiali di analisi dei cereali. Riconoscimento e dosaggio degli sfarinati di frumento tenero negli sfarinati di frumento duro e nelle paste alimentari mediante focalizzazione ionica. *G. U.* supplemento n. 2 al n.4 del 5/1/1980.

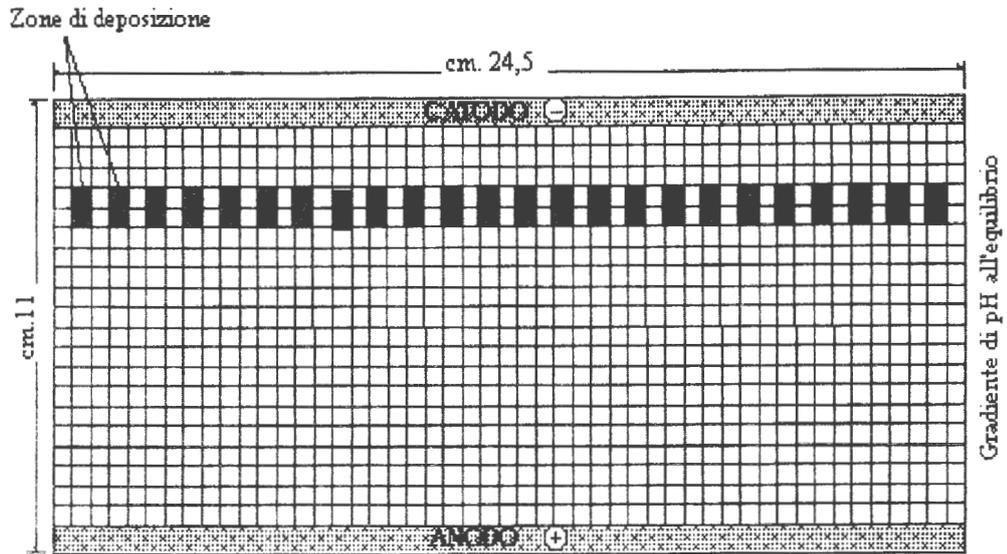


Figura 1. - Schema di sistemazione sulla piastra di poliacrilammide dei rettangoli di deposizione e delle strisce agli elettrodi.

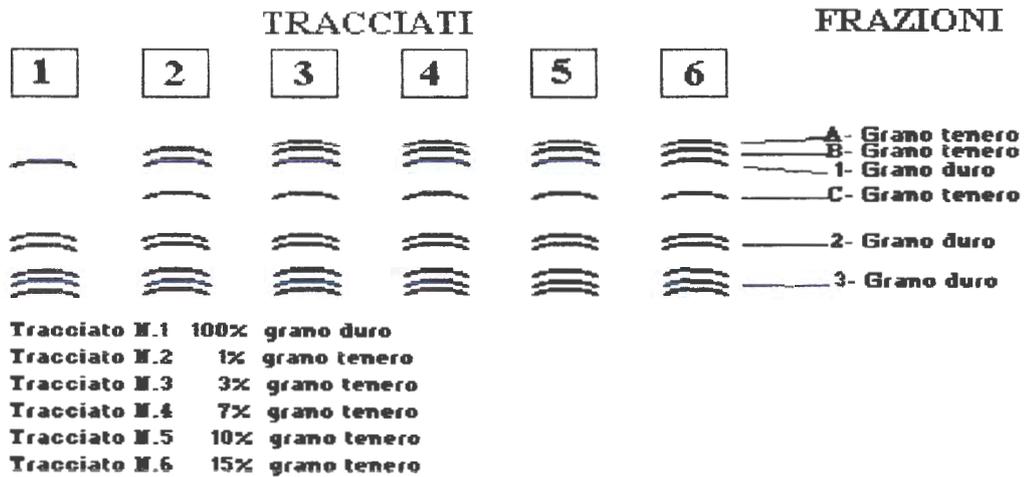


Figura 2. - Traccianti relativi a miscele standard di sfarinati di frumento duro e tenero.

**RICERCA DELLA CASEINA DI LATTE BOVINO
IN FORMAGGI PRODOTTI CON LATTE DI PECORA**

Metodo elettroforetico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ai formaggi freschi e stagionati prodotti con latte di pecora per l'individuazione della caseina di latte vaccino.

2. Metodo

Per l'esecuzione del metodo procedere come indicato nella Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee L 74 del 20/03/92 - Metodo di riferimento per individuare la caseina di latte bovino in formaggi prodotti con latte di pecora.

* Luciana Del Giovine

**RICERCA DEL LATTE VACCINO
NELLA MOZZARELLA DI BUFALA**

Metodo elettroforetico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alla mozzarella di bufala per identificare e dosare l'aggiunta di latte vaccino.

2. Metodo

Per l'esecuzione del metodo procedere come indicato nella Gazzetta Ufficiale Italiana n. 160 dell' 11/7/94 - Riconoscimento e dosaggio del latte vaccino nella Mozzarella di bufala per elettroforesi della caseina del formaggio.

* Luciana Del Giovine

AMINOACIDI LIBERI

Metodo per HPLC*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti i prodotti destinati ad una alimentazione particolare, al vino, ai succhi di frutta e alle bibite analcoliche contenenti il 12% di succo di frutta.

2. Principio del metodo

Gli aminoacidi liberi sono estratti in soluzione acida, dopo precipitazione delle proteine e dei peptidi con acido solfosalicilico. Gli aminoacidi sono determinati mediante HPLC previa derivatizzazione con fluoroenilmetilcloroformiato (FMOC) e rilevazione in fluorescenza o con U.V. Il metodo è applicabile anche per la determinazione di aminoacidi aggiunti.

3. Reattivi

- 3.1 *Acido cloridrico 0.1N*
- 3.2 *Soluzione di acido solfosalicilico al 10% (m/v)*
- 3.3 *Acetone anidro*
- 3.4 *Alcool metilico per HPLC*
- 3.5 *Acetonitrile per HPLC*
- 3.6 *Pentano*
- 3.7 *Acetato di etile*
- 3.8 *Acido fosforico 85%*
- 3.9 *Tampone bicarbonato 0.2 N pH 7.8-8.0.* - In un matraccio tarato da 1000 ml solubilizzare 16.8 g di bicarbonato di sodio, aggiustare il pH con HCl 1N e portare a volume.
- 3.10 *Soluzione standard di aminoacidi (0.5 μ moli/ml di ciascun aminoacido).* - Soluzione in sodio citrato 0.2N pH 2.2 (Sigma o equivalente).
- 3.11 *Soluzione di standard interno di β -tienilalanina (0.5 μ moli/ml) in tampone bicarbonato (3.9)*
- 3.12 *Soluzione di lavoro di aminoacidi (10 nmoli/ml di ciascun aminoacido).* - In un matraccio tarato da 50 ml introdurre 1ml della soluzione standard di aminoacidi (3.10) e 1 ml della soluzione di standard interno (3.11) e portare a volume con il tampone bicarbonato (3.9).

* Brunella Carratù

- 3.13 *Soluzione di 9-fluoroenilmetilcloroformiato (FMOC-Cl) 8 mM in acetone anidro.* - La soluzione si conserva a + 4 °C per 1 settimana.
- 3.14 *Soluzione estraente.* - Pentano (3.6)-acetato di etile (3.7) 80:20
- 3.15 *Tampone sodio citrato 0.015 M/ tetrametilammonio cloruro 0.010 M pH 3.3.* - In un matraccio tarato da 1000 ml solubilizzare 5.8 g di citrato trisodico biidrato ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) e 0.5 g di cloruro di tetrametilammonio $(CH_3)_4NCl$, aggiustare il pH con acido fosforico (3.8) e portare a volume.
- 3.16 *Tampone sodio citrato 0.015 M/ tetrametilammonio cloruro 0.010 M pH 4.3.* - In un matraccio tarato da 1000 ml solubilizzare 5.8 g di citrato trisodico biidrato ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) e 0.5 g di cloruro di tetrametilammonio $(CH_3)_4NCl$, aggiustare il pH con acido fosforico (3.8) e portare a volume.
- 3.17 *Fase mobile*
 A) Tampone sodio citrato pH 3.3 (3.15) - alcool metilico (3.4) 90:10
 B) Tampone sodio citrato pH 4.3 (3.15) - alcool metilico (3.4) 90:10
 C) Acetonitrile (3.5).

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Filtri a membrana da 0.45 μm o centrifuga a 12.000 giri/minuto*
- 4.2 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione, munito di autocampionatore*
- 4.3 *Rivelatore fluorimetrico.* - Lunghezza d'onda di eccitazione 265 nm e di emissione 340 nm
- 4.4 *Rivelatore U.V.* - Lunghezza d'onda 265 nm
- 4.5 *Forno termostato per colonne*
- 4.6 *pH-metro*
- 4.7 *Colonna HPLC C18 Aminotag Varian 15 cm x 4 mm o equivalente*
- 4.8 *Bilancia analitica*

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione.* - Per campioni con matrici proteiche pesare esattamente 3-5 g di campione o, nel caso di campioni liquidi, pipettare 20-30 ml in un matraccio tarato da 50 ml e portare a volume con acido cloridrico (3.1); agitare per 15 minuti, quindi aspettare che il sedimento si depositi. Aggiungere a 20 ml del surmatante 5 ml di acido solfosalicilico (3.2), agitare per 5 minuti e quindi filtrare. Diluire con tampone bicarbonato (3.9) la soluzione campione, aggiungendo contemporaneamente una quantità idonea di standard interno (3.11) in modo da avere una concentrazione finale di detto standard uguale a quella presente nella soluzione di lavoro di aminoacidi (3.12). Nell'effettuare la diluizione del campione è opportuno che anche la concentrazione dei singoli aminoacidi in esame sia resa il più possibile simile a quella della soluzione di lavoro (3.12). Filtrare o centrifugare (4.1) la soluzione.

Nel caso di prodotti semplici ,contenenti solo aminoacidi liberi, omettere la fase di precipitazione con acido solfosalicilico (3.2).

- 5.2 *Derivatizzazione precolonna con FMOC.* - Nell'apposita bottiglietta dell'autocampionatore introdurre 20 µl della soluzione da sottoporre alla derivatizzazione [soluzione campione o soluzione di lavoro di aminoacidi (3.12)]. Le successive operazioni sono eseguite dall'autocampionatore, precedentemente programmato, compresa la fase di miscelazione dopo ciascuna addizione: aggiungere 20 µl di soluzione di FMOC (3.13) e dopo 10 minuti esatti 60 µl di soluzione estraente (3.14). Dopo 1 minuto si ha l'iniezione automatica della soluzione nel loop tarato da 10 µl del sistema cromatografico.
- 5.3 *Determinazione per HPLC.* - L'analisi è condotta mediante un cromatografo liquido ad alta risoluzione (4.2) utilizzando una colonna C18 (4.7) termostata a 32°C (4.5) e le seguenti condizioni operative :

Tempo di analisi: 58.5 minuti

Gradiente di eluizione :

Tempo (min.)	Fase mobile			Flusso (ml/min.)
	%A	%B	%C	
0	75	0	25	1.0
32.0	49	0	51	1.0
32.5	2	50	48	1.0
40.0	5	46	49	1.2
55.5	0	25	75	1.2

Rivelazione: UV (4.4) per il triptofano, Fluorimetro (4.3) o UV per tutti gli altri.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto dei singoli aminoacidi del campione, espresso in milligrammi per 100 g o per 100 ml, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Aminoacido (mg / 100 g o 100 ml)} = \frac{CS \times AC \times 25 \times 50 \times 100}{AS \times 20 \times P} \times FC$$

dove:

AC = area aminoacido nel campione

AS = area aminoacido nello standard

CS = concentrazione aminoacido nella soluzione standard (mg/ml) prima della derivatizzazione

P = g o ml di campione utilizzati per l'analisi

FC = fattore di correzione (area della β -tienilalanina della soluzione di lavoro/area della β -tienilalanina del campione).

Riferimenti bibliografici

DE SANTIS, D. CARRATÙ, B. CONTINI, M. BOCCA, A. ANELLI, G. Characterization of caciotta blended cheese from Latium. V. Study of the nitrogenous fraction. *Agr. Med.* 1993, 123: 101-105.

EINARSSON, S, JOSEFSSON, B. LAGERKWIST, S. Determination of amino-acids with 9-fluorenylmethylchloroformate and reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1983, 282: 609-612.

EINARSSON, S. Selective determination of secondary amino acids using precolumn derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate and reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1985, 348: 213-220.

FUROSINA

Metodo per HPLC*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile al latte crudo o trattato termicamente, alla mozzarella ed a tutti gli altri formaggi a pasta filata.

2. Metodo

Per l'esecuzione del metodo procedere come indicato nella Gazzetta Ufficiale n. 69 del 23/03/1994 - Determinazione di un valore massimo di furosina per il formaggio mozzarella e per gli altri formaggi freschi a pasta filata.

* Luciana Del Giovine

LIPIDI

SOSTANZE GRASSE TOTALI

Metodo Soxhlet

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti quei prodotti le cui materie grasse possono essere completamente estratte senza idrolisi preliminare.

Il metodo è utilizzabile anche per la determinazione dell'estratto etero nelle paste all'uovo impiegando al posto dell'etere di petrolio, etere etilico.

2. Principio del metodo

Il campione è estratto con etere di petrolio. Il solvente viene eliminato ed il residuo viene essiccato e pesato.

3. Reattivi

3.1 *Etere di petrolio 40 °C - 60 °C*

3.2 *Solfato di sodio anidro*

3.3 *Quarzo in polvere*

4. Apparecchiatura

4.1 *Estrattore Soxhlet.* - La portata del riflusso deve essere regolata in modo da ottenere almeno dieci cicli l'ora.

4.2 *Ditali da estrazione*

4.3 *Stufa termostata a pressione atmosferica o da vuoto*

4.4 *Evaporatore rotante*

4.5 *Essiccatore*

4.6 *Bilancia analitica*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione.* - Pesare 5 g di campione nel ditale da estrazione, aggiungere una uguale quantità di solfato di sodio anidro (3.2) e mescolare con una bacchetta di vetro.

Per campioni ad alto tenore di umidità pesare 5g di campione nel ditale da estrazione ed aggiungere circa 5 g di quarzo (3.3) ed altrettanti di sodio solfato

anidro (3.2). Mescolare con una bacchetta di vetro, porre ditale e bacchetta in un becher ed essiccare in stufa a 125°C per un'ora e mezza.

- 5.2 *Estrazione.* - Pulire accuratamente la bacchetta con un tampone di cotone sgrassato e con esso coprire il campione. Porre il ditale in un estrattore Soxhlet ed estrarre per 6-8 ore con etere di petrolio (3.1). Raccogliere l'estratto in un pallone essiccato contenente qualche pallina di vetro e tarato. Eliminare il solvente per distillazione con evaporatore rotante ed essiccare il residuo in stufa a 100 °C a pressione atmosferica o a 75 °C sotto vuoto per un'ora e mezza. Lasciar raffreddare in un essiccatore e pesare. Ripetere l'operazione fino a peso costante.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di sostanze grasse totali del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Sostanze grasse totali (g / 100g)} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

dove:

A = peso in grammi del pallone contenente la materia grassa estratta

B = peso in grammi del pallone

C = peso in grammi del campione utilizzati per l'analisi

Riferimenti bibliografici

Modifica ai metodi di analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per animali. Determinazione delle sostanze grasse gregge. *G. U. CEE* L15/29 del 18.1.1984

Method 960.39 Fat (crude) or ether extract in meat. In *Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemists (AOAC)* 15. Ed., K. Helrich (Ed.), Arlington (Virginia), 1990.

Method 920.85 Fat (crude) or ether extract in flour. In *Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemists (AOAC)* 15. Ed., K. Helrich (Ed.), Arlington (Virginia), 1990.

SOSTANZE GRASSE TOTALI

Metodo con idrolisi acida

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti quei prodotti le cui materie grasse non possono essere completamente estratte senza idrolisi preliminare.

2. Principio del metodo

Metodo A. - Il campione è idrolizzato a caldo con acido cloridrico 3 N. La miscela è raffreddata e filtrata. Dopo essere stato lavato ed essiccato, il residuo è sottoposto ad estrazione in Soxhlet con etere di petrolio. Il solvente è eliminato ed il residuo essiccato e pesato.

Metodo B. - Il campione è idrolizzato a caldo con acido cloridrico al 25%. La miscela acida, addizionata di alcool etilico, è estratta con etere etilico e etere di petrolio. Il solvente è eliminato ed il residuo essiccato e pesato.

Il metodo A, che utilizza una idrolisi più blanda, è preferibile nei casi in cui sulla materia grassa estratta debba essere condotta una successiva analisi gascromatografica.

Per i campioni ad elevato contenuto lipidico, quali i formaggi, utilizzare il metodo B.

Metodo A

3A. Reattivi

3.1 *Acido cloridrico 3 N*

3.2 *Acido cloridrico 6 N*

3.3 *Coadiuvante di filtrazione.* - Farina fossile tipo Hyflosupercel

3.4 *Etere di petrolio 40 °C - 60 °C*

4A. Apparecchiatura

4.1 *Bagnomaria*

4.2 *Imbuti Buchner*

4.3 *Vetri da orologio*

- 4.4 *Ditali da estrazione*
- 4.5 *Estrattore Soxhlet.* - La portata del riflusso deve essere regolata in modo da ottenere almeno dieci cicli l'ora.
- 4.6 *Evaporatore rotante*
- 4.7 *Essiccatore*
- 4.8 *Stufa termostata a pressione atmosferica o da vuoto*
- 4.9 *Bilancia analitica*

5A. Procedimento

- 5.1A *Idrolisi.* - Per campioni solidi pesare 5-10 g di campione, introdurre in una beuta da 300 ml ed aggiungere 100 ml di acido cloridrico 3 N (3.1). Per campioni liquidi prelevare 50 ml di campione ed aggiungere 50 ml di acido cloridrico 6 N (3.2). Applicare alla beuta un refrigerante a ricadere e porla in bagno maria bollente per un'ora. Evitare che la sostanza aderisca alle pareti del recipiente. Raffreddare ed aggiungere una quantità sufficiente (almeno 5 g) di un coadiuvante di filtrazione (3.3) per evitare qualsiasi perdita di sostanza grassa durante la filtrazione. Filtrare su imbuto Buchner con un doppio filtro di carta bagnata esente da materie grasse. Lavare il residuo con acqua distillata fino a reazione neutra del filtrato. Verificare che il filtrato non contenga sostanze grasse. In caso contrario effettuare l'idrolisi acida e l'estrazione secondo il procedimento B.
- 5.2A *Estrazione.* - Porre il doppio filtro con il residuo su un vetro da orologio ed essiccare per un'ora e mezza in stufa a pressione atmosferica a 100 °C o sotto vuoto a 75 °C. Introdurre il doppio filtro con il residuo secco in un ditale da estrazione e coprire con cotone sgrassato. Porre il ditale in un estrattore Soxhlet estrarre per 6-8 ore con etere di petrolio (3.4). Raccogliere l'estratto in un pallone essiccato contenente qualche pallina di vetro e tarato. Eliminare il solvente per distillazione con evaporatore rotante ed essiccare il residuo in stufa a pressione atmosferica a 100 °C o sotto vuoto a 75 °C. per un'ora e mezza. Lasciar raffreddare in un essiccatore e pesare. Ripetere l'operazione fino a peso costante.

6A. Espressione dei risultati

Il contenuto di sostanze grasse totali del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Sostanze grasse totali (g / 100 g o 100 ml)} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

dove:

- A* = peso in grammi del pallone contenente la materia grassa estratta
- B* = peso in grammi del pallone tarato
- C* = Peso in grammi di campione utilizzati per l'analisi.

Riferimenti bibliografici

Metodi di analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per animali. Determinazione delle sostanze grasse gregge. *G. U. CEE* L 15/29 del 18/1/1984

Metodo B

Per l'esecuzione del metodo procedere come indicato nei metodi ufficiali sotto indicati.

Approvazione dei metodi ufficiali di analisi per i formaggi. Determinazione della materia grassa nel formaggio e nel formaggio fuso. *G.U.* supplemento al n.229 del 2.10.1986.

Approvazione dei metodi ufficiali di analisi dei cereali e derivati. Determinazione delle sostanze grasse totali - Metodo per idrolisi acida. *G.U.* supplemento al n.186 del 10.8.1994.

SOSTANZE GRASSE TOTALI

Metodo Röse - Gottlieb

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile al latte crudo o trattato termicamente, intero, parzialmente scremato, scremato o in polvere.

2. Principio del metodo

Il contenuto di materia grassa è determinato mediante per estrazione da una soluzione ammoniacalcolica del latte con etere etilico ed etere di petrolio, successiva evaporazione dei solventi e pesata del residuo.

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione di ammoniaca circa al 25% (m/v) di NH_3 . - Densità a 20 °C circa 0.91 g/ml.*
- 3.2 *Alcool etilico 96 % (v/v)*
- 3.3 *Etere etilico esente da perossidi.*
- 3.4 *Etere di petrolio distillato tra 30 °C -60 °C.*
- 3.5 *Miscela, in volumi uguali, di etere di petrolio ed etere etilico. - Preparare poco prima dell'analisi.*

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Bilancia analitica*
- 4.2 *Stufa termostata*
- 4.3 *Essiccatore*
- 4.4 *Evaporatore rotante*

5. Procedimento

- 5.1 *Prova in bianco. - Contemporaneamente alla determinazione sul campione, effettuare una prova in bianco con 10 ml di acqua distillata operando come descritto a partire dal paragrafo 5.3, escludendo l'aggiunta del campione. Se il risultato della prova in bianco supera 0.5 mg è necessario verificare i reattivi sostituendo quelli eventualmente impuri.*

5.2 *Determinazione.* - Deporre in un pallone da evaporazione due o tre perle di vetro ed essiccare in stufa per circa una ora.

Lasciare raffreddare in essiccatore e pesare con la precisione di 0.1 mg. Pesare in un cilindro da 100 ml con tappo, con l'approssimazione di 1 mg, 10-11 g di latte liquido o 1 g di latte intero in polvere o 1.5 g di latte parzialmente o totalmente scremato in polvere. Nel caso dei latti in polvere aggiungere 10 ml di acqua ed agitare fino alla totale dispersione della polvere di latte.

Aggiungere 1.5 ml di soluzione di ammoniaca al 25% (3.1) o un volume equivalente di una soluzione più concentrata e mescolare accuratamente. Per i latti in polvere scaldare a bagnomaria per 15 minuti a 60 - 70 °C agitando di tanto in tanto ed infine raffreddare.

Aggiungere 10 ml di alcool etilico (3.2) e mescolare lentamente senza tappare.

Aggiungere 25 ml di etere etilico (3.3), tappare ed agitare energicamente per circa 1 minuto.

Togliere il tappo con precauzione, aggiungere 25 ml di etere di petrolio (3.4) usando i primi ml per lavare il tappo ed il collo del cilindro facendo sgocciolare all'interno il solvente. Chiudere con il tappo ed agitare rovesciando più volte il cilindro per 30 secondi.

Lasciare a riposo finché lo strato superiore divenga limpido e si separi nettamente.

Togliere il tappo, lavarlo insieme al collo del cilindro, con alcuni ml della miscela dei solventi (3.5) lasciandoli sgocciolare nel cilindro stesso. Travasare con cura, il più completamente possibile, lo strato superiore nel pallone precedentemente tarato.

Lavare con alcuni ml della miscela (3.5) il collo del cilindro sia all'interno, facendo ricadere il solvente nel cilindro stesso che all'esterno facendo ricadere il solvente nel pallone tarato.

Procedere ad una seconda estrazione ripetendo le operazioni descritte a partire dall'aggiunta dei solventi, utilizzando però soltanto 15 ml di etere etilico (3.3) e 15 ml di etere di petrolio (3.4).

Effettuare una terza estrazione senza effettuare il lavaggio finale.

Allontanare con cura per distillazione la maggior parte del solvente.

Scaldare il pallone per circa 1 ora in stufa a 102 °C.

Far raffreddare il pallone a temperatura ambiente e pesare con l'approssimazione di 0.1 mg.

Ripetere le ultime due operazioni scaldando per 30 minuti ogni volta, fino a peso costante.

In alternativa l'estrazione può essere condotta utilizzando un imbuto separatore anziché un cilindro.

6. **Espressione dei risultati**

Il contenuto di sostanze grasse del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Sostanze grasse totali (g / 100 g)} = \frac{(M_1 - M_2) - (B_1 - B_2)}{S} \times 100$$

dove:

M_1 = peso in grammi del pallone M contenente la materia grassa dopo l'operazione 5.2

M_2 = peso in grammi del pallone M (vuoto) dopo essiccamento dello stesso.

B_1 = peso in grammi del pallone B della prova in bianco dopo l'operazione 5.2

B_2 = peso in grammi del pallone B (vuoto) dopo essiccamento dello stesso.

S = Aliquota di campione in grammi utilizzata per l'analisi.

Riferimenti bibliografici

Determinazione del tenore in materia grassa del latte. *Norma Internazionale FIL-IDF 1A*: 1969.

Determinazione del tenore in materia grassa dei latti in polvere. *Norma Internazionale FIL-IDF 9A*: 1969.

ACIDI GRASSI

Metodo gascromatografico

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti compresi quelli destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

La sostanza grassa, opportunamente estratta dal campione, è sottoposta a transesterificazione e gli esteri metilici degli acidi grassi, così ottenuti, sono analizzati per gascromatografia.

3. Procedimento

- 3.1 *Estrazione della sostanza grassa.* - Estrarre la sostanza grassa dal campione utilizzando una delle metodiche riportate sotto la voce Sostanze grasse totali (ad eccezione del Metodo con idrolisi acida - Procedimento B), omettendo la fase di essiccamento dell'estratto.
- 3.2 *Preparazione degli esteri metilici.* Procedere come indicato nei punti **A** o **B** in base al tipo di acidi grassi presenti nel campione.
 - A** Prodotti contenenti acidi grassi inferiori a C₁₂
Procedere come indicato nella Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea L 248. Procedimenti B e C, oppure in alternativa secondo i metodi di seguito riportati:
 - A1. Acidi grassi nel burro
 - A2. Acido linoleico nei prodotti destinati ad una alimentazione particolare
 - B** Prodotti contenenti acidi grassi superiori a C₁₂
Procedere come indicato nella Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea L 248 oppure in alternativa secondo il metodo di seguito riportato:
 - B. Acidi grassi negli oli-Metodo rapido.
- 3.3 *Analisi gascromatografica.* - Procedere come indicato nella Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea L 248 e per quanto riguarda la determinazione degli isomeri trans secondo quanto indicato nella Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea L 150.

Riferimenti bibliografici

Regolamento CEE relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e di sansa d'oliva nonchè ai metodi ad essi attinenti. Preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi. *G.U. CEE L 248* del 5.9.1991.

Regolamento CEE relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e di sansa d'oliva nonchè ai metodi ad essi attinenti. Analisi gascromatografica degli esteri metilici degli acidi grassi. *G.U. CEE L 248* del 5.9.1991.

Modifica al Regolamento CEE relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e di sansa d'oliva nonchè ai metodi ad essi attinenti. *G.U. CEE L 150* del 2.6.1992.

A1. ACIDI GRASSI NEL BURRO*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile al burro.

2. Principio del metodo

La sostanza grassa, deacquificata, è sottoposta a transesterificazione in fiala chiusa con metilato sodico, a caldo.

3. Reattivi

- 3.1 *Metilato sodico.* - Soluzione all'1.5% in metanolo preparata sciogliendo 0.5g di sodio metallico in 100 ml di metanolo anidro. Il prodotto è reperibile, già preparato, in commercio.
- 3.2 *Sodio solfato anidro.*
- 3.3 *n-pentano*

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Fiala di vetro da 5 ml sigillabile a caldo.*
- 4.2 *Stufa termostata*
- 4.3 *Provetta Sovirel con tappo a vite*
- 4.4 *Bagnomaria termostato*
- 4.5 *Gascromatografo per colonne capillari con rivelatore a ionizzazione di fiamma.*
- 4.6 *Colonna capillare in silice fusa.* - Avente un diametro interno da 0.25 mm a 0.32 mm ed una lunghezza di almeno 50 m, ricoperta di cianopropilsilicone di spessore compreso tra 0.2 e 0.3 mm (tipo SP 2340, SP 2380, CP sil 88, Silar 10 e simili).

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione.* - Introdurre in un becker un quantitativo di campione adeguato e fondere a bagnomaria. Lasciare separare la fase acquosa e filtrare decantando su filtro di carta contenente sodio solfato anidro (3.2).
- 5.2 *Transesterificazione.* - Prelevare 2 ml di grasso ed introdurli nella fiala. Aggiungere 0.4 ml di reattivo metilante (3.1) e sigillare la fiala alla fiamma.

* Mirella Delise

Mettere in stufa a 104 °C per almeno 4 ore. Aprire la fiala e trasferire la fase superiore del contenuto in una provetta Sovirel con tappo a vite.

Diluire, se necessario, con pochi ml di n-pentano (3.3).

Iniettare nel gascromatografo da 0.5 ad 1 µl del contenuto della provetta.

- 5.3 *Analisi gascromatografica.* - Per quanto riguarda le condizioni operative gascromatografiche, essendo queste correlate al tipo di strumentazione ed alla colonna adottata, devono essere trovate sperimentalmente in modo tale da ottenere una separazione soddisfacente degli acidi grassi presenti nel campione.

A scopo indicativo si riportano le seguenti condizioni operative:

temperatura iniziale della colonna	60 °C
temperatura finale della colonna	195 °C
incremento della temperatura	7 °C/minuto
isoterma iniziale	7 minuti
isoterma finale	20 minuti
temperatura iniettore	250 °C
temperatura rivelatore	250 °C

6. Espressione dei risultati

Per una valutazione quantitativa utilizzare il metodo della normalizzazione interna procedendo alla correzione delle aree dei singoli picchi, utilizzando i fattori di correzione ottenuti iniettando al gascromatografo una miscela standard degli acidi grassi presenti nella composizione del burro.

Riferimenti bibliografici

Regolamento CEE relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti. Preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi. *G.U. CEE L 248 del 5.9.1991.*

Modifica al Regolamento CEE relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti. *G.U. CEE L 150 del 2.6.1992.*

A2. ACIDO LINOLEICO NEI PRODOTTI DESTINATI AD UNA ALIMENTAZIONE PARTICOLARE*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ai prodotti destinati ad una alimentazione particolare. La metodica è utilizzabile anche per quantificare acidi grassi diversi dall'acido linoleico e per determinare la composizione percentuale degli acidi grassi (omettendo l'aggiunta dello standard interno) anche in altre matrici alimentari.

2. Principio del metodo

La sostanza grassa estratta è sottoposta a transesterificazione in fiala chiusa con acido cloridrico-metanolo in presenza di uno standard interno e di un antiossidante.

3. Reattivi

- 3.1 *Acido cloridrico gassoso in metanolo 3 N*
- 3.2 *Alcool metilico*
- 3.3 *Soluzione allo 0.1% di idrochinone in metanolo anidro.* - Preparare al momento dell'uso
- 3.4 *Soluzione al 2% di acido cloridrico in metanolo contenente lo 0.01% di idrochinone.* - Prelevare 2 ml della soluzione (3.1), aggiungere 1 ml della soluzione (3.3) e portare a volume in un matraccio tarato da 10 ml con alcool metilico.
- 3.5 *Soluzione al 2% di sodio bicarbonato*
- 3.6 *Esano per gascromatografia*
- 3.7 *Solfato di sodio anidro*
- 3.8 *Soluzione standard di trieptadecanoina.* - Solubilizzare, in un matraccio tarato da 10 ml, 150 mg di trieptadecanoina in cloroformio e portare a volume.

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Evaporatore rotante*
- 4.2 *Fiala di vetro a pareti robuste tipo penicillina da circa 20 ml, munita di setto teflonato e tappo metallico*
- 4.3 *Blocco termostato*
- 4.4 *Gascromatografo per colonne capillari munito di rivelatore a ionizzazione di fiamma*

* Stefania Giammarioli

- 4.5 *Colonna capillare polare in silice fusa* (es. polietilenglicol, cianopropil o cianopropilfenilsilicone ecc.). - Diametro interno di 0.2 - 0.8 mm e lunghezza 25 - 30 m
- 4.6 *Bilancia analitica*

5. Procedimento

- 5.1 *Estrazione della sostanza grassa.* - Estrarre la sostanza grassa dal campione secondo una delle metodiche riportate sotto la voce Sostanze grasse totali ad eccezione del Metodo con idrolisi acida- Procedimento B. Concentrare l'estratto ottenuto dopo eventuale lavaggio con acqua fino a neutralità, ad una temperatura massima di 40 °C, trasferire quantitativamente con etere di petrolio in un matraccio tarato da 25 ml filtrando su solfato di sodio anidro (3.7) e portare a volume.
- 5.2 *Transesterificazione.* - Prelevare un volume di estratto corrispondente a circa 0.2 g di sostanza grassa e porlo nella fiala. Aggiungere, come standard interno, un idoneo volume della soluzione di trieptadecanoina in cloroformio (3.8). La quantità di acido eptadecanoico aggiunta ($\text{mg trieptadecanoina} \times 0.995 = \text{mg acido eptadecanoico}$) deve essere circa equivalente a quella di acido linoleico presente nel campione in fiala. Portare a secco sotto azoto riscaldando ad una temperatura non superiore a 40 °C, aggiungere 2 ml della soluzione di acido cloridrico - metanolo (3.4), chiudere la fiala e porla nel blocco termostato a 100 °C per 2 ore e mezza. Raffreddare ed introdurre nella fiala attraverso il setto, mediante una siringa, 2 ml della soluzione di sodio bicarbonato (3.5) e 2 ml di esano (3.6). Agitare, lasciar separare le fasi ed iniettare una opportuna aliquota nel gascromatografo.
- 5.3 *Analisi gascromatografica.* - Per quanto riguarda le condizioni operative gascromatografiche, essendo correlate alle caratteristiche del gascromatografo e della colonna adottata, devono essere scelte sperimentalmente in modo da ottenere una separazione soddisfacente degli acidi grassi presenti nel campione. A scopo indicativo vengono riportate le seguenti condizioni operative :
- Colonna capillare: Omegawax 320, 30 m, 0.32 mm d.i.
 - Carrier gas: elio 1.2 ml/min
 - Temperatura della colonna : programmata da 65 a 200°C
 - Temperatura iniettore: 250°C
 - Temperatura rivelatore (FID): 250°C
 - Split 1:50

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di acido linoleico del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Acido linoleico (g/100 g o 100 ml)} = \frac{(A \times FC) \times P \times 25 \times 100}{B \times V \times G}$$

dove:

- A* = area del picco dell'acido linoleico
FC = fattore di correzione dell'acido linoleico rispetto all'acido eptadecanoico
P = g di acido eptadecanoico in fiala
B = area del picco dell'acido eptadecanoico
V = volume di estratto lipidico introdotto in fiala in ml
G = g o ml di campione impiegati nella preparazione dell'estratto lipidico

Il fattore di correzione dell'acido linoleico deve essere verificato periodicamente analizzando soluzioni standard degli esteri metilici degli acidi linoleico e eptadecanoico e calcolato in base alla seguente formula:

$$FC = \frac{AR \times C}{CR \times A}$$

dove:

- AR* = area del picco dell'acido eptadecanoico
A = area del picco dell'acido linoleico
CR = concentrazione dell'acido eptadecanoico
C = concentrazione dell'acido linoleico.

Riferimenti bibliografici

Regolamento CEE relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e di sansa d'oliva nonchè ai metodi ad essi attinenti. Preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi. *G.U. CEE* L 248 del 5.9.1991.

BELLOMONTE, G. GIAMMARIOLI, S. TERILLI, R. Quantitative determination of linoleic acid in infant formulas. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 1990, 61: 91-97.

B. ACIDI GRASSI DEGLI OLI (Metodo rapido)*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli oli per una rapida preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi.

2. Principio del metodo

Metilazione a freddo degli acidi grassi in provetta.

3. Reattivi

- 3.1 *Metilato sodico.* - Soluzione all' 1.5% in metanolo preparata sciogliendo 0.5 g di sodio metallico in 100 ml di metanolo anidro. Il prodotto è reperibile, già pronto, in commercio.
- 3.2 *n-pentano.*

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Provette Sovirel con tappo a vite.*
- 4.2 *Agitatore Vortex*

5. Procedimento

Introdurre circa 200 mg di olio nella provetta Sovirel ed aggiungere 3 ml di n-pentano (3.2).

Agitare per circa un minuto con l'agitatore Vortex ed aggiungere 0.25 ml di metilato sodico. Agitare per un minuto con il Vortex. Lasciare stratificare per circa 5 minuti ed iniettare la fase superiore al gascromatografo procedendo come indicato al punto 3.3 del metodo - Acidi grassi.

* Mirella Delise

STEROLI

Metodo gascromatografico (A)*

Metodo gravimetrico (B)**

1. Campo di applicazione

- 1.1 *Metodo A.* - Il metodo è applicabile agli oli, ai grassi vegetali e alla sostanza grassa totale estratta dai prodotti da forno.
- 1.2 *Metodo B.* - Il metodo è applicabile alle paste alimentari all'uovo.

2. Principio del metodo e procedimento

- 2.1 *Metodo A.* - La sostanza grassa, addizionata di standard interno, è saponificata con idrossido di potassio in soluzione etanolica, quindi l'insaponificabile è estratto con etere etilico. Dall'insaponificabile estratto la frazione sterolica è separata mediante TLC su silice basica; gli steroli recuperati dal gel di silice sono trasformati in trimetilsilileteri ed analizzati mediante gascromatografia in colonna capillare.
Operare come riportato sulla Gazzetta Ufficiale supplemento n° 4 al n° 86 del 10/08/1994 - Approvazione dei metodi ufficiali di analisi dei cereali e derivati. Determinazione del contenuto in steroli nelle paste alimentari preparate con aggiunta di uova.
- 2.2 *Metodo B.* - L'insaponificabile ottenuto dalla pasta all'uovo è estratto con acetone, e gli steroli, precipitati dall'estratto acetone con digitonina, sono determinati per pesata come digitonide.
Operare come riportato sulla Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea L 248 del 05/09/1991 - Regolamento CEE relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti.

* Mauro Di Pasquale (A)

** Roberta Onori (B)

COMPOSTI POLARI

Metodo cromatografico-gravimetrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile agli oli ed ai grassi di frittura (vedi nota).

2. Principio del metodo

I composti polari dell'olio e del grasso in esame sono separati per cromatografia su colonna dai composti non polari. Il contenuto dei composti polari è calcolato per differenza tra il peso del campione introdotto su colonna e quello dei composti non polari presenti nella frazione eluita.

3. Reattivi

- 3.1 *Etere di petrolio (40 °C-60 °C) per cromatografia, ridistillato*
- 3.2 *Etanolo al 95% (v/v)*
- 3.3 *Cloroformio puro*
- 3.4 *Etere dietilico esente da perossidi*
- 3.5 *Acido acetico anidro*
- 3.6 *Solvente di eluizione.* - Miscelare etere di petrolio ed etere dietilico in rapporto 87:13
- 3.7 *Solvente di sviluppo.* - Miscelare etere di petrolio, etere dietilico ed acido acetico in rapporto 70:30:2 (v/v/v)
- 3.8 *Gel di silice 0.063-0.200 mm (70-230 mesh) Merk n.7734 o l'equivalente.* - Porre il gel di silice in un disco di porcellana, seccare in stufa a 160 °C per almeno 4 ore e raffreddare a temperatura ambiente in essiccatore. Portare il gel ad un tenore di umidità del 5% ponendo 152 g di gel di silice in una beuta da 500 ml ed aggiungendo 8 g di acqua. Chiudere la beuta con un tappo ed agitare tramite agitatore meccanico in nota 2.
- 3.9 *Acido fosfomolibdico in soluzione di etanolo, 100 g/l.*
- 3.10 *Sabbia di mare purificata per calcinazione acida.*

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Colonna cromatografica in vetro.* - Diametro interno 21mm, lunghezza 450 mm con rubinetto e giunti in vetro smerigliato.

* Mauro Di Pasquale

- 4.2 *Imbuto separatore da 250 ml con giunto in vetro smerigliato da adattare alla colonna.*
- 4.3 *Pipette capillari da 2 μ l per cromatografia su strato sottile.*
- 4.4 *Lastre di gel di silice per cromatografia su strato sottile. - 20x20 cm (senza indicatore di fluorescenza), spessore 0.25 mm.*
- 4.5 *Vasca di sviluppo in vetro per cromatografia su strato sottile con coperchio.*
- 4.6 *Spruzzatore per cromatografia su strato sottile.*
- 4.7 *Dischi di porcellana di circa 20 cm di diametro.*
- 4.8 *Stufa termostata.*
- 4.9 *Bagnomaria.*
- 4.10 *Essiccatore con gel di silice.*
- 4.11 *Evaporatore rotante.*
- 4.12 *Agitatore meccanico.*

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione. - Omogeneizzare il campione e filtrare usando, se è presente acqua, carta da filtro idrofoba. Per campioni semiliquidi o solidi, riscaldare a temperatura leggermente superiore al punto di fusione, senza surriscaldare.*
- 5.2 *Preparazione della colonna. - Riempire la colonna con circa 30 ml di solvente di eluizione (3.6), introdurre un batuffolo di cotone nella parte inferiore con l'aiuto di una bacchetta di vetro e rimuovere l'aria facendo pressione sul cotone. Sospendere, in un becker, 25 g di gel di silice (3.8) in 80 ml di solvente di eluizione (3.6) e versare, tramite imbuto, in colonna lavando quest'ultima con pochi ml dello stesso solvente (3.6).
Aprire il rubinetto facendo defluire il solvente in un altro becker finché il livello del solvente in colonna sia di circa 10 cm sopra il gel di silice.
Livellare la superficie di quest'ultimo battendo delicatamente la colonna ed aggiungere circa 4 g di sabbia (3.10) facendo poi defluire il solvente fino al livello dello strato sabbioso.*
- 5.3 *Cromatografia su colonna. - Per la determinazione dei composti polari è necessario conoscere solamente la frazione non polare ma se l'efficienza del frazionamento è valutata per cromatografia su strato sottile o per recupero del campione sono necessarie sia la frazione polare che non polare.
Pesare con approssimazione di 0.001 g, 2.5 ± 0.1 g di campione preparato come nel punto 5.1, in un pallone tarato da 50 ml.
Sciogliere in circa 20 ml di solvente di eluizione (3.6) scaldando leggermente.
Raffreddare a temperatura ambiente e portare a volume con lo stesso solvente (3.6).
Introdurre, tramite pipetta tarata, 20 ml di questa soluzione nella colonna preparata come nel punto 5.2.*

Seccare due palloni da 250 ml in stufa a 103 ± 2 °C; lasciare raffreddare a temperatura ambiente e pesare con l'approssimazione di 0.001g. Porre uno sotto l'uscita della colonna, aprire il rubinetto e far defluire la soluzione fino al livello dello strato di sabbia.

Eluire i composti non polari con 150 ml del solvente di eluizione (3.6) usando un imbuto separatore posto sopra la colonna e regolando il flusso in modo che 150 ml passino in colonna in 60-70 minuti. Dopo l'eluizione lavare la superficie del letto di silice con il solvente di eluizione (3.6).

Se sono richiesti i composti polari, eluirli in un secondo pallone da 250 ml essiccato, con 150 ml di solo etere etilico (3.4) come già descritto.

Rimuovere il solvente con l'aiuto di un evaporatore rotante usando un bagnomaria a temperatura non superiore a 60 °C. Evitare perdite dovute a formazione di schiuma. Completare l'evaporazione sotto azoto e pesare il pallone.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di composti polari del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Composti polari (g/100 g)} = \frac{m - m^1}{m} \times 100$$

dove:

m^1 = massa in g della frazione non polare

m = massa in g del campione contenuto in 20 ml della soluzione aggiunta in colonna.

Nota

I componenti polari comprendono sostanze polari come: monogliceridi, digliceridi, acidi grassi liberi presenti in grassi tal quali o formati durante la frittura o il riscaldamento.

I composti non polari sono prevalentemente trigliceridi tal quali.

Per i grassi contenenti piccole quantità di composti polari il quantitativo di campione messo in colonna può essere portato da 1 a 2 g.

L'efficienza del frazionamento può essere valutata per cromatografia su strato sottile. Per effettuare tale prova preparare delle soluzioni, al 10% in cloroformio, delle sostanze e fare deposizioni puntiformi di 2 µl su lastra usando pipette capillari. Disporre all'interno della vaschetta di sviluppo della carta da filtro per favorire la saturazione. Porre la lastra nella vaschetta a far sviluppare con il solvente di sviluppo.

Quando il fronte del solvente si trova a circa 15 cm dal bordo superiore della lastra rimuovere quest'ultima lasciandola asciugare all'aria.

Spruzzare la lastra con una soluzione di acido fosfomolibdico.

Quando la lastra è completamente asciutta scaldarla in stufa 120-130 °C.

Riferimenti bibliografici

Oli e grassi impiegati per friggere alimenti. Determinazione dei composti polari in oli e grassi di frittura. *Ministero Sanità*, Circolare n. 1 del 11/1/1991.

CARBOIDRATI

CARBOIDRATI SINGOLI O IN MISCELA

Metodo per cromatografia ionica*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ai prodotti destinati ad una alimentazione particolare.
Il metodo è stato messo a punto per le matrici indicate, ma risulta applicabile anche ad altre matrici alimentari.

2. Principio del metodo

Il campione è sottoposto a chiarificazione con i reattivi di Carrez. I carboidrati (zuccheri e/o polialcoli) sono dosati sul filtrato mediante cromatografia ionica con rivelatore amperometrico pulsato.

3. Reattivi

Tutte le soluzioni debbono essere preparate utilizzando acqua distillata e deionizzata 18 Mohm filtrata su filtri a membrana da 0.22 μm .

- 3.1 *Soluzione Carrez 1.* - Solubilizzare 119 g di acetato di zinco biidrato e 15 g di acido acetico glaciale in un matraccio tarato da 500 ml e portare a volume.
- 3.2 *Soluzione Carrez 2.* - Solubilizzare 53 g di ferrocianuro di potassio in un matraccio tarato da 500 ml e portare a volume.
- 3.3 *Sodio idrato al 50%.* - Preparare utilizzando acqua esente da carbonati (bollita e deareata)
- 3.4 *Soluzione eluente sodio idrato 150 mM.* - Preparare, al momento dell'uso, diluendo la soluzione concentrata (3.3) con acqua esente da carbonati (bollita e deareata).
- 3.5 *Soluzioni acquose standard di zuccheri e polialcoli 1-3%.* - Glucosio, fruttosio, lattosio, saccarosio, sorbitolo, xilitolo, mannitolo, maltitolo, isomalto.

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Agitatore magnetico*
- 4.2 *Cromatografo ionico con rivelatore amperometrico pulsato ed elettrodo in oro*
- 4.3 *Colonna a scambio anionico HPIC - AS6 - 10 μm Dionex o equivalente*

* Maurizio Mosca

- 4.4 *Centrifuga a 12.000 giri/minuto*
- 4.5 *Filtri a membrana da 0.45 µm*
- 4.6 *Bilancia analitica*

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione.* - Pesare esattamente circa 5 g di campione in polvere o prelevare, nel caso di prodotti liquidi, 50 ml ed introdurli in un matraccio tarato da 100 ml. Al campione in polvere aggiungere circa 70 ml di acqua e agitare con agitatore magnetico per 10 minuti. Aggiungere 5 ml della soluzione di Carrez 1 (3.1) e 5 ml della soluzione di Carrez 2 (3.2), portare a volume e filtrare. Centrifugare il filtrato e filtrare il supernatante su filtri a membrana.

Nel caso di prodotti a basso o nullo contenuto proteico omettere la fase di chiarificazione.

- 5.2 *Determinazione mediante cromatografia ionica.* - Diluire il campione in modo da ottenere una concentrazione di circa 1-3 mg/ml per ciascuno zucchero e/o polialcole in esame.

Effettuare la determinazione utilizzando una colonna a scambio anionico usando come eluente sodio idrato 150 mM (3.4) ad un flusso di 1-2 ml/minuto. Per la rivelazione usare un rivelatore amperometrico pulsato ed i seguenti potenziali e tempi:

Tempo di integrazione: 200 msec

E ₁	0.1 V (t ₁ = 300 msec)
E ₂	0.6 V (t ₂ = 120 msec)
E ₃	-0.8 V (t ₃ = 300 msec)

Analizzare parallelamente al campione soluzioni standard di zuccheri e/o polialcoli (3.5) diluite in modo da avere una concentrazione analoga a quella del campione.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto dei singoli carboidrati o polialcoli del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Zucchero o polialcole (g / 100 g o 100 ml)} = \frac{A \times C}{B} \times F \times \frac{100}{G}$$

dove:

- A = area del picco dello zucchero o polialcole del campione
- C = concentrazione (mg/ml) della soluzione di zucchero o polialcole standard
- B = area del picco dello zucchero o polialcole della soluzione standard
- F = fattore di diluizione.
- G = g o ml di campione utilizzati per l'analisi

Riferimenti bibliografici

POLLMANN, R.M. Ion chromatographic determination of lactose, galactose, and dextrose in grated cheese using pulsed amperometric detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1989, 72: 425-428.

BENETTI, G. CAVALLI, S. RENZETTI, R. Determinazione HPLC degli zuccheri nella radice e negli estratti di liquirizia su colonna a scambio ionico e rivelazione mediante amperometria integrata. *Industrie alimentari* 1991, 30: 845-847.

CORRADINI, C. CRISTALLI, A. CORRADINI, D. Determination of carbohydrates in fruit-based beverages by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). *Ital. J. Food Sci.* 1994, 1: 103-111.

CARBOIDRATI SINGOLI O IN MISCELA

Metodo per HPLC*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ai cereali e ai prodotti derivati.

Il metodo è stato messo a punto per le matrici indicate, ma risulta applicabile anche ad altre matrici alimentari.

2. Principio del metodo

Gli zuccheri sono estratti dal campione con una miscela di acqua e acetonitrile in bagno ad ultrasuoni. La separazione e la determinazione sono eseguite mediante HPLC utilizzando una colonna cromatografica specifica; la rivelazione è effettuata mediante rivelatore ad indice di rifrazione, o rivelatore UV.

3. Reattivi

3.1 *Acetonitrile/acqua (60:40)*

3.2 *Soluzioni standard di zuccheri in acetonitrile/acqua (1:1).*- Fruttosio, glucosio, saccarosio e maltosio

3.3 *Fase mobile acetonitrile/acqua (75:25) (solventi per HPLC RS - PLUS)*

4. Apparecchiatura

4.1 *Macinino da laboratorio*

4.2 *Bilancia analitica*

4.3 *Bagno ad ultrasuoni*

4.4 *Agitatore magnetico*

4.5 *Carta da filtro a pieghe*

4.6 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione*

4.7 *Colonna analitica per HPLC amminica Carbohydrate Analysis Waters Millipore o equivalente.*

4.8 *Rivelatore ad indice di rifrazione*

4.9 *Rivelatore UV ($\lambda = 190\text{nm}$)*

4.10 *Registratore integratore*

* Carlo Brera

5. Procedimento

- 5.1 *Estrazione.* - Estrarre 10 g del campione finemente macinato con 100 ml della miscela 3.1 in bagno ad ultrasuoni per 30 minuti. Mantenere il campione sotto agitazione costante per 3 ore. Iniettare l'estratto filtrato in HPLC.
- 5.2 *Determinazione cromatografica.* - Predisporre la pompa dell'HPLC ad un flusso di circa 1.0 ml/min ed utilizzare la fase mobile (3.3). Costruire una curva di calibrazione mediante soluzioni di lavoro. Controllare la riproducibilità della curva di calibrazione ed iniettare una opportuna aliquota del campione ottenuto in 5.1.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto dei singoli carboidrati del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Zucchero (g/100g)} = (A_c / A_s) \times Ms / Mc \times 100$$

dove:

A_c = area del picco del campione

A_s = area del picco dello standard

Ms = quantità di standard iniettata espressa in g

Mc = quantità di campione iniettata espressa in g.

L'area del picco dello standard, utilizzata per il calcolo, deve essere comparabile quella del campione.

Riferimenti bibliografici

GROSSI, M. MICCO, C. CHIRICO, M. ARNALDI, C. Determinazione degli zuccheri in sfarinati di frumento tenero mediante GLC e HPLC. *Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione* 1985, 14 (6): 429 - 434.

FIBRA ALIMENTARE TOTALE

Metodo enzimatico-gravimetrico*

1. Campo di applicazione.

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo.

Dopo digestione enzimatica con alfa-amilasi stabile al calore, proteasi ed amiloglicosidasi per rimuovere le proteine e l'amido, è effettuata una precipitazione con etanolo e il residuo è filtrato ed essiccato. La massa ottenuta, detratte le ceneri e le rimanenti proteine, costituisce la fibra alimentare totale.

3. Reattivi

- 3.1 *Alfa-amilasi stabile al calore da Bacillus licheniformis, avente un'attività approssimativa di 1 500 unità/ml.*
- 3.2 *Proteasi da Bacillus licheniformis, avente un'attività approssimativa di 10 unità/mg di solido.* - Preparare una soluzione di 50 mg di proteasi in 1 ml di tampone fosfato (3.4) subito prima dell'uso.
- 3.3 *Amiloglicosidasi da Aspergillus niger avente un'attività approssimativa di 3000 unità/ml.*
- 3.4 *Tampone fosfato 0.08 M, pH 6.0.* - Sciogliere in 700 ml di acqua distillata 1.40 g di fosfato disodico anidro o 1.75 g di fosfato disodico biidrato, e 9.68 g di fosfato monosodico monoidrato o 10.94 g di fosfato monosodico biidrato. Portare il volume a 1 l e aggiustare il pH a 6.0 con aggiunta di idrossido di sodio o acido fosforico.
- 3.5 *Idrossido di sodio 0.275 N.* - Sciogliere 11.0 g di NaOH in acqua distillata e portare ad 1 litro.
- 3.6 *Acido cloridrico 0.325 N.* - Portare 28.8 ml di HCl 37% ad 1 litro con acqua distillata.
- 3.7 *Etanolo 95%*
- 3.8 *Etanolo 78%.* - Porre in un matraccio tarato da 1 litro 207 ml di acqua distillata; portare a volume con etanolo al 95%. Miscelare e portare di nuovo a volume, se necessario con etanolo (3.7).
- 3.9 *Celite 545 trattata con HCl, lavata ed essiccata, o farina fossile analoga.*

* Maurizio Mosca; Roberta Onori

- 3.10 *Acetone.*
- 3.11 *Etere etilico.*

4. **Apparecchiatura**

- 4.1 *Bilancia analitica*
- 4.2 *pHmetro*
- 4.3 *Macinino da laboratorio*
- 4.4 *Bagnomaria*
- 4.5 *Bagnomaria termostato con agitatore*
- 4.6 *Pompa per vuoto*
- 4.7 *Muffola*
- 4.8 *Crogioli filtranti aventi porosità di 40-60 μm*
- 4.9 *Essiccatori da laboratorio*
- 4.10 *Stufa sottovuoto o alternativamente stufa ad aria*

5. **Procedimento**

Per determinare il contributo dei reagenti alla massa del residuo è necessario effettuare una prova in bianco.

Se il campione contiene una quota lipidica maggiore del 10%, sgrassare lavando per tre volte con 25 ml di etere etilico (3.11). Della quantità di grasso estratto dovrà essere tenuto conto nell'espressione finale del risultato.

Omogeneizzare accuratamente il campione e seccarlo per una notte in stufa quindi raffreddare in essiccatore e macinare a finezza minore di 300 μm . Essiccare di nuovo brevemente in stufa e conservare in essiccatore fino al momento della pesata.

Per ciascun campione eseguire due pesate (oppure quattro per l'analisi in doppio) di circa 1 g. Le due pesate non devono differire di più di 20 mg.

- 5.1 *Digestione enzimatica.* - Introdurre il campione in un bicchiere da 600 ml, unitamente a 50 ml di tampone fosfato (3.4) e a 100 μl di alfa-amilasi (3.1), miscelando accuratamente. Introdurre i bicchieri, coperti con un foglio di alluminio, nel bagnomaria bollente e tenerveli per 15 minuti oltre il tempo necessario a raggiungere, nella sospensione, la temperatura di 95-100 °C, agitando delicatamente ogni 5 minuti. Raffreddare fino a temperatura ambiente e portare il pH a 7.5 ± 0.2 con la soluzione (3.5); aggiungere 0.1 ml della soluzione di proteasi (3.2), miscelare accuratamente ed incubare per 30 minuti in bagnomaria con agitazione continua. Raffreddare fino a temperatura ambiente e portare il pH a 4.0-4.6 con la soluzione (3.6); aggiungere 300 μl di amiloglucosidasi (3.3) miscelare accuratamente, coprire il bicchiere con un foglio di alluminio ed incubare per 30 minuti in bagnomaria a 60 °C con agitazione continua.
- 5.2 *Precipitazione e filtrazione.* - Preparare i crogioli trattandoli come segue: porre in ciascun crogiolo 0.5 g di celite (3.9), condizionare in muffola alla temperatura di

550 °C per 1 h, raffreddare in essiccatore e pesare con accuratezza di 0.1 mg; prima di eseguire la filtrazione del campione ridistribuire la celite nel crogiolo usando alcuni millilitri di etanolo al 78% (3.8) e mediante aspirazione formare un letto di filtrazione che permetta poi una facile rimozione del materiale.

Aggiungere 280 ml di etanolo al 95% (3.7) preriscaldato a 60 °C misurando il volume dopo riscaldamento e lasciar precipitare per 1 h a temperatura ambiente.

Filtrare attraverso il crogiolo in beuta da vuoto. Lavare il residuo 3 volte con 20 ml di etanolo (3.8), 2 volte con 10 ml di etanolo (3.7) e 2 volte con 10 ml di acetone (3.10).

Essiccare i crogioli per una notte a 70 °C nella stufa sottovuoto o a 105 °C in quella ad aria fino a peso costante.

Raffreddare in essiccatore e pesare con l'accuratezza di 0.1 mg; sottrarre la tara del crogiolo con la celite e registrare la massa del residuo.

- 5.3 *Determinazione di proteine e ceneri.* - Determinare su uno dei residui le proteine con il metodo Kjeldahl, utilizzando il fattore specifico per la conversione dell'azoto in proteina¹⁾.

Incenerire il secondo residuo in muffola per 5 h a 550 °C; raffreddare in essiccatore e pesare con l'accuratezza di 0.1 mg. Sottrarre la tara del crogiolo con la celite per determinare le ceneri.

¹⁾Vedi tabella 1 metodo sostanze azotate.

6. Espressione dei risultati

Allo scopo di facilitare l'espressione dei risultati, vengono di seguito riportati i prospetti di calcolo per la determinazione del valore del bianco e del campione:

Tabella 1. - Calcolo per il valore del bianco

	analisi in	singolo	analisi in	doppio
	a		b	
	1° pesata g	2° pesata g	1° pesata g	2° pesata g
Tara (crogiolo + celite)				
Tara + residuo				
Massa del residuo	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂
Proteine (P)		X		X
Tara + ceneri	X		X	
Ceneri (A)	X		X	
Bianco (B)				

$$\text{Bianco} = \frac{R_1 + R_2}{2} - P - A$$

dove:

P = massa delle proteine;

A = massa delle ceneri;

R_1 = risultato della prima pesata dell'analisi in singolo o in doppio;

R_2 = risultato della seconda pesata dell'analisi in singolo o in doppio.

Tabella 2. - Calcolo del valore del campione

	analisi in singolo		analisi in doppio	
	1	2	1	2
	1° pesata g	2° pesata g	1° pesata g	2° pesata g
Massa del campione	m_1	m_2	m_1	m_2
Tara (crogiolo + celite)				
Tara + residuo				
Massa del residuo	R_1	R_2	R_1	R_2
Proteine (P)		X		X
Tara + ceneri	X		X	
Ceneri (A)	X		X	
Bianco (B)				
Fibra alimentare totale %				

Il contenuto di fibra alimentare totale del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Fibra alimentare totale (g/100 g)} = \frac{\frac{R_1 + R_2}{2} - P - A}{\frac{m_1 + m_2}{2}} \times 100$$

dove:

P = massa delle proteine;

A = massa delle ceneri;

R_1 = risultato della prima pesata in singolo o in doppio;

R_2 = risultato della seconda pesata in singolo o in doppio;

m_1 = prima pesata del campione su cui eseguire l'analisi in singolo o in doppio;

m_2 = seconda pesata del campione su cui eseguire l'analisi in singolo o in doppio;

B = bianco.

Riferimenti bibliografici

PROSKY, L. ASP, N.G. FURDA, I. DE VRIES, J.W SCHWEIZER, T.F. HARLAND, B.F.
Determination of Total Dietary Fiber in Foods Products: Collaborative Study. *J. Assoc. Anal. Chem.*
1985, 8 (4): 677-679.

Determinazione del Contenuto in Fibra Alimentare Totale nei Cereali e Derivati.
G. U. supplemento n.4. al n. 86 del 10/08/1994.

CELLULOSA

Metodo gravimetrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile agli sfarinati ed alle paste alimentari.

1. Principio del metodo

La determinazione gravimetrica del residuo viene effettuata dopo trattamento del prodotto con una miscela di acido nitrico (idrolizzante e ossidante) e acido acetico (solvente delle sostanze legnose).

3. Reattivi

- 3.1 *Acido acetico all'80% (m/m).*
- 3.2 *Acido nitrico concentrato*
- 3.3 *Miscela acido acetico all'80% e acido nitrico concentrato (90:10)*
- 3.4 *Alcool etilico.*
- 3.5 *Etere etilico.*

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Crogiolo di alundum del tipo Norton n° 5204R.A.98, o crogiolo di vetro con porosità 0*
- 4.2 *Fornelli riscaldanti a temperatura regolabile, o bruciatore a gas*
- 4.3 *Palloni da 100 ml con refrigerante ad acqua, o con refrigerante ad aria (lunghezza 1 m e diametro 5 mm)*
- 4.4 *Bilancia analitica*
- 4.5 *Stufa termostata*

5. Procedimento

Introdurre nel pallone mediante un imbuto 3 g di farina e 15 ml di miscela acida (3.3), applicare il refrigerante, riscaldare lentamente per evitare la carbonizzazione del campione e mantenere a leggera ebollizione per 25 minuti

* Roberta Onori

Filtrare il liquido caldo sotto vuoto attraverso crogiolo, lavare il pallone con 10 ml di miscela acida e 10 ml di acqua, filtrare i liquidi di lavaggio attraverso il crogiolo e lavare con 20 ml di alcool etilico e 20 ml di etere; proseguire il lavaggio con acqua bollente fino a scomparsa della reazione acida (circa mezzo litro di acqua). Essiccare il crogiolo per 3 ore in stufa a 105 °C e pesare in pesafiltro dopo raffreddamento in essiccatore. Calcinare e pesare. La differenza tra le due pesate dà la quantità di cellulosa esente da ceneri che si riferisce a 100 parti di sostanza secca.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di cellulosa del campione, espresso come percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Cellulosa (g/100 g)} = \frac{m_1}{m_0} \times 100$$

dove:

m_0 = massa, in grammi, dell'aliquota del campione d'analisi

m_1 = massa in grammi del residuo detratte le ceneri;

Riferimenti bibliografici

Metodi di analisi di frumento, farine, pane e pasta: determinazione della cellulosa *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. 1967, 3(1): 242-243.

CENERI

CENERI

Metodo gravimetrico

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti compresi quelli destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il metodo prevede l'incenerimento di una aliquota del campione d'analisi in un'atmosfera ossidante alla temperatura di 550 ± 10 °C fino a completa combustione della sostanza organica ed al raggiungimento di una massa costante.

3. Apparecchiatura

- 3.1 *Capsule da incenerimento.* - Preferibilmente di platino o di altro materiale non intaccabile nelle condizioni sperimentali.
- 3.2 *Piastra elettrica o bruciatore a gas.*
- 3.3 *Forno a muffola.*
- 3.4 *Essiccatore.*
- 3.5 *Bilancia analitica.*
- 3.6 *Bagnomaria.*
- 3.7 *Stufa termostata*

4. Procedimento

- 4.1 *Campioni solidi.* - Pesare nella capsula tarata con bilancia analitica da 2 a 10 g di prodotto secondo la resa in ceneri attesa. Per i formaggi effettuare un preriscaldamento in stufa a 105 °C per 4 ore.
- 4.2 *Campioni liquidi.* - Trasferire mediante pipetta tarata 20 - 50 ml di liquido direttamente nella capsula tarata, porre la capsula su bagnomaria bollente fino a completa evaporazione dell'acqua contenuta.
- 4.3 *Pre-incenerimento.* - Porre la capsula con il suo contenuto sulla piastra elettrica o sul bruciatore a gas. Scaldare avendo cura di evitare una troppo rapida combustione per evitare la fuoriuscita di particelle di materiale.
- 4.4 *Incenerimento.* - Collocare la capsula dentro il forno precedentemente riscaldato a 550 ± 10 °C. Continuare l'incenerimento fino a completa combustione di tutte le

particelle carboniose contenute nel residuo.¹⁾ Quando l'incenerimento è completato (4 - 6 ore) rimuovere la capsula dal forno e lasciarla raffreddare in essiccatore. Raggiunta la temperatura ambiente pesare rapidamente, con una precisione di 0.0001 g ripetere riscaldamento, raffreddamento e pesata fino al raggiungimento di una massa costante.

¹⁾ Per accelerare l'incenerimento è possibile rimuovere la capsula dal forno, collocarla su una piastra resistente al calore e dopo raffreddamento inumidire il contenuto della capsula con poche gocce di acqua distillata o ossigenata. Riporre la capsula nel forno e scaldarla gradualmente con attenzione.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di ceneri del campione, espresso come percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Ceneri (g / 100 g o 100 ml)} = \frac{m_1}{m_0} \times 100$$

dove:

m_0 = massa, in grammi o il volume in ml, dell'aliquota del campione d'analisi.

m_1 = massa in grammi del residuo.

Riferimenti

Cereali, leguminose e prodotti derivati. Determinazione delle ceneri. *UNI ISO 2171*.

Determinazione delle ceneri nel formaggio, nel formaggio fuso e nella ricotta. *G.U.* supplemento al n. 229 del 02/10/1986.

CENERI ESENTI DA CLORURO DI SODIO

Metodo titrimetrico-gravimetrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile al pane preparato con aggiunta di sale, e alla pasta all'uovo con ripieno.

2. Principio del metodo

Il metodo prende in considerazione l'azione esercitata dal residuo fosforico sul cloruro di sodio durante l'incenerimento e precisamente la perdita di cloro durante l'incenerimento, e la fissazione del sodio corrispondente. Per conoscere quindi la quantità di ione cloro presente inizialmente, è effettuato il dosaggio del cloruro di sodio sia sulle ceneri sia direttamente sul prodotto tal quale.

3. Reattivi

3.1 *Acido nitrico*

3.2 *Soluzione N/10 di nitrato di argento*

3.3 *Soluzione N/10 di solfocianato di ammonio*

4. Apparecchiatura

4.1 *Capsule da incenerimento.* - Preferibilmente di platino o di altro materiale non intaccabile nelle condizioni sperimentali.

4.2 *Piastra elettrica o bruciatore a gas*

4.3 *Forno a muffola*

4.4 *Bilancia analitica*

4.5 *Essiccatore*

4.6 *Bilancia analitica*

4.7 *Stufa termostata*

* Roberta Onori

5. Procedimento

- 5.1 *Determinazione del cloruro di sodio nel tal quale.* - Trasferire in una beuta da 400 ml 2 g di campione essiccato e finemente macinato, aggiungere 100 ml di acqua e 5 ml di acido nitrico concentrato ed un eccesso di soluzione N/10 di nitrato di argento (10 ml).

Riscaldare lentamente e mantenere a leggera ebollizione per 10 min. agitando di frequente; dopo raffreddamento si titolare l'eccesso di nitrato di argento con solfocianato di ammonio N/10, usando come indicatore una soluzione satura a freddo di allume ferrico acidificata con acido nitrico. Nei campioni che presentano una intensa colorazione gialla è necessaria una diluizione prima di effettuare la titolazione.

- 5.2 *Determinazione del cloruro di sodio nelle ceneri.* - Su 5 g di campione essiccato e finemente macinato effettuare la determinazione delle ceneri come riportato nel metodo generale utilizzando un tempo di incenerimento in muffola di 6 ore. Solubilizzare le ceneri in beuta da 400 ml con acqua acidulata con acido nitrico aggiungere un eccesso di soluzione N/10 di nitrato di argento (15 ml). Procedere quindi come per il tal quale.

6. Espressione dei risultati

- 6.1 *Calcolo del cloro e del cloruro di sodio nel tal quale.* - Se la determinazione è effettuata su 2 g, il contenuto di Cl e di NaCl (espresso in grammi), riferito a 5 g, è dato dalla seguente formula:

$$Cl_{tot} = (10 - ml_1) \times Pm_{Cl} \times 2.5 \times 10^{-4}$$

$$NaCl_{tot} = (10 - ml_1) \times PM_{NaCl} \times 2.5 \times 10^{-4}$$

dove:

ml_1 = millilitri di soluzione di solfocianato di ammonio consumati nella titolazione.

PM_{Cl} = 35.457

PM_{NaCl} = 58.454

- 6.2 *Calcolo del cloro nelle ceneri.* - Il contenuto in cloro delle ceneri è dato dalla seguente formula:

$$Cl_{cen} = (15 - ml_2) \times PM_{Cl} \times 10^{-4}$$

dove:

ml_2 = millilitri di soluzione di solfocianato di ammonio consumati nella titolazione.

- 6.3 *Calcolo delle ceneri esenti da cloruro di sodio.* - Nel calcolo è necessario tenere conto dell'ossigeno entrato in combinazione ed eventualmente delle ceneri del lievito.

Il contenuto di ceneri del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Ceneri (g / 100 g)} = [(Cl_{tot} - Cl_{cen}) + A - NaCl_{tot}] \times 20 - B - C$$

dove:

A = valore delle ceneri espresso in g corrispondente a 5 g di pane.

B = correzione relativa all'ossigeno fissato: $(Cl_{tot} - Cl_{cen}) \times 2.24$

C = valore delle ceneri del lievito (0.04%).

Riferimenti

Metodo di analisi di frumento, farine, pane e pasta: determinazione delle ceneri del pane. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 1967, 3 (1): 252-253.

METALLI

METALLI RACCOMANDAZIONI GENERALI (M.R.G)*

Introduzione

I laboratori che effettuano le analisi atte a rilevare la presenza di metalli devono garantire il rispetto dei criteri per l'interpretazione dei risultati in conformità con quanto disposto nella decisione della Comunità Europea del 26/9/90: "Analysis For Residues of elements-Criteria-Part I: Heavy metals and arsenic".

I criteri in parola sono destinati a permettere l'individuazione e quantificazione dell'analita e ad evitare risultati erroneamente positivi.

Criteri per la mineralizzazione dei campioni

A seconda del sistema di misura da utilizzare può essere necessaria una digestione più o meno completa della sostanza organica del campione. A tale scopo, si possono prendere in considerazione la mineralizzazione mediante incenerimento, la mineralizzazione per via umida in sistema aperto e la mineralizzazione in forno a microonde.

Allorché occorra determinare la presenza di metalli a livello di traccia, bisogna fare particolare attenzione alla pulizia delle attrezzature di vetro e delle altre apparecchiature.

Spesso le procedure di mineralizzazione comportano operazioni di manipolazioni potenzialmente pericolose, pertanto si rimanda al capitolo "Raccomandazioni generali-Sicurezza in laboratorio".

Reagenti

Gli acidi minerali, l'acqua ossigenata ed i modificatori di matrice, ad esempio il nitrato di magnesio, devono avere caratteristiche di grande purezza, in genere superiori al grado previsto per le analisi.

Vi sono diversi fabbricanti che producono sostanze chimiche particolarmente adatte per la determinazione della presenza di tracce di metalli pesanti.

Ogni nuovo lotto di un dato reagente deve essere sottoposto a prova in bianco onde accertare l'effettivo tenore dell'elemento da misurare, ed i risultati ottenuti devono essere confrontati con quelli relativi ad un lotto precedente.

* Massimo Baldini

Verifica delle perdite di analita

E' necessario verificare le eventuali perdite di analita dovute alla presenza o formazione di composti volatili o precipitati insolubili.

Questa verifica deve essere effettuata preferibilmente analizzando un materiale di riferimento, la cui matrice corrisponda il più possibile al campione da analizzare.

Qualora non si disponga di materiale di riferimento, occorrerà effettuare prove di recupero a vari livelli di concentrazione dell'analita aggiunto al materiale campione.

Tecniche d'incenerimento (non applicabili per la determinazione della presenza di mercurio)

Nel caso dell' incenerimento è importante un severo controllo della temperatura allo scopo di evitare perdite di analita per volatilizzazione. Per ottenere condizioni di incenerimento ripetibili è essenziale disporre di un forno a muffola munito di termostato programmabile.

Mineralizzazione del campione

1. Reattivi

- 1.1 *Acido nitrico 65% puro per analisi metalli in tracce*
- 1.2 *Acido perclorico 70% puro per analisi metalli in tracce*
- 1.3 *Acido solforico 98% puro per analisi metalli in tracce*
- 1.4 *Acido cloridrico 37% puro per analisi metalli in tracce*
- 1.5 *Acido nitrico 65%*
- 1.6 *Acido cloridrico 37%*
- 1.7 *Acqua ossigenata 30 vol.*
- 1.8 *Soluzioni standard di riferimento dei metalli, da 1000 mg/l. - In alternativa, in ciascun metodo sono riportate le modalità per la preparazione in laboratorio delle soluzioni di riferimento dei metalli*

2. Apparecchiature, vetreria e materiale vario

Tutta la vetreria deve essere di vetro borosilicato o vetro di qualità simile.

Prima dell'uso la vetreria deve essere lavata a caldo con una soluzione di acido cloridrico (1.6) 1:3 (v/v), quindi risciacquata con acqua distillata, trattata a caldo con una soluzione di acido nitrico (1.5) 1:3 (v/v), ed infine risciacquate con acqua bidistillata.

La vetreria deve essere asciugata e conservata in un luogo al riparo da possibili contaminazioni.

Le cuvette in teflon devono essere trattate nello stesso modo.

- 2.1 *Capsule di platino, a fondo piatto, o capsule di quarzo.*
- 2.2 *Forno a muffola.* - Programmatore elettronico di temperatura e rivestimento interno in quarzo.
- 2.3 *Spettrofotometro ad assorbimento atomico.* - Fornace di grafite, correttore del fondo, autocampionatore con cuvette in teflon, stampante, lampade a catodo cavo per i diversi elementi, tubi di grafite pirolizzati, piattforme del L'Vov, ecc.
- 2.4 *Bilancia analitica*
- 2.5 *Trituratore*
- 2.6 *Omogeneizzatore*
- 2.7 *Piastra riscaldante*
- 2.8 *Forno a microonde, con contenitori in teflon*

3. Procedimento

- 3.1 *Incenerimento a secco.* - Sottoporre ad essiccamento, in funzione del contenuto di analita nel campione di analisi, da 0.50 a 5.00 g del prodotto accuratamente omogeneizzato e pesato in capsula di platino. Carbonizzare su piastra riscaldante in maniera lenta e graduale al fine di evitare perdite per proiezione di materiale. Trasferire il residuo carbonioso in muffola, e incenerire per 8 ore alla temperatura di $380\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$.
Dopo tale trattamento le ceneri devono risultare perfettamente bianche. Nel caso contrario essiccare nuovamente il residuo, trattato con poche gocce di HNO_3 (1.1) e sottoporre ad un nuovo ciclo di incenerimento per almeno 4 ore.
Riprendere le ceneri con 1 ml di HNO_3 (1.1), riscaldare fino a completa dissoluzione, trasferire in un palloncino tarato da 25-50 ml e portare a volume con H_2O bidistillata.
Nel caso in cui debbano essere analizzati elementi poco volatili possono essere usate le ceneri preparate secondo il metodo Ceneri.
In funzione della matrice alimentare e del contenuto di analita nel campione, in alternativa all'incenerimento a secco del campione, utilizzare i seguenti procedimenti:
- 3.2 *Mineralizzazione per via umida.* - Aggiungere a 0.50-2.00 g di campione, accuratamente omogeneizzato e pesato in un palloncino di 10 ml di miscela HNO_3 conc. (1.1) - HClO_4 conc. (1.2) - H_2SO_4 conc. (1.3) 24+24+1 (v/v).
Collegare un refrigerante a 3 bolle e riscaldare gradualmente proseguendo fino ad illimpidimento.
Raffreddare quindi la soluzione e lavare il refrigerante dall'alto con pochi ml di acqua distillata.
Togliere il refrigerante e concentrare a piccolo volume su piastra riscaldante.
Trasferire il residuo in un matraccio tarato da 25 ml e portare a volume con acqua bidistillata.

- 3.3 *Mineralizzazione in forno a microonde.* - Pesare 0.50 g di campione direttamente nel contenitore in teflon, aggiungere 5 ml di HNO₃ (1.1) e quindi 1.5 ml di H₂O₂ (1.7) secondo il seguente schema di mineralizzazione (come esempio):

Stadio	Reattivi	Volume (ml)	Potenza (%)	Tempo (min)
1	HNO ₃	5.0	25	5
			50	4
2	H ₂ O ₂	1.5	25	5
			50	4

Portare la soluzione a volume in pallone tarato da 25 ml.

- 3.4 *Bianco campione.* - Condurre l'intero procedimento di mineralizzazione, omettendo la porzione del campione da analizzare.

Le soluzioni del campione e del bianco così ottenute sono sottoposte alla determinazione spettrofotometrica dei metalli, secondo i metodi di seguito elencati.

Nota:

Nei metodi specifici per i singoli metalli i risultati sono espressi in milligrammi per chilogrammo di campione. Qualora fosse necessario utilizzare una diversa unità di misura (es. mg/100 g o 100 ml come per la maggior parte dei prodotti destinati ad una alimentazione particolare) effettuare le opportune correzioni.

ARSENICO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il contenuto totale di arsenico negli alimenti è determinato mediante la spettrofotometria di assorbimento atomico in fornetto di grafite sul campione opportunamente preparato e mineralizzato. Allo scopo di ridurre gli effetti interferenti della matrice durante la misura spettrofotometrica è applicato il metodo delle addizioni standards.

3. Reattivi

- 3.1 *Modificante di matrice Ni* (4 g/l). - Pesare 19.81 g di $Ni(NO_3)_2 \times 6 H_2O$. Sciogliere e portare a volume di 1 l con acqua bidistillata.
- 3.2 *Arsenico triossido* (As_2O_3)
- 3.3 *Soluzione concentrata di riferimento di arsenico* (100 mg As/l).- Sciogliere 0.1320 g di arsenico triossido (3.2) in 20 ml di soluzione di idrossido di sodio al 20 % (p/v). Aggiungere 100 ml di acqua bidistillata e, cautamente, 10 ml di acido solforico (1.3 M.R.G). Portare a volume in un pallone tarato da 1000 ml, con acqua bidistillata. Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.
- 3.4 *Soluzione di riferimento di arsenico* (1 mg As/l). - Pipettare 1.0 ml di soluzione concentrata (3.3) in un pallone tarato da 100 ml e portare a volume con acqua bidistillata.
- 3.5 *Soluzioni diluite di riferimento di arsenico* (10.0 e 20.0 μg As/l). - Pipettare 1.0 e 2.0 ml della soluzione di riferimento (3.4) in due palloni tarati da 100 ml, aggiungere a ciascuno 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) e portare al volume di 100 ml con acqua ed agitare. Preparare le soluzioni fresche ogni giorno.
- 3.6 *Argon ultrapuro*

* Massimo Baldini

4. Procedimento

4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare (M.R.G.).

4.2 *Determinazione spettrofotometrica*

4.2.1 *Parametri dello spettrofotometro:*

Misura strumentale:	Assorbanza
Metodo di calibrazione:	Addizioni standards
Modo di misura:	Area di picco
Fenditura (nm):	0.7
Lunghezza d' onda (nm)	193.7
Introduzione del campione:	Campionatore automatico
Tempo di misura durante l' atomizzazione (s):	3
Repliche:	3
Correzione del fondo	inserito durante l'atomizzazione
Tubicini pirolitici di grafite con piattaforma del L'Vov	
Modificante di matrice:	0.02 mg di Ni 5 µl (3.1)

4.2.2 *Parametri del fornello di grafite:*

Stadio	Temperatura (C°)	Tempo (sec)		Flusso Gas (ml/min)
		Rampa	Isoterma	
1	90	10	10	300
2	130	10	20	300
3	450	15	20	300
4	800	15	20	300
5	1200	15	15	300
6	2300	0	3	0
7	2500	2	2	300
8	20	2	2	300

4.2.3 Parametri dell' autocampionatore:

Volumi (μl)				
	Standard (20 μg/l As)	Campione	Acqua	Modificante di matrice (0.02 mg Ni)
Bianco	—	—	40	5
Campione	—	20	20	5
1° Addizione	10	20	10	5
2° Addizione	20	20	—	5

4.2.4 *Misura strumentale.* - Se lo spettrofotometro dispone di un computer, la concentrazione dell'arsenico nella soluzione del campione è calcolata direttamente dallo strumento con il metodo delle addizioni standards e riportata sulla stampante. Se lo strumento non dispone di un computer, è necessario costruire la retta di taratura con il metodo delle addizioni standards, riportando in ascisse i valori di concentrazione e in ordinata le assorbanze corrispondenti. Riportati i tre punti corrispondenti alle tre letture, rispettivamente del campione, del campione più la prima aggiunta e del campione più la seconda aggiunta, costruire la retta passante per i tre punti e prolungarla fino ad intercettare l' asse delle x. Il valore di concentrazione corrispondente all' intercetta rappresenta il valore di concentrazione di arsenico nella soluzione del campione.

5. **Espressione dei risultati**

Il contenuto dell'arsenico del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Arsenico (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

- c = contenuto di arsenico espresso in μg/ml nella soluzione del campione
- V = volume della soluzione espresso in ml
- m = porzione del campione utilizzata per l'analisi, espressa in grammi

CADMIO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti, compresi quelli destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il contenuto totale di cadmio negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fornetto di grafite. Allo scopo di ridurre gli effetti interferenti della matrice durante la misura spettrofotometrica è utilizzato il metodo delle addizioni standards.

3. Reattivi

- 3.1 *Fosfato biacido di ammonio* ($NH_4H_2PO_4$)
- 3.2 *Nitrato di magnesio* [$Mg(NO_3)_2$]
- 3.3 *Modificante di matrice.* - Sciogliere 4 g di fosfato biacido di ammonio (3.1) e 0.2 g di nitrato di magnesio (3.2) in acqua e portare a 100 ml.
- 3.4 *Soluzione concentrata di riferimento di cadmio* (100 mg Cd/l). - Sciogliere 274.4 mg di nitrato di cadmio [$(Cd(NO_3)_2 \times 4H_2O)$] in acqua in un pallone tarato da 1000 ml, aggiungere 10 ml di acido nitrico (1.1MRG) e portare al volume di 1000 ml con acqua ed agitare. Mantenere questa soluzione in bottiglie di vetro borosilicato.
- 3.5 *Soluzione di riferimento di cadmio* (1 mg Cd/l). - Pipettare 1.0 ml di soluzione concentrata di cadmio (3.4) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1MRG), portare al volume di 100 ml con acqua ed agitare. Mantenere questa soluzione in una bottiglia di polietilene.
- 3.6 *Soluzioni diluite di riferimento di cadmio* (1.0 e 2.0 $\mu g/l$). - Pipettare 100 e 200 μl di soluzione di riferimento (3.5) in due palloni tarati da 100 ml, aggiungere in ciascuno 1 ml di acido nitrico (1.1MRG), portare al volume di 100 ml con acqua ed agitare. Mantenere queste soluzioni in bottiglie di polietilene. Preparare le soluzioni fresche ogni giorno.
- 3.7 *Argon ultrapuro.*

* Massimo Baldini

4. Procedimento

4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare. (M.R.G.)

4.2 *Determinazione spettrofotometrica*

4.2.1 *Parametri dello spettrofotometro:*

Misura strumentale:	Assorbanza
Metodo di calibrazione:	Addizioni standards
Modo di misura:	Aria di picco
Fenditura (nm):	0.7
Lunghezza d'onda (nm):	228.8
Introduzione del campione:	campionatore automatico
Tempo di misura, durante l'atomizzazione (sec.):	3
Repliche:	3
Correttore del fondo	inserito durante l'atomizzazione
Tubicini pirolitici di grafite con piattaforma del L'VoV.	

4.2.2 *Parametri del fornello di grafite:*

Stadio	Temperatura (°C)	Tempo (sec)		Flusso gas (ml/min)
		Rampa	Isoterma	
1	90	10	10	300
2	130	10	20	300
3	300	15	20	300
4	700	15	20	300
5	1800	0	3	0
6	2500	2	2	300
7	20	2	2	300

4.2.3 Parametri dell'autocampionatore:

Volume (µl)				
	Standard (20 µg/l As)	Campione	Acqua	Modificante di matrice (0.02 mg Ni)
Bianco	—	—	40	5
Campione	—	20	20	5
1° Addizione	10	20	10	5
2° Addizione	20	20	—	5

4.2.4 *Misura strumentale.* - Se lo spettrofotometro dispone di un computer, la concentrazione del cadmio nella soluzione del campione è calcolata direttamente dallo strumento con il metodo delle addizioni standards, e riportata sulla stampante. Se lo strumento non dispone di un computer, è necessario costruire la retta di taratura con il metodo delle addizioni standards, riportando in ascisse i valori di concentrazione e in ordinata le assorbanze corrispondenti. Riportati i tre punti corrispondenti alle tre letture, rispettivamente del campione, del campione più la prima aggiunta e del campione più la seconda aggiunta, costruire la retta passante per i tre punti e prolungarla fino ad intercettare l'asse delle x. Il valore di concentrazione corrispondente all'intercetta rappresenta il valore di concentrazione di cadmio, nella soluzione di campione.

6. **Espressione dei risultati**

Il contenuto di cadmio del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Cadmio (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

c = contenuto di cadmio espresso in µg/ml nella soluzione del campione

V = il volume della soluzione espresso in ml

m = porzione del campione utilizzata per l'analisi, espressa in grammi

CALCIO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il contenuto di calcio negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene.

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione concentrata di riferimento di calcio (500 mg Ca/l).* - Sciogliere 1.249 g di calcio carbonato, (CaCO₃) in piccolo volume di acido cloridrico (1.4 M.R.G) 1+1 e diluire al volume di 1 litro con acido cloridrico (1.4 M.R.G) all' 1% (v/v).
- 3.2 *Soluzione di riferimento di calcio (10 mg Ca/l).* - Pipettare 2.0 ml di soluzione di riferimento concentrata (3.1) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) e portare al volume di 100 ml ed agitare.
Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.
- 3.3 *Soluzione al 10% di lantanio (m/v)*
- 3.4 *Aria per analisi AAS*
- 3.5 *Acetilene per analisi AAS*

4. Procedimento

- 4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare (M.R.G.).
- 4.2 *Determinazione spettrofotometrica del calcio*
 - 4.2.1 *Condizioni strumentali.* - La misura strumentale è eseguita mediante uno spettrofotometro per assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene, possibilmente gestito da un computer completo di stampante grafica.

* Massimo Baldini; Maurizio Mosca

I parametri strumentali sono i seguenti:

Lunghezza d'onda:	422.7 nm
Fenditura:	0.7 nm
Tipo di fiamma:	aria/acetilene ossidante (blu)

4.2.2 *Preparazione della retta di taratura.* - Porre tre aliquote rispettivamente da 5, 10, e 20 ml della soluzione di riferimento di calcio (3.2) in tre matracci tarati da 50 ml contenenti 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) e 0.5 ml di soluzione di lantanio (3.3). Portare a volume con acqua bidistillata. Le soluzioni così preparate contengono rispettivamente 1.00, 2.00 e 4.00 mg/l di calcio.

Misurare le assorbanze delle tre soluzioni e costruire la retta di taratura.

Si misura quindi l'assorbanza della soluzione del campione allo 0,1% di lantanio e ricavare la concentrazione dalla retta di taratura.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di calcio del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Calcio (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

c = contenuto di calcio espresso in $\mu\text{g/ml}$ nella soluzione del campione

V = volume della soluzione espresso in ml

m = porzione del campione utilizzata per l'analisi, espressa in grammi

CROMO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo A è applicabile a tutti i gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare. Il metodo B è applicabile agli alimenti conservati in contenitori di banda cromata.

Metodo A

2. Principio del metodo

Il contenuto totale di cromo negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fornetto di grafite. Allo scopo di ridurre gli effetti interferenti della matrice durante la misura spettrofotometrica è utilizzato il metodo delle addizioni standards.

3. Reattivi

3.1 *Nitrato di magnesio*

3.2 *Modificante di matrice.* - Sciogliere 0.2 g di nitrato di magnesio (3.1) in acqua e portare a 100 ml.

3.3 *Soluzione concentrata di riferimento di cromo (1000 mg Cr/l).* - Sciogliere 3.735 g di cromato di potassio (K_2CrO_4) in un pallone tarato da 1000 ml con acqua bidistillata. Aggiungere 10 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) concentrato e portare a volume con acqua bidistillata. Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.

3.4 *Soluzione di riferimento di cromo (10 mg Cr/l).* - Pipettare 1.0 ml di soluzione concentrata di cromo (3.3) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G), portare al volume di 100 ml con acqua ed agitare. Mantenere la soluzione in bottiglia di polietilene.

3.5 *Soluzione diluita di riferimento di cromo (10.0 e 20.0 μ g Cr/l).* - Pipettare 100 e 200 μ l della soluzione di riferimento (3.4) in palloni tarati da 100 ml, aggiungere a ciascuno 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) e portare al volume di 100 ml con acqua ed agitare.

* Massimo Baldini

Mantenere la soluzione in bottiglia di polietilene. Preparare le soluzioni fresche ogni giorno.

3.6 Argon ultrapuro.

4. Procedimento

4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare. (M.R.G.).

4.2 Determinazione spettrofotometrica

4.2.1 Parametri dello spettrofotometro:

Misura strumentale:	Assorbanza
Metodo di calibrazione:	Addizioni standards
Modo di misura:	Area di picco
Fenditura (nm):	0.7
Lunghezza d' onda (nm):	357.9
Introduzione del campione:	Campionatore Automatico
Tempo di misura, durante l'atomizzazione (sec.):	3
Correttore del fondo	inserito durante l'atomizzazione
Tubicini pirolitici di grafite con piattaforma del L' Vov.	

4.2.2 Parametri del fornello di grafite:

Stadio Numero	Temperatura (C°)	Tempo (sec)		Flusso gas (ml/min)
		Rampa	Isoterma	
1	90	10	10	300
2	130	10	20	300
3	450	15	20	300
4	1200	30	20	300
5	2400	0	3	0
6	2650	2	2	300
7	20	2	2	300

4.2.3 Parametri dell' autocampionatore:

Volume (μl)				
	Standard (20 $\mu\text{g/l Cr}$)	Campione	Acqua	Modificante di matrice (3.2) $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$
Bianco	—	—	40	5
Campione	—	20	20	5
1° addizione	10	20	10	5
2° addizione	20	20	—	5

4.2.4 *Misura strumentale.* - Se lo spettrofotometro dispone di un computer, la concentrazione del cromo nella soluzione del campione è calcolata direttamente dallo strumento con il metodo delle addizioni standards, e riportata sulla stampante. Se lo strumento non dispone di un computer, è necessario costruire la retta di taratura con il metodo delle addizioni standards, riportando in ascisse i valori di concentrazione e in ordinata le assorbanze corrispondenti. Riportati i tre punti corrispondenti alle tre letture, rispettivamente del campione, del campione più la prima aggiunta e del campione più la seconda aggiunta, costruire la retta passante per i tre punti e prolungarla fino ad intercettare l'asse delle x. Il valore di concentrazione corrispondente all'intercetta rappresenta il valore di concentrazione di cromo, nella soluzione di campione.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di cromo del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Cromo (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

c = contenuto di cromo espresso in $\mu\text{g/ml}$ nella soluzione del campione

V = volume della soluzione espresso in ml

m = porzione del campione utilizzato per l'analisi, espressa in grammi

Metodo B

Procedere come indicato nella Gazzetta Ufficiale n.153 del 01/07/88 - Disciplina degli oggetti in banda cromata destinati a venire in contatto con gli alimenti. Metodo di analisi ufficiale del cromo negli alimenti conservati in contenitori in banda cromata. Decreto Ministeriale 1 Giugno n. 243 1988.

FERRO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo A è applicabile a tutti gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare. Il metodo B è applicabile agli alimenti conservati in contenitori di banda stagnata.

Metodo A

2. Principio del metodo

Il contenuto di ferro negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene.

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione concentrata di riferimento di ferro (1000 mg Fe/l).* - Sciogliere 1.000 g di ferro metallico in 50 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) 1+1, diluire al volume di 1 litro con acqua bidistillata .
- 3.2 *Soluzione di riferimento di ferro (10 mg Fe/l).* - Pipettare 1.0 ml di soluzione di riferimento concentrata (3.1) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G), portare al volume di 100 ml ed agitare.
Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.
- 3.3 *Aria per analisi AAS*
- 3.4 *Acetilene per analisi AAS*

4. Procedimento

- 4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare (M.R.G.).

* Massimo Baldini; Maurizio Mosca

4.2 *Determinazione spettrofotometrica del ferro*

4.2.1 *Condizioni strumentali.* - La misura strumentale è eseguita mediante uno spettrofotometro per assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene, possibilmente gestito da un computer completo di stampante grafica.

I parametri strumentali sono i seguenti:

Lunghezza d' onda:	248.3 nm
Fenditura:	0.2 nm
Tipo di fiamma:	aria/acetilene ossidante (blu)

4.2.2 *Preparazione della retta di taratura.* - Porre tre aliquote rispettivamente da 5, 15 e 25 ml della soluzione di riferimento di ferro (3.2) in tre matracci tarati da 50 ml contenenti 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G). Portare a volume con acqua bidistillata. Le soluzioni così preparate contengono rispettivamente 1, 3, 5 mg/l di ferro.

Misurare le assorbanze delle tre soluzioni e costruire la retta di taratura.

Misurare quindi l' assorbanza della soluzione del campione e ricavarne la concentrazione dalla retta di taratura.

5. **Espressione dei risultati**

Il contenuto di ferro del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Ferro (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

c = contenuto di ferro espresso in $\mu\text{g/ml}$ nella soluzione del campione

V = volume della soluzione espresso in ml

m = porzione del campione utilizzato per l'analisi, espressa in grammi

Metodo B

Procedere come indicato nella Gazzetta Ufficiale n.76 del 16/03/84 - Disciplina dei contenitori in banda stagnata saldati con lega stagno-piombo ed altri mezzi. Metodo di analisi ufficiale del ferro negli alimenti conservati in banda stagnata. Decreto Ministeriale 18 febbraio 1984.

LITIO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il contenuto di litio negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene.

3. Reattivi

3.1 *Soluzione concentrata di riferimento di litio (1000 mg Li/l).* - Sciogliere 5.324 g di litio carbonato, (Li_2CO_3) in piccolo volume di acido cloridrico (1.4 M.R.G) 1+1 e diluire al volume di 1 litro con acqua bidistillata .

3.2 *Soluzione di riferimento di litio (10 mg Li/l).* - Pipettare 1.0 ml di soluzione di riferimento concentrata (3.1) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G), 1 ml di soluzione di lantanio (3.3) e portare al volume di 100 ml e agitare.

Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.

3.3 *Soluzione al 10% di lantanio (m/v)*

3.4 *Aria per analisi AAS*

3.5 *Acetilene per analisi AAS*

4. Procedimento

4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare (M.R.G.).

4.2 *Determinazione spettrofotometrica del litio*

* Massimo Baldini; Maurizio Mosca

4.2.1 *Condizioni strumentali.* - La misura strumentale è eseguita mediante uno spettrofotometro per assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene, possibilmente gestito da un computer completo di stampante grafica.

I parametri strumentali sono i seguenti:

Lunghezza d' onda:	670.8 nm
Fenditura:	0.7 nm
Tipo di fiamma:	aria/acetilene ossidante (blu)

4.2.2 *Preparazione della retta di taratura.* - Porre tre aliquote rispettivamente da 2.5, 5, e 10 ml della soluzione di riferimento di litio (3.2) in tre matracci tarati da 50 ml contenenti 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) e 0.5 ml di soluzione di lantanio (3.3). Portare a volume con acqua bidistillata. Le soluzioni così preparate contengono rispettivamente 0.50, 1.00 e 2.00 mg/l di litio.

Misurare le assorbanze delle tre soluzioni e costruire la retta di taratura. Misurare quindi l' assorbanza della soluzione del campione allo 0,1% di lantanio e ricavarne la concentrazione dalla retta di taratura.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di litio del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Litio (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

- c = contenuto di litio espresso in $\mu\text{g/ml}$ nella soluzione del campione
- V = volume della soluzione espresso in ml
- m = porzione del campione utilizzato per l'analisi, espressa in grammi

MAGNESIO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il contenuto di magnesio negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene.

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione concentrata di riferimento di magnesio (500 mg Mg/l).* - Sciogliere 1.7346 g di magnesio carbonato, (MgCO_3) in piccolo volume di acido cloridrico (1.4 M.R.G) 1+1 e diluire al volume di 1 litro con acido cloridrico (1.4 M.R.G) all' 1% (v/v).
- 3.2 *Soluzione di riferimento di magnesio (10 mg Mg/l).* - Pipettare 2.0 ml di soluzione di riferimento concentrata (3.1) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) portare al volume di 100 ml ed agitare.
Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.
- 3.3 *Soluzione di lantanio 10% (m/v)*
- 3.4 *Aria per analisi AAS*
- 3.5 *Acetilene per analisi AAS*

4. Procedimento

- 4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare (M.R.G.).
- 4.2 *Determinazione spettrofotometrica del magnesio*

* Massimo Baldini; Maurizio Mosca

4.2.1 *Condizioni strumentali.* - La misura strumentale è eseguita mediante uno spettrofotometro per assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene, possibilmente gestito da un computer completo di stampante grafica.

I parametri strumentali sono i seguenti:

Lunghezza d' onda:	285.2 nm
Fenditura:	0.7 nm
Tipo di fiamma:	aria / acetilene ossidante (blu)

4.2.2 *Preparazione della retta di taratura.* - Porre tre aliquote rispettivamente da 1, 2.5, e 5 ml della soluzione di riferimento di magnesio (3.2) in tre matracci tarati da 100 ml contenenti 2 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G). Aggiungere 1 ml di soluzione di lantanio (3.3). Portare a volume con acqua bidistillata. Le soluzioni così preparate contengono rispettivamente 0.10, 0.25 e 0.50 mg/l di magnesio.

Misurare le assorbanze delle tre soluzioni e costruire la retta di taratura .

Misurare quindi l' assorbanza della soluzione del campione allo 0,1% di lantanio e ricavarne la concentrazione dalla retta di taratura.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di magnesio del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Magnesio (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

c = contenuto di magnesio espresso in $\mu\text{g/ml}$ nella soluzione del campione

V = volume della soluzione espresso in ml

m = porzione del campione utilizzata per l'analisi, espressa in grammi

MANGANESE

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il contenuto di manganese negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene.

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione concentrata di riferimento di manganese* (1000 mg Mn/l). - Sciogliere 1.000 g di manganese, in piccolo volume di acido nitrico (1.1 M.R.G) 1+1 e diluire al volume di 1 litro con acido cloridrico (1.4 M.R.G) all' 1% (v/v).
- 3.2 *Soluzione di riferimento di manganese* (10 mg Mn/l). - Pipettare 1.0 ml di soluzione di riferimento concentrata (3.1) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) portare al volume di 100 ml con acqua ed agitare. Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.
- 3.3 *Aria per analisi AAS*
- 3.4 *Acetilene per analisi AAS*

4. Procedimento

- 4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare (M.R.G.).
- 4.2 *Determinazione spettrofotometrica del manganese*
 - 4.2.1 *Condizioni strumentali.* - A misura strumentale è eseguita mediante uno spettrofotometro per Assorbimento Atomico, in fiamma aria/acetilene, possibilmente gestito da un computer completo di stampante grafica.

* Massimo Baldini; Maurizio Mosca

I parametri strumentali sono i seguenti:

Lunghezza d' onda:	279.5 nm
Fenditura:	0.2 nm
Tipo di fiamma:	aria / acetilene ossidante (blu)

4.2.2 *Preparazione della retta di taratura.* - Porre tre aliquote rispettivamente da 5, 10, e 15 ml della soluzione di riferimento di manganese (3.2) in tre matracci tarati da 50 ml contenenti 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G).

Portare a volume con acqua bidistillata. Le soluzioni così preparate contengono rispettivamente 1.00, 2.00 e 3.00 mg/l di manganese.

Misurare le assorbanze delle tre soluzioni e costruire la retta di taratura.

Misurare quindi l' assorbanza della soluzione del campione e ricavarne la concentrazione dalla retta di taratura.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di manganese del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Manganese (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

c = contenuto di manganese espresso in $\mu\text{g/ml}$ nella soluzione del campione

V = volume della soluzione espresso in ml

m = porzione del campione utilizzato per l'analisi, espressa in grammi

MERCURIO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti, compresi quelli destinati ad una alimentazione particolare.

La quantità di campione analizzabile è compresa tra 0.5 e 3 g

2. Principi del metodo

La determinazione del mercurio è eseguita mediante spettrofotometria di assorbimento atomico sul campione opportunamente mineralizzato, con il metodo dei vapori freddi.

3. Reattivi

3.1 *Miscela solfonitrica.* - Miscelare volumi uguali di:

a) acido nitrico 65% puro per analisi metalli in tracce (1.1 M.R.G)

b) acido solforico 98% puro per analisi metalli in tracce (1.3 M.R.G)

3.2 *Acido solforico 1N.* - Preparato con opportuna diluizione da 3.1 (b)

3.3 *Soluzione di riferimento di mercurio.* - Sciogliere 0.1354 g di cloruro mercurico in acido solforico 1N (3.2) e portare a 100 ml con acido solforico 1N (3.2) (concentrazione 1000 mg/l di Hg). Da questa soluzione preparare immediatamente prima dell'analisi, per diluizione con acido solforico 1N (3.2) una soluzione contenente 0.50 mg/l di Hg

3.4 *Soluzione di cloridrato di idrossilammina.* - Sciogliere 12 g di cloridrato di idrossilammina e 12 g di cloruro di sodio in acqua e portare a ml 100.

3.5 *Soluzione di cloruro stannoso.* - Sciogliere g 10.0 di cloruro stannoso biidrato in acido solforico 1 N (3.2) e portare a 100 ml con acido solforico 1 N (3.2). Questa soluzione va preparata ogni giorno e deve essere conservata al riparo della luce.

3.6 *Acido nitrico (1:1) puro per analisi.* - Miscelare volumi uguali di acido nitrico (1.1M.R.G) e di acqua.

* Massimo Baldini

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Digestore.* - Composto da un pallone munito di collo a smeriglio (fig.1-A) della capacità di ml 100 e da un refrigerante di Friedrichs (fig.1-B), in vetro borosilicato
- 4.2 *Apparecchio di gorgogliamento, in vetro borosilicato (fig 1-C,D,E,F)*
- 4.3 *Cella cilindrica in quarzo per spettrofotometria (fig.1-G)* - Cammino ottico mm 100, diametro da mm 20 a 30 con due colli a smeriglio e due giunti a smeriglio in vetro
- 4.4 *Pompa peristaltica, portata da 50 a 100 litri/ora (fig.1)*

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione.* - Pesare direttamente nel pallone di digestione da 0.5 a 3 g di campione accuratamente omogeneizzato, con la precisione di 10 mg
- 5.2 *Mineralizzazione.* - Nel pallone contenente la quantità di campione prevista al punto 5.1 aggiungere ml 10 di miscela solfonitrica (3.1) alcune palline di vetro ed innestare il refrigerante.
Lasciar reagire a temperatura ambiente per 15 minuti, agitando di tanto in tanto.
Riscaldare quindi cautamente con una microfiamma, avendo cura di evitare che la reazione diventi violenta; lasciare quindi ad ebollizione incipiente fino a che la soluzione diventi pressochè limpida (20 minuti circa).
La presenza eventuale di bolle di grasso non pregiudica il corso delle analisi. Raffreddare il pallone ed aggiungere dall'alto del refrigerante ml 20 di acqua. Fare bollire quindi per altri 20 minuti al fine di scacciare gli ossidi di azoto.
Raffreddare di nuovo, lavare l' interno del refrigerante con ml 10 di acqua, trasferire quantitativamente la soluzione in un pallone tarato da ml 50 e portare a volume con acqua.
- 5.3 *Curva standard.* - In ciascuno dei cinque palloni tarati da ml 50 versare ml 10 di miscela solfonitrica (3.1); portare quindi il primo a volume con acqua (prova in bianco), aggiungere negli altri quattro rispettivamente 0.50-1.00-1.50-2.00 ml della soluzione diluita di riferimento di mercurio da 0.5 mg/l. Le soluzioni così ottenute contengono 0-5-10-15-20 µg/l di mercurio.
- 5.4 *Letture.* - Tanto per gli standard come per il campione porre ml 10.00 di soluzione nel palloncino del gorgogliatore, aggiungere ml 0.5 di soluzione di cloridrato di idrossilammia (3.4) ed innestare il palloncino nell'apparecchio.
Versare dall'imbuto di carico ml 1.0 di soluzione di cloruro stannoso (3.5) ed iniziare immediatamente il passaggio dell'aria.
Seguire sullo spettrofotometro preventivamente azzerato, i valori della assorbanza; questi aumenteranno per 40-50 secondi, raggiungeranno un massimo e quindi diminuiranno.
Effettuare la lettura in corrispondenza del massimo.
Con i valori corrispondenti agli standard (compresa la prova in bianco) tracciare il diagramma analitico.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di mercurio del campione espresso in milligrammi per chilogrammo , è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Mercurio (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

c = contenuto di mercurio espresso in $\mu\text{g/ml}$ nella soluzione del campione

V = volume della soluzione espresso in ml

m = porzione del campione utilizzata per l'analisi, espressa in grammi

Nota

La vetreria deve essere lavata con il massimo scrupolo; a tal fine è conveniente immergerla per 15 minuti in una soluzione calda al 10 % di un detergente "decontaminante", sciacquando successivamente con acqua e con acido nitrico diluito 1:1 (3.6) ed infine con acqua distillata.

I recipienti che hanno contenuto gli standard concentrati non devono essere assolutamente impiegati per contenere i campioni.

Dopo ogni lettura rimuovere il palloncino e lasciare passare aria nella cella fino a che l'assorbanza sia ritornata a 0; lavare quindi il tubo pescante del gorgogliatore con acido nitrico diluito 1:1 (3.6).

Per evitare la condensazione del valore acqueo sulle finestre delle cellette in quarzo, è necessario che questa sia mantenuta ad una temperatura di 10 °C - 20 °C superiore a quell'ambiente; questo può essere realizzato avvolgendo la celletta con un nastro riscaldante o dirigendo su di essa un flusso di aria calda.

Riferimenti bibliografici

Limite di contaminazione da mercurio e metalli pesanti del pesce e degli altri prodotti alimentari della pesca di provenienza estera. Decreto Ministeriale 14/12/1971 *G.U.* n. 328 del 28/12/1971.

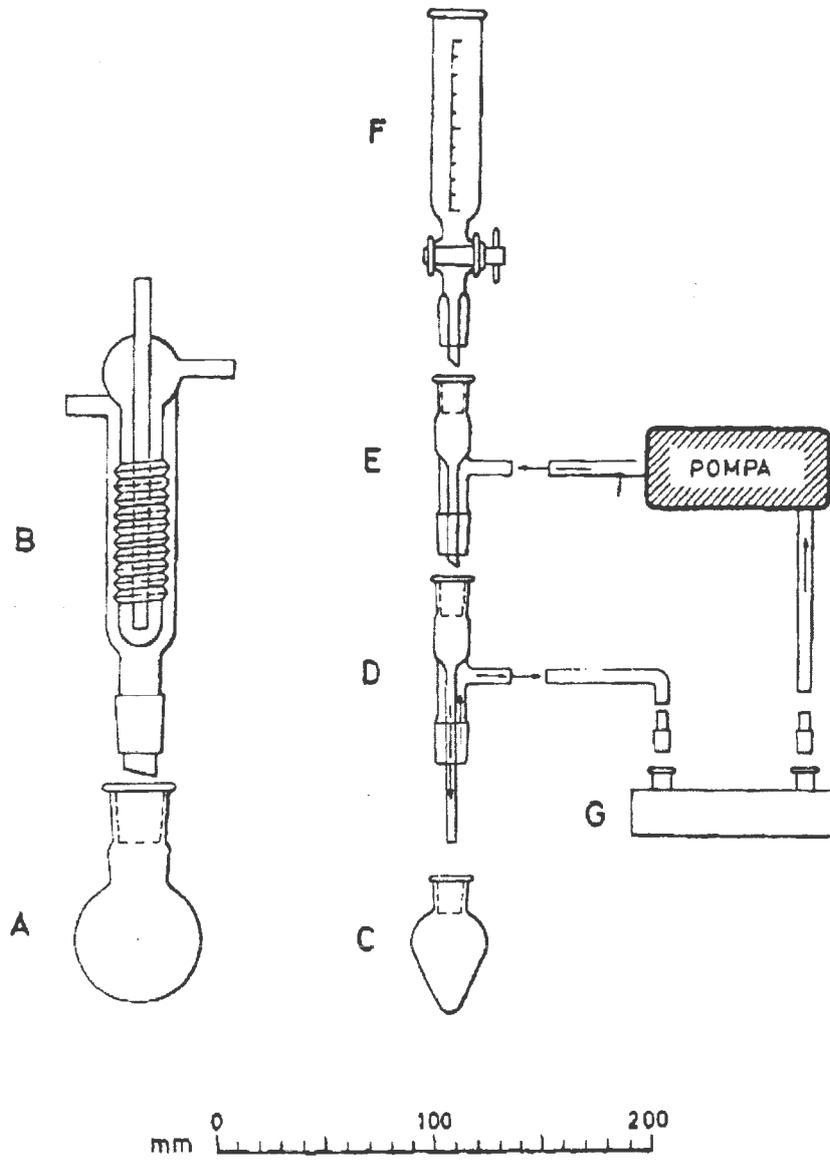


Figura 1. - *Apparato per la determinazione del mercurio nei prodotti ittici*

PIOMBO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo A è applicabile a tutti i gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare. Il metodo B è applicabile agli alimenti conservati in contenitori di banda stagnata.

2. Principio del metodo

Il contenuto totale di piombo negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fornetto di grafite. Allo scopo di ridurre gli effetti interferenti della matrice durante la misura spettrofotometrica è utilizzato il metodo delle addizioni standards.

3. Reattivi

3.1 *Fosfato biacido di ammonio* ($NH_4H_2PO_4$).

3.2 *Nitrato di magnesio* [$Mg(NO_3)_2$].

3.3 *Modificante di matrice.* - Sciogliere 4 g di fosfato biacido in ammonio (3.1) e 0.2 g di nitrato di magnesio (3.2) in acqua e portare a 100 ml.

3.4 *Soluzione concentrata di riferimento di piombo* (1000 mg Pb/l). - Sciogliere 1.599 g di nitrato di piombo [$Pb(NO_3)_2$] in acqua in un pallone tarato da 1000 ml aggiungere 10 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G), portare al volume di 1000 ml con acqua ed agitare. Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.

3.5 *Soluzione di riferimento di piombo* (1 mg Pb/l). - Pipettare 100 μ l di soluzione concentrata di piombo (3.4) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G), portare al volume di 100 ml ed agitare. Mantenere la soluzione in bottiglia di polietilene.

3.6 *Soluzione diluita di riferimento di piombo* (10.0 e 20.0 μ g Pb/l). - Pipettare 1.0 e 2.0 ml della soluzione di riferimento (3.5) in palloni tarati da 100 ml, aggiungere a ciascuno 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) e portare al volume di 100 ml con acqua ed agitare.

Mantenere la soluzione in bottiglia di polietilene. Preparare le soluzioni fresche ogni giorno.

* Massimo Baldini

3.7 Argon ultrapuro.

4. Procedimento

4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare. (M.R.G.).

4.2 *Determinazione spettrofotometrica*4.2.1 *Parametri dello spettrofotometro*

Misura strumentale:	Assorbanza
Metodo di calibrazione:	Addizioni standards
Modo di misura:	Area di picco
Fenditura (nm):	0.7
Lunghezza d' onda(nm):	283.3
Introduzione del campione:	Campionatore Automatico
Tempo di misura, durante l'atomizzazione (sec.):	3
Correttore del fondo	inserito durante l' atomizzazione
Tubicini pirolitici di grafite con piattaforma del L' Vov.	

4.2.2 *Parametri del fornello di grafite:*

Stadio Numero	Temperatura (C°)	Tempo (sec)		Flusso gas (ml/min)
		Rampa	Isoterma	
1	90	10	10	300
2	130	10	20	300
3	450	15	20	300
4	800	15	20	300
5	1800	0	3	0
6	2500	2	2	300
7	20	2	2	300

4.2.3 Parametri dell' autocampionatore:

Volume (μ l)				
	Standard	Campione	Acqua	Modificante di matrice (3.3) $Mg(NO_3)_2 + NH_4H_2PO_4$
Bianco	—	—	40	5
Campione	—	20	20	5
1° addizione	10	20	10	5
2° addizione	20	20	—	5

4.2.4 *Misura strumentale.* - Se lo spettrofotometro dispone di un computer, la concentrazione del piombo nella soluzione del campione è calcolata direttamente dallo strumento con il metodo delle addizioni standards, e riportata sulla stampante. Se lo strumento non dispone di un computer, è necessario costruire la retta di taratura con il metodo delle addizioni standards, riportando in ascisse i valori di concentrazione e in ordinata le assorbanze corrispondenti.

Riportati i tre punti corrispondenti alle tre letture, rispettivamente del campione, del campione più la prima aggiunta e del campione più la seconda aggiunta, costruire la retta passante per i tre punti e prolungarla fino ad intercettare l' asse delle x. Il valore di concentrazione corrispondente all'intercetta rappresenta il valore di concentrazione di piombo, nella soluzione di campione.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di piombo del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$Piombo (mg / kg) = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

c = contenuto di piombo espresso in μ g/ml nella soluzione del campione

V = volume della soluzione espresso in ml

m = porzione del campione utilizzata per l' analisi, espressa in grammi

Metodo B

Procedere come indicato nella Gazzetta Ufficiale n. 76 del 16/03/84 - Disciplina dei contenitori in banda stagnata saldati con lega stagno-piombo ed altri mezzi. Metodo di Analisi del Piombo negli Alimenti Conservati in Contenitori in Banda Stagnata. Decreto Ministeriale 18 febbraio 1984.

POTASSIO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il contenuto di potassio negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene.

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione concentrata di riferimento di potassio (1000 mg K/l).* - Sciogliere 1.907 g di potassio cloruro, (KCl), in matraccio tarato da 1 litro con acqua bidistillata e portare a volume.
- 3.2 *Soluzione di riferimento di potassio (10 mg K/l).* - Pipettare 1.0 ml di soluzione di riferimento concentrata (3.1) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G), portare al volume di 100 ml ed agitare.
Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.
- 3.3 *Soluzione al 10% di lantano (m/v)*
- 3.4 *Aria per analisi AAS*
- 3.5 *Acetilene per analisi AAS*

4. Procedimento

- 4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare (M.R.G.).
- 4.2 *Determinazione spettrofotometrica del potassio*
 - 4.2.1 *Condizioni strumentali.* - La misura strumentale è eseguita mediante uno spettrofotometro per assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene, possibilmente gestito da un computer completo di stampante grafica.

* Massimo Baldini; Maurizio Mosca

I parametri strumentali sono i seguenti:

Lunghezza d' onda:	766.5 nm
Fenditura:	2.0 nm
Tipo di fiamma:	aria / acetilene ossidante (blu)

- 4.2.2 *Preparazione della retta di taratura.* - Porre tre aliquote rispettivamente da 2.5, 5, e 10 ml della soluzione di riferimento di potassio (3.2) in tre matracci tarati da 50 ml contenenti 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) e 0.5 ml di soluzione di lantanio (3.3). Portare a volume con acqua bidistillata. Le soluzioni così preparate contengono rispettivamente 0.50, 1.00 e 2.00 mg/l di potassio. Misurare le assorbanze delle tre soluzioni e costruire la retta di taratura. Misurare quindi l' assorbanza della soluzione del campione allo 0.1% di lantanio e ricavarne la concentrazione dalla retta di taratura.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di potassio del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Potassio (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

- c = contenuto di potassio espresso in $\mu\text{g/ml}$ nella soluzione del campione
 V = volume della soluzione espresso in ml
 m = porzione del campione utilizzata per l'analisi, espressa in grammi

RAME**Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*****1. Campo di applicazione**

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il contenuto di rame negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene.

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione concentrata di riferimento di rame* (1000 mg Cu/l). - Sciogliere 1.000 g di rame metallico in piccolo volume di acido nitrico (1.1 M.R.G) 1+1 e diluire al volume di 1 litro con acido nitrico (1.1 M.R.G) all' 1% (v/v).
- 3.2 *Soluzione di riferimento di rame* (10 mg Cu/l). - Pipettare 1.0 ml di soluzione di riferimento concentrata (3.1) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) portare al volume di 100 ml ed agitare.
Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.
- 3.3 *Aria per analisi AAS*
- 3.4 *Acetilene per analisi AAS*

4. Procedimento

- 4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare (M.R.G.).
- 4.2 *Determinazione spettrofotometrica del rame*
 - 4.2.1 *Condizioni strumentali.* - La misura strumentale è eseguita mediante uno spettrofotometro per assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene, possibilmente gestito da un computer completo di stampante grafica.

* Massimo Baldini; Maurizio Mosca

I parametri strumentali sono i seguenti:

Lunghezza d' onda:	324.8 nm
Fenditura:	0.7 nm
Tipo di fiamma:	aria/acetilene ossidante (blu)

4.2.2 *Preparazione della retta di taratura.* - Porre tre aliquote rispettivamente da 5, 10, e 25 ml della soluzione di riferimento di rame (3.2) in tre matracci tarati da 50 ml contenenti 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G). Portare a volume con acqua bidistillata. Le soluzioni così preparate contengono rispettivamente 1.00, 2.00 e 5.00 mg/l di rame.

Misurare le assorbanze delle tre soluzioni e costruire la retta di taratura.

Misurare quindi l' assorbanza della soluzione del campione e ricavarne la concentrazione dalla retta di taratura.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di rame del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Rame}(\text{mg} / \text{kg}) = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

- c = contenuto di rame espresso in $\mu\text{g}/\text{ml}$ nella soluzione del campione
- V = volume della soluzione espresso in ml
- m = porzione del campione utilizzata per l'analisi, espressa in grammi

SELENIO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti i gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il contenuto totale di selenio negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fornetto di grafite. Allo scopo di ridurre gli effetti interferenti della matrice durante la misura spettrofotometrica è utilizzato il metodo delle addizioni standards.

3. Reattivi

- 3.1 *Modificante di matrice Cu* (1g/l). - Pesare 3.80 g di nitrato di rame $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}]$, sciogliere e portare al volume di 1 l, con acqua.
- 3.2 *Soluzione concentrata di riferimento di selenio* (100 mg Se/l). - Sciogliere 159.9 mg di nitrato di selenio $[(\text{Se}(\text{NO}_3)_2)]$ in acqua in un pallone tarato da 1000 ml, aggiungere 10 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G), portare al volume di 1000 ml con acqua ed agitare. Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.
- 3.3 *Soluzione di riferimento di selenio* (1 mg Se/l). - Pipettare 1.0 ml di soluzione concentrata di selenio (3.2) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G), portare al volume di 100 ml ed agitare. Mantenere la soluzione in bottiglia di polietilene.
- 3.4 *Soluzione diluita di riferimento di selenio* (10.0 e 20.0 μg Se/l). - Pipettare 1.0 e 2.0 ml della soluzione di riferimento (3.3) in palloni tarati da 100 ml, aggiungere a ciascuno 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) e portare al volume di 100 ml con acqua ed agitare.
Mantenere la soluzione in bottiglia di polietilene. Preparare le soluzioni fresche ogni giorno.
- 3.5 *Argon ultrapuro*.

* Massimo Baldini

4. Procedimento

4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare (M.R.G.).

4.2 *Determinazione spettrofotometrica:*

4.2.1 *Parametri dello spettrofotometro*

Misura strumentale:	Assorbanza
Metodo di calibrazione:	Addizioni standards
Modo di misura:	Area di picco
Fenditura (nm):	2.0
Lunghezza d' onda (nm):	196.0
Introduzione del campione:	Campionatore Automatico
Tempo di misura, durante l' atomizzazione (sec.):	3
Replica	3
Correttore del fondo	inserito durante l' atomizzazione
Tubicini pirolitici di grafite con piattaforma del L' Vov.	

4.2.2 *Parametri del fornello di grafite:*

Stadio Numero	Temperatura (C°)	Tempo (sec)		Flusso gas (ml/min)
		Rampa	Isoterma	
1	90	10	10	300
2	130	10	20	300
3	450	15	20	300
4	800	15	20	300
5	2100	0	3	0
6	2600	2	2	300
7	20	2	2	300

4.2.3 Parametri dell'autocampionatore:

Volume (μl)				
	Standard (20 $\mu\text{g/l}$ Se)	Campione	Acqua	Modificante di matrice Cu (3.1)
Bianco	—	—	40	5
Campione	—	20	20	5
1° addizione	10	20	10	5
2° addizione	20	20	—	5

4.2.4 *Misura strumentale.* - Se lo Spettrofotometro dispone di un computer, la concentrazione del selenio nella soluzione del campione è calcolata direttamente dallo strumento con il metodo delle addizioni standards, e riportata sulla stampante. Se lo strumento non dispone di un computer, è necessario costruire la retta di taratura con il metodo delle addizioni standards, riportando in ascisse i valori di concentrazione e in ordinata le assorbanze corrispondenti. Riportati i tre punti corrispondenti alle tre letture, rispettivamente del campione, del campione più la prima aggiunta e del campione più la seconda aggiunta, costruire la retta passante per i tre punti e prolungarla fino ad intercettare l'asse delle x. Il valore di concentrazione corrispondente all'intercetta rappresenta il valore di concentrazione di selenio, nella soluzione di campione.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di selenio del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Selenio (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

- c = contenuto di selenio espresso in $\mu\text{g/ml}$ nella soluzione del campione
- V = volume della soluzione espresso in ml
- m = porzione del campione utilizzata per l'analisi, espressa in grammi

SODIO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il contenuto di sodio negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene.

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione concentrata di riferimento di sodio* (1000 mg Na/l). - Sciogliere 2.542 g di sodio cloruro, (NaCl), in matraccio tarato da 1 litro con acqua bidistillata e portare a volume.
- 3.2 *Soluzione di riferimento di sodio* (10 mg Na/l). - Pipettare 1.0 ml di soluzione di riferimento concentrata (3.1) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G.), portare al volume di 100 ml ed agitare.
Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.
- 3.3 *Soluzione al 10 % di lantanio* (m/v)
- 3.4 *Aria per analisi AAS*
- 3.5 *Acetilene per analisi AAS*

4. Procedimento

- 4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare (M.R.G.).
- 4.2 *Determinazione spettrofotometrica del sodio*
 - 4.2.1 *Condizioni strumentali.* - La misura strumentale è eseguita mediante uno spettrofotometro per assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene, possibilmente gestiti da un computer completo di stampante grafica.

* Massimo Baldini; Maurizio Mosca

I parametri strumentali sono i seguenti:

Lunghezza d' onda:	589.6 nm
Fenditura:	0.7 nm
Tipo di fiamma:	aria/acetilene ossidante (blu)

4.2.2 *Preparazione della retta di taratura.* - Porre tre aliquote rispettivamente da 2, 5, e 10 ml della soluzione di riferimento di sodio (3.2) in tre matracci tarati da 100 ml contenenti 2 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) e 1 ml di soluzione di lantanio (3.3). Portare a volume con acqua bidistillata. Le soluzioni così preparate contengono rispettivamente 0.20, 0.50 e 1.00 mg/l di sodio.

Misurare le assorbanze delle tre soluzioni e costruire la retta di taratura .

Misurare quindi l' assorbanza della soluzione del campione allo 0.1 di lantanio e ricavarne la concentrazione dalla retta di taratura.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di litio del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Sodio (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

c = contenuto di sodio espresso in $\mu\text{g/ml}$ nella soluzione del campione

V = volume della soluzione espresso in ml

m = porzione del campione utilizzata per l'analisi, espressa in grammi

STAGNO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo A è applicabile a tutti i gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare. Il metodo B è applicabile agli alimenti conservati in contenitori di banda stagnata.

Metodo A

2. Principio del metodo

Il contenuto totale di stagno negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fornetto di grafite. Allo scopo di ridurre gli effetti interferenti della matrice durante la misura spettrofotometrica è utilizzato il metodo delle addizioni standards.

3. Reattivi

- 3.1 *Fosfato biacido di ammonio* ($NH_4H_2PO_4$)
- 3.2 *Modificante di matrice.* - Sciogliere 4 g di fosfato biacido in ammonio (3.1) in acqua e portare a 100 ml
- 3.3 *Soluzione concentrata di riferimento di stagno* (1000 mg Sn/l). - Sciogliere 1.000 g di stagno metallico in 10 ml di acido cloridrico (1.4 M.R.G) concentrato in un pallone tarato da 1000 ml. Diluire fino al volume 1000 ml con acqua ed agitare. Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.
- 3.4 *Soluzione di riferimento di stagno* (10 mg Sn/l). - Pipettare 1.0 ml di soluzione concentrata di stagno (3.3) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G), portare al volume di 100 ml ed agitare. Mantenere la soluzione in bottiglia di polietilene.
- 3.5 *Soluzione diluita di riferimento di stagno* (10.0 e 20.0 μ g Sn/L). - Pipettare 100 e 200 μ l della soluzione di riferimento (3.4) in palloni tarati da 100 ml, aggiungere a ciascuno 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) e portare al volume di 100 ml con acqua ed agitare.

* Massimo Baldini

Mantenere la soluzione in bottiglia di polietilene. Preparare le soluzioni fresche ogni giorno.

3.6 Argon ultrapuro.

4. Procedimento

4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare. (M.R.G.).

4.2 Determinazione spettrofotometrica

4.2.1 Parametri dello spettrofotometro:

Misura strumentale:	Assorbanza
Metodo di calibrazione:	Addizioni standards
Modo di misura:	Area di picco
Fenditura (nm):	0.7
Lunghezza d' onda (nm):	286.3
Introduzione del campione:	Campionatore Automatico
Tempo di misura, durante l'atomizzazione (sec.):	3
Correttore del fondo	inserito durante l' atomizzazione
Tubicini pirolitici di grafite con piattaforma del L' Vov.	

4.2.2 Parametri del fornello di grafite:

Stadio Numero	Temperatura (C°)	Tempo (sec)		Flusso gas (ml/min)
		Rampa	Isoterma	
1	90	10	10	300
2	130	10	20	300
3	450	15	20	300
4	800	15	20	300
5	2100	0	3	0
6	2500	2	2	300
7	20	2	2	300

4.2.3 Parametri dell' autocampionatore:

Volume (μ l)				
	Standard (20 μ g/l Sn)	Campione	Acqua	Modificante di matrice (3.2) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
Bianco	—	—	40	5
Campione	—	20	20	5
1° addizione	10	20	10	5
2° addizione	20	20	—	5

4.2.4 *Misura strumentale.* - Se lo spettrofotometro dispone di un computer, la concentrazione dello stagno nella soluzione del campione è calcolata direttamente dallo strumento con il metodo delle addizioni standards, e riportata sulla stampante. Se lo strumento non dispone di un computer, è necessario costruire la retta di taratura con il metodo delle addizioni standards, riportando in ascisse i valori di concentrazione e in ordinata le assorbanze corrispondenti. Riportati i tre punti corrispondenti alle tre letture, rispettivamente del campione, del campione più la prima aggiunta e del campione più la seconda aggiunta, costruire la retta passante per i tre punti e prolungarla fino ad intercettare l'asse delle x. Il valore di concentrazione corrispondente all'intercetta rappresenta il valore di concentrazione di stagno, nella soluzione di campione.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di stagno del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Stagno (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

- c = contenuto di stagno espresso in μ g/ml nella soluzione del campione
- V = volume della soluzione espresso in ml
- m = porzione del campione utilizzata per l'analisi, espressa in grammi

Metodo B

Procedere come indicato nella Gazzetta Ufficiale n. 76 del 16/03/84 - Metodo di analisi ufficiale dello stagno negli alimenti conservati in contenitori in banda stagnata - Disciplina dei contenitori in banda stagnata saldati con lega stagno-piombo ed altri mezzi. Decreto Ministeriale 18 Febbraio 1984.

STRONZIO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il contenuto di stronzio negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene.

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione concentrata di riferimento di stronzio (1000 mg Sr/l).* - Sciogliere 2.415 g di stronzio nitrato, $[\text{Sr}(\text{NO}_3)_2]$ in matraccio tarato da 1 litro con acido nitrico (1.1 M.R.G) al 1% (v/v) e portare a volume sempre con acido nitrico.
- 3.2 *Soluzione di riferimento di stronzio (10 mg Sr/l).* - Pipettare 1.0 ml di soluzione di riferimento concentrata (3.1) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G), portare al volume di 100 ml ed agitare.
Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.
- 3.3 *Soluzione al 10% di lantanio (m/v)*
- 3.4 *Aria per analisi AAS*
- 3.5 *Acetilene per analisi AAS*

4. Procedimento

- 4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare (M.R.G.).
- 4.2 *Determinazione spettrofotometrica dello stronzio*
 - 4.2.1 *Condizioni strumentali.* - La misura strumentale è eseguita mediante uno spettrofotometro per assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene, possibilmente gestito da un computer completo di stampante grafica.

* Massimo Baldini

I parametri strumentali sono i seguenti:

Lunghezza d' onda:	460.7 nm
Fenditura:	0.7 nm
Tipo di fiamma:	aria/acetilene ossidante (blu)

4.2.2 *Preparazione della retta di taratura.* - Porre tre aliquote rispettivamente da 5, 10, e 20 ml della soluzione di riferimento di stronzio (3.2) in tre matracci tarati da 50 ml contenenti 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) e 0.5 ml di soluzione di lantanio (3.3). Portare a volume con acqua bidistillata. Le soluzioni così preparate contengono rispettivamente 1.00, 2.00 e 4.00 mg/l di stronzio. Misurare le assorbanze delle tre soluzioni e costruire la retta di taratura . Misurare quindi l' assorbanza della soluzione del campione allo 0.1% di lantanio e ricavarne la concentrazione dalla retta di taratura.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di stronzio del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Stronzio (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

- c = contenuto di stronzio espresso in $\mu\text{g/ml}$ nella soluzione del campione
- V = volume della soluzione espresso in ml
- m = porzione del campione utilizzata per l'analisi, espressa in grammi

ZINCO

Metodo per spettrofotometria di assorbimento atomico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti, compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il contenuto di zinco negli alimenti è determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene.

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione concentrata di riferimento di zinco* (1000 mg Zn/l). - Sciogliere 1.000 g di zinco metallico in piccolo volume di acido cloridrico (1.4 M.R.G) 1+1 e diluire al volume di 1 litro con acido cloridrico (1.4 M.R.G) all' 1% (v/v).
- 3.2 *Soluzione di riferimento di zinco* (10 mg Zn/l). - Pipettare 1.0 ml di soluzione di riferimento concentrata (3.1) in un pallone tarato da 100 ml, aggiungere 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G) portare al volume di 100 ml ed agitare.
Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.
- 3.6. *Aria per analisi AAS*
- 3.7. *Acetilene per analisi AAS*

4. Procedimento

- 4.1 *Mineralizzazione del campione.* - La mineralizzazione del campione può essere condotta mediante incenerimento a secco, mineralizzazione per via umida a pressione ambiente, mineralizzazione in forno a microonde, secondo il tipo di matrice alimentare da analizzare (M.R.G.).
- 4.2 *Determinazione spettrofotometrica dello zinco*
 - 4.2.1 *Condizioni strumentali.* - La misura strumentale è eseguita mediante uno spettrofotometro per assorbimento atomico, in fiamma aria/acetilene, possibilmente gestito da un computer completo di stampante grafica.

* Massimo Baldini; Maurizio Mosca

I parametri strumentali sono i seguenti:

Lunghezza d' onda:	213.9 nm
Fenditura:	0.7 nm
Tipo di fiamma:	aria/acetilene ossidante (blu)

4.2.2 *Preparazione della retta di taratura.* - Porre tre aliquote rispettivamente da 2, 5, e 10 ml della soluzione di riferimento di zinco (3.2) in tre matracci tarati da 100 ml contenenti 1 ml di acido nitrico (1.1 M.R.G). Portare a volume con acqua bidistillata (3.1). Le soluzioni così preparate contengono rispettivamente 0.20, 0.50 e 1.00 mg/l di zinco.

Misurare le assorbanze delle tre soluzioni e costruire la retta di taratura.

Misurare quindi l' assorbanza della soluzione del campione e ricavarne la concentrazione dalla retta di taratura.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di zinco del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Zinco (mg / kg)} = \frac{c \times V}{m}$$

dove:

c = contenuto di zinco espresso in $\mu\text{g/ml}$ nella soluzione del campione

V = volume della soluzione espresso in ml

m = porzione del campione per l'analisi espressa in grammi

VITAMINE

VITAMINA A - VITAMINA E**Metodo per HPLC*****1. Campo di applicazione**

Il metodo è applicabile a tutti i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Determinazione simultanea delle vitamine A ed E mediante HPLC, dopo idrolisi basica ed estrazione con dicloroetano.

3. Reattivi

- 3.1 *Alcool etilico 95°*
- 3.2 *Soluzione di ascorbato di sodio al 10%*
- 3.3 *Soluzione di idrossido di potassio al 50%*
- 3.4 *Idrossido di potassio 1 N*
- 3.5 *Idrossido di potassio 0.5 N*
- 3.6 *Soluzione di solfuro di sodio 0.5 M in glicerina al 70%*
- 3.7 *1,2 - dicloroetano*
- 3.8 *Solfato di sodio anidro*
- 3.9 *Alcool metilico per HPLC*
- 3.10 *Soluzione standard di vitamina E acetato.* - Pesare esattamente 250 mg di vitamina in un matraccio da 50 ml di vetro scuro e portare a volume con alcool metilico (3.9). Il titolo di questa soluzione va controllato tramite spettrofotometro, ogni volta prima dell'uso. Per il controllo prelevare 1 ml della soluzione e trasferirlo in un matraccio da 50 ml di vetro scuro e portare a volume con alcool etilico (3.1). Leggere allo spettrofotometro a 285 nm in vaschetta da 1 cm contro alcool etilico. L'estinzione di tale soluzione standard deve essere compresa tra 0.420 e 0.440. La soluzione standard madre si conserva a +4 °C per circa 20 giorni.
- 3.11 *Fase mobile.* - metanolo-acqua 98:2
- 3.12 *Soluzione standard di vitamina E acetato.* - Pesare esattamente 500 mg di vitamina in un matraccio tarato da 50 ml di vetro scuro e portare a volume con alcool metilico (3.9).

* Carmelina Filesi

- 3.13 *Soluzione standard di vitamina E alcool.* - Pesare esattamente 160 mg di vitamina in un matraccio tarato da 50 ml di vetro scuro e portare a volume con alcool metilico (3.9).
- 3.14 *Soluzione standard di vitamina A alcool in cristalli.* - Pesare esattamente 60 mg di vitamina (3.300.000 U.I./g) in un matraccio tarato da 50 ml di vetro scuro e portare a volume con alcool metilico (3.9). Diluire questa soluzione 1:10 sempre con alcool metilico.
- 3.15 *Soluzione standard contenente 1 mg/ml di vit. E acetato, 320 mcg/ml di vit.E alcool, 40 U.I./ml di vit.A alcool.* - Trasferire in un matraccio tarato da 50 ml di vetro scuro 5 ml delle soluzioni iniziali di vit. E acetato (3.12), di vit. E alcool (3.13), di vit. A alcool (3.14) e portare a volume con alcool metilico (3.9).
I reattivi 3.12 - 3.13 - 3.14 - 3.15 servono esclusivamente per il calcolo dei fattori di correzione (5.3).

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Piastra riscaldante munita di agitatore magnetico*
- 4.2 *Evaporatore rotante*
- 4.3 *Spettrofotometro*
- 4.4 *Filtri a membrana da 0.45 μ m*
- 4.5 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione con rivelatore a 290 nm*
- 4.6 *Forno termostato per colonne*
- 4.7 *Colonna HPLC C18 da 25 cm x 4 mm*
- 4.8 *Bilancia analitica*

5. Procedimento

- 5.1 *Idrolisi ed estrazione.* - Condurre le operazioni al riparo della luce, impiegando vetreria scura. Pesare esattamente 10 g di campione o, per i prodotti liquidi, prelevare esattamente 10 ml e porli in un pallone da evaporazione da 250 ml di vetro scuro. Aggiungere successivamente 40 ml di alcool etilico (3.1), 2 ml della soluzione di ascorbato di sodio (3.2), 10 ml di idrossido di potassio al 50% (3.3) e 2 ml di solfuro di sodio (3.6). Porre in bagnomaria bollente su piastra riscaldante (4.1) con refrigerante a ricadere per 30 minuti agitando con agitatore magnetico. Raffreddare e aggiungere 100 ml esatti di dicloroetano (3.7), tappare, agitare e travasare in un imbuto separatore. Lavare il pallone in più riprese con 50 ml totali di alcool etilico (3.1) travasando sempre nell'imbuto separatore. Aggiungere in quest'ultimo 150 ml di idrossido di potassio 1 N (3.4), agitare, lasciar separare le due fasi e raccogliere la fase dicloroetanica (inferiore) direttamente in un altro imbuto separatore. Aggiungere alla fase dicloroetanica 40 ml di idrossido di potassio 0.5 N (3.5), agitare, lasciar separare le fasi e raccogliere la fase inferiore in

un altro imbuto separatore. Operando come in precedenza lavare con 40 ml di acqua distillata fino a scomparsa dell'alcalinità (3 volte).

- 5.2 *Determinazione per HPLC.* - Filtrare la fase dicloroetanica su solfato di sodio anidro (3.8) e prelevare una aliquota rifacendosi alla tabella 1. Portare a piccolo volume con evaporatore rotante e poi a secco con azoto. Riprendere il residuo con aliquote di alcool metilico (3.9) e di soluzione standard di vitamina E acetato (3.10), rifacendosi alle indicazioni della tabella 1. Filtrare su filtro da 0.45 µm ed iniettare la quantità ritenuta opportuna, scelta sempre in base alla tabella. Il flusso della fase mobile (3.11) deve essere di 1.2 ml/min e la temperatura della colonna regolata a 30 °C.

Tabella 1. - Volumi di campione da iniettare in funzione dei contenuti di vitamine

Quantità da iniettare µl	Quota di residuo di Vit.A evaporata U.I.	Soluzione standard di Vit. E acetato ml
5	160 - 400	2.0
10	80 - 200	1.0
25	32 - 80	0.4
50	16 - 40	0.2
100	8 - 20	0.1

Portare ad un volume finale di 2 ml con metanolo

- 5.3 *Determinazione dei fattori di correzione fra le aree delle vit. A ed E con l'area dello standard interno di vit. E acetato.* - I quantitativi di vit. A e di vit. E presenti nel campione non sono calcolati facendo riferimento ad uno standard esterno iniettato di volta in volta, ma utilizzando dei fattori di correzione ricavati a partire da iniezioni ripetute di quantità fisse di vit.A, vit. E e vit. E acetato. Dopo aver identificato i picchi corrispondenti a ciascuna vitamina, iniettando 25 µl delle soluzioni standard di vitamine (3.12 - 3.13 - 3.14), iniettare per almeno 10 volte 25 µl della soluzione multivitaminica (3.15). Sono iniettati così 1 U.I. di vit. A, 8 µg di vit. E e 25 µg di vit. E acetato. Sulla base della media di tutte le aree corrispondenti a vit. A, E ed E acetato calcolare:

$$\text{Fattore di correzione vit. A} = \frac{\text{area media vit. A}}{\text{area media vit. E acetato}}$$

$$\text{Fattore di correzione vit. E} = \frac{\text{area media vit. E}}{\text{area media vit. E acetato}}$$

La quantità di standard di vit. E acetato aggiunta al campione, in base alla tabella 1, sarà nel volume di iniezione sempre di 25 µg.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di vitamine A ed E del campione, espresso rispettivamente in Unità Internazionali o in milligrammi per 100 grammi o 100 millilitri, è calcolato in base alle seguenti formule:

$$\text{Vitamina A (U.I./100 g o 100 ml)} = \frac{A}{B \times FA} \times \frac{2000}{V \times v}$$

$$\text{Vitamina E (mg/100 g o 100 ml)} = \frac{C \times 8}{B \times FC} \times \frac{2}{V \times v}$$

dove:

- A = area del picco della vitamina A
- B = area del picco dello standard interno di vitamina E acetato
- C = area del picco della vitamina E
- V = volume di dicloroetano prelevato e portato a secco espresso in ml
- v = volume iniettato espresso in ml
- FA = fattore di correzione della vitamina A
- FC = fattore di correzione della vitamina E

Riferimenti bibliografici

SANZINI, E. BELLOMONTE, G. Determinazione simultanea delle vitamine A ed E nei prodotti dietetici mediante cromatografia ad alta risoluzione. *Acta Vitaminol.Enzymol.* 1982, (4), 347-352.

VITAMINA B₁**Metodo spettrofluorimetrico*****1. Campo di applicazione**

Il metodo è applicabile a tutti i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il campione è trattato a caldo con acido diluito e poi idrolizzato per via enzimatica. La soluzione ottenuta è sottoposta ad ossidazione alcalina, il tiocromo così formatosi è determinato per fluorimetria.

La fase di estrazione è comune al metodo per la determinazione della vitamina B₂.

3. Reattivi

3.1 *Acido cloridrico 1 N*

3.2 *Acido cloridrico 0.1 N*

3.3 *Acetato di sodio 2.5 M*

3.4 *Clarasi*

3.5 *Permutite T - Decalso*

3.6 *Soluzione acida di cloruro di potassio.* - Sciogliere 250 g di KCl in 700 ml di acqua, aggiungere 10 ml di HCl 1 N (3.1) e portare a volume in un matraccio da 1000 ml.

3.7 *Alcool isobutilico per spettrofotometria*

3.8 *Soluzione di idrossido di potassio al 25%*

3.9 *Soluzione di ferricianuro di potassio all'1%*

3.10 *Miscela ossidante.* - Miscelare al momento dell'uso 10 ml di KOH al 25% (3.8), 2 ml di ferricianuro di potassio all'1% (3.9) e portare a 25 ml con acqua.

3.11 *Soluzione standard di tiamina.* - Solubilizzare 30 mg di tiamina cloridrato in 1000 ml di HCl 0.1 N (3.2).

3.12 *Solfato di sodio anidro*

4. Apparecchiatura

4.1 *Spettrofluorimetro.* - Lunghezza d'onda di eccitazione a 370 nm e di emissione a 420 nm.

*Elisabetta Snzini

- 4.2 *Piastra riscaldante con agitatore magnetico*
- 4.3 *Stufa termostata*
- 4.4 *Colonna cromatografica in vetro.* - 1 cm di diametro e 20 cm di altezza.
- 4.5 *Bilancia analitica*

5. Procedimento

- 5.1 *Idrolisi.* - Condurre le operazioni al riparo dalla luce impiegando vetreria scura. Pesare in due beute con collo a smeriglio da 250 ml (contrassegnate con C = campione e C+St = campione + standard) 10 g o introdurvi, nel caso di prodotti liquidi, 10 ml di campione, aggiungere 100 ml di HCl 0.1 N (3.2) ed a quella contrassegnata C+St aggiungere una quantità di soluzione standard (3.11) circa equivalente a quella presente nel campione. Collegare con una canna refrigerante e porre in bagnomaria bollente su piastra riscaldante con agitatore magnetico per 30 minuti. Raffreddare a circa 45 °C e portare a pH 4.5 con acetato di sodio 2.5 M (circa 5 ml) (3.3), aggiungere 500 mg di Clarasi (3.4) ed agitare in modo da ottenere una dispersione omogenea, porre in stufa termostata a 45 °C per 2 ore agitando di tanto in tanto. Quindi trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 250 ml, raffreddare e portare a volume con acqua, filtrare infine su carta da filtro rapida. Per prodotti a matrice semplice, quali integratori vitaminico-minerali contenenti tiamina aggiunta come cloridrato o mononitrato, è sufficiente solubilizzare il prodotto con HCl 0.1 N.
- 5.2 *Purificazione su colonna.* - Allestire due colonne cromatografiche introducendo in ciascuna 3 g di Decalso (3.5) e lavando per 2 volte con 10 ml di acqua bollente. Introdurre nelle colonne corrispondenti una uguale quantità del filtrato, diluito se necessario, tale da contenere circa 2 - 3 µg di vitamina B₁ per il campione (C) e 4 - 6 µg per il campione addizionato di standard (C + St). Lasciar percolare e lavare per 3 volte con 10 ml di acqua bollente, quando il livello dell'ultimo lavaggio è a pochi millimetri dalla superficie della resina, eluire la vitamina con la soluzione KCl acida (3.6) calda a 70-80 °C raccogliendo gli eluati in matracci tarati da 25 ml, raffreddare e portare a volume con la soluzione di KCl acida (3.6).
- 5.3 *Determinazione fluorimetrica.* - Porre in due imbuti separatori da 25 ml 5 ml dell'eluato C e in un terzo imbuto 5 ml dell'eluato C + St. A uno degli imbuti separatori contenente l'eluato C, contrassegnato come bianco campione, aggiungere 5 ml di KOH al 25% (3.8). Dopo agitazione aggiungere 10 ml di alcool isobutilico (3.7) ed agitare di nuovo per 5 secondi. Agli altri imbuti separatori aggiungere 5 ml della miscela ossidante (3.10) agitare ed attendere 1 minuto, addizionare quindi 10 ml di alcool isobutilico (3.7) ed agitare di nuovo vigorosamente per 5 secondi. Dopo separazione delle fasi eliminare la fase inferiore e filtrare su solfato di sodio anidro (3.12) la fase isobutanolica (superiore). Leggere il valore di fluorescenza azzerando lo strumento con alcool isobutilico e regolando la lunghezza d'onda di eccitazione a 370 nm e quella di emissione a 420 nm.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di vitamina B₁ del campione espresso in milligrammi per 100 grammi o 100 millilitri, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Vitamina B}_1 \text{ (mg/100 g o 100 ml)} = \frac{A \times C}{B - A} \times 10$$

dove:

- A* = valore della lettura fluorimetrica del campione (C) sottratta del valore di fluorescenza del bianco campione
- B* = valore della lettura fluorimetrica del campione addizionato di standard (C + St) sottratta del valore di fluorescenza del bianco campione
- C* = mg totali di standard di tiamina aggiunti nel C + St nella fase di idrolisi (5.1).

Riferimenti bibliografici

STROHECKER, R. HENNING, H.M. Vitamin B₁ (Thiamine) In: *Vitamin Assay. Tested methods* 1965, 65-76, Verlag Chemie GMBH, Weinheim.

VITAMINA B₂**Metodo spettrofluorimetrico*****1. Campo di applicazione**

Il metodo è applicabile a tutti i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il campione è trattato a caldo con acido diluito e poi idrolizzato per via enzimatica. La soluzione ottenuta è sottoposta ad ossidazione con permanganato, e la vitamina B₂ è determinata per fluorimetria.

La fase di estrazione è comune al metodo per la determinazione della vitamina B₁.

3. Reattivi

- 3.1 *Acido cloridrico 0.1 N*
- 3.2 *Acetato di sodio 2.5 M*
- 3.3 *Clarasi*
- 3.4 *Acido acetico glaciale*
- 3.5 *Acido acetico 0.02 N*
- 3.6 *Soluzione di KMnO₄ al 4%*
- 3.7 *Soluzione di acqua ossigenata a 12 volumi*
- 3.8 *Soluzione standard di riboflavina.* - Solubilizzare a caldo in un matraccio tarato da 1000 ml 30 mg di riboflavina in 400 ml di acido acetico 0.02 N (3.5), dopo aver raffreddato portare a volume sempre con acido acetico (3.5)
- 3.9 *Sodio idrosolfito*

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Spettrofluorimetro.* - Lunghezza d'onda di eccitazione a 440 nm e di emissione a 525 nm.
- 4.2 *Piastra riscaldante con agitatore magnetico*
- 4.3 *Stufa termostata*
- 4.4 *Bilancia analitica*

* Elisabetta Sanzini

5. Procedimento

- 5.1 *Idrolisi.* - Condurre le operazioni al riparo dalla luce impiegando vetreria scura. Pesare in due beute con collo a smeriglio da 250 ml (contrassegnate con C = campione e C + St = campione + standard) 10 g o introdurvi, nel caso di prodotti liquidi, 10 ml di campione, aggiungere 100 ml di HCl 0.1 N (3.1) ed a quella contrassegnata C + St aggiungere una quantità di soluzione standard (3.8) circa equivalente a quella presente nel campione. Collegare con una canna refrigerante e porre in bagnomaria bollente su piastra riscaldante con agitatore magnetico per 30 minuti. Raffreddare a circa 45 °C e portare a pH 4.5 con acetato di sodio 2.5 M (circa 5 ml) (3.2), aggiungere 500 mg di Clarasi (3.3) ed agitare in modo da ottenere una dispersione omogenea, porre in stufa termostata a 45 °C per 2 ore agitando di tanto in tanto. Quindi trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 250 ml, raffreddare e portare a volume con acqua, filtrare infine su carta da filtro rapida. Per prodotti a matrice semplice, quali integratori vitaminico minerali, omettere l'idrolisi enzimatica.
- 5.2 *Determinazione spettrofluorimetrica.* - Diluire con acqua distillata la soluzione C in modo da avere una concentrazione di vitamina B₂ circa compresa tra 0.05-0.10 µg/ml, effettuare la stessa diluizione per la soluzione C + St. Porre 5 ml delle soluzioni in due provette, aggiungere in ognuna 0.5 ml di acido acetico glaciale (3.4), agitare ed aggiungere quindi 0.3 ml di KMnO₄ (3.6), lasciar riposare per 2 minuti. Aggiungere 0.3 ml di acqua ossigenata (3.7) ed agitare fino a quando la soluzione diventa chiara, se questa non si decolora aggiungere altra acqua ossigenata in quantità uguale in entrambe le provette. Leggere quindi i valori di fluorescenza delle soluzioni C e C + St azzerando il fluorimetro con acqua distillata. Aggiungere poi nelle cuvette (ad eccezione di quella contenente acqua) 10 mg di sodio idrosolfito (3.9), agitare e leggere nuovamente il valore di fluorescenza entro 10 secondi.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di vitamina B₂ del campione espresso in milligrammi per 100 grammi o 100 millilitri, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Vitamina B}_2 \text{ (mg / 100 g o 100 ml)} = \frac{A \times C}{B - A} \times 10$$

dove:

- A = valore della lettura fluorimetrica del campione (C) sottratta del valore di fluorescenza letto dopo aggiunta di idrosolfito.
- B = valore della lettura fluorimetrica del campione addizionato di standard (C + St) sottratta del valore di fluorescenza letto dopo aggiunta di idrosolfito.
- C = mg totali di standard di riboflavina aggiunti al C + St nella fase idrolisi (5.1).

Riferimenti bibliografici

STROHECKER R., HENNING H.M. Vitamin B₂ (Riboflavine) In: *Vitamin Assay. Tested methods 1965*, 98-108. Verlag Chemie GMBH, Weinheim.

VITAMINA C

Metodo enzimatico-spettrofotometrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

La vitamina C, a pH 3.5 ed in presenza di un carrier di elettroni, riduce il sale di tetrazolio MTT [3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5 difeniltetrazolio bromuro] a formazano dosabile spettrofotometricamente. L'allestimento di un bianco campione contenente ascorbato ossidasi consente di eliminare le interferenze dovute ad altre sostanze riducenti presenti nel campione. Per comodità può essere usato il kit di reagenti disponibili in commercio.

3. Reattivi

3.1 *Soluzione di acido metafosforico al 15%.*

3.2 *Idrossido di potassio 4 N.*

3.3 *Soluzione standard madre di acido ascorbico.* - Sciogliere 100 mg di vitamina con 10 ml di acido metafosforico (3.1) in un matraccio tarato da 100 ml, portare a volume con acqua.

3.4 *Soluzione standard di lavoro.* - In un matraccio tarato da 100 ml porre un 1 ml della soluzione (3.3), 10 ml acido metafosforico (3.1) e prima di portare a volume con acqua aggiustare il pH a circa 3.5 - 4.0 con la soluzione di KOH (3.2).

3.5 *Sodio fosfato bibasico biidrato.*

3.6 *Acido citrico monoidrato.*

3.7 *Etilen-diamino-tetracetato disodico biidrato.*

3.8 *Triton X - 100.*

3.9 *3- (4,5- dimetiltiazolil- 2) - 2,5 - difeniltetrazolio bromuro (MTT).*

3.10 *Soluzione tampone di MTT.* - Sciogliere 3.56 g di sodio fosfato (3.5) 4.20 g di acido citrico (3.6) con circa 80 ml di acqua in un matraccio tarato da 100 ml, aggiungere 74.5 mg di etilendiamminotetraacetato (3.7), 3.0 g di Triton (3.8) e 310 mg di MTT (3.9), sciogliere scaldando a 40 °C e portare a volume con acqua. La soluzione è stabile per due mesi a 4 °C.

* Concetta Boniglia

- 3.11 *Soluzione di ascorbato ossidasi (AAO).* - Sciogliere 7.5 mg di ascorbato ossidasi in 1 ml di acqua. La soluzione è stabile due giorni a 4 °C.
- 3.12 *Soluzione di 5 - metilfenazina-metisolfato (PMS) 15 mM.* - Sciogliere 46 mg di PMS in 10 ml di acqua.
Le soluzioni (3.10), (3.11) e (3.12) sono fornite già pronte nel kit.

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Bagnomaria termostato.*
4.2 *Spettrofotometro*
4.3 *Bilancia analitica*

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione.* - Pesare esattamente o prelevare con una pipetta tarata, nel caso di prodotti liquidi, una aliquota di campione contenente 1-3 mg di vitamina C ed aggiungere, in un matraccio tarato da 100 ml, 25 ml di acido metafosforico (3.1), quindi portare a volume con acqua. Porre 25 ml della soluzione, filtrata in precedenza, in un matraccio tarato da 50 ml e prima di portare a volume con acqua aggiustare il pH a circa 3.5-4.0 con KOH (3.2).
- 5.2 *Reazione colorimetrica.* - In due cuvette denominate bianco e campione operare seguendo lo schema qui riportato:

	Bianco	Campione
Soluzione tampone di MTT (3.10) (scaldata a 37°C)	1.00 ml	1.00 ml
Acqua distillata	0.58 ml	0.60 ml
Soluzione campione	1.00 ml	1.00 ml
Soluzione AAO (3.11)	0.02 ml	---

Mescolare ed incubare nel bagnomaria termostato a 37 °C agitando ogni due minuti il contenuto della cuvetta. Esattamente dopo 10 minuti procedere alle letture di assorbanza a 578 nm (A1).

Successivamente aggiungere ad ogni cuvetta 0.1 ml della soluzione di PMS (3.12) ed incubare nel bagnomaria per 15 minuti a 37 °C al buio. Procedere di nuovo alle letture di assorbanza dopo aver lasciato le cuvette al buio per altri 10 minuti (A2).

Procedere alla stessa reazione per lo standard di vitamina C con il relativo bianco, utilizzando 1 ml di soluzione standard di lavoro (3.4) al posto della soluzione campione.

6. Espressione dei risultati

Calcolare la differenza di assorbanza (DA= A2-A1) sia per il bianco che per il campione e sottrarre la differenza di assorbanza del bianco da quella del campione.

$$A \text{ campione} = DA \text{ campione} - DA \text{ bianco campione}$$

Operare gli stessi calcoli per lo standard

$$A \text{ standard} = DA \text{ standard} - DA \text{ bianco standard}$$

Il contenuto di vitamina C del campione, espresso in milligrammi per 100 grammi o 100 millilitri, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Vit. C (mg/100 g o 100 ml)} = \frac{A \text{ campione} \times C \times 20.000}{A \text{ Standard} \times P}$$

dove:

C = concentrazione della soluzione standard di lavoro in mg/ml

P = g o ml di campione utilizzati per l'analisi

Riferimenti bibliografici

DENEKE, U. MICHAL, G. BEUTLER, H.O. Neue Methode zur Bestimmung von Vitamin C in Lebensmitteln, *Deutsche Lebensmittel - Rundschau* 1978, (74), 400-403.

BEUTLER, H.O. BEISTINGL, G. Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Lebensmitteln, *Deutsche Lebensmittel - Rundschau* 1980. (76), 69-75.

EURO FOOD CHEM II: Proceedings of European Conference on food chemistry - determination of ascorbic acid in complex foodstuffs: comparison between diazotization method and enzymatic methods. Giammarioli, S. Filesi, C. Azocar, M.E. Bellomonte, G., Rome, 15-18 march 1983.

ADDITIVI

ACESULFAME**Metodo per HPLC****1. Campo di applicazione**

Il metodo è applicabile alle bevande e ai dolcificanti.

2. Principio del metodo

L'acesulfame è determinato mediante HPLC su colonna a fase inversa.

3. Reattivi

3.1 *Alcool metilico per HPLC.*

3.2 *Tampone fosfato 0.1 M a pH 4.* - In un matraccio tarato da 1000 ml solubilizzare con acqua 13.6 g di potassio fosfato monobasico, portare il pH a 4 con acido fosforico 0.1 M e portare quindi a volume sempre con acqua.

3.3 *Fase mobile.* - Miscelare 950 ml di tampone fosfato (3.2) e 50 ml di alcool metilico (3.1). Filtrare su filtro a membrana.

3.4 *Soluzione standard di acesulfame-K (1 mg/ml).* - Pesare esattamente 100 mg di acesulfame-K e trasferirli quantitativamente in un matraccio tarato da 100 ml con la fase mobile (3.3), portando a volume con la stessa soluzione.

3.5 *Soluzione di lavoro di acesulfame-K.* - Diluire la soluzione (3.4) con la fase mobile (3.3) in modo da ottenere una concentrazione di circa 40 µg/ml.

4. Apparecchiatura

4.1 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione con rivelatore UV a 210 nm.*

4.2 *Colonna HPLC C 18 25 cm x 4 mm*

4.3 *Filtri a membrana da 0.45 µm*

4.4 *Bilancia analitica.*

5. Procedimento

* Elisabetta Sanzini

- 5.1 *Preparazione del campione.* - Pesare o prelevare, nel caso delle bevande, una aliquota di campione contenente circa 4 mg di acesulfame e introdurla in un matraccio tarato da 100 ml. Solubilizzare e portare a volume con la fase mobile (3.3). Filtrare su filtri a membrana.
- 5.2 *Determinazione per HPLC.* - Iniettare 10 µl della soluzione campione e parallelamente 10 µl della soluzione standard di lavoro (3.5). Il flusso della fase mobile (3.3) deve essere regolato a 1.5 ml/min.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di acesulfame del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Acesulfame (g / 100 g o / 100 ml)} = \frac{A \times P_{ST}}{A_{ST} \times P \times 10.000}$$

dove:

A = area del picco dell'acesulfame del campione

A_{ST} = area del picco dell'acesulfame della soluzione standard

P = g o ml di campione utilizzati per l'analisi

P_{ST} = concentrazione della soluzione standard di lavoro (3.5) in µg/ml

**ACIDI ACETICO, FORMICO, LATTICO, MALICO,
PROPIONICO, SUCCINICO E TARTARICO**

Metodo per HPLC*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti.

2. Principio del metodo

Gli acidi organici sono estratti dal campione, in fase acquosa, e determinati mediante HPLC in fase inversa con rivelatore UV.

3. Reattivi

3.1 *Acido metafosforico 0.1%*

3.2 *Acetonitrile per HPLC*

3.3 *Acido fosforico 0.1%*

3.4 *Soluzione acquosa di acido acetico (250 mg/l), acido formico (250 mg/l), acido lattico (500 mg/l), acido malico (100 mg/l), acido propionico (250 mg/l), acido succinico (100 mg/l), acido tartarico (500 mg/l).*

4. Apparecchiatura

4.1 *Cartuccia C 18 Sep - Pac Waters o equivalente*

4.2 *Filtro a membrana da 0.45 µm*

4.3 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione*

4.4 *Colonna cromatografica per HPLC Supelcosil C - 610H, 30 cm x 7.8 mm ID, o equivalente.*

4.5 *Rivelatore spettrofotometrico regolato alla lunghezza d'onda di 210 nm.*

4.6 *Registratore o integratore.*

5. Procedimento

* Massimo Baldini; Paolo Stacchini

- 5.1 *Preparazione del campione ed estrazione.* - Prelevare 50 ml nel caso di prodotti liquidi o 50 g nel caso di prodotti solidi. Miscelare per 3 minuti in blender con 50 ml di acido metafosforico (3.1)
Centrifugare e raccogliere il supernatante in pallone da 100 ml, portare a volume con acido metafosforico (3.1)
Purificare l'estratto mediante passaggio su cartuccia Sep Pac preconditionata con 2 ml di acetonitrile (3.2) seguiti da 5 ml di acqua bidistillata. Filtrare l'estratto attraverso una membrana da 0.45 µm, prima dell'iniezione in HPLC.
- 5.2 *Preparazione delle soluzioni standard.* - Introdurre in 3 palloni tarati da 25 ml rispettivamente 1, 2.5 e 5 ml di soluzione (3.4) e portare a volume con acqua.
- 5.3 *Determinazione cromatografica.* - Predisporre la pompa per HPLC ad un flusso di 0.5 ml/min e usare la fase mobile (3.3). Selezionare la lunghezza d'onda di 210 nm al rivelatore UV. Iniettare 5 µl. Costruire le rette di taratura per ciascuno dei 7 acidi organici riportando in ordinata le assorbanze lette e in ascissa le concentrazioni corrispondenti. Quindi iniettare il campione ottenuto in 5.1. Calcolare sulla corrispondente retta di taratura il contenuto di ciascun acido organico della soluzione del campione.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di ciascun acido organico nel campione, espresso in milligrammi per chilogrammo o milligrammi per litro rispettivamente per campioni solidi o liquidi, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Acido organico (mg / kg, mg / l)} = \frac{c \times V}{g}$$

dove:

- c = concentrazione dell'acido organico nella soluzione del campione, in mg/l.
 V = volume della soluzione del campione, in ml.
 g = la quantità di campione analizzato, in grammi per campioni solidi, in ml per campioni liquidi.

ACIDI ASCORBICO E CITRICO**Metodo per HPLC*****1. Campo di applicazione**

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti.

2. Principio del metodo

Gli acidi ascorbico e citrico sono estratti dal campione, in fase acquosa, e determinati mediante HPLC in fase inversa con rivelatore UV.

3. Reattivi

3.1 *Acido fosforico 0.05 M*

3.2 *Fosfato di sodio biacido (KH_2PO_4) 0.025 M, pH 2.0 con acido fosforico conc. (3.1)*

3.3 *Acetonitrile per HPLC*

3.4 *Soluzione di acido ascorbico (1000 mg/l). - Pesare 100 mg di acido ascorbico ($C_6H_8O_6$) puro per analisi, dissolvere in poca acqua calda in pallone tarato da 100 ml e portare a volume con acqua bidistillata .*

3.5 *Soluzione di acido citrico (1000 mg/l). - Pesare 109.4 mg di acido citrico ($C_6H_8O_7 \times H_2O$) puro per analisi, dissolvere in poca acqua calda in pallone tarato da 100 ml e portare a volume con acqua bidistillata .*

4. Apparecchiatura

4.1 *Cartuccia C 18 Sep - Pac Waters o equivalente*

4.2 *Filtro a membrana da 0.45 μm*

4.3 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione*

4.4 *Colonna cromatografica per HPLC Supelcosil LC - ABZ 15 cm x 4.6 mm ID, o equivalente.*

4.5 *Rivelatore spettrofotometrico regolato alla lunghezza d'onda di 210 nm.*

4.6 *Registratore o integratore.*

* Massimo Baldini; Paolo Stacchini

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione ed estrazione.* - Prelevare 50 ml nel caso di prodotti liquidi o 10 - 50 g nel caso di prodotti solidi. Miscelare per 3 minuti in blender con 50 ml di acido fosforico (3.1) Centrifugare e raccogliere il supernatante in pallone da 100 ml, portare a volume con acido fosforico (3.1). Purificare l'estratto mediante passaggio su cartuccia Sep Pac preconditionata con 2 ml di acetonitrile (3.3) seguiti da 5 ml di acqua bidistillata. Filtrare l'estratto attraverso una membrana da 0.45 μm , prima dell' iniezione in HPLC.
- 5.2 *Preparazione delle soluzioni standard*
- 5.2.1 Introdurre in 3 palloni tarati da 100 ml rispettivamente 1, 2.5 e 5 ml di soluzione (3.4) e portare a volume con acqua. Le 3 soluzioni contengono rispettivamente 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l di acido ascorbico.
- 5.2.2 Introdurre in 3 palloni tarati da 100 ml rispettivamente 1, 2.5 e 5 ml di soluzione (3.5) e portare a volume con acqua. Le 3 soluzioni contengono rispettivamente 10 mg /l, 25 mg/l, 50 mg /l di acido citrico.
- 5.3 *Determinazione cromatografica.* - Predisporre la pompa per HPLC ad un flusso di 2 ml/min e usare la fase mobile (3.3). Selezionare la lunghezza d'onda di 210 nm al rivelatore UV. Iniettare 5 μl . Costruire le due rette di taratura: quella per l'acido ascorbico con le soluzioni ottenute in 5.2.1 e quella per l' acido citrico con le soluzioni ottenute in 5.2.2, riportando in ordinata le assorbanze lette e in ascissa le concentrazioni corrispondenti.
Quindi iniettare il campione ottenuto in 5.1. Calcolare sulla retta di taratura il contenuto di acido ascorbico e di acido citrico della soluzione del campione.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di ciascun acido organico nel campione, espresso in milligrammi per chilogrammo o milligrammi per litro rispettivamente per campioni solidi o liquidi, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Acido organico (mg / kg; mg / l)} = \frac{c \times V}{g}$$

dove:

- c = concentrazione dell'acido organico nella soluzione del campione, in mg/l.
 V = volume della soluzione del campione, in ml.
 g = la quantità di campione analizzato, in grammi per campioni solidi, in ml per campioni liquidi.

ACIDO BENZOICO**Metodo per HPLC*****1. Campo di applicazione**

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti.

2. Principio del metodo

L'acido benzoico è estratto dal campione, in fase acquosa, e determinato mediante HPLC in fase inversa con rivelatore UV.

3. Reattivi

3.1 *Acido fosforico 0.05 M*

3.2 *Fase mobile.* - Acetonitrile: acetato di sodio 0.02 M/acido acetico pH 4.3 (20:80)

3.3 *Soluzione di acido benzoico (1000 mg/l).* - Pesare 100 mg di acido benzoico puro per analisi, dissolvere in poca acqua calda in pallone tarato da 100 ml e portare a volume con acqua bidistillata.

4. Apparecchiatura

4.1 *Filtro a membrana da 0.45 μ m*

4.2 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione*

4.3 *Colonna cromatografica per HPLC Supelcosil LC - 18, 15 cm x 4.6 mm ID, o equivalente.*

4.4 *Rivelatore spettrofotometrico regolato alla lunghezza d'onda di 254 nm.*

4.5 *Registratore o integratore.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione ed estrazione.* - Prelevare 50 ml nel caso di prodotti liquidi o 50 g nel caso di prodotti solidi. Miscelare per 3 minuti in blender con 50 ml di acido fosforico (3.1) Centrifugare e raccogliere il supernatante in pallone da 100 ml, portare a volume con acido fosforico (3.1).

* Massimo Baldini; Paolo Stacchini

Filtrare l'estratto attraverso una membrana da 0.45 μm , prima dell' iniezione in HPLC.

- 5.2 *Preparazione delle soluzioni standard.* - Introdurre in tre palloni tarati da 100 ml rispettivamente 1, 2.5 e 5 ml di soluzione (3.3) e portare a volume con acqua. Le tre soluzioni contengono rispettivamente 10, 25 e 50 mg/l di acido benzoico
- 5.3 *Determinazione cromatografica.* - Predisporre la pompa per HPLC ad un flusso di 1.5 ml/min e usare la fase mobile (3.2). Selezionare la lunghezza d'onda di 254 nm al rivelatore UV. Iniettare 5 μl .
Costruire la retta di taratura, riportando in ordinata le assorbanze lette e in ascissa le concentrazioni corrispondenti.
Quindi iniettare il campione ottenuto in 5.1. Calcolare sulla retta di taratura il contenuto di acido benzoico della soluzione del campione.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di ciascun acido organico nel campione, espresso in milligrammi per chilogrammo o milligrammi per litro rispettivamente per campioni solidi o liquidi, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Acido benzoico (mg / kg; mg / l)} = \frac{c \times V}{g}$$

dove:

- c = concentrazione dell'acido organico nella soluzione del campione, in mg/l.
 V = volume della soluzione del campione, in ml.
 g = la quantità di campione analizzato, in grammi per campioni solidi, in ml per campioni liquidi.

ACIDO PROPIONICO E PROPIONATI

Metodo gascromatografico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ai prodotti da forno.

2. Principio del metodo

L'acido propionico è determinato mediante gascromatografia, previa estrazione con una soluzione di acido formico 0.05 M che permette di convertire i propionati eventualmente presenti in acido propionico.

3. Reattivi

3.1 *Acido propionico standard per gascromatografia*

3.2 *Acido valerico standard per gascromatografia*

3.3 *Acido formico 0.05 M*

4. Apparecchiature

4.1 *Omogeneizzatore a lame del tipo Waring Blender*

4.2 *Filtri a membrana di dimensioni 0.5 µm*

4.3 *Gascromatografo fornito di detector a ionizzazione di fiamma*

4.4 *Colonna per la determinazione degli acidi impaccata o preferibilmente capillare polare in silice fusa (ad es. con fase stazionaria: FFAP, ET1000, BP20, OV351, OV353, SP1000, SP1200, SUPEROX FA, ecc.)*

4.5 *Integratore elettronico.*

5. Procedimento

5.1 *Estrazione.* - Per evitare perdite di acido propionico durante l'essiccamento effettuare la determinazione sul campione tal quale. Aggiungere ad un' aliquota di campione (5 -10 g) una quantità nota dello standard interno (3.2) in modo di ottenere una concentrazione di circa 100 ppm.

* Roberta Onori

Estrarre in Waring Blender, per 5 minuti a bassa velocità, con 100 ml di una soluzione di acido formico (3.3).

Filtrare un'aliquota dell'estratto, il filtrato ottenuto è pronto per l'analisi gascromatografica.

- 5.2 *Determinazione gascromatografica.* - Per quanto riguarda le condizioni operative gascromatografiche, essendo correlate alle caratteristiche del gascromatografo e della colonna adottata, devono essere scelte sperimentalmente in modo da ottenere una separazione soddisfacente.

Sono riportate a titolo esemplificativo le condizioni utilizzate con la seguente strumentazione.

Condizioni operative:

Gasromatografo per colonne capillari fornito di rivelatore a ionizzazione di fiamma e iniettore on - column

Colonna capillare MEGA in silice fusa, fase stazionaria MEGAACID, spessore del film 0.10-0.15 μ , diametro interno 0.32 mm, lunghezza 15 m.

Precolonna vuota diametro interno 0.53 mm, lunghezza 5m.

Forno: temperatura programmata: da 50 °C a 170 °C con velocità di 5.0 °C/min.

Gas di trasporto Elio flusso 2 ml/min.

Temperatura del rivelatore: 220 °C

La determinazione dell'acido propionico è ottenuta iniettando nel gascromatografo un'opportuna aliquota dell'estratto. Nel calcolo è utilizzato il rapporto tra l'area dell'acido propionico e quella dello standard interno. A tal fine è allestita una curva di calibrazione iniettando una serie di soluzioni di acido propionico a concentrazione nota e contenenti 100 ppm di standard interno.

6. Espressione dei risultati

Calcolare sulla retta di taratura il contenuto in acido propionico della soluzione del campione. Procedere al calcolo della concentrazione dell'acido nel campione tenendo conto delle diluizioni effettuate.

Riferimenti bibliografici

LAMKIN, W.M. UNRUH, POMERANZ, N.Y. Gas-chromatographic determination of Calcium Propionate Added as Preservative to Bread. *J. Assoc. Anal. Chem.* 1987, 70 (4), 763-767.

ACIDO SORBICO

Metodo spettrofotometrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alla margarina per la determinazione dell'acido sorbico come tale o sotto forma di un suo sale.

2. Principio del metodo

Il campione in esame è sottoposto, in ambiente acido, ad estrazione con metanolo acquoso. Sull'estratto, filtrato, determinare spettrofotometricamente l'acido sorbico mediante la misura dell'estinzione a 258 nm.

3. Apparecchiatura

3.1 *Spettrofotometro per misurare nell'UV*

3.2 *Vaschette di quarzo prismatiche.* - Munite di coperchio, di percorso ottico di 1 cm. Le vaschette, riempite di acqua o metanolo, non devono presentare fra di loro differenze superiori a 0.01 unità di estinzione.

4. Reagenti

4.1. *Metanolo puro per spettrofotometria.* - Il suo spettro UV non deve mostrare massimi fra 200 e 300 nm; l'assorbanza, misurata in vaschetta di quarzo da 1 cm contro acqua distillata, non deve essere superiore a 0.1 nella zona fra 200 e 300 nm.

Se il metanolo non risponde a detti requisiti può essere purificato come segue: 2 l di metanolo sono fatti bollire a ricadere per 3 ore con 10 g di potassio idrossido e 25 g di zinco in polvere; si distilla quindi scartando i primi e gli ultimi 250 ml di distillato.

4.2. *Acido solforico, soluzione acquosa 4 N*

4.3. *Soluzione idrometanolica di acido solforico.* - Si miscelano 11 ml di acqua con 0.5 ml di acido solforico 4 N e si diluisce a 100 ml con metanolo.

* Mirella Delise

5. Procedimento

- 5.1. Pesare nella beuta da 250 ml a tappo smerigliato, con la precisione di 0.001 g una quantità di campione, opportunamente omogeneizzato, pari a 5 g circa, ovvero che contenga, in via presuntiva, 2.5 mg circa di acido sorbico.
Immergere il matraccio in bagnomaria a 70 °C circa; quando il campione è fuso, aggiungere 30 ml di metanolo, 10 ml di acqua e 0.5 ml di acido solforico 4 N; scaldare di nuovo a bagnomaria, tappare il matraccio e agitare vigorosamente per un minuto.
Aggiungere 55 ml di metanolo, raffreddare a temperatura ambiente e poi per 30 minuti in acqua e ghiaccio fino a solidificazione del grasso.
Filtrare attraverso un filtro a pieghe previamente bagnato con metanolo, raccogliendo il filtrato in un matraccio tarato da 200 ml.
Ripetere l'estrazione e filtrazione con le stesse modalità a partire dall'aggiunta di 30 ml, raccogliendo insieme gli estratti nel matraccio tarato da 200 ml e portando infine a volume con la soluzione idrometanolica di acido solforico e omogeneizzando accuratamente.
- 5.2. Dalla soluzione ottenuta si prelevare, mediante pipetta tarata, 10 ml e trasferire quantitativamente in un matraccio tarato da 50 ml.
Diluire a volume con soluzione idrometanolica di acido solforico e omogeneizzare.
- 5.3. Dalla soluzione diluita misurare le estinzioni a 252, 258 e 264 nm, in vaschetta da 1 cm, impiegando come riferimento la soluzione idrometanolica di acido solforico.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di acido sorbico del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Acido sorbico mg / kg} = \frac{55000}{m} \times \left(E_{258} - \frac{E_{252} + E_{264}}{2} \right)$$

dove:

E = estinzione alle lunghezze d'onda indicate

m = massa di campione prelevato per la determinazione, grammi

ACIDO SORBICO

Metodo per HPLC*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ai prodotti da forno, alla polenta, agli gnocchi di patate e alla pasta con ripieno.

2. Principio del metodo

L'acido sorbico è determinato mediante HPLC con rivelazione UV, previa estrazione con una soluzione di acqua e metanolo.

3. Reattivi

3.1 *Acqua bidistillata per HPLC*

3.2 *Acetonitrile, reattivo per HPLC*

3.3 *Acido acetico glaciale*

3.4 *Acetato di sodio*

3.5 *Fase mobile.* - Sciogliere 2.5 g di acetato di sodio (3.4) in due litri di acqua bidistillata (3.1), aggiungere 2.4 ml di acido acetico (3.3) e portare il pH ad un valore di 4.5 con una soluzione di acido acetico 1 M. Preparare la fase mobile mescolando il tampone così ottenuto con acetonitrile (3.2) rapporto 80/20. Verificare ed eventualmente correggere il valore del pH (4.5) prima dell'utilizzazione.

3.6 *Metanolo*

3.7 *Acido sorbico*

4. Apparecchiatura

4.1 *Bilancia analitica*

4.2 *Omogeneizzatore tipo ultra turrax*

4.3 *Filtro a membrana da 0.45 μ*

4.4 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione*

4.7 *Colonna cromatografica per HPLC C18 (lunghezza 15 cm)*

4.8 *Rivelatore spettrofotometrico*

* Carlo Brera

4.9 *Registratore o integratore.*

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione.* - Mescolare una aliquota (circa 20 g) di campione con uguale peso di acqua ed omogeneizzare (4.2) per 10 minuti circa.
- 5.2 *Estrazione.* - Diluire 5 g del campione (5.1) con 15 ml di metanolo e dopo agitazione centrifugare per 10 minuti a 12000 rpm. Filtrare una porzione del sovrantante, il filtrato ottenuto è pronto per l'analisi in HPLC.
- 5.3 *Preparazione delle soluzioni standard.* - Preparare una soluzione concentrata di acido sorbico (0.05 gr in 100 ml di acqua metanolo 80 : 20). Preparare per diluizione gli standard relativi alla curva di calibrazione in modo da ottenere le seguenti concentrazioni: 0.2 - 1 - 3- 5 - e 8 mg/ml.
- 5.4 *Determinazione cromatografica.* - Predisporre la pompa per HPLC ad un flusso di 1.0 ml/min usare la fase mobile 3.5. Selezionare la lunghezza d'onda di 257 nm al rivelatore UV. Costruire una retta di taratura con le soluzioni ottenute in 5.3, quindi iniettare una opportuna aliquota del filtrato ottenuto in 5.2.

6. Espressione dei risultati

Dall'area del picco ottenuto ricavare sulla curva di calibrazione la quantità di acido sorbico contenuta nell'estratto. Calcolare il contenuto di acido sorbico presente nel campione considerando le diluizioni effettuate durante la preparazione.

Riferimenti bibliografici

BRERA, C. MASCI, V. CAVA, E. Valutazioni sul fenomeno di migrazione dell'acido sorbico del ripieno alla pasta di tortellini. *Italian Journal of Food Science*. In corso di pubblicazione.

ALCOOL ETILICO

Metodo gascromatografico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile al pane in cassetta e ai prodotti da forno

2. Principio del metodo

La determinazione dell'alcool etilico è effettuata mediante gascromatografia in spazio di testa.

3. Reattivi

- 3.1 *Alcool etilico standard per gascromatografia*
- 3.2 *Alcool ter-butilico standard per gascromatografia*
- 3.3 *Acqua degasata.* - Mantenere per 20 minuti in bagno ad ultrasuoni prima dell'uso

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Bilancia analitica*
- 4.2 *Vials per spazio di testa con tappi in gomma teflonata e ghiere in alluminio*
- 4.3 *Pinze chiudi vials*
- 4.4 *Bagno ad ultrasuoni*
- 4.5 *Gascromatografo*
- 4.6 *Rivelatore a ionizzazione di fiamma*
- 4.7 *Colonna impaccata* (es. Chromosorb 102, 80/100 mesh o equivalenti) o *preferibilmente capillare polare in silice fusa* (ad es. CW 20M o equivalenti)
- 4.8 *Autocampionatore per spazio di testa; in alternativa bagno termostatico ad acqua e siringa per iniezione di gas.*
- 4.9 *Integratore elettronico*

5. Procedimento

* Roberta Onori

- 5.1 *Estrazione.* - Pesare in vial da 10 ml 0.4 - 0.8 g di campione ed aggiungere un'aliquota di standard interno (3.2) e 6 ml di acqua degasata (3.3). Chiudere le vials con la pinza e dopo 1 h di condizionamento in bagno ad acqua alla temperatura di 80 °C effettuare la determinazione gascromatografica.
- 5.2 *Determinazione gascromatografica.* - Per quanto riguarda le condizioni operative gascromatografiche, essendo correlate alle caratteristiche del gascromatografo e della colonna adottata, devono essere scelte sperimentalmente in modo da ottenere una separazione soddisfacente.

Sono riportate a titolo esemplificativo le condizioni utilizzate con la strumentazione di seguito citata.

Condizioni operative:

Gasromatografo fornito di rivelatore a ionizzazione di fiamma

Colonna impaccata Chromosorb 102, 80/100 mesh, lunghezza 1m.

Forno: temperatura isoterma a 175 °C

Gas di trasporto Elio 150 kPa di pressione al lato iniettore

Temperatura iniettore 200 °C

Temperatura del rivelatore: 230 °C

Autocampionatore per spazio di testa: temperatura del bagno 80°C, temperatura della siringa 90 °C, tempo di condizionamento 1 h.

La determinazione dell'alcool etilico è ottenuta iniettando nel gas - cromatografo un'opportuna aliquota dello spazio di testa del flacone. Nel calcolo è utilizzato il rapporto tra l'area dell' alcool etilico e quella dello standard interno. A tal fine allestire, utilizzando le stesse condizioni impiegate per il campione, una curva di calibrazione a tre punti nel range di concentrazione 500 - 2000 ppm .

6. **Espressione dei risultati**

Calcolare sulla retta di taratura il contenuto in alcool etilico del campione, considerando le diluizioni effettuate durante la preparazione.

La determinazione deve essere effettuata su almeno 5 aliquote di campione prelevate in differenti punti della confezione.

Riferimenti bibliografici

HOLLINGWORTH, T.A. THROM, H.R. A Headspace Gas-chromatographic Method for the Rapid Analysis of Ethanol in Canned Salmon. *Jour. of Food Sci.* 1983, 48, 290 - 291.

ALDEIDE FORMICA

Metodo spettrofotometrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è valido per l'aldeide formica e per l'esametilentetramina ed è applicabile ai campioni di formaggio.

2. Metodo

Procedere come indicato nella Gazzetta Ufficiale Italiana n° 184 del 17/07/1972 Metodo per la determinazione dell'Aldeide Formica e dell'Esametilentetramina in campioni di formaggio.

* Mirella Delise

ASPARTAME

Metodo per HPLC*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle bevande ed ai dolcificanti.

2. Principio del metodo

L'aspartame è determinato mediante HPLC su colonna a fase inversa.

3. Reattivi

3.1 *Alcool metilico per HPLC*

3.2 *Tampone fosfato 0.1 M a pH 4.* - In un matraccio tarato da 1000 ml solubilizzare 13.6 g di potassio fosfato monobasico con acqua, portare il pH a 4 con acido fosforico 0.1 M e portare quindi a volume sempre con acqua.

3.3 *Fase mobile.* - Miscelare 400 ml di alcool metilico (3.1) con 600 ml di tampone fosfato (3.2) Filtrare su filtri a membrana (4.4).

3.4 *Soluzione di standard interno.* - Pesare esattamente 300 mg di N-acetil-L-tirosina etilestere monoidrato e trasferirli quantitativamente in un matraccio tarato da 100 ml con la fase mobile (3.3), portando a volume con la stessa soluzione.

3.5 *Aspartame.* - N-L- α -aspartil-L-fenilalanina metilestere.

4. Apparecchiatura

4.1 *Bilancia analitica*

4.2 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione con rivelatore UV a 210 nm.*

4.3 *Colonna HPLC C18 25 cm x 4 mm*

4.4 *Filtri a membrana da 0.45 μ m*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione.* - Pesare o prelevare, nel caso delle bevande, una aliquota di campione contenente circa 10-30 mg di aspartame e introdurli in un matraccio tarato da 100 ml.

* Elisabetta Sanzini

Aggiungere 10 ml della soluzione di standard interno (3.4) e portare a volume con la fase mobile (3.3).

5.2 *Determinazione per HPLC.* - Iniettare 20 μ l della soluzione così preparata. Il Flusso della fase mobile (3.3) deve essere regolato a 1.2 ml/min.

5.3 *Determinazione dei fattori di correzione.* - Per effettuare la determinazione dei fattori di correzione preparare due soluzioni A e B come di seguito indicato.

A: pesare 25 mg di aspartame e trasferirli quantitativamente con la fase mobile (3.3) in un matraccio tarato da 100 ml, aggiungere 10 ml della soluzione di standard interno (3.4) e portare a volume sempre con la fase mobile .

B: pesare 35 mg di aspartame e procedere come indicato in A.

Filtrare le soluzioni su filtro a membrana (4.4) ed iniettare più volte 20 μ l di ciascuna soluzione nelle condizioni sopra riportate (5.2).

Per ricavare il fattore di correzione applicare le seguente formula:

$$F = \frac{A_{Si} \times P_A}{A_A \times P_{Si}}$$

A_{Si} = area del picco dello standard interno

A_A = area del picco dell'aspartame

P_{Si} = mg di standard interno contenuti in 10 ml della soluzione (3.4)

P_A = mg di aspartame pesati

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di aspartame del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Aspartame (g / 100 o 100 ml)} = \frac{A \times P_{Si} \times F}{A_{Si} \times P \times 10}$$

dove:

A = area del picco dell'aspartame

A_{Si} = area del picco dello standard interno

P_{Si} = mg di standard interno contenuti in 10 ml della soluzione (3.4)

P = g o ml di campione utilizzati per l'analisi

F = fattore di correzione (5.3)

Riferimenti bibliografici

Aspartame. In: *Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana*, 9. Ed, II volume, I parte: 183-186, Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma 1985.

GLUTAMMATO MONOSODICO**Metodo per HPLC*****1. Campo di applicazione**

Il metodo è applicabile a tutti gli alimenti.

Procedere come indicato nel Metodo Aminoacidi Liberi della sezione Sostanze azotate.

La soluzione di lavoro potrà essere sostituita con una soluzione contenente solo acido glutammico (10 nmoli/ml) preparata in modo analogo.

2. Espressione dei risultati

Il contenuto di glutammato monosodico, espresso in percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Glutammato monosodico (g/100g)} = \frac{A \times 1.15}{1000}$$

dove:

A = acido glutammico (mg/100 g) calcolato in base alla formula riportata nel metodo aminoacidi liberi

* Brunella Carratù

MONO E DIGLICERIDI DEGLI ACIDI GRASSI

Metodo gascromatografico*

1. Campo di applicazione

Il metodo é applicabile ai prodotti da forno

2. Principio del metodo

I mono e digliceridi, dopo digestione enzimatica del campione, sono estratti con cloroformio. Dopo separazione e clean-up, ottenuti mediante TLC, la determinazione gascromatografica degli acidi grassi è effettuata previa saponificazione/esterificazione.

3. Reattivi

- 3.1 *α - amilasi batterica*
- 3.2 *Papaina*
- 3.3 *Cloroformio.*
- 3.4 *Solfato di sodio anidro*
- 3.5 *Miscela di toluene e acido acetico 85:15*
- 3.6 *n - esano per gascromatografia*
- 3.7 *Iodio puro*
- 3.8 *Soda metanolica 0,1 N*
- 3.9 *Reattivo metilante. - Soluzione al 10% di BF₃ in metanolo*
- 3.10 *α - monostearina*
- 3.11 *α - β e α - γ dipalmitina*
- 3.11 *Metileptadecanoato Standard per GC*
- 3.12 *Lastre per TLC di gel di silice da 20x 20x 0,025 cm*

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Bagno termostatico ad acqua con agitatore*
- 4.2 *Evaporatore rotante*
- 4.3 *Bagno a secco con blocco di riscaldamento per provette*

* Roberta Onori

- 4.4 *Gasromatografo per colonne capillari munito di rivelatore a ionizzazione di fiamma*
- 4.5 *Colonna capillare polare in silice fusa* (es. polietilenglicol, cianopropil o cianopropilfenilsilicone ecc.). - Diametro interno di 0.2 - 0.8 mm e lunghezza 25 - 30 m
- 4.6 *Integratore elettronico.*

5. Procedimento

- 5.1 *Estrazione.* - Sospendere 1 g di prodotto macinato addizionato con 50 mg di α - amilasi e 50 mg di papaina in 10 ml di acqua e incubarlo per 30 minuti a 60-62 °C e successivamente per 30 minuti a 70-75 °C. Travasare la miscela in provette da centrifuga da 25 ml con tappo a vite, aggiungere 10 ml di cloroformio, sottoporre ad energica agitazione per 10 minuti e centrifugare a 18.000 r.p.m. Filtrare lo strato cloroformico separato su ovatta. Ripetere l'estrazione due volte, riunire gli estratti e portare a secco sotto vuoto, ad una temperatura inferiore a 50 °C. Solubilizzare il residuo ottenuto 10 ml con cloroformio in matraccio tarato.
- 5.2 *Separazione.* - Deposare ad una distanza di circa 2 cm dal bordo lungo una linea parallela, 2 ml di estratto (5.1) e le soluzioni degli standard dei mono e digliceridi (3.10, 3.11). Sviluppare la lastra in vasca satura con la miscela toluene-acido acetico (3.5).
Effettuata la corsa e asciugata la lastra, evidenziare le bande di interesse per esposizione ai vapori di iodio. Effettuare le attribuzioni per confronto con gli standard. Asportare le bande e raccogliere in provette con tappo a vite.
- 5.3 *Saponificazione/esterificazione.* - Effettuare una saponificazione/esterificazione con soda metanolica in presenza di BF_3 in metanolo (3.9) secondo le seguenti modalità. Aggiungere al gel di silice, addizionato di un'opportuna quantità di standard interno (metil eptadecanoato circa 0.2 mg), 3 ml di una soluzione 0.1 N di idrossido di sodio in metanolo. Agitare energicamente e riscaldare per 1 minuto a 60 °C ripetendo questa operazione per quattro volte. Dopo raffreddamento aggiungere 1.4 ml di reattivo metilante e agitare energicamente e riscaldare per 1 minuto a 60 °C ripetendo questa operazione per tre volte. Alla provetta raffreddata aggiungere 5 ml di n-esano agitare e far separare le fasi mediante breve riscaldamento; effettuare l'agitazione ed il riscaldamento cinque volte. Pipettare la fase esanica superiore in una provetta da 15 ml. Ripetere il procedimento di estrazione rispettivamente con 5 e 4 ml di esano. Le fasi riunite e opportunamente concentrate sotto flusso di azoto sono pronte per essere iniettate al GC.
- 5.4 *Analisi gascromatografica.* - Per quanto riguarda le condizioni operative gascromatografiche, essendo correlate alle caratteristiche del gascromatografo (4.4) e della colonna adottata (4.5), devono essere scelte sperimentalmente in modo da ottenere una separazione soddisfacente degli acidi grassi presenti nel campione (vedi metodo generale per la determinazione degli acidi grassi).

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di mono (MG) e digliceridi (DG) del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alle seguenti formule:

$$MG (g / 100 g) = \frac{Area_{tot}}{Area_{st}} \times St \times F_1 \times 2,5$$

$$DG (g / 100 g) = \frac{Area_{tot}}{Area_{st}} \times St \times F_2 \times 2,5$$

dove:

$Area_{tot}$ = somma delle aree dei picchi corrispondenti agli acidi grassi

$Area_{st}$ = area del picco corrispondente allo standard interno (C17)

St = quantitativo in mg di Standard interno aggiunto

F_1 = 1,206 fattore di correzione per MG

F_2 = 1,05 fattore di correzione per DG

Riferimenti bibliografici

MIRAGLIA, M., TASSI MICCO, C. BONIFATI BENELLI, L. Determinazione dei mono e digliceridi nei prodotti lievitati e sottoposti a cottura. Nota 1. *La Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione* 1982, 11 (1), 31-36.

NITRATI E NITRITI

Metodo spettrofotometrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle carni.

2. Principio del metodo

Estrazione dei nitriti e dei nitrati con soluzione tampone (pH 9.6), purificazione dell'estratto con i reattivi di Carrez e determinazione colorimetrica previa riduzione del nitrato su spugna di cadmio.

3. Reattivi

3.1 *Ammonio idrato*

3.2 *Soluzione tampone pH 9.6-9.7.* - In un pallone tarato da 1 l versare 500 ml di acqua distillata, 20 ml di HCl, 50 ml di NH₄OH e diluire ad un litro con acqua distillata.

3.3 *Carrez I.* - Pesare 219 g di zinco acetato biidrato, trasferire in un pallone tarato da un litro, aggiungere 30 ml di acido acetico glaciale e portare a volume con acqua distillata.

3.4 *Carrez II.* - Solubilizzare con acqua distillata 106 g di potassio ferrocianuro-triidrato in un pallone tarato da un litro e portare a volume.

3.5 *Naftilendiammina.* - Sciogliere 0.2 g di naftilendiammina dicloridrato in 150 ml di soluzione acquosa al 15% di acido acetico. La soluzione conservata in bottiglia di vetro scuro, alla temperatura di + 4 °C è stabile per 4 giorni.

3.6 *Sulfanilamide.* - Sciogliere 0.5 g di sulfanilamide in 150 ml di acido acetico al 15%. La soluzione deve essere conservata in una bottiglia di vetro scuro alla temperatura di +4 °C ed è stabile per 4 giorni.

3.7 *Zinco in polvere*

3.8 *Acetato di cadmio al 5%*

3.9 *Soluzione allo 0.25% di nitrito di sodio.* - Sciogliere 2.5 g di nitrito di sodio, previamente seccato in stufa a 105 °C, in un pallone tarato da 1000 ml e portare a volume con acqua.

* Massimo Baldini; Paolo Stacchini

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Spettrofotometro UV-Visibile, munito di vaschette aventi 1 cm di cammino ottico*
 4.2 *Bilancia analitica*

5. Procedimento

Omogeneizzare perfettamente il campione. Pesare (4.2) 5g di campione, aggiungere 15 ml di tampone pH 9.6 (3.2); omogeneizzando per 5-10 minuti. Trasferire il campione in un pallone tarato da 100 ml mediante imbuto. Lavare con pochi ml di acqua distillata l'omogeneizzatore.

Lavare per tre volte il contenitore del campione con pochi ml di soluzione tampone pH 9.6 (3.2).

Aggiungere 5 ml di Carrez I (3.3), goccia a goccia. Agitare per 30 secondi.

Aggiungere 5 ml di Carrez II (3.4), goccia a goccia. Agitare per 30 secondi.

Portare a volume con acqua distillata.

Lasciare a riposo per 15 minuti.

Filtrare su carta da filtro previamente lavata più volte con soluzione tampone pH 9.6 (3.2). Allontanare i primi 5 ml di filtrato e raccogliere il filtrato successivo in una beuta.

- 5.1 *Prova in bianco.* - Mettere in un pallone tarato da 100 ml, 50 ml di H₂O distillata, 15 ml di tampone, 5 ml di Carrez I (3.3) e successivamente 5 ml di Carrez II (3.4) e portare a volume.

Attendere 30 minuti. Filtrare su carta da filtro previamente lavata più volte con tampone pH 9.6 (3.2) e portare a pH 0 con HCl concentrato. La prova in bianco va eseguita come la prova del campione sia per i nitriti che per i nitrati.

- 5.2 *Dosaggio dei nitriti (NO₂⁻).* - Prelevare 20 ml del filtrato (corrispondenti ad un contenuto in ione nitroso 3-60 µg) e metterli in una beuta da 100 ml. Aggiungere 2 ml di HCl concentrato, 2.5 ml di sulfanilamide, miscelare ed attendere 5 minuti. Aggiungere 2.5 ml di naftilendiammina dicloridrato. Lasciare riposare per 20 minuti. Leggere l'assorbanza a 540 nm.

Eeguire la prova in bianco allo stesso modo.

- 5.3 *Dosaggio dei nitrati (NO₃⁻).* - Prelevare 20 ml del filtrato e metterli in una beuta da 100 ml. Aggiungere 2 ml di ammonio idrato. Aggiungere 1 ml di acetato di cadmio + 0.5 g di zinco in polvere. Agitare per 3 minuti. Filtrare. Prelevare 10 ml di filtrato +4 ml di HCl concentrato poi aggiungere 2.5 ml di sulfanilamide, mescolare ed attendere 5 minuti. Aggiungere 2.5 ml di naftilendiammina. Miscelare ed attendere 20 minuti. Leggere allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 540 nm.

- 5.4 *Preparazione della curva di calibrazione.* - Prelevare 10 ml della soluzione (3.9), porli in un pallone tarato da 1000 ml e portare a volume. Prelevare 10 ml di questa soluzione, porli in un pallone tarato da 100 ml e portare a volume. Prelevare 5, 10 e 20 ml di queste soluzioni, porli in 3 palloni tarati da 100 ml e portare a volume con acqua. Tali soluzioni contengono rispettivamente 12.5-25-50 µg di nitrito di sodio.

Per costruire la retta di calibrazione, prelevare 20 ml da ciascuna delle 3 soluzioni ottenute e procedere come indicato al punto 5.2.
Ultimate le letture spettrofotometriche, costruire la curva di calibrazione

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di nitriti e di nitrati del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alle seguenti formule:

$$\text{Nitrito di sodio (mg / kg)} = \frac{N \times 5}{5}$$

$$\text{Nitrate di sodio (mg / kg)} = \frac{N \times 10}{5} \times 1.23$$

dove:

N = quantità in microgrammi nitrito di sodio ricavato dalla curva di calibrazione

POLIFOSFATI

Metodo spettrofotometrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo A descrive il modo di calcolare il contenuto, espresso come fosforo, in emulsionanti fosfatici aggiunti ai formaggi fusi. Il metodo B consente la determinazione dei polifosfati nei prodotti carnei.

Metodo A

2. Principio del metodo

Una quantità di campione pesata è mineralizzata con acido solforico in presenza di acqua ossigenata. Il fosfato è trattato con molibdato di sodio e solfato di idrazina come agente riducente.

Il blu di molibdeno ottenuto è misurato fotometricamente.

Si calcola quindi il contenuto in fosforo. Si corregge poi tale contenuto in funzione del fosforo proveniente da costituenti diversi dagli emulsionanti. La correzione si calcola a partire dal contenuto in azoto mediante il rapporto costante fosforo/azoto.

3. Reattivi

3.1 *Acido solforico concentrato* (densità a 20 °C: 1.84 g/ml)

3.2 *Soluzione di acqua ossigenata al 30% (m/v)*

3.3 *Reagente al molibdato ed al solfato di idrazina.* - Sciogliere 12.5 g di molibdato di sodio $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in acido solforico 10 N e portare a volume a 500 ml (soluzione A al 25% di molibdato di sodio). Sciogliere 0.30 g di $\text{H}_2\text{NNH}_2\text{SO}_4$ in acqua distillata e portare a volume a 200 ml (soluzione B allo 0.15% di solfato di idrazina).

Al momento dell'uso preparare il reagente al molibdato ed al solfato di idrazina mescolando 25 ml della soluzione A con ml 10 della soluzione B e portare a 100 ml con acqua distillata. Tale soluzione non può essere conservata.

3.4 *Soluzione standard di fosfato.* - Sciogliere g 0.4390 di fosfato acido monopotassico KH_2PO_4 in acqua distillata fino ad ottenere ml 1000 di soluzione. Tale soluzione contiene mcg 100 di fosforo/ml. Il fosfato di potassio deve essere essiccato per 48 ore in presenza di un essiccante efficace come l'acido solforico concentrato.

* Mirella Delise

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Bilancia analitica*
- 4.2 *Spettrofotometro che consenta letture ad una lunghezza d'onda di 700 nm.*
- 4.3 *Apparecchio di mineralizzazione*
- 4.4 *Pallone da Kjeldhal da 250 ml*

5. Procedimento

- 5.1 *Determinazione.* - Introdurre in un pallone Kjeldahl circa 0.5 g di campione pesati con l'approssimazione di g 0.001, alcune palline di vetro e 4 ml di acido solforico (3.1). Scaldare con precauzione il pallone nell'apparecchio di mineralizzazione (4.3). Quando cessa la formazione di schiuma raffreddare a temperatura ambiente. Aggiungere con precauzione alcune gocce della soluzione di acqua ossigenata (3.2), scaldare di nuovo e ripetere tali operazioni fino a che il contenuto del pallone sia divenuto limpido ed incolore. Durante il riscaldamento, mescolare il contenuto del pallone mediante periodica agitazione. Lavare il collo del pallone con 2 ml circa di acqua distillata e scaldare di nuovo fino ad evaporazione dell'acqua. Lasciare bollire per 30 minuti dopo decolorazione per eliminare eventuali tracce di acqua ossigenata. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, trasferire il contenuto del pallone Kjeldahl in un pallone tarato da 100 ml; portare a volume con acqua distillata e mescolare. Pipettare 1 ml della soluzione in un pallone tarato da 50 ml e diluire con circa 25 ml di acqua distillata. Aggiungere 20 ml del reagente al molibdato ed al solfato di idrazina, (3.3) portare a volume con acqua distillata e mescolare. Porre il pallone in acqua bollente e lasciar sviluppare il colore per 15 minuti. Raffreddare a temperatura ambiente in acqua fredda ed, entro 1 ora, misurare la densità ottica, in rapporto al saggio in bianco, ad una lunghezza d'onda di 700 nm.
- 5.2 *Preparazione della curva standard.* - Diluire 10 ml della soluzione standard (3.4) con acqua distillata e portare a 100 ml in un pallone tarato. Introdurre in 5 palloni tarati da 50 ml 0, 0.1; 2; 5; 10 ml della soluzione standard diluita per ottenere una serie di soluzioni standard contenenti μg 0 (valore zero); 10; 20; 50; 100 di fosforo. Aggiungere acqua distillata ai palloni fino ad ottenere un volume di circa 25 ml, aggiungere 20 ml del reagente al molibdato e solfato di idrazina (3.3), portare a volume con acqua distillata, mescolare e porre in acqua bollente e lasciare per 15 minuti. Raffreddare con acqua fredda fino a temperatura ambiente e misurare la densità ottica degli standards, rispetto al valore zero, ad una lunghezza d'onda di 700 nm.

- Allestire la curva standard mettendo la densità ottica in relazione con la quantità di fosforo espressa in microgrammi.
- 5.3 *Saggio in bianco.* - Effettuare un saggio in bianco seguendo la procedura indicata al paragrafo 5.1 senza aggiunta di campione (formaggio).
- 5.4 *Determinazione del contenuto in azoto totale.* - Determinare il contenuto in azoto totale del campione mediante il metodo .determinazione delle sostanze azotate totali. (metodo Kjeldahl).

6. Espressione dei risultati

- 6.1 *Calcolo del contenuto di fosforo.*- Il contenuto di fosforo del campione, espresso come percentuale, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Fosforo (g/100 g)} = \frac{P}{100 W}$$

dove:

P = quantità di fosforo in μg ottenuta tramite curva standard

W = peso in grammi del campione utilizzato per l'analisi

- 6.2 *Calcolo del contenuto di in emulsionanti fosfatici.* - Il contenuto percentuale di emulsionanti fosfatici, espresso come fosforo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Emulsionanti fosfatici espressi come fosforo (g/100 g)} = P - 0.14 N$$

dove:

P = contenuto totale in fosforo del campione

N = contenuto in azoto del campione

0.14 = livello più elevato del rapporto P/N (0.12 ± 0.02)

Riferimenti bibliografici

Determinazione del tenore in fosforo del formaggio e dei formaggi fusi. *Norma Internazionale FIL - IDF 33 A:1971*

Calcolo del tenore (espresso come fosforo) in emulsionanti a base di fosfato aggiunti ai formaggi. *Norma Internazionale FIL - IDF 51: 1969*

Metodo B

2. Principio del metodo

Il campione è mineralizzato e le ceneri ottenute sono sciolte in soluzione acida. La soluzione è quindi trattata con il reattivo vanado-molibdico. La densità ottica della soluzione gialla così formata è misurata spettrofotometricamente.

3. Reattivi

- 3.1 *Acido nitrico* (d 1.38 - 1.43).
- 3.2 *Acido cloridrico 6 N*.
- 3.3 *Acido nitrico diluito*. - 7 ml di HNO₃ (3.1) più 13 ml di acqua.
- 3.4 *Soluzione di eptamolibdato di ammonio*. - Sciogliere con acqua calda in un matraccio tarato da 100 ml 10 g di eptamolibdato d'ammonio (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4H₂O ed aggiungere 1 ml di ammoniaca (d 0.91), portare a volume con acqua.
- 3.5 *Soluzione di monovanadato di ammonio (NH₄VO₃)*. - Sciogliere in un matraccio tarato da 100 ml, 235 mg di monovanadato di ammonio con 40 ml di acqua calda, aggiungere lentamente agitando 2 ml di acido nitrico diluito (3.3) e portare a volume con acqua.
- 3.6 *Reattivo vanado-molibdico*. - Mescolare in un matraccio tarato da 100 ml, 20 ml di soluzione (3.4) con 20 ml della soluzione (3.5) e aggiungere 13.4 ml di acido nitrico concentrato (3.1), portare a volume con acqua.
- 3.7 *Soluzione standard di fosforo (1 mg/ml)*. - Sciogliere in un matraccio tarato da 1000 ml, 3.487 g di fosfato monopotassico KH₂PO₄ con acqua.

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Spettrofotometro*.
- 4.2 *Piastra elettrica riscaldante*
- 4.3 *Bilancia analitica*

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione*. - Solubilizzare le ceneri del prodotto in esame, ottenute come descritto nel metodo per la determinazione delle ceneri, con 10 ml di acido cloridrico 6 N (3.2), coprire la capsula con un vetro da orologio e riscaldare su piastra elettrica fino a leggera ebollizione. Prolungare l'ebollizione per circa 10 minuti, lasciare raffreddare e trasferire quindi quantitativamente la soluzione in un matraccio tarato da 25 ml filtrando. Portare quindi a volume con acqua. Diluire la

soluzione così ottenuta con acqua in modo da ottenere una concentrazione in fosforo non superiore a 40 µg/ml.

- 5.2 *Reazione colorimetrica.* - Introdurre in un tubo da saggio 10 ml della soluzione campione diluita e aggiungere 10 ml del reattivo vanado-molibdico (3.6). Mescolare e lasciare riposare per 10 minuti a temperatura ambiente. Misurare la densità ottica allo spettrofotometro a 430 nm usando come bianco una soluzione composta da 10 ml di reattivo vanado-molibdico e 10 ml di acqua.
- 5.3 *Curva di taratura.* - Preparare a partire dalla soluzione standard (3.7) delle soluzioni contenenti rispettivamente 5, 10, 20, 30 e 40 µg di fosforo per ml. Prelevare 10 ml di ciascuna di tali soluzioni ed aggiungervi 10 ml di reattivo (3.6). Mescolare e lasciare riposare 10 minuti a temperatura ambiente. Misurare la densità ottica nelle stesse condizioni utilizzate per il campione. Tracciare la curva di taratura mettendo in ordinata i valori di densità ottica e in ascissa le quantità corrispondenti di fosforo. La curva è lineare per le concentrazioni di fosforo comprese tra 0 e 40 µg/ml.

6. Espressione dei risultati

- 6.1 *Calcolo della quantità di fosforo.* - La quantità di fosforo nel campione, espressa in mg/100 g o 100 ml, è ricavata riferendosi alla curva di taratura tenendo conto delle eventuali operazioni di diluizione.
- 6.2 *Calcolo delle quantità di polifosfati aggiunti*
Azoto totale. - vedi metodo delle sostanze azotate totali-metodo Kjeldhal
Proteine. - azoto totale x 6.25
Anidride fosforica naturale. - proteine x 0.025
Anidride fosforica totale. - fosforo (come calcolato al punto 5.3) x 2.29
Anidride fosforica in eccesso. - anidride fosforica totale - Anidride fosforica naturale

$$\text{Polifosfati aggiunti (mg / 100 g o 100 ml)} = \text{Anidride fosforica in eccesso} \times 1.42$$

SACCARINA

Metodo per HPLC*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle bevande ed ai dolcificanti.

2. Principio del metodo

La saccarina è determinata mediante HPLC su colonna a fase inversa.

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione di acido acetico all'1%.*
- 3.2 *Alcool metilico per HPLC.*
- 3.3 *Fase mobile.* - Mescolare 950 ml della soluzione di acido acetico (3.1) con 50 ml di alcool metilico (3.2).
- 3.4 *Soluzione standard di saccarina (100 mg/l).* - Pesare esattamente 25 mg di saccarina sodica biidrata ($C_7H_{14}NNaO_3S \times 2H_2O$) e trasferirli quantitativamente in un matraccio tarato da 250 ml con acqua. Portare a volume sempre con acqua.

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Bilancia analitica.*
- 4.2 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione con rivelatore UV a 254 nm.*
- 4.3 *Colonna HPLC C18, 25 cm x 4 mm.*
- 4.4 *Filtri a membrana da 0.45 μ m.*

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione.* - Filtrare le bevande su filtro a membrana dopo aver allontanato l'anidride carbonica eventualmente presente.
Per i dolcificanti preparare una soluzione acquosa ad una concentrazione di saccarina pari a circa 100 mg/l e filtrare su filtro a membrana.

* Elisabetta Sanzini

- 5.2 *Determinazione per HPLC.* - Iniettare una aliquota di soluzione campione contenente circa 1 µg di saccarina. Iniettare 10 µl di soluzione standard (3.4). Effettuare la cromatografia utilizzando la fase mobile di acido acetico-metanolo (3.3) ad un flusso di 2.0 ml/min.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di saccarina del campione, espresso in percentuale, è calcolato in base alle seguenti formule:

Per le bevande:

$$\text{Saccarina sodica (g / 100 ml)} = \frac{C \times AC}{AS \times v \times 10.000}$$

Per i dolcificanti:

$$\text{Saccarina sodica (g / 100 g)} = \frac{C \times AC}{AS \times v \times P \times 10.000}$$

dove:

C = µg di standard iniettati

AC = area del picco della saccarina della soluzione campione

AS = area del picco della saccarina della soluzione standard

v = volume di campione iniettato (in ml)

V = volume totale (in ml) di soluzione campione preparata

P = aliquota di campione, in g, utilizzata per l'analisi

Nel caso in cui il contenuto non sia espresso come saccarina sodica, ma come saccarina o saccarinato di calcio effettuare le opportune correzioni in base ai P.M.

Riferimenti bibliografici

SJOBERG, A.K., ALANKO, T.A. Liquid Chromatographic Determination of Saccharin in Beverages and Sweets: NMKL Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1987, 70, 58-60.

RESIDUI

ALDEIDE FORMICA

Metodo spettrofotometrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ai prodotti ittici.

2. Principio del metodo

Il metodo è basato sulla separazione dell'aldeide formica mediante distillazione in corrente di vapore dal campione previamente acidificato e sulla reazione con acido cromotropico e successiva determinazione spettrofotometrica a 570 nm.

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione di acido cromotropico di 250 mg/l* (acido 1-8 desossinaftalene-solfonico). - Sciogliere 25 mg del sale sodico in 100 ml di acido solforico (3.4); la soluzione va preparata di fresco.
- 3.2 *Soluzione di aldeide formica di 0.5 mg/ml*
- 3.3 *Soluzione di aldeide formica di 1, 2, 5, 10, 25, 50 µg/ml*. - Prelevare rispettivamente 1, 2, 5, 10, 25, 50 ml della soluzione (3.2) diluire fino a 500 ml.
- 3.4 *Acido solforico 96% (p/p)*
- 3.5 *Acido solforico al 10% (p/p)*
- 3.6 *Silicone antischiuma*.

4. Procedimento

- 4.1 *Estrazione dell'aldeide formica*. - In un palloncino a fondo tondo da 150 ml porre 20 grammi del campione previamente sminuzzato più 40 ml di acqua distillata e acidificare con 7 ml di acido solforico (3.5); aggiungere poche gocce di silicone antischiuma (3.6) e dei granuli di quarzo. Distillare in corrente di vapore fino a raccogliere 200 ml di distillato in pallone tarato.
- 4.2 *Determinazione spettrofotometrica*. - Trasferire 30 ml di ciascuna soluzione standard di aldeide formica (3.3) in pallone tarato da 100 ml. Aggiungere 40 ml di reattivo (3.1) e portare a volume.

* Massimo Baldini; Paolo Stacchini

Eeguire la lettura spettrofotometrica. Costruire la retta di taratura riportando in ordinata le assorbanze lette ed in ascissa le concentrazioni di aldeide formica corrispondenti. Prelevare 30 ml del distillato del campione e porre in un palloncino tarato da 100 ml, aggiungere 40 ml del reattivo (3.1), agitare, raffreddare sotto acqua corrente e portare a volume.

Leggere l'assorbanza a 575 nm in vaschetta da 10 ml di cammino ottico contro un bianco preparato con gli stessi volumi di reattivi impiegati per l'analisi del campione.

Ricavare la concentrazione (c) della soluzione del campione dalla retta di taratura.

5. Espressione dei risultati

Il contenuto di aldeide formica del campione, espresso in milligrammi per chilogrammo, è calcolato in base alle seguente formula:

$$\text{Aldeide formica (mg / kg)} = \frac{c \times v}{g}$$

dove:

- c = concentrazione di aldeide formica nella soluzione del campione ($\mu\text{g/ml}$)
- v = volume di distillato (ml)
- g = porzione di campione analizzato.

CLORAMFENICOLO E NITROFURANI

Metodo per HPLC*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a carni (tessuti ed organi), uova e prodotti per il divorzamento a base carnea, per la ricerca dei residui di cloramfenicolo e nitrofurani.

2. Principio del metodo

Il metodo consiste in una fase iniziale di estrazione con acetato di etile seguita da una fase di purificazione su colonnina di Extrelut; entrambe le fasi sono comuni per la determinazione di tutte le sostanze considerate (cloramfenicolo, furazolidone, nitrofurazone e furaltadone).

Cloramfenicolo e nitrofurani sono quindi determinati per HPLC usando una colonna a fase inversa.

3. Reattivi

3.1 *Acetato di etile*

3.2 *Acetonitrile per HPLC*

3.3 *n-Esano*

3.4 *Alcool metilico per HPLC*

3.5 *Dimetilformammide*

3.6 *Miscela acqua-metanolo 75:25*

3.7 *Tampone fosfato pH 6.3.* - Solubilizzare 4 g di fosfato monobasico di potassio e 1 g di fosfato bibasico di potassio in 1000 ml di acqua.

3.8 *Fase mobile per nitrofurani.* - Acetonitrile (3.2) e tampone fosfato (3.7) 20:80.

3.9 *Fase mobile per cloramfenicolo.* - Metanolo (3.4) e tampone fosfato (3.7) 40:60.

3.10 *Soluzione standard madre di furazolidone, nitrofurazone e furaltadone.* - Solubilizzare insieme 50 mg di ciascuna sostanza in 50 ml di dimetilformammide.

3.11 *Soluzione standard madre di cloramfenicolo.* - Solubilizzare 50 mg di cloramfenicolo in 50 ml di alcool metilico (3.4).

3.12 *Soluzioni standard di lavoro.* - Diluire le soluzioni (3.10) e (3.11) con le rispettive fasi mobili in modo da ottenere una concentrazione di 1 µg/ml.

* Carmelina Filesi

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Vetreteria attinica lavata con misto cromatico.*
- 4.2 *Macinino IKA analytical Mill A 10 o equivalente.*
- 4.3 *Alcool etilico e ghiaccio secco.*
- 4.4 *Azoto liquido.*
- 4.5 *Centrifuga a 3000 giri.*
- 4.6 *Colonna Extrelut 1 Merck o equivalente.*
- 4.7 *Filtri a membrana da 0.45 μ m.*
- 4.8 *Colonna HPLC a fase inversa C 18 (5 μ m) 250 x 4.6 mm ID.*
- 4.9 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione con rivelatore UV possibilmente a diodi.*
- 4.10 *Bilancia analitica.*

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione.* - Nel caso di prodotti carnei (tessuti ed organi) se il campione è congelato al momento dell'analisi, effettuare l'omogenizzazione con un idoneo macinino prima dello scongelamento. Se il campione è fresco surgelare rapidamente per immersione in azoto liquido e quindi omogeneizzare.
- 5.2 *Estrazione.* - Pesare esattamente 5 g di campione in un tubo da centrifuga e aggiungere 6 ml di acetato di etile (3.1). Agitare vigorosamente per un minuto e centrifugare per 5 min. Porre quindi il tubo nella miscela alcool-ghiaccio secco che, in seguito al congelamento della fase acquosa, permette di prelevare facilmente la fase superiore di acetato di etile. Ripetere l'estrazione con altri 6 ml di acetato di etile e evaporare a secco sotto azoto gli estratti riuniti. Per eliminare i grassi solubilizzare il residuo con 5 ml di acetonitrile (3.2), aggiungere 3 ml di esano (3.3) e agitare per 1 minuto. Dopo la separazione delle fasi allontanare l'esano e ripetere l'operazione con altri 3 ml di esano. Successivamente evaporare a secchezza sotto azoto l'acetonitrile e riprendere il residuo con 1 ml della miscela acqua-metanolo (3.6).
- 5.3 *Purificazione.* - Depositare la soluzione su colonna Extrelut e, dopo un periodo di equilibratura di 10 minuti, eluire con 6 ml di acetato di etile. Raccogliere l'eluato ed portare a secco sotto azoto.
- 5.4 *Analisi per HPLC.* - Se la determinazione riguarda solo il cloramfenicolo o solo i nitrofurani, riprendere il residuo con 200 μ l delle rispettive fasi mobili (3.8 - 3.9). Qualora si debba effettuare sullo stesso campione la determinazione contemporanea del cloramfenicolo e di uno o più furanici, riprendere il residuo con 500 μ l di acetonitrile. Di questi prelevare esattamente 250 μ l e porli in un'altra provetta, evaporare a secchezza entrambe le quantità e riprendere i residui con 100 μ l delle fasi mobili rispettivamente del cloramfenicolo e dei nitrofurani. Iniettare 20 μ l (0.02 μ g) della soluzione standard (3.12) e 20 μ l del campione.

Per il cloramfenicolo il flusso della fase mobile (3.9) è di 1.0 ml/min. e la lunghezza d'onda impiegata per la rivelazione è di 280 nm.

Per i nitrofurani il flusso della fase mobile (3.8) è di 1.2 ml/min e la lunghezza d'onda impiegata per la rivelazione è di 362 nm.

La disponibilità di un rivelatore a diodi permette di confermare la natura dei picchi mediante gli spettri di assorbanza.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di cloramfenicolo o di ciascun nitrofurano del campione, espresso in microgrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Cloramfenicolo o nitrofurano } (\mu\text{g} / \text{kg}) = \frac{AC \times C}{AS} \times 2000$$

dove:

AC = area del picco del composto in esame nella soluzione campione

AS = area del picco del composto in esame nella soluzione standard

C = μg di standard iniettati

La sensibilità del metodo è di 10 ppb per il cloramfenicolo e di 4 ppb per i singoli nitrofurani.

Riferimenti bibliografici

BELLOMONTE, G. FILESI, C. MACRÌ, A. MOSCA, M. SANZINI, E. High performance liquid chromatographic determination of nitrofurans and free chloramphenicol in poultry, muscle, liver and eggs. *Ital. J. Food Sci.* 1993, 3: 247-253.

SOLVENTI ORGANOALOGENATI

Metodo gascromatografico*

1. Campo di applicazione

Metodo A. - Il metodo è applicabile alle acque minerali.

Metodo B. - Il metodo è applicabile agli oli

Metodo A

2. Principio del metodo

I solventi organoalogenati sono estratti dal campione con isottano e analizzati per gascromatografia utilizzando un rivelatore a cattura di elettroni.

3. Reattivi

3.1 *Isoottano.* - Il solvente deve essere testato per via gascromatografica prima di ogni serie di analisi, per controllare l'assenza di picchi interferenti con quelli dei composti da esaminare. In caso contrario procedere a distillazione.

3.2 *Solventi organoalogenati standard; grado di purezza > 99%*

1,1 - dicloroetilene
tetracloruro di carbonio
1,2 - dicloroetano
tetracloroetilene
tricloroetilene
cloroformio
metilcloroformio

3.3 *Acqua distillata e deionizzata esente da aloderivati*

3.4 *N,N - dimetilacetammide (DMA), grado di purezza > 99%*

3.5 *Solfato di sodio anidro calcinato a 600 °C*

3.6 *Soluzioni standard concentrate.* - Introdurre in una provetta con tappo a vite e setto teflonato 10 ml di DMA, pesare e raffreddare a 4 °C.

* Stefania Giammarioli; Maurizio Mosca (A); Mirella Delise (B)

Successivamente aggiungere una goccia (circa 10 mg) dell'aloderivato (3.2) in esame, attendere che la soluzione torni a temperatura ambiente e pesare nuovamente la provetta. Calcolare in base alla differenza tra le due pesate la quantità di aloderivato introdotta nella provetta.

Si ottengono in tal modo soluzioni standard concentrate dell'ordine di 1 mg/ml.

- 3.7 *Soluzioni standard intermedie.* - Diluire, utilizzando una microsiringa, le soluzioni standard concentrate sempre con DMA preventivamente raffreddata a + 4 °C.
- 3.8 *Soluzioni standard acquose.* - Introdurre in un matraccio tarato da 100 ml munito di tappo a vite e setto teflonato e contenente 4 g di solfato di sodio (3.5), 100 ml di acqua (3.3). Raffreddare a +4 °C ed aggiungere, con una microsiringa, una aliquota di standard intermedio in modo da ottenere una concentrazione analoga a quella del campione in esame. Il volume di standard aggiunto non dovrebbe superare i 100 µl. Tutta la vetreria deve essere lavata accuratamente con miscela solfo-cromica o con un idoneo detergente di efficacia analoga e mantenuta in stufa a 90 °C per tutta la notte al fine di allontanare ogni possibile residuo.

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Gasromatografo dotato di rivelatore a cattura di elettroni (ECD Ni63)*
- 4.2 *Colonne capillari quali VOCOL, CLOT, Carbograph VOC, 30 - 60 m, 0.53 mm d.i. o equivalenti*

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione.* - Non essendo possibile formare un unico campione miscelando aliquote prelevate da diverse confezioni originali, data la volatilità dei composti in esame, le analisi debbono essere condotte singolarmente su più aliquote, prelevate da diverse bottiglie refrigerate per almeno 24 ore a + 4 °C prima del prelievo.
- 5.2 *Estrazione.* - Introdurre 100 ml di ciascun campione refrigerato in un matraccio tarato da 100 ml con tappo a vite e setto teflonato contenente 4 g di sodio solfato (3.5), aggiungere 1 ml di isottano (3.1) chiudere immediatamente il matraccio e dibattere.
- 5.3 *Determinazione gascromatografica.* - Iniettare una idonea aliquota della fase isottanica nel gascromatografo.
Effettuare l'identificazione dei picchi incogniti per confronto con i tempi di ritenzione di una soluzione di isottano dei solventi organoalogenati standard (3.2), preparata a partire dagli standard intermedi (3.7). Per una maggiore sicurezza di identificazione sarebbe opportuno effettuare l'analisi su due colonne di differente polarità.
Effettuare l'analisi quantitativa analizzando, contemporaneamente al campione, una uguale aliquota di uno standard acquoso (3.8) del o dei solventi organoalogenati

identificati, ad una concentrazione il più possibile simile a quella del campione e sottoposto ad estrazione in modo analogo. Le condizioni operative, essendo correlate alla strumentazione e alle colonne capillari prescelte debbono essere individuate sperimentalmente.

A scopo indicativo sono fornite le seguenti condizioni operative :

Colonna:	VOCOL 30 m , 0.53 mm d.i.
Carrier gas:	elio 10 ml/min.
Make up gas:	argon-metano 95:5 50 ml/min.
Temperatura del forno:	50 °C
Detector:	ECD 300 °C
Iniettore:	200 °C
Aliquota di campione iniettata:	0.5 µl

6. Espressione dei risultati

Il contenuto dei singoli solventi organoalogenati del campione, espresso in microgrammi per litro, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Solvente organoalogenato (mg/l)} = \frac{AC \times CS}{AS}$$

dove:

AC = area del picco del solvente organoalogenato del campione

AS = area del picco del solvente organoalogenato dello standard acquoso.

CS = concentrazione del solvente organoalogenato dello standard acquoso (µg/l)

Riferimenti bibliografici

GIAMMARIOLI, S. MOSCA, M. BELLOMONTE, G. *Indagine sulla eventuale presenza di solventi organoalogenati in acque minerali confezionate*. Rapporti ISTISAN 1992, 92/33

Metodo B

Procedere come indicato nella Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee L 248/48 del 5/9/1991. Regolamento CEE relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonchè ai metodi ad esso attinenti. Determinazione del contenuto di solventi alogenati volatili nell'olio di oliva.

SULFAMIDICI

Metodo per HPLC*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a carni (tessuti e organi), latte e prodotti per il divezzamento a base carnea, per la ricerca dei residui di sulfamidici.

2. Principio del metodo

Il metodo prevede in una fase di estrazione con solvente organico acidificato, una estrazione su colonnina solfonica, che in ambiente acido trattiene i sulfamidici, e una successiva eluzione di questi dopo alcalizzazione. I sulfamidici sono poi determinati per HPLC.

3. Reattivi

- 3.1 *Acido acetico al 10%.*
- 3.2 *Soluzione cloroformio-acetone 1:1*
- 3.3 *Soluzione cloroformio-acetone 1:1 con il 5% di acido acetico (3.4).*
- 3.4 *Acido acetico glaciale.*
- 3.5 *Esano.*
- 3.6 *Alcool metilico.*
- 3.7 *Bombola di ammoniaca o idrossido di ammonio al 32%.*
- 3.8 *Tampone acetato a pH 4.5. - In un matraccio tarato da 1000 ml solubilizzare 6.8 g di sodio acetato triidrato, aggiustare il pH a 4.5 con idrossido di sodio 0.1 N e portare a volume.*
- 3.9 *Fase mobile. - Acetonitrile per HPLC-tampone acetato (3.8) 30:70*
- 3.10 *Sulfamidici standard*
 - Sulfatiazolo
 - Sulfadiazina
 - Sulfapiridina
 - Sulfamerazina
 - Sulfametazina
 - Sulfametossipiridazina
 - Sulfacloropiridazina

* Carmelina Filesi

Sulfametossazolo
Sulfachinosalina
Sulfadimetossina

- 3.11 *Soluzione standard di sulfamidici.* - Preparare una soluzione standard madre contenente il o i sulfamidici in esame alla concentrazione di 1 mg/ml in alcool metilico. Diluire poi con la fase mobile (3.9) in modo da avere una soluzione finale contenente 1 µg/ml di ogni sulfamidico.

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Bagno ad ultrasuoni condizionato a 40 °C.*
4.2 *Centrifuga a 5.000 giri.*
4.3 *Colonnina solfonica SPE da 3 ml della Baker codice 7090-03 o equivalente.*
4.4 *Evaporatore rotante.*
4.5 *Apparecchiatura da vuoto per l'estrazione con colonnina in fase solida con accessorio di misura e controllo del vuoto.*
4.6 *Filtri a membrana da 0.45 µm.*
4.7 *Colonna HPLC C8 (5 µm) 250 x 4,6 mm ID.*
4.8 *Cromatografo liquido con rivelatore UV a 270 nm, possibilmente a diodi.*
4.9 *Bilancia analitica*
4.10 *Macinino IKA analytical Mill A 10 o equivalente*
4.11 *Azoto liquido*
4.12 *Alcool etilico e ghiaccio secco.*

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione.* - Nel caso di prodotti carnei (tessuti ed organi) se il campione è congelato al momento dell'analisi effettuare l'omogeneizzazione con un idoneo macinino prima dello scongelamento.
Se il campione è fresco surgelare rapidamente per immersione in azoto liquido e quindi omogeneizzare.
- 5.2 *Estrazione.* - Pesare esattamente circa 10 g del campione in un provettone da centrifuga da 50 ml, e umettare omogeneamente con alcune gocce della soluzione (3.1) sino a raggiungere il pH di 5.5.
Aggiungere nella stessa provetta 25 ml della soluzione cloroformio: acetone (3.2) e dopo chiusura con tappo o parafilm, porre in bagno ad ultrasuoni per 10 minuti. Centrifugare e allontanare la fase organica che è messa da parte. Ripetere l'estrazione per altre due volte sempre con la stessa aliquota della soluzione (3.2). Filtrare gli estratti riuniti e aggiungere 5 ml di acido acetico glaciale (3.4).
- 5.3 *Purificazione.* - Lavare la colonnina solfonica, prima dell'uso, per due volte con 3 ml di esano e due volte con 3 ml della soluzione contenente il 5% di acido acetico (3.3), facendo particolare attenzione a non mandare a secco la colonnina prima di

caricare il campione. Effettuato il lavaggio preliminare far passare tutto l'estratto attraverso la colonna mantenendo accuratamente il vuoto intorno a 15 inch Hg. Lavare successivamente con 5 ml di H₂O e quindi con 5 ml di metanolo (3.6). Dopo essiccamento della colonnina in flusso di aria per 10 minuti, passare i vapori di ammoniaca per altri 10 minuti. In alternativa alla bombola di ammoniaca si può utilizzare come sorgente gassosa la soluzione ammoniacale (3.7) leggermente scaldata. I vapori possono essere convogliati attraverso la colonnina con un tubo fissato sulla testa della colonna e facendo il vuoto. Eluire quindi i sulfamidici con 10 ml di metanolo raccogliendo l'eluato in un palloncino da evaporazione, portare a secco con evaporatore rotante a 40 °C sotto vuoto. Riprendere il residuo con 1 ml della fase mobile (3.9), centrifugare per 10 minuti a 5.000 giri e filtrare su filtri a membrana.

- 5.4 *Determinazione per HPLC.* - Iniettare 20 µl della soluzione campione e della soluzione standard (3.11) Il flusso della fase mobile (3.9) deve essere regolato a 1 ml/min. Effettuare l'identificazione dei picchi incogniti per confronto con i tempi di ritenzione della soluzione standard. Sarebbe auspicabile l'uso del rilevatore a diodi per confermare la natura dei picchi sospetti mediante gli spettri di assorbanza.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di ciascun sulfamidico del campione, espresso in microgrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Sulfamidico } (\mu\text{g} / \text{kg}) = \frac{AC \times C \times 100}{AS \times v}$$

dove:

AC = area del picco del sulfamidico della soluzione campione

AS = area del picco del sulfamidico della soluzione standard

C = µg di standard iniettati

v = aliquota (in ml) di soluzione campione iniettata.

La sensibilità del metodo è di 5 ppb.

Riferimenti bibliografici

FILESI, C. SANZINI, E. BELLOMONTE, G. *Determinazione per cromatografia liquida dei residui di sulfamidici negli omogeneizzati a base di carne destinati all'infanzia.* Rapporti ISTISAN 1993, 93/10.

FERRINI, A.M. FILESI, C. MANNONI, V. SANZINI, E. AURELI, P. BELLOMONTE, G. *Indagine sulla presenza di residui di sulfamidici in latti dell'Agro Pontino.* *L'Industria del latte*, 1994, 1, 31-39.

MICOTOSSINE

**METODI DI CAMPIONAMENTO
PER LA DETERMINAZIONE
DELLE AFLATOSSINE**

1.1 Piano di campionamento per i fichi secchi

Il prelevamento deve essere effettuato in modo diverso in base alle dimensioni della partita, ed alla tipologia di confezionamento.

Per grosse partite è prevista la raccolta di campioni alimentari che dopo opportuna miscelazione sono riuniti in un campione globale *. Da questo campione globale si ricava successivamente il sottocampione* macinando l'intera quantità, omogeneizzando il macinato e prelevando una quantità pari ad 1/20 del campione globale tramite suddivisione per quarti o tramite divisione meccanica. Successivamente il campione da destinare all'analisi deve essere prelevato dal sottocampione tramite ulteriore suddivisione per quarti o tramite divisione meccanica.

Per il prelevamento ai punti vendita è necessario che l'aliquota del campione non sia inferiore ad 1 kg. Al fine di ottenere una risposta significativa, il prelevamento al dettaglio deve interessare, per una stessa area, il numero più possibile elevato di punti vendita.

* Per le definizioni vedi le didascalie della Tabella 1 al punto 1.2 dei metodi di campionamento per la determinazione delle aflatoSSine.

1.2 Piano di campionamento per derrate alimentari diverse

Le procedure di massima da seguire a seconda del tipo, della forma e delle condizioni di imballaggio delle varie derrate alimentari, sono indicate nella Tabella 1, che in assenza di un piano di campionamento nazionale, rappresenta una utile indicazione di lavoro. Si fa presente che le procedure di campionamento indicate si riferiscono alla regolamentazione della Food and Drug Administration.

Tabella 1. - Procedure per il prelevamento di campioni rappresentativi per le analisi delle aflatossine

PRODOTTO	TIPO DI IMBALLAGGIO	DIMENSIONE DEL LOTTO ¹	NUMERO DI UNITA' DI CAMPIONE ELEMENTARE ² (minimo)	GRANDEZZA DELLA UNITA' DI CAMPIONE ELEMENTARE (minima)	GRANDEZZA TOTALE DELLA UNITA' DI CAMPIONE GLOBALE ³ (minima)	GRANDEZZA DELLA ALIQUOTA DEL SOTTOCAMPIONE ⁴	GRANDEZZA DEL CAMPIONE FINALE DESTINATO ALL'ANALISI ⁵
A) Semi di pistacchio con guscio	1) Grandi lotti*	≤ 34 t	20% dell'unità del lotto	0,25 kg	25 kg per ogni intervallo multiplo di 34 t	1100 g	20 grammi intutti i casi previsti
	a) in sacchi						
	b) sfuso	≤ 34 t	100	0,25 kg	25 kg per ogni intervallo multiplo di 34 t	1100 g	//
	c) confezioni	Fino a 500 confezioni	50	0,5 kg	25kg	1100 g	//
B) Semi di pistacchio sgusciati	2) Dettaglio**		4	0,250 kg	1 kg	-----	//
	1) Grandi lotti*	≤ 34 t	20% delle unità	0,25 kg	12,5 kg	1100g	//
	a) in sacchi						
	b) prodotto sfuso	≤ 34 t	100	0,125	12,5 kg	1100 g	//
c) confezioni	fino a 500 confezioni	50	0,25 kg	12.5 kg	1100 g	//	
Noci	Grandi lotti *	Non influente	10	0.5 kg	5 kg	1000 g	50 g
	Dettaglio **		4	0.5 kg	2 kg		50 g
Noci brasiliane	Grandi lotti *	< 200 sacchi 201-800. 801-2000.	20	0.5 kg	10 kg	1100 g per tutti i casi	50 gr per tutti i casi
			40	0.5 kg	20 kg		
	Dettaglio **		60	0.5 kg	30 kg		
Arachidi sgusciate	Grandi lotti *	Non influente	44	0.5 kg	22 kg	1100 g	50 g
	Dettaglio **		4	0.250 kg	1 kg		50 g
Burro di arachidi	Dettaglio °		24	0.200 kg	4.8 kg		20 g
Frutta secca ed essiccata (fichi e albicocche)	Grandi lotti *	Non influente	22	1.0 kg	22 kg	1000 g	50 g
	Dettaglio **		4	0.250 kg	1 kg		

PRODOTTO	TIPO DI IMBALLAGGIO	DIMENSIONE DEL LOTTO ¹	NUMERO DI UNITA' DI CAMPIONE ELEMENTARE ² (minimo)	GRANDEZZA DELLA UNITA' DI CAMPIONE ELEMENTARE (minima)	GRANDEZZA TOTALE DELLA UNITA' DI CAMPIONE GLOBALE ³ (minima)	GRANDEZZA DELLA ALIQUOTA DEL SOTTOCAMPIONE ⁴	GRANDEZZA DEL CAMPIONE FINALE DESTINATO ALL'ANALISI ⁵
Cereali, prodotti a base di cereali e prodotti estrusi e soffiati	Grandi lotti **	Non influente	10	0.5 kg	5 kg	1100 g	50 g in entrambi i casi
	Dettaglio **		4	0.250 kg	1kg		
Prodotti dolciari	Confezioni	Fino a 500 confezioni	50	0.5 kg	25 kg	1100 g	50 g

Il piano di campionamento è basato su modelli statistici elaborati per le singole matrici (regolamentazione statunitense)

** Il piano di campionamento è stato elaborato sulla base di requisiti pratici, ma non sono rispondenti a valutazioni di carattere statistico

° Il piano di campionamento è stato elaborato sulla base del Regolamento Britannico SI 1992 3236.

- 1 *Lotto*. - Quantità di prodotto costituente la massa da campionare;
- 2 *Numero di unità campione casuale da un punto del lotto*. - Numero delle unità (sacchi, confezioni, scatole ...) da campionare.
- 3 *Campione globale*. - Insieme dei campioni elementari presi dallo stesso lotto.
- 4 *Sottocampione*. - Parte rappresentativa del campione globale, ottenuto per macinazione dell'intero campione globale.
- 5 *Campione finale*. - Parte rappresentativa del sottocampione.

Per il prelevamento al dettaglio nei casi in cui la grandezza della confezione sia inferiore a quella della corrispondente unità di campione elementare indicata, prelevare un numero di unità di campione elementare tale da raggiungere la grandezza totale della unità di campione globale indicata; nei casi in cui la grandezza della confezione sia superiore a quella della corrispondente unità di campione elementare indicata, prelevare comunque il numero di unità di campione elementare indicato.

AFLATOSSINE TOTALI
(AFB₁ ; AFB₂ ; AFG₁ ; AFG₂)

Metodo per HPLC*

1. Campo di applicazione

L'applicabilità del metodo è stata verificata per le seguenti matrici alimentari: arachidi, mais, riso, crusca, peperoncino, fichi secchi, torrone e datteri; con qualche lieve modifica a caffè solubile, estrusi e grano (procedura A) e burro di arachidi (procedura B) descritte al punto 7.

2. Principio del metodo

Le aflatoSSine totali sono estratte dal campione con cloroformio. Dopo filtrazione un'aliquota del filtrato è purificata su cartuccia di florisil e successivamente su cartuccia di C18.

La separazione e la determinazione finale sono ottenute tramite HPLC su una colonna a fase inversa C18. Si esegue quindi una derivatizzazione post-colonna con soluzione satura di iodio in acqua ed una quantificazione tramite rivelatore a fluorescenza.

3. Reattivi

- 3.1 *Cloroformio stabilizzato con etanolo (0.5 - 1 %)*
- 3.2 *Alcool metilico*
- 3.3 *Acetone*
- 3.4 *Acetone/acqua (98:2)*
- 3.5 *Acqua/metanolo (80:20)*
- 3.6 *Acqua/acetone (85:15)*
- 3.7 *Fase mobile per HPLC. - Acqua/metanolo/acetonitrile (130:70:40); tutti i solventi devono essere per HPLC.*
- 3.8 *Soluzione satura di iodio in acqua. - Aggiungere 2 g di iodio in 400 ml di acqua, e mantenere sotto agitazione magnetica per almeno due ore e filtrare attraverso filtro (4.6).*
- 3.9 *Celite 545 o equivalente lavata con acido*
- 3.10 *Cartucce di florisil*
- 3.11 *Cartucce di C18 (Waters SEP-PAK a 1 g di riempimento o equivalenti).*
- 3.12 *Soluzione standard di aflatoSSine.*

* Carlo Brera

Attenzione:

Le aflatossine sono sostanze cancerogene e devono essere quindi manipolate con molta attenzione. Svolgere l'analisi, esclusivamente, sotto cappa utilizzando guanti in lattice di gomma. Per quanto possibile utilizzare standard di aflatossine in soluzione evitando l'impiego di quelli allo stato secco. Infatti essendo le aflatossine fortemente elettrostatiche, possono facilmente diffondersi nell'area di lavoro.

Detergere eventuali versamenti di soluzioni di tossina con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1%, lasciare reagire per 10 minuti aggiungere quindi una soluzione di acetone al 5%.

Sciacquare tutta la vetreria utilizzata con metanolo, aggiungere la soluzione di ipoclorito di sodio all'1% quindi, dopo due ore, acetone fino al 5% del totale. Lasciare reagire per 30 minuti e lavare accuratamente (7.4, 7.5, 7.6).

3.12.1 *Soluzione standard di aflatossine a concentrazione di circa 1 µg/ml.*

3.12.2 *Determinazione della concentrazione per via spettrofotometrica.* - Registrare lo spettro UV della soluzione da 330 a 370 nm contro la miscela benzene acetonitrile (9:1); misurare l'assorbanza del massimo (A) e determinare la concentrazione mediante la seguente formula:

$$AF(\mu\text{g} / \text{ml}) = \frac{A \times PM \times 1000}{\varepsilon}$$

dove:

A = assorbanza nel punto di massimo

PM = peso molecolare dell'AFB₁

ε = coefficiente d'estinzione molare.

Nella seguente tabella sono riportati i valori dei pesi molecolari e dei coefficienti di estinzione delle AF.

Tabella 1. - *Pesi molecolari e coefficienti di estinzione di AF.*

Aflatoxine	PM	ε
B ₁	312	19.800
B ₂	314	20.900
G ₁	328	17.100
G ₂	330	18.200
M ₁	328	18.815

3.12.3 *Soluzione di calibrazione per HPLC.* - Prima dell'uso portare a temperatura ambiente la soluzione standard (3.12.1). Trasferire una opportuna aliquota della soluzione standard (3.12.1) in recipiente tarato per ottenere una soluzione standard di lavoro diluita di circa 4 ng/ml di aflatoxine in acqua/acetone (3.6). Usare questa soluzione diluita per la preparazione di una serie di soluzioni di calibrazione.

Tenere queste soluzioni a 4 °C e al riparo dalla luce.

Nota

Nella preparazione delle soluzioni standard e nello svolgimento delle analisi é necessario evitare l'esposizione diretta alla luce UV e la presenza di vapori di ipoclorito di sodio che possono provocare la decomposizione delle AF .

La vetreria nuova deve essere trattata per 12 ore con una soluzione 2 N di H₂SO₄, prima di essere sottoposta al comune lavaggio.

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Apparato tipo tritacarne o omogeneizzatore equivalente*
- 4.2 *Agitatore meccanico, o Waring Blender*
- 4.3 *Bilancia analitica*
- 4.4 *Evaporatore rotante*
- 4.5 *Carta da filtro a pieghe MN 6171/4 diametro 24 cm o equivalente*
- 4.6 *Filtro Millipore con diametro dei pori 0.45 µm (tipo HAWP 04700)*
- 4.7 *Colonna di vetro.* - Diametro interno circa 1 cm e lunghezza circa 30 cm dotata di attacco luer
- 4.8 *Rubinetto di nylon attacco luer*
- 4.9 *Siringa attacco luer da 10 ml*
- 4.10 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione (HPLC)*
- 4.11 *Colonna analitica per HPLC (C 18 da 3 µ o da 5 µ)*
- 4.12 *Pompa per HPLC per la soluzione di iodio*
- 4.13 *Collegamento a T Valco in acciaio inossidabile.* - Volume morto zero da 1/16 per 0.75 mm
- 4.14 *Spirale di reazione in teflon oppure in acciaio inossidabile.*- Dimensioni comprese tra 300 x 0.5 mm e 5000 x 0.5 mm
- 4.15 *Bagno termostatico a olio o ad acqua a 60 °C con regolatore di temperatura (± 0.1 °C)*
- 4.16 *Rivelatore a fluorescenza.* - Lunghezza d'onda di eccitazione = 365 nm ed emissione = 435 nm (per strumenti a filtri emissione < 400 nm). Usare un regolatore di contropressione per evitare eventuali bolle di aria nella cella a flusso.
- 4.17 *Integratore elettronico*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione.* - Macinare totalmente ed omogeneizzare il campione finale, prelevato come indicato nei metodi di campionamento.

5.2 *Estrazione.* - Estrarre 50 g di campione in una beuta a tappo smeriglio con 250 ml di cloroformio e 25 ml di acqua distillata, aggiungendo come coadiuvante di filtrazione 25 g di celite (3.9). Dopo 30 minuti di agitazione meccanica, filtrare attraverso filtro a pieghe e raccogliere 50 ml di filtrato. E' possibile anche effettuare l'estrazione mediante agitazione per 3 minuti in Waring blender ad alta velocità.

5.3 *Purificazione su cartuccia di florisil.* - Attaccare il rubinetto al gambo corto della cartuccia di florisil, lavare la cartuccia e rimuovere l'aria aspirando con la siringa 10 ml di cloroformio e passando 8 ml di cloroformio attraverso il rubinetto nella cartuccia. Attaccare il gambo lungo ad una colonna di vetro e far passare i rimanenti 2 ml nella colonna attraverso la cartuccia. Chiudere il rubinetto e disconnettere la siringa.

Aggiungere il filtrato ottenuto all'apparato colonna-cartuccia e far percolare per gravità. Lavare con 5 ml di cloroformio e successivamente con 20 ml di metanolo, scartare gli eluati. Durante queste operazioni assicurarsi che l'apparato colonna cartuccia non vada a secco. Eluire le aflatossine con 40 ml della miscela acetone/acqua (3.4) e raccogliere tutto l'eluato. Concentrare l'eluato in evaporatore rotante, eliminando completamente i residui di acetone che potrebbero portare a perdita di aflatossine nella cartuccia di C 18. Riprendere il residuo con 1 ml di metanolo e 4 ml di acqua.

5.4 *Purificazione su cartuccia C 18.* - Attaccare il rubinetto al gambo corto della cartuccia di C 18 e rimuovere l'aria facendo passare con la siringa 10 ml di metanolo. Quindi aspirare 10 ml di acqua facendone passare 8 ml attraverso la cartuccia. Attaccare il gambo lungo ad una colonna di vetro e far passare i rimanenti 2 ml nella colonna attraverso la cartuccia. Chiudere il rubinetto e disconnettere la siringa.

Aggiungere l'estratto precedentemente ottenuto quantitativamente alla colonna, lavare il pallone due volte con la miscela acqua/metanolo (3.5) e far percolare per gravità; assicurarsi che l'apparato colonna cartuccia non vada a secco. Eluire le aflatossine con 50 ml della miscela acqua/acetone (3.6) e raccogliere l'intero eluato in un cilindro graduato. Se necessario portare a 50 ml con acqua e miscelare. La soluzione risultante è usata per l'analisi in HPLC.

Nota

In alternativa alla siringa è possibile utilizzare un sistema da vuoto per estrazione in fase solida

5.5 *Determinazione cromatografica.* - Predisporre la pompa per HPLC ad un flusso di 0.5/0.3 ml/min. per una colonna rispettivamente da 5 o da 3 μ . Usare la fase mobile (3.7)

Predisporre la pompa derivatizzante ad un flusso di 0.4 - 0.2 ml/min della soluzione acquosa satura di iodio rispettivamente per flussi di 0.5 e 0.3 ml/min. della fase mobile.

Impostare il rivelatore a fluorescenza alle lunghezze d'onda di lavoro. Regolare l'attenuatore del detector in modo da ottenere una deviazione pari all'80% circa del fondo scala del registratore per 1 ng di aflatossina B₁.

Iniettare 250 µl delle soluzioni di calibrazione e dell'estratto del campione.

Effettuare la verifica della linearità della risposta fluorimetrica mediante il calcolo della curva di regressione lineare ($y = ax + b$), ottenuta correlando la quantità (x) delle aflatossine iniettate espresse in ng, con le aree proporzionali all'intensità di fluorescenza (y). La proporzionalità dovrebbe essere quanto più possibile lineare (coefficiente di correlazione non inferiore a 0.998).

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di ogni aflatossina del campione, espresso in microgrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Aflatossina } (\mu\text{g} / \text{kg}) = \frac{m}{V_m} \times \frac{V_{ext}}{M \times V_f / 250}$$

dove:

m = quantità di aflatossina in ng ottenuta dal picco del campione, calcolata sulla curva di regressione lineare.

V_m = volume in ml di estratto del campione iniettato.

V_{ext}^m = volume finale in ml dell'estratto del campione

M^{ext} = massa del campione in grammi.

V_f = volume in ml del filtrato ottenuto in 5.2

250 = quantità in ml di cloroformio usato per l'estrazione del campione.

Se la procedura è stata eseguita secondo quanto indicato la formula diventa:

$$\text{Aflatossina } (\mu\text{g} / \text{kg}) = 20 \times m$$

7. Modifiche

Procedura A. - La procedura A consiste nel metodo precedentemente riportato omettendo la fase di purificazione finale su colonna per estrazione in fase solida C18.

Procedura B. - La procedura B consiste nel metodo precedentemente riportato con una variazione del quantitativo di campione da sottoporre all'analisi (20g) ed una variazione nella miscela di estrazione (150 ml di CHCl₃+20 ml di acido citrico al 20%).

Riferimenti bibliografici

Preparation of Standards for Mycotoxins, In: *Official Methods of Analysis* 1990. Association of Official Analytical Chemist (AOAC), 15. Ed., Arlington Virginia, (Ed.) K.Helrich, 1990, 1185-1186.

Regolamento CEE relativo alla determinazione dell' aflatossina B₁ nei mangimi. *G.U.* n. 327/54 del 13/11/1992.

MIRAGLIA, M. BRERA, C. STACCHINI, A. Le aflatossine: problematiche connesse ai programmi di intervento. *Rapporti ISTISAN* 93/31 1993.

CASTEGNARO, et al. *Laboratory decontamination and destruction of Aflatoxins B1, B2, G1, G2 in laboratory wastes.* Eds Castegnaro et al. *IARC Science Publications* 1980, n. 37.

AFLATOSSINE TOTALI NEI PISTACCHI
(AFB₁ ; AFB₂ ; AFG₁ ; AFG₂)

Metodo per HPLC*

1. Campo di applicazione

Il metodo é applicabile ai pistacchi.

2. Principio del metodo

Le aflatoSSine sono estratte dai campioni mediante una miscela di alcool metilico e acqua. Dopo filtrazione un'aliquota del campione filtrato é purificata tramite ripartizione liquido-liquido con n-esano e successivamente estratta con cloroformio.

La separazione e la determinazione finale sono ottenute mediante HPLC su colonna a fase inversa C 18 effettuando una derivatizzazione post- colonna con soluzione satura di iodio in acqua ed utilizzando un rivelatore a fluorescenza.

3. Reattivi

- 3.1 *Cloroformio stabilizzato con etanolo (0.5 - 1%)*
- 3.2 *Alcool metilico*
- 3.3 *n - esano*
- 3.4 *Fase mobile per HPLC. - Acqua/metanolo/acetone (130:70:40) solventi per HPLC*
- 3.5 *Soluzione satura di iodio in acqua. - Sciogliere 2 g di iodio in 400 ml di acqua, mescolare per almeno due ore e filtrare attraverso filtro (4.6)*
- 3.6 *Acqua/acetone (85:15)*
- 3.7 *Soluzione standard di aflatoSSine. - Procedere come indicato nel metodo AFLATOSSINE TOTALI ai punti 3.12.1 e 3.12.2.*
- 3.8 *Soluzione di calibrazione per HPLC. - Procedere come indicato nel metodo AFLATOSSINE TOTALI al punto 3.12.3.*

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Apparato tipo tritacarne o omogeneizzatore equivalente*
- 4.2 *Agitatore meccanico o Waring Blender*
- 4.3 *Bilancia analitica*

* Carlo Brera

- 4.4 *Evaporatore rotante*
- 4.5 *Carta da filtro a pieghe MaN 6171/4 diametro 24 cm o equivalente*
- 4.6 *Filtro Millipore con diametro dei pori 0.45 μ (tipo HAWP 04700)*
- 4.7 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione (HPLC)*
- 4.8 *Colonna analitica per HPLC (C 18 da 3 o da 5 μ)*
- 4.9 *Pompa per HPLC per la soluzione di iodio*
- 4.10 *Collegamento a T Valco in acciaio inossidabile. - Volume morto zero da 1/16 per 0.75 mm*
- 4.11 *Spirale di reazione in teflon oppure in acciaio inossidabile. - Dimensioni comprese tra 300 x 0.5 mm e 5000 x 0.5 mm*
- 4.12 *Bagno termostatico ad olio a 60 °C con regolatore di temperatura ($\pm 0.1^\circ\text{C}$)*
- 4.13 *Rivelatore a fluorescenza. - Lunghezza d'onda di eccitazione = 365 nm ed emissione = 435 nm (per strumenti a filtri emissione < 400 nm). Usare un regolatore di contropressione per evitare eventuali bolle di aria nella cella a flusso.*
- 4.14 *Integratore elettronico*

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione. - Macinare totalmente ed omogeneizzare il campione finale prelevato come indicato nella tab.1 relativa al metodo di campionamento 1.2.*
- 5.2 *Estrazione. - Estrarre 20 g di campione con 100 ml di alcool metilico e 10 ml di acqua mediante agitazione meccanica per 30 minuti e dopo aggiunta di 30 ml di acqua ripetere l'agitazione per 15 minuti. Filtrare attraverso filtro a pieghe e raccogliere 70 ml di filtrato.*
- 5.3 *Purificazione dell'estratto. - Aggiungere al filtrato 50 ml di n-esano, 55 ml di acqua e 2 g di cloruro di sodio. Agitare in imbuto separatore per 1 minuto. Dopo separazione delle fasi, raccogliere quella inferiore, aggiungere 90 ml di cloroformio, dibattere per 1 minuto e raccogliere la fase cloroformica. Evaporare l'estratto purificato con evaporatore rotante, riprendere con cloroformio e trasferire in provetta. Evaporare con leggero flusso di azoto e riprendere con 2 ml di fase mobile per HPLC (3.4).*
- 5.4 *Analisi quantitativa per HPLC. - Procedere come indicato nel metodo AFLATOSSINE TOTALI al punto 5.5*

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di ogni aflatossina del campione, espresso in microgrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Aflatossina } (\mu\text{g} / \text{kg}) = \frac{m \times V_{\text{ext}} \times 140}{V_m \times M \times V_f}$$

dove:

m = quantità di aflatossina in ng ottenuta dal picco del campione, calcolata sulla curva di regressione lineare.

V_m = volume di estratto del campione iniettato in ml.

V_{ext} = volume finale dell'estratto del campione in ml

M = massa del campione in grammi.

V_f = volume del filtrato ottenuto in 5.2 in ml.

140 = quantità di solvente di estrazione del campione espresso in ml.

Se la procedura è stata eseguita secondo quanto indicato la formula diventa:

$$\text{Aflatossina } (\mu\text{g} / \text{kg}) = 20 \times m$$

Riferimenti bibliografici

Preparation of Standards for Mycotoxins In *Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemists (AOAC)*. 15. Ed., K. Helrich (Ed.), Arlington, Virginia, 1990, 1185-1186.

Regolamento CEE relativo alla determinazione dell'aflatossina B₁ nei mangimi. *G.U. CEE* L. 327/54 del 13/11/1992.

MIRAGLIA, M. BRERA, C. STACCHINI, A. Le aflatossine: problematiche connesse ai programmi di intervento. *Rapporti ISTISAN* 1993, 93/31.

**AFLATOSSINE TOTALI NELL'OLIO DI OLIVA
(AFB₁ ; AFB₂ ; AFG₁ ; AFG₂)**

Metodo per HPLC*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile all'olio di oliva

2. Principio del metodo

Il campione è estratto con una miscela di metanolo e soluzione di cloruro di potassio al 4%. Dopo sgrassamento con esano, rimozione dei pigmenti ed estrazione con cloroformio, effettuare il clean-up per immunoaffinity.

La separazione e la determinazione finale sono ottenute mediante HPLC su colonna a fase inversa C18. Eseguire quindi una derivatizzazione post-colonna con soluzione satura di iodio in acqua e rivelazione a fluorescenza.

3. Reattivi

3.1 *Etere di petrolio*

3.2 *Soluzione estraente.* - Metanolo/ Soluzione acquosa di cloruro di potassio al 4% (2:1)

3.3 *Esano*

3.4 *Soluzione di acetato di piombo al 20%*

3.5 *Celite 545*

3.6 *Cloroformio*

3.7 *Sodio solfato anidro*

3.8 *Acetonitrile/ Acqua (3 : 2)*

3.9 *Tampone fosfato a pH 7.3 (PBS)*

3.10 *Colonne di immunoaffinity Oxoid o equivalenti*

3.11 *Fase mobile.* - Metanolo acqua (1 : 1) solventi per HPLC

3.12 *Soluzione standard di aflatossine.* - Procedere come indicato nel metodo AFLATOSSINE TOTALI ai punti 3.12.1 e 3.12.2

3.13 *Soluzione di calibrazione per HPLC.* - Procedere come indicato nel metodo AFLATOSSINE TOTALI al punto 3.12.3.

4. Apparecchiatura

* Carlo Brera

- 4.1 *Evaporatore rotante*
- 4.2 *Siringhe monouso da 20 ml o apparecchiatura da vuoto per estrazione in fase solida*
- 4.3 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione (HPLC)*
- 4.4 *Colonna analitica per HPLC (C 18 da 3 μ o da 5 μ)*
- 4.5 *Pompa per HPLC per la soluzione di iodio*
- 4.6 *Collegamento a T Valco in acciaio inossidabile a volume morto zero da 1/16 per 0.75 mm*
- 4.7 *Spirale di reazione in teflon oppure in acciaio inossidabile. - Dimensioni comprese tra 3000 x 0.5 mm e 5000 x 0.5 mm*
- 4.8 *Bagno termostatico a 60 °C con regolatore di temperatura (± 0.1 °C)*
- 4.9 *Rivelatore a fluorescenza. - Lunghezza d'onda di eccitazione = 365 nm ed emissione = 435 nm (per strumenti a filtri: emissione < 400 nm. Usare un regolatore di contropressione per evitare eventuali bolle di aria nella cella a flusso.*
- 4.10 *Integratore elettronico*

5. Procedimento

- 5.1 *Estrazione.* - Porre 20 ml di campione in un imbuto separatore, aggiungere 50 ml di etere di petrolio ed estrarre per due volte con 100 ml di soluzione estraente (3.2). Riunire gli estratti e sgrassarli con 50 ml di esano per tre volte. Lavare l'esano con 100 ml di soluzione estraente che è poi riunita ai precedenti estratti. Aggiungere l'estratto finale di 35 ml di una soluzione acquosa di acetato di piombo al 20% e di 5 g di celite ed agitato; filtrare, aggiungere 25 ml di acqua ed estrarre con 50 ml di cloroformio per tre volte. Passare l'estratto cloroformico attraverso sodio solfato anidro e portare a secco in evaporatore rotante.
- 5.2 *Clean-up.* - Riprendere l'estratto ottenuto al punto 5.1 con 2 ml di Acetonitrile: H₂O (3:2) con aggiunta di 46 ml di tampone fosfato pH 7.3 PBS (3.9). Condizionare la colonna di immunoaffinity con 10 ml di PBS (3.9), quindi far passare l'estratto in colonna scartando l'eluato; lavare con 10 ml di H₂O ed eluire con 2 ml di Acetonitrile. Ridurre il volume in corrente di Azoto e portarlo ad un volume finale di 1 ml con MeOH : H₂O (1:1).
- 5.3 *Analisi quantitativa per HPLC.* - Procedere come indicato nel metodo AFLATOSSINE TOTALI al punto 5.5.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di ogni aflatossina del campione, espresso in microgrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Aflatossina } (\mu\text{g} / \text{kg}) = \frac{m \times V_{\text{ext}}}{V_m \times M}$$

dove:

m = quantità di aflatossina in ng ottenuta dal picco del campione, calcolata sulla curva di regressione lineare

V_m = volume di estratto del campione iniettato in ml

V_{ext} = volume finale dell'estratto del campione in ml

M = massa del campione in grammi

Riferimenti bibliografici

Preparation of Standards for Mycotoxins In *Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemists* (AOAC). 15. Ed., K. Helrich (Ed.), Arlington, Virginia, 1990, 1185-1186.

Regolamento CEE relativo alla determinazione dell'aflatossina B₁ nei mangimi. *G.U. CEE*. L.327/54 del 13/11/1992

MIRAGLIA, M. BRERA, C. STACCHINI, A. Le aflatossine: problematiche connesse ai programmi di intervento. *Rapporti ISTISAN* 1993, 93/31.

AFLATOSSINA M₁ (AFM₁) NEL LATTE**Metodo per HPLC*****1. Campo di applicazione**

Il metodo è applicabile al latte.

2. Principio del metodo

L'estrazione ed il clean-up sono effettuati in colonnine contenenti un anticorpo monoclonale specifico per l'AFM₁. La quantificazione finale è ottenuta mediante HPLC in fase inversa con rivelatore a fluorescenza.

3. Reattivi

3.1 *Metanolo*

3.2 *Acetonitrile*

3.3 *Metanolo. - Acqua (3:2)*

3.4 *Metanolo. - Acqua (1:1)*

3.5 *Standard di AFM₁*

3.6 *Colonna di immunoaffinity Easy-Extract contenente anticorpi monoclonali contro l'AFM₁ legati con agarosio, Unipath (distribuita in Italia dalla Biocode) o equivalenti.*

3.7 *Soluzione fisiologica tamponata (PBS) (pH= 7.3)*

3.8 *Fase mobile. - Acqua: acetonitrile (60:40) /metanolo (5:4). Tutti i solventi devono essere per HPLC*

3.9 *Soluzione di calibrazione per HPLC. - Procedere come indicato nel metodo AFLATOSSINE TOTALI al punto 3.12.*

4. Apparecchiatura

4.1 *Centrifuga*

4.2 *Siringhe monouso da 20 ml o apparecchiatura da vuoto per estrazione in fase solida.*

4.3 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione*

4.4 *Colonna cromatografica per HPLC C 18.*

4.5 *Rivelatore spettrofluorimetrico*

4.6 *Registratore o integratore*

* Carlo Brera

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione.* - Ricostituire il latte in polvere con acqua calda fino ad ottenere una soluzione al 10% (p/v). Per facilitare il passaggio in colonna del latte é necessario effettuare, con l'eccezione del latte scremato, una centrifugazione preliminare a 3400 g per rimuovere la materia grassa.
- 5.2 *Preparazione della colonna ed estrazione.* - Collegare la colonna (3.6) ad una siringa da 20 ml ed attivare la colonna facendo eluire lentamente con lo stantuffo della siringa 10 ml di PBS (3.7). Disconnettere la siringa ed applicare il campione con la stessa procedura. Possono essere passati in colonna volumi di latte fino a 100 ml. Scartare gli eluati e lavare la colonna con 10 ml di acqua. Eluire l'AFM₁ con 1 ml di metanolo o di acetonitrile. Concentrare il campione sotto flusso di azoto e riprendere con 500 µl di fase mobile (3.8).

Nota

Evitare di sollevare lo stantuffo con la colonna attaccata alla siringa per evitare il danneggiamento della colonna stessa.

Utilizzare come alternativa una apparecchiatura da vuoto per estrazione in fase solida.

- 5.3 *Determinazione cromatografica.* - Predisporre la pompa per HPLC ad un flusso di 0.75 ml/min; usare la fase mobile (3.8). Sistemare il rivelatore a fluorescenza a lunghezza d'onda di eccitazione = 360 nm e lunghezza d'onda di emissione = 440 nm.

Iniettare 200 µl delle soluzioni di calibrazione e dell'estratto del campione. Effettuare la verifica della linearità della risposta fluorimetrica mediante il calcolo della curva di regressione lineare ($y = ax + b$) ottenuta correlando la quantità (x) di AFM₁ iniettata espressa in ng, con le aree proporzionali all'intensità di fluorescenza (y). La proporzionalità dovrebbe essere quanto più possibile lineare.

6. Espressione dei risultati

Calcolare sulla retta di taratura il contenuto di AFM₁ dell'estratto finale e riportare il valore ottenuto al volume iniziale di latte applicato alla colonna di immunoaffinity.

Riferimenti bibliografici

MORTIMER, D. N. GILBERT, J. SHEPHERD, M.J. *Journal Chromatography* 1987, 407: 393-398.

OCRATOSSINA (OA)**Metodo per HPLC*****1. Campo di applicazione**

Il metodo è applicabile a cereali ed al rene di suino.

2. Principio del metodo

L'ocratossina A è estratta dal campione con cloroformio ed una soluzione acquosa di acido fosforico, e quindi isolata mediante una ripartizione liquido-liquido in una soluzione diluita di bicarbonato di sodio. Dopo un ulteriore clean-up mediante cartuccia di estrazione in fase solida (riempimento C 18) l'ocratossina A è dosata per cromatografia liquida in fase inversa con rivelatore a fluorescenza. L'identità dell'ocratossina A è confermata mediante la formazione dell'estere metilico.

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione 0.1 M di acido fosforico*
- 3.2 *Cloroformio*
- 3.3 *Diclorometano*
- 3.4 *Soluzione acquosa al 3% di bicarbonato di sodio*
- 3.5 *Soluzione acetato di etile. - Metanolo: acido acetico (95:5:0.5)*
- 3.6 *Soluzione di benzene acido acetico (99: 1)*
- 3.7 *Celite 545*
- 3.8 *Fase mobile. - Acqua: acetonitrile: acido acetico (99:99:2) solventi per HPLC*
- 3.9 *Soluzioni standard di Ocratossina A*

Attenzione

L'ocratossina A è una sostanza molto tossica e deve essere quindi manipolata con molta attenzione (vedi norme di precauzione al punto 3.12 del metodo AFLATOSSINE TOTALI)

- 3.9.1 *Preparare una soluzione con una concentrazione di circa 24 µg /ml in benzene acido acetico (99:1).*

* Carlo Brera

3.9.2 *Determinazione della concentrazione per via spettrofotometrica.* - Registrare lo spettro UV della soluzione da 310 a 350 nm contro la miscela toluene: acido acetico (99:1); misurare in cuvette con percorso ottico di un cm l'assorbanza del massimo (A) e determinare la concentrazione mediante la seguente formula:

$$OA(\mu\text{g} / \text{ml}) = \frac{A \times MW \times 1000}{\epsilon}$$

dove:

A = assorbanza nel punto di massimo

MW = peso molecolare dell'OA

ϵ = coefficiente d'estinzione molare.

Nella seguente tabella sono riportati i valori dei pesi molecolari e dei coefficienti di estinzione delle ocratossine

Tabella 1. - *Pesi molecolari e coefficienti di estinzione delle ocratossine*

Ocratossina	max nm	PM	ϵ
A	333	403	5550
B	320	369	6000
estere etilico A	333	431	6200
estere etilico B	320	397	6500

3.9.3 *Soluzione standard di lavoro.* - Preparare per diluizione con benzene: acido acetico (99:1) la soluzione di lavoro (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

3.10 *Soluzione di trifluoruro di boro al 14% in metanolo*

4. Apparecchiatura

4.1 *Bilancia analitica*

4.2 *Omogenizzatore ad alta velocità (Waring Blender).*

4.3 *Carta da filtro a pieghe MN6171/4 diametro 24 cm od equivalente.*

4.4 *Vortex*

4.5 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione.* - Flusso 1 ml/min con riproducibilità del $\pm 0.1\%$.

4.6 *Spettrofluorimetro con lunghezza d'onda d'eccitazione a 333 nm e d'emissione a 470 nm.*

4.7 *Registratore od integratore elettronico.*

4.8 *Colonna cromatografica per HPLC 300 x 3.9 mm, C 18 4 μm*

4.9 *Cartucce per estrazione in fase solida di C18.* - Tubo di polipropilene da 3 ml impaccato con 500 mg di riempimento, dimensione delle particelle 40 μ .

- 4.10 *Apparecchiatura da vuoto per estrazione in fase solida o in alternativa siringhe monouso da 10 ml.*

5. Procedimento

- 5.1 *Estrazione.* - Pesare 50 g di campione, aggiungere 250 ml di cloroformio e 25 ml di acido fosforico 0.1M; estrarre per 3 minuti ad alta velocità. Prima del termine dell'estrazione aggiungere 10 g di celite. Dopo filtrazione raccogliere 50 ml di filtrato e trasferirlo in un imbuto separatore. Aggiungere 10 ml di soluzione di bicarbonato di sodio al 3% (3.4), agitare e far separare le due fasi. Raccogliere la fase superiore (bicarbonato) per il passaggio in colonna.
- 5.2 *Purificazione su cartuccia C 18.* - Collegare la cartuccia all'apparecchiatura da vuoto. Condizionare la colonna con 2 ml di metanolo, 2 ml di acqua distillata e 2 ml di soluzione al 3% di bicarbonato di sodio (3.4) effettuare il condizionamento per due volte. Sia durante le fasi di condizionamento che in quelle successive assicurarsi che la colonna non vada a secco; lasciare circa 2 mm di solvente sul frit.
- Passare in colonna 5 ml dell'estratto, quindi lavare la colonna con 2 ml di soluzione 0.1 M di acido fosforico e 2 ml di acqua distillata; scartare i lavaggi. Eluire l'ocratossina A con 8 ml di soluzione 3.4 in provetta con tappo a vite contenente 2 ml di acqua distillata.

Nota

Utilizzare in alternativa siringhe monouso da 10 ml evitando di sollevare lo stantuffo con la colonna attaccata alla siringa per evitare il danneggiamento della stessa.

- 5.3 *Estrazione finale.* - Agitare con Vortex e raccogliere la fase organica superiore in un'altra provetta con il tappo a vite; estrarre la fase sottostante acquosa per due volte con 1 ml di acetato di etile, riunire le fasi organiche e mandare a secco in corrente di azoto.
- Riprendere il campione mandato a secco con 2 ml di acetato di etile, prelevare 1 ml e mandarlo a secco in corrente di azoto quindi ricostituirlo con 1 ml di fase mobile. La soluzione campione così ottenuta è pronta per essere iniettata in HPLC; mantenere la restante soluzione in acetato di etile per la conferma dell'identità dell'ocratossina A mediante formazione dell'estere metilico.
- 5.4 *Determinazione cromatografica.* - Predisporre la pompa da HPLC a 1 ml/min di flusso di fase mobile e lo spettrofluorimetro a 333 nm di lunghezza d'onda d'eccitazione e 470 nm d'emissione.
- Costruire una curva di calibrazione a 4 punti e verificare la linearità mediante il calcolo del fattore di risposta medio (la deviazione standard percentuale per ogni punto deve essere $\leq 5\%$). Controllare giornalmente la riproducibilità della curva di calibrazione. Iniettare al cromatografo un'aliquota del campione 5.3 ripreso in fase mobile.

6. Espressione dei risultati

- 6.1 *L'identificazione dell'ocratossina A nel campione viene effettuata in base al tempo di ritenzione dello standard.* - Il contenuto di ocratossina A del campione, espresso in microgrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$OA(\mu\text{g} / \text{kg}) = (R_s \times V_f) / (R_a \times V_i \times w)$$

dove:

R_s = risposta del campione iniettato

V_f = volume finale in l del campione

R_a = calcolo della media normalizzata delle risposte (per 1 ng di OA) relative alle concentrazioni delle soluzioni calibranti.

V_i = volume iniettato in μl del campione.

w = peso in g del campione presente nell'estratto finale.

- 6.2 *Conferma dell'identità dell'OA.* - Nel caso di campioni positivi è possibile effettuare la conferma della positività mediante formazione dell'estere metilico dell'OA.

Trasferire quantitativamente l'aliquota residua dell'estratto finale del campione (5.3), in imbuto separatore da 25 ml usando tre porzioni da 1 ml di diclorometano. Agitare e lasciare separare le fasi. Raccogliere la fase inferiore e mandare a secco sotto flusso di azoto.

Effettuare la metilazione, sia del campione che dello standard, aggiungendo 0.5 ml di trifloruro di boro al 14% in metanolo, far reagire per 15 minuti ad una temperatura di 50-60 °C. Dopo evaporazione in corrente di azoto, sciogliere in 1 ml di acetonitrile ed evaporare. Riprendere il campione e lo standard in fase mobile utilizzando lo stesso volume impiegato al punto 5.3. Iniettare il campione e lo standard così trattati.

La conferma positiva è data dalla scomparsa del picco con tempo di ritenzione dell'OA e dalla contemporanea comparsa di un nuovo picco con tempo di ritenzione uguale a quello dell'estere metilico dell'OA.

Riferimenti bibliografici

NESHEIM, S. STACK, M.E. TRUCKSESS, M.W. EPPLEY, R.M. Rapid solvent-efficient method for liquid chromatographic determination of Ochratoxin A in corn, barley and kidney: collaborative study. *J. of AOAC Intern.* 1992, 75 (3): 481-487.

Preparation of Standards for Mycotoxins In Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemists (AOAC). 15. Ed., K. Helrich (Ed.), Arlington, Virginia, 1990, 1185-1186; 1207.

METODICHE SPECIFICHE

ACIDITÀ IN PASTA E SFARINATI**Metodo titrimetrico*****1. Campo di applicazione**

Il metodo è applicabile a sfarinati e paste alimentari.

1. Principio del metodo

La valutazione dell'acidità è effettuata titolando con alcali dopo estrazione mediante alcool al 50%.

3. Reattivi

- 3.1 *Alcool al 50%*. - ($d = 0.932$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) esattamente neutralizzato
- 3.2 *NaOH N/50*
- 3.3 *Indicatore fenolftaleina*. - Soluzione alcolica all'1%

4. Apparecchiature

- 4.1 *Agitatore magnetico*
- 4.2 *Filtro Schleicher e Schull 589/2 o equivalente*
- 4.3 *Bilancia analitica*

5. Procedimento

Estrarre un aliquota di campione pari a 4 g in beuta con 100 ml della soluzione (3.1) sotto agitazione magnetica per 3 ore. Dopo filtrazione, prelevare 50 ml del filtrato limpido e titolare l'aliquota prelevata, con NaOH N/50 utilizzando fenolftaleina (3.3) come indicatore.

6. Espressione dei risultati

Il valore dell'acidità è espresso in gradi: il grado di acidità corrisponde al numero di ml di alcali N necessari a neutralizzare grammi 100 di sostanza secca.

* Roberta Onori

Operando nel modo descritto, il numero di ml di alcali N/50 usati per la titolazione corrisponde al grado di acidità che deve essere riferito a 100 parti di sostanza secca:

$$\text{Acidità} = ml_{NaOH} \times 2 \times 0.02 \frac{100}{m} \times \frac{100}{100-H}$$

dove:

- m = massa, in grammi, dell'aliquota del campione d'analisi
 ml_{NaOH} = ml di titolante (3.2)
 H = umidità relativa del campione in % sulla massa del campione d'analisi

Riferimenti bibliografici

Metodi di analisi di frumento, farine, pane e pasta: determinazione dell'acidità. *Annali Istituto Superiore di Sanità* 1967, 3 (1): 242; 250; 253; 256 - 257.

ACIDITA' NEL LATTE**Metodo titrimetrico*****1. Campo di applicazione**

Il metodo consente la determinazione del grado di acidità del latte ed è applicabile al latte fresco normale.

2. Principio del metodo

Si titola la quantità di acido lattico in 100 ml di latte mediante una soluzione NaOH N/4.

3. Reattivi

3.1 *Soluzione di NaOH N/4*

3.2 *Soluzione di fenolftaleina allo 0.1% in etanolo*

4. Apparecchiatura

4.1 *Buretta da 50 ml graduata in 0.1 ml*

5. Procedimento

Introdurre, tramite pipetta, 50 ml di latte in una beuta ed aggiungere 1 ml di fenolftaleina (3.2). Titolare, tramite buretta, con soluzione NaOH N/4 (3.1).

6. Espressione dei risultati

Il numero di millilitri della soluzione di NaOH N/4 necessari a titolare il contenuto di acido lattico in 50 ml di latte, moltiplicato per 2, rappresenta l'acidità espressa in gradi S.H.

Per esprimere l'acidità in % di acido lattico moltiplicare il numero di gradi S.H. per 0.0225 (valore equivalente, in acido lattico, ad 1 ml di NaOH N/4).

* Mauro Di Pasquale

ANALISI SPETTROFOTOMETRICA NELL'UV DELLO STRUTTO

Metodo spettrofotometrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile allo strutto per evidenziarne un'eventuale raffinazione.

2. Principio del metodo

La sostanza grassa è disciolta in un solvente e si determina l'estinzione della soluzione alle lunghezze d'onda prescritte, in riferimento al solvente puro.

3. Reattivi

3.1 *n-esano per cromatografia*

3.2 *Allumina basica, per cromatografia su colonna.* - Preparare l'allumina essiccandola in forno a 380-400 °C per 3 ore ed aggiungendo successivamente, nel recipiente in cui è contenuta, 5 ml di acqua ogni 100 g. Chiudere il recipiente ed agitare ripetutamente quindi lasciare a riposo per almeno 12 ore prima dell'uso.

4. Apparecchiatura

4.1 *Bagno termostato*

4.2 *Spettrofotometro per misure di estinzione nell'ultravioletto*

4.3 *Colonna per cromatografia.* - Lunghezza 450 mm e diametro 35 mm, con tubo di deflusso del diametro di circa 10 mm.

4.4 *Vaschette in quarzo prismatiche, con coperchio, di percorso ottico da 1 cm.*

4.5 *Evaporatore rotante*

5. Procedimento

Fondere lo strutto su bagno termostato a 50 °C. Filtrare per carta e pesare circa 0.25 g di filtrato in un pallone tarato da 25 ml.

Portare a volume con n-esano (3.1) omogeneizzare agitando.

* Mirella Delise

Misurare le estinzioni alle lunghezze d'onda di 232 e 270 nm usando come riferimento lo stesso solvente puro. Usare vaschette in quarzo.

Nel caso che il valore dell'estinzione a 270 nm fosse superiore a 0.25, operare di nuovo la lettura dopo passaggio del campione su allumina (3.2).

Introdurre nella colonna di vetro per cromatografia 30 g di allumina basica, preparata come sopra, in sospensione in esano (3.1) e, dopo l'assestamento dell'adsorbente, eliminare l'eccesso di esano fino a circa 1 cm al di sopra del livello superiore dell'allumina.

Sciogliere 10 g di strutto, fuso e filtrato, in 100 ml di esano (3.1) e versare la soluzione in colonna. Raccogliere l'eluato ed evaporare totalmente il solvente sotto vuoto, a temperatura non superiore a 40 °C.

Diluire all'1% in esano.

Sottoporre nuovamente la sostanza grassa ottenuta ad analisi spettrofotometrica alle lunghezze d'onda di 232 e 270 nm.

6. Espressione dei risultati

Si esprimono i valori di estinzione ottenuti alle lunghezze d'onda di 232 e 270 nm ed il loro rapporto R .

$$R = \frac{232}{270}$$

AZOTO AMMONIACALE NELLE ACQUE MINERALI

Metodo spettrofotometrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque minerali naturali.

2. Principio del metodo

In presenza di un catalizzatore (nitroprussiato di sodio) e per mezzo di un agente ossidante (sale sodico dell'acido dicloroisocianurico), gli ioni ammonio reagiscono con sostanze contenenti gruppi fenolici (salicilato di sodio) per formare un composto indofenolico colorato in blu.

3. Reattivi

Tutte le soluzioni debbono essere preparate utilizzando acqua bidistillata o distillata e deionizzata.

- 3.1 *Soluzione di citrato di sodio.* - Solubilizzare, in un matraccio tarato da 100 ml, 2 g di sodio idrato e 20 g di sodio citrato tribasico biidrato ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) e portare a volume con acqua.
- 3.2 *Soluzione di sodio nitroprussiato-sodio salicilato.* - Solubilizzare, in un matraccio tarato da 100 ml, 0.2 g di nitroprussiato di sodio [$\text{Na}_2 \text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \times 2\text{H}_2\text{O}$] e 17 g di salicilato di sodio e portare a volume con acqua. La soluzione si conserva per un periodo di tempo limitato.
- 3.3 *Soluzione di acido dicloroisocianurico.* - Solubilizzare, in un matraccio tarato da 100 ml, 0.58 g del sale sodico dell'acido dicloroisocianurico ($\text{C}_3\text{N}_3\text{Cl}_2\text{NaO}_3$) La soluzione deve essere preparata giornalmente.
- 3.4 *Reattivo ossidante.* - Mescolare, al momento dell'uso, 100 ml della soluzione di citrato (3.1) e 25 ml di soluzione di acido dicloroisocianurico (3.3).
- 3.5 *Soluzione madre di cloruro di ammonio (1000 mg/l NH_4^+).* - Solubilizzare 2.9655 g di cloruro di ammonio, essiccato in essiccatore su gel di silice, in un matraccio tarato da 1000 ml portare a volume con acqua.
- 3.6 *Soluzione standard di cloruro di ammonio 1 (10 mg/l NH_4^+).* - Diluire 10 ml di soluzione madre di cloruro di ammonio (3.5) a 1000 ml con acqua.
- 3.7 *Soluzione standard di cloruro di ammonio 2 (1 mg/l NH_4^+).* - Diluire 1 ml di soluzione madre di cloruro di ammonio (3.5) a 1000 ml con acqua.

*Maurizio Mosca

4. Apparecchiatura

4.1 *Bilancia analitica*

4.2 *Spettrofotometro.*

5. Procedimento

5.1 *Reazione colorimetrica.* - Trattare 50 ml di campione con 2 ml della soluzione di sodio nitroprussiato-sodio salicilato (3.2) e 2 ml del reattivo ossidante (3.4) mescolando accuratamente dopo ogni aggiunta. Effettuare parallelamente una determinazione in bianco, utilizzando 50 ml di acqua al posto del campione. Lasciare per 90 minuti a temperatura ambiente e quindi effettuare le letture a 690 nm contro bianco.

Per concentrazioni di NH_4^+ comprese tra 0.01 e 0.1 mg/l effettuare le letture utilizzando delle cuvette di cammino ottico di 5 cm, per concentrazioni tra 0.1 e 1.0 mg/l utilizzare cuvette da 1 cm.

5.2 *Allestimento della curva di taratura.* - Preparare, a partire dalle soluzioni standard di cloruro di ammonio 1 (3.6) e 2 (3.7), 3-5 soluzioni di lavoro con una concentrazione di NH_4^+ compresa tra 0.01 e 0.1 mg/l o tra 0.1 e 1.0 mg/l in funzione del contenuto presunto di ione ammonio nel campione. Prelevare 50 ml e trattare in modo analogo al campione (5.1).

Allestire la curva di taratura riportando i valori dell'assorbanza in funzione della concentrazione dello ione NH_4^+ espressa in mg/l.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di azoto ammoniacale del campione, espresso in mg/l di NH_4^+ , è ricavato direttamente dalla curva di taratura.

Riferimenti bibliografici

Ammonium (ammonia). In *Water analysis*, Fresenius W., Quentin K.E. and Schneider W. (Eds.), Springer Verlag, Berlin, 1988, 287-290.

CAFFEINA NEL CAFFÈ'**Metodo per HPLC*****1. Campo di applicazione**

Il metodo è applicabile al caffè.

2. Principio del metodo

La caffeina estratta dal campione è determinata mediante HPLC in fase inversa con rivelatore UV.

3. Reattivi

3.1 *Caffeina pura per analisi*

3.2 *Metanolo*

3.3 *Etanolo*

3.4 *Ossido di magnesio*

3.5 *Fase mobile.* - Acqua: metanolo (70:30) solventi per HPLC

4. Apparecchiatura

4.1 *Bilancia analitica*

4.2 *Macinino da laboratorio*

4.3 *Piastra riscaldante con agitatore magnetico*

4.4 *Filtro a membrana da 0.45 µm*

4.5 *Bagno ad ultrasuoni*

4.6 *Cromatografo liquido ad alta risoluzione*

4.7 *Colonna cromatografica per HPLC C 18*

4.8 *Rivelatore spettrofotometrico*

4.9 *Registratore o integratore.*

5. Procedimento

5.1 *Preparazione del campione ed estrazione.* - Mantenere il caffè in grani nel congelatore per 1 ora e 30 minuti prima di effettuare la macinazione e setacciare il prodotto ottenuto su setaccio con luci maglie da 0.63 mm.

* Carlo Brera

Introdurre in una beuta da 250 ml 1 g di campione, 4 g di ossido di Mg pesante e 100 ml di acqua; mantenere sotto agitazione magnetica alla temperatura di 90 °C per 1 ora. Registrare il peso della beuta prima e dopo l'estrazione per correggere le eventuali perdite di acqua. Filtrare l'estratto attraverso una membrana da 0.45 µm. Il filtrato è pronto per la successiva analisi in HPLC.

- 5.2 *Preparazione delle soluzioni standard.* - Preparare una soluzione concentrata di caffeina (0.5 mg/ml) in acqua/ etanolo 4:1.

La soluzione conservata in frigorifero può essere utilizzata per un mese. Preparare per diluizione con acqua gli standard relativi alla curva di calibrazione: 5; 10 e 15 µg/ml.

- 5.3 *Determinazione cromatografica.* - Predisporre la pompa per HPLC ad un flusso di 1.0 ml/m usare la fase mobile (3.5). Selezionare la lunghezza d'onda di 272 nm al rivelatore UV. Costruire una retta di taratura con le soluzioni ottenute in 5.2, quindi iniettare una opportuna aliquota del campione ottenuto in 5.1.

6. **Espressione dei risultati**

Calcolare sulla retta di taratura il contenuto di caffeina del campione, tenendo conto delle diluizioni effettuate.

CLORURI - NITRITI - NITRATI - SOLFATI NELLE ACQUE MINERALI

Metodo per cromatografia ionica*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque minerali naturali per la determinazione di cloruri, nitriti, nitrati e solfati.

2. Principio del metodo

Gli ioni sono determinati per cromatografia a scambio anionico utilizzando un rivelatore a conducibilità.

3. Reattivi

Tutte le soluzioni debbono essere preparate utilizzando acqua distillata e deionizzata 18 Mohm filtrata su filtri a membrana da 0.22 μm .

- 3.1 *Soluzione eluente 1.8 mM Na_2CO_3 / 1.7 mM NaHCO_3 .* - Solubilizzare 0.1907 g di carbonato di sodio e 0.1428 g di bicarbonato di sodio in un matraccio tarato da 1000 ml.
- 3.2 *Soluzione madre di cloruro di sodio (1000 mg/l Cl^-).* - Solubilizzare con poca acqua 1.6484 g di cloruro di sodio, essiccato per 2 ore a 150 °C, in un matraccio tarato da 1000 ml e portare a volume con acqua.
- 3.3 *Soluzione madre di nitrito di sodio (1000 mg/l NO_2^-).* - Solubilizzare con poca acqua 1.4998 g di nitrito di sodio, essiccato per 1 ora a 150 °C, in un matraccio tarato da 1000 ml e portare a volume con acqua.
- 3.4 *Soluzione madre di nitrato di sodio (1000 mg/l NO_3^-).* - Solubilizzare con poca acqua 1.3707 g di nitrato di sodio, essiccato per 24 ore a 105 °C, in un matraccio tarato da 1000 ml e portare a volume con acqua.
- 3.5 *Soluzione madre di solfato di sodio (1000 mg/l SO_4^{2-}).* - Solubilizzare con poca acqua 1.4790 g di solfato di sodio, essiccato per 1 ora a 105 °C, in un matraccio tarato da 1000 ml e portare a volume con acqua.

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Cromatografo ionico con rivelatore a conducibilità, munito di autosoppressore.*

* Maurizio Mosca

- 4.2 *Colonna a scambio anionico IONPAC AS4A-SC 4 x 250 mm Dionex o equivalente con relativa precolonna AG4A.*
- 4.3 *Filtri a membrana da 0.45 μm*
- 4.4 *Bilancia analitica*

5. Procedimento

- 5.1 *Determinazione per cromatografia ionica.* - Filtrare il campione, diluito con acqua se necessario, su filtro a membrana (4.3) ed iniettare una opportuna aliquota, in funzione del loop installato sulla valvola di iniezione, nel cromatografo ionico (4.1). Utilizzare come eluente la soluzione di carbonato/bicarbonato (3.1) ad un flusso di 2.0 ml/min..
- 5.2 *Allestimento della curva di calibrazione.* - In funzione della concentrazione presunta del o dei singoli ioni nel campione in esame, preparare almeno 3 soluzioni standard diluite a partire dalle soluzioni madri, in modo che il campione rientri nell'intervallo di concentrazione di tali standard, e sottoporle ad analisi cromatografica secondo le condizioni precedentemente riportate (5.1).
Allestire la curva di calibrazione riportando le aree ottenute in funzione delle concentrazioni degli standard espressi in mg/l.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto dei singoli anioni del campione è ricavato in base alla curva di taratura ed espresso in mg/l tenendo conto, nel calcolo, delle eventuali operazioni di diluizione.

Riferimenti bibliografici

Ion chromatography of seven anions. In *Water analysis*, Fresenius W., Quentin K.E. and Schneider W. (Eds.), Springer Verlag, Berlin 1988, 264-273.

PFAFF, J.D. BROCKHOFF, C.A. O'DELL, J.W. Method 300.0 The determination of inorganic anions in water by ion chromatography. *United States Environmental Protection Agency (EPA)*. 1991.

DIMETILNITROSOAMMINA NELLA BIRRA

Metodo gascromatografico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alla birra.

2. Principio del metodo

La determinazione della DMNA è eseguita mediante dosaggio gascromatografico con Rivelatore Termal Energy Analyzer (T.E.A.), previa estrazione e purificazione della DMNA su colonna EXTRELUT[®] 20.

3. Reattivi

- 3.1 *Diclorometano, per gas-cromatografia*
- 3.2 *Esano per gas-cromatografia*
- 3.3 *Solfato di sodio anidro puro per analisi*
- 3.4 *Scaglie di carborundum*
- 3.5 *DMNA pura*
- 3.6 *Soluzione standard di riferimento di DMNA, concentrazione 10 mg/l. - Diluire 1ml di DMNA (3.5) a 100 ml in matraccio tarato con esano (3.2)*

4. Apparecchiature

- 4.1 *Colonne Extrelut[®] 20*
- 4.2 *Colonne cromatografiche in vetro*
- 4.3 *Concentratore Kuderna Danish con colonna di Snyder*
- 4.4 *Gas-cromatografo (G.L.C.)*
- 4.5 *Rivelatore Termal Energy Analyzer (TEA)*
- 4.6 *Bilancia analitica*

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione. - Passare 50 ml di birra degassata su una colonna contenente 50 ml di Extrelut. Eluire dopo 20 minuti la colonna con 50 ml di diclorometano per tre volte.*

* Massimo Baldini; Paolo Stacchini

Essiccare gli eluati riuniti mediante passaggio su colonna contenente 15 g di solfato di sodio anidro e successivamente concentrare.

Quando il volume della soluzione è ridotto a circa 5ml aggiungere 1 ml di esano (3.2) e continuare la concentrazione fino al volume finale di 1 ml. Analizzare una aliquota del concentrato (6 µl) in GC-TEA.

5.2 Determinazione gascromatografica

Condizioni gascromatografiche:

Temperatura iniettore	180 °C
Temperatura colonna (programmata)	40 °C x 4' (8 °C/min) 100 °C 30 °C/min) 180 °C
Flusso gas (He):	30 ml/min

Condizioni TEA:

Temperatura di pirolisi	450 °C
Flusso ossigeno	5 ml/min
Trappola (azoto liquido/etanolo)	- 100 °C

- 5.3 *Preparazione della retta di taratura.* - Preparare la retta di taratura iniettando nel GLC-TEA 6 µl di soluzione standard alle seguenti concentrazioni: 1, 5, 10, 20 µg/l di DMNA preparate diluendo con esano (3.2) la soluzione di riferimento di DMNA (3.6).

6. Espressione dei risultati

Ricavare la concentrazione di DMNA nell' estratto del campione dalla retta di taratura.

Il contenuto di DMNA nella birra, espresso in microgrammi per litro, è calcolato in base alla seguente formula:

$$DMNA(\mu g / l) = \frac{C}{50}$$

dove:

C = la concentrazione, in µg/l, di DMNA nella soluzione dell'estratto esanico.

Nota

La Dimetilnitrosammina è una sostanza fortemente cancerogena, pertanto le manipolazioni della DMNA pura o di soluzioni di DMNA debbono essere condotte sotto cappa aspirante, usando guanti di gomma e comunque osservando scrupolosamente tutte le procedure di sicurezza

Riferimenti bibliografici

BALDINI, M. STACCHINI, P. Nitrosodimetilammina nella birra - Studio sulla presenza in birre estere e nazionali. *La Rivista della Società di Scienza dell'Alimentazione* 1994, 23(2): 187-193.

FOSFORO NELLE ACQUE MINERALI

Metodo spettrofotometrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque minerali naturali.

Il fosforo nelle acque naturali, è presente quasi esclusivamente come fosfato, in particolare ortofosfato, fosfato condensato (piro-, meta-, polifosfato) e fosfato legato a composti organici. Non è tuttavia da escludere la presenza di composti di fosforo a più basso numero di ossidazione. Ad ogni buon conto, ai fini della determinazione del fosforo totale, qualunque sia la specie in cui si è a trovare, il fosforo deve essere preliminarmente trasformato in ortofosfato. Tale trasformazione è realizzata con attacco ossidante per i composti organici e per quelli in cui il fosforo è presente con un numero di ossidazione inferiore a +5 e con l'idrolisi acida per i polifosfati.

Tale metodo è usato per:

A Dosaggio del fosforo presente come ortofosfato solubile.

B Dosaggio del fosforo totale.

Metodo A

2. Principio del metodo

Gli ioni ortofosfato reagiscono con il molibdato di ammonio ed il tartrato di ossido di antimonio e potassio, in ambiente acido, formando un eteropoliacido che è ridotto a blu di molibdeno con acido ascorbico.

Il metodo può essere impiegato per un intervallo di concentrazione di fosforo compreso tra 0.03 e 0.3 mg/l. Per campioni a concentrazione fino a 5 volte inferiore a 0.03 mg/l occorre impiegare vaschette con cammino ottico maggiore di 1 cm ed effettuare la taratura con standard opportunamente diluiti.

3. Reattivi

L'acqua usata deve essere bidistillata o deionizzata e distillata.

- 3.1 *Soluzione di molibdato di ammonio.* - Sciogliere 15 g di eptamolibdato (VI) di esammonio tetraidrato $[(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}]$ in 500 ml di acqua.

* Maurizio Mosca

La soluzione, conservata in bottiglie di polietilene fuori del contatto con la luce, è stabile per molti mesi.

- 3.2 *Soluzione di acido solforico.* - Versare cautamente e sotto raffreddamento 140 ml di H_2SO_4 concentrato ($d=1,84$ a $20\text{ }^\circ C$) in 900 ml di acqua. Una volta raffreddata, la soluzione è conservata in bottiglie di vetro.
- 3.3 *Soluzione di acido ascorbico.* - Sciogliere 27 g di acido ascorbico ($C_6H_8O_6$) in 500 ml di acqua. La soluzione deve essere conservata in bottiglie di polietilene ed in frigorifero quando non è utilizzata. In tal modo è stabile per molti mesi. La soluzione non può essere mantenuta alla temperatura ambiente per più di due o tre giorni.
- 3.4 *Soluzione di tartrato di ossido di antimonio e potassio.* - Sciogliere 0.34 g di tartrato di ossido di antimonio (III) e potassio emiidrato [$K(SbO)C_4H_4O_6 \times 1/2H_2O$] in 250 ml di acqua, scaldando se necessario. La soluzione, conservata in bottiglie di vetro o di plastica è stabile per molti mesi.
- 3.5 *Reagente misto.* - Mescolare 100 ml della soluzione di molibdato di ammonio (3.1) con 250 ml di acido solforico (3.2), 100 ml di acido ascorbico (3.3) e 50 ml di tartrato di antimonio e potassio (3.4). Il reagente preparato al momento dell'uso, non può essere conservato per più di 6 ore.
- 3.6 *Soluzione standard di fosforo concentrata (0.1 mg/ml).* - Sciogliere con acqua 0.4393 g di diidrogenofosfato di potassio anidro (KH_2PO_4) seccato a $105\text{ }^\circ C$ e diluire con acqua a 1000 ml in matraccio tarato. Conservare la soluzione in bottiglia scura, previa aggiunta di 1 ml di cloroformio. La soluzione è stabile per molti mesi.
- 3.7 *Soluzione standard di fosforo diluita (0.001 mg/ml).* - Prelevare 10.0 ml della soluzione concentrata (3.6) e diluire a 1000 ml con acqua in matraccio tarato.

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Spettrofotometro.* - Spettrofotometro con vaschette con cammino ottico da 1 cm (o superiore a seconda delle esigenze) adatto per misure intorno a 710 nm e comunque non inferiore a 650 nm.
Con uno spettrofotometro che consenta misure a 885 nm si può ottenere un notevole aumento della sensibilità.

5. Procedimento

- 5.1 *Taratura.* - In una serie di 7 beute da 250 ml introdurre rispettivamente 0 (bianco) - 3-5-10-15-20-30 ml della soluzione standard diluita di fosforo (3.7), portare a volume di 100 ml mediante aggiunta di acqua prelevata con una buretta da 100 ml. Aggiungere quindi 10 ml di reagente misto (3.5) mescolando contemporaneamente

te. Dopo 10 min leggere le assorbanze rispetto al bianco. Costruire la retta di taratura ponendo in ordinata le assorbanze ed in ascissa le corrispondenti quantità di fosforo presenti nei 100 ml.

- 5.2 *Dosaggio del campione.* - Prelevare 100 ml di campione e introdurli in una beuta da 250 ml. Aggiungere 10 ml di reagente misto (3.5), mescolando contemporaneamente. Dopo 10 e non oltre 15 minuti dopo l'aggiunta del reattivo, a non meno di 20 °C, eseguire la misura dell'assorbanza della soluzione rispetto al bianco a 885 nm.

Qualora si esegua la misura intorno a 710 nm, si avrà una certa perdita di sensibilità che può essere compensata impiegando vaschette con cammino ottico di 5 cm.

- 5.3 *Controllo del bianco dei reattivi.* - L'assorbanza del bianco non deve superare 0.005. Qualora si trovino valori di bianco troppo alti, si debbono controllare i reattivi e in particolare la soluzione di molibdato di ammonio (3.1).

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di fosforo del campione, presente come ortofosfato ed espresso in milligrammi per litro, è calcolato in base alla seguente formula:

$$P(\text{mg/l}) = P_t \times 10$$

dove:

P_t = quantità di fosforo ricavato dal grafico di taratura.

Nota

Il rame (II) ed il ferro (III) non interferiscono se presenti in quantità inferiori rispettivamente a 10 e 50 mg/l. Gli arseniati interferiscono in quanto danno la stessa reazione cromatica dei fosfati. Il cromo (VI) ed i nitriti danno interferenza negativa pari al 3%, se presenti in concentrazione superiore a 1 mg/l, ed al 10÷15%, se superiore a 10 mg/l. Solfuri e composti del silicio non interferiscono se presenti in concentrazioni inferiori rispettivamente a 1.0 (S) e 10.0 (SiO₂) mg/l; per quanto concerne i composti di silicio, 20 mg/l di SiO₂ corrispondono a circa 0.005 mg/l di P.

Riferimenti bibliografici

D-011 Fosforo In *Metodi analitici per le acque*, Istituto di Ricerca sulle Acque. Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), marzo 1981.

Metodo B

2. Principio del metodo

Il metodo si basa su una preliminare trasformazione di tutti i composti del fosforo, organici ed inorganici, a ortofosfati mediante mineralizzazione acida con persolfato di potassio. Eventuali fosfati di metalli pesanti presenti in composti particolarmente resistenti all'attacco dei reagenti potrebbero non essere solubilizzati.

Gli ioni ortofosfato sono quindi fatti reagire con il molibdato d'ammonio ed il tartrato di antimonio e potassio, in ambiente acido, in modo da formare un eteropoliacido che è ridotto a blu di molibdeno con acido ascorbico. Il metodo è applicabile nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0.06 e 0.6 mg/l per un'aliquota di 50 ml di acqua in esame. Per concentrazioni più elevate occorre diluire opportunamente il campione. Per campioni a concentrazione fino a 5 volte inferiore a 0.06 mg/l occorre impiegare vaschette con cammino ottico maggiore di 1 cm ed effettuare la taratura con standard opportunamente diluiti.

3. Reattivi

L'acqua usata deve essere bidistillata o deionizzata e distillata.

- 3.1 *Soluzione di molibdato di ammonio.* - Sciogliere 15 g di eptamolibdato (VI) di esammonio tetraidrato $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ in 500 ml di acqua. La soluzione, conservata in bottiglia di polietilene fuori del contatto con la luce, è stabile per molti mesi.
- 3.2 *Soluzione di acido solforico.* - Versare cautamente e sotto raffreddamento 140 ml di H_2SO_4 concentrato ($d=1,84$ a 20°C) in 900 ml di acqua. Una volta raffreddata, la soluzione è conservata in bottiglie di vetro.
- 3.3 *Soluzione di acido ascorbico.* - Sciogliere 27 g di acido ascorbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) in 500 ml di acqua. La soluzione deve essere conservata in bottiglie di plastica ed in frigorifero quando non è utilizzata. In tal modo è stabile per molti mesi. La soluzione non può essere mantenuta alla temperatura ambiente per più di due o tre giorni.
- 3.4 *Soluzione di tartrato di ossido di antimonio e potassio.* - Sciogliere 0.34 g di tartrato di ossido di antimonio (III) e potassio emiidrato $[\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 1/2\text{H}_2\text{O}]$ in 250 ml di acqua, scaldando se necessario. La soluzione, conservata in bottiglie di vetro o di plastica è stabile per molti mesi.
- 3.5 *Reagente misto.* - Mescolare 100 ml della soluzione di molibdato di ammonio (3.1) con 250 ml di acido solforico (3.2), 100 ml di acido ascorbico (3.3) e 50 ml di tartrato di antimonio e potassio (3.4). Il reagente preparato al momento dell'uso, non può essere conservato per più di 6 ore.
- 3.6 *Soluzione standard di fosforo concentrata (0.1 mg/ml).* - Sciogliere con acqua 0.4393 g di diidrogenofosfato di potassio anidro (KH_2PO_4), seccato a 105°C ,

e diluire con acqua a 1000 ml in matraccio tarato. Conservare la soluzione in bottiglia scura, previa aggiunta di 1 ml di cloroformio. La soluzione è stabile per molti mesi.

- 3.7 *Soluzione standard di fosforo diluita* (0.001 mg/ml). - Prelevare 10.0 ml della soluzione concentrata (3.6) e diluire a 1000 ml con acqua in matraccio tarato.
- 3.8 *Soluzione di acido solforico 10 M*. - Aggiungere a 40 ml di acqua 55 ml di H_2SO_4 concentrato ($d = 1.84$ a $20\text{ }^\circ C$), cautamente e sotto raffreddamento, e portare al volume di 100 ml con acqua. Conservare in bottiglia di vetro.
- 3.9 *Soluzione di idrossido di sodio 2 M*. - Sciogliere 8 g di NaOH in 100 ml di acqua. La soluzione deve essere conservata in bottiglia di plastica.
- 3.10 *Soluzione di acido solforico 5 M*. - Diluire con ugual volume di acqua la soluzione di acido solforico 10 M (3.8).
- 3.11 *Persolfato di potassio* ($K_2S_2O_8$).
- 3.12 *Soluzione di fenoltaleina*. - Sciogliere 0.5 g fenoltaleina in una miscela di 50 ml di etanolo e 50 ml di acqua.

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Cilindri graduati da 100 ml con tappo a smeriglio, oppure matracci tarati a doppia tacca a 100 e 110 ml, oppure matracci tarati a 100 ml muniti di bolla da almeno 10 ml, al disopra della tacca.*
- 4.2 *Spettrofotometro*. - Spettrofotometro con vaschette con cammino ottico da 1 cm (o superiore a seconda delle esigenze) adatto per misure intorno a 710 nm e comunque non inferiore a 650 nm.
Con uno spettrofotometro che consenta misure a 885 nm si può ottenere un notevole aumento della sensibilità.
- 4.3 *Beute pyrex da 250 ml*. - Munite di tappo a vite e guarnizione di politetrafluoroetilene (teflon).
- 4.4 *Autoclave o stufa termostata*
- 4.5 *Centrifuga*

5. Procedimento

- 5.1 *Taratura*. - In una serie di 7 beute con tappo a vite (4.3) introdurre rispettivamente 0-3-5-10-15-20-30 ml della soluzione standard diluita di fosforo (3.7), portare a volume di 50 ml mediante aggiunta di acqua prelevata con apposita buretta e trattare come il campione (5.2). Costruire la retta di taratura ponendo in ordinata le assorbanze ed in ascissa le corrispondenti quantità di fosforo presenti nei 100 ml.
- 5.2 *Dosaggio del campione*. - Prelevare esattamente 50 ml di campione. Per concentrazioni elevate prelevare una aliquota di campione v , inferiore a 50 ml, diluire con acqua ad un volume V opportuno e prelevarne 50 ml. Introdurre nella beuta pyrex con tappo a vite (4.3) i 50 ml. Aggiungere una goccia di

fenolftaleina (3.12) e aggiustare il pH del campione al limite inferiore del viraggio dell'indicatore mediante la soluzione di acido solforico 5 M (3.10) e di idrossido di sodio 2 M (3.9). Quindi aggiungere 1 ml di acido solforico 10 M (3.8) e 0.4 g di persolfato di potassio (3.11).

Tappare e trasferire la beuta in autoclave a 120 °C per 30 minuti o in stufa termostata a 95-100 °C per 2 ore. Lasciare raffreddare e trasportare quantitativamente la soluzione in un cilindro graduato da 100 ml munito di tappo a smeriglio (o meglio in un matraccio tarato a doppia tacca o munito di bolla al disopra della tacca) (4.1). Aggiungere una goccia di fenolftaleina (3.12) e idrossido di sodio 2 M (3.9) fino a leggera colorazione rosa e diluire con acqua al volume di 100 ml.

Aggiungere 10 ml di reagente misto (3.5), mescolando contemporaneamente. Se la soluzione resta torbida occorre centrifugare fino a renderla limpida. Dopo 10 minuti a non di meno di 20 °C, eseguire la misura dell'assorbanza a 885 nm della soluzione rispetto al bianco (5.3).

Qualora si esegua la misura intorno intorno a 710 nm, si avrà una certa perdita di sensibilità che può essere compensata impiegando vaschette con cammino ottico di 5 cm.

5.3 *Determinazione del bianco dei reattivi.* - Per la valutazione del bianco dei reattivi occorre procedere esattamente come descritto al paragrafo 5.2, dove al posto del campione si prelevano 50 ml di acqua.

Qualora si trovino valori di bianco troppo alti, si devono controllare i reattivi e in particolare la soluzione di molibdato di ammonio (3.1).

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di fosforo del campione, espresso in milligrammi per litro, è calcolato in base alla seguente formula:

$$P(\text{mg/l}) = P_t \frac{V \times 20}{v}$$

dove:

P_t = quantità di fosforo ricavato dal grafico di taratura

V = volume in ml al quale si è diluito eventualmente il campione

v = volume in ml dell'aliquota prelevata.

Se il campione non è stato preliminarmente diluito e quindi sono stati prelevati 50 ml di esso l'espressione diviene $P = P_t \times 20$

Riferimenti bibliografici

D-011 Fosforo In *Metodi analitici per le acque*, Istituto di Ricerca sulle Acque. Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), marzo 1981.

FOSFORO NEI PRODOTTI DESTINATI AD UNA ALIMENTAZIONE PARTICOLARE

Metodo spettrofotometrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti i prodotti destinati ad una alimentazione particolare.

2. Principio del metodo

Il campione è mineralizzato e le ceneri ottenute sono sciolte in soluzione acida. La soluzione è quindi trattata con il reattivo vanado-molibdico. La densità ottica della soluzione gialla così formata è misurata spettrofotometricamente.

3. Reattivi

- 3.1 *Acido nitrico* ($d = 1.38 - 1.43$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- 3.2 *Acido cloridrico 6 N*.
- 3.3 *Acido nitrico diluito*. - Aggiungere 13 ml di acqua a 7 ml di HNO_3 (3.1)
- 3.4 *Soluzione di eptamolibdato di ammonio*. - Sciogliere con acqua calda in un matraccio tarato da 100 ml 10 g di eptamolibdato d'ammonio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ ed aggiungere 1 ml di ammoniaca ($d = 0.91$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$), portare a volume con acqua.
- 3.5 *Soluzione di monovanadato di ammonio* (NH_4VO_3). - Sciogliere in un matraccio tarato da 100 ml, 235 mg di monovanadato di ammonio con 40 ml di acqua calda, aggiungere lentamente agitando 2 ml di acido nitrico diluito (3.3) e portare a volume con acqua.
- 3.6 *Reattivo vanado-molibdico*. - Mescolare in un matraccio tarato da 100 ml, 20 ml di soluzione (3.4) con 20 ml della soluzione (3.5) e aggiungere 13.4 ml di acido nitrico concentrato (3.1), portare a volume con acqua.
- 3.7 *Soluzione standard di fosforo* (1 mg/ml). - Sciogliere in un matraccio tarato da 1000 ml, 4.387 g di fosfato monopotassico KH_2PO_4 con acqua.

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Spettrofotometro*.
- 4.2 *Piastra elettrica riscaldante*.

* Brunella Carratù

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione.* - Solubilizzare le ceneri del prodotto in esame, ottenute come descritto nel metodo per la determinazione delle ceneri, con 10 ml di acido cloridrico 6 N (3.2), coprire la capsula con un vetro da orologio e riscaldare su piastra elettrica fino a leggera ebollizione. Prolungare l'ebollizione per circa 10 minuti, lasciare raffreddare e trasferire quindi quantitativamente la soluzione in un matraccio tarato da 25 ml filtrando. Portare quindi a volume con acqua. Diluire la soluzione così ottenuta con acqua in modo da ottenere una concentrazione in fosforo non superiore a 40 µg/ml.
- 5.2 *Reazione colorimetrica.* - Introdurre in un tubo da saggio 10 ml della soluzione campione diluita e aggiungere 10 ml del reattivo vanado-molibdico (3.6). Mescolare e lasciare riposare per 10 minuti a temperatura ambiente. Misurare la densità ottica allo spettrofotometro a 430 nm usando come bianco una soluzione composta da 10 ml di reattivo vanado-molibdico e 10 ml di acqua.
- 5.3 *Curva di taratura.* - Preparare a partire dalla soluzione standard (3.7) delle soluzioni contenenti rispettivamente 5, 10, 20, 30 e 40 µg di fosforo per ml. Prelevare 10 ml di ciascuna di tali soluzioni ed aggiungervi 10 ml di reattivo (3.6). Mescolare e lasciare riposare 10 minuti a temperatura ambiente. Misurare la densità ottica nelle stesse condizioni utilizzate per il campione. Tracciare la curva di taratura mettendo in ordinata i valori di densità ottica e in ascissa le quantità corrispondenti di fosforo. La curva è lineare per le concentrazioni di fosforo comprese tra 0 e 40 µg/ml.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di fosforo del campione, espresso in mg/100 g o 100 ml, è ricavato riferendosi alla curva di taratura tenendo conto delle eventuali operazioni di diluizione.

Riferimenti bibliografici

Metodi di analisi comunitari per il controllo ufficiale degli alimenti per animali. Determinazione del fosforo totale. *G.U. CEE L 279/15 del 20/12/1971.*

GLIADINA NEI PRODOTTI DICHIARATI PRIVI DI GLUTINE

Metodo per immunodiffusione*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a tutti i prodotti dichiarati privi di glutine

2. Principio del metodo

La frazione gliadinica del glutine è lasciata diffondere su gel di agarosio in presenza del suo specifico anticorpo. La diffusione delle due soluzioni dà origine nel punto di incontro ad una banda di precipitazione dovuta al complesso antigene-anticorpo.

3. Reattivi

- 3.1 *Alcool etilico al 50%.* - Versare in un cilindro da 1000 ml, 526 ml di alcool etilico a 95° e portare a volume con acqua.
- 3.2 *Tampone tris-citrico a pH 8.2.* - Solubilizzare 9.2 g di 2-amino-2-idrossimetil-1-3-propandiolo (tris) e 2.5 g di acido citrico monoidrato in un matraccio tarato da 1000 ml e portare a volume con acqua.
- 3.3 *Soluzione di sodio azide all'1%.*
- 3.4 *Soluzione di agarosio.* - Sciogliere 1 g di agarosio in 100 ml di soluzione tampone (3.2), aggiungere 1 ml della soluzione di sodio azide (3.3).
- 3.5 *Idrossido di sodio 0.01 N.*
- 3.6 *Soluzione standard madre di gliadina.* - Solubilizzare 175 mg di gliadina con NaOH (3.5) in un matraccio tarato da 25 ml.
- 3.7 *Soluzione standard di lavoro.* - Diluire 1 ml della soluzione madre (3.6) con la soluzione alcoolica al 50% (3.1) in un matraccio tarato da 100 ml.
- 3.8 *Siero specifico antigliadina (RIFTEL - DE HAEN).*
- 3.9 *Cloruro di sodio 0.15 M.*
- 3.10 *Soluzione di fissaggio.* - Soluzione di acido tannico all'1%.
- 3.11 *Alcool metilico.*
- 3.12 *Acido acetico glaciale.*
- 3.13 *Blu di Coomassie.*
- 3.14 *Soluzione colorante.* - Sciogliere 100 mg di blu di Coomassie (3.13) in 50 ml di alcool metilico, aggiungere poi 10 ml di acido acetico glaciale e 40 ml di acqua.

* Concetta Boniglia

- 3.15 *Glicerina.*
3.16 *Soluzione decolorante.* - Miscelare 50 ml di alcool metilico (3.11), 10 ml di acido acetico glaciale (3.12), 10 ml di glicerina (3.15) e 30 ml di acqua.

4. **Apparecchiatura**

- 4.1 *Centrifuga per tubi da 50 ml.*
4.2 *Capsule di Petri di 8 cm di diametro.*
4.3 *Foratappi di 5 mm di diametro.*
4.4 *Contenitore ad atmosfera satura di acqua.*

5. **Procedimento**

- 5.1 *Preparazione del campione.* - In un tubo da centrifuga aggiungere a 5 g di campione 50 ml della soluzione alcoolica (3.1), centrifugare per 20 minuti a 5000 giri, prelevare il supernatante e trasferirlo in un pallone a fondo tondo da 100 ml. Evaporare l'alcool sotto vuoto alla temperatura di 40 °C. Riprendere il residuo con 1 ml della soluzione alcoolica al 50% (3.1).
- 5.2 *Allestimento della piastra.* - Allestire la piastra di gel versando nella capsula di Petri 22 ml della soluzione di agarosio (3.4) precedentemente riscaldata all'ebollizione fino a limpidezza. Dopo solidificazione, incidere con il foratappi 1 pozzetto centrale e 6 pozzetti disposti circolarmente e distanziati tra loro di 1 cm (fig.1). Versare in ogni pozzetto una piccola aliquota dell'agarosio asportato dalla piastra diluita con poche gocce di acqua.
- 5.3 *Determinazione per immunodiffusione.* - Depositare nel pozzetto centrale 25 µl del siero antigliadina (3.8) e in quelli laterali quantità crescenti dell'estratto proteico del campione, corrispondenti a 10, 25 e 50 µl. Sulla stessa piastra depositare 10, 25 e 50 µl della soluzione standard di lavoro (3.7). Lasciar diffondere le soluzioni in ambiente saturo di acqua per almeno 24 ore. In presenza di gliadina, nel punto di incontro delle due soluzioni (siero e campione) si formerà una banda di precipitazione che è possibile evidenziare con una fonte luminosa a luce radente su fondo scuro.
- Lavare la piastra per almeno 48 ore con la soluzione di NaCl (3.9), cambiando la soluzione circa 10 volte. Versare quindi sullo strato di agarosio la soluzione di acido tannico (3.10) e dopo 5-10 minuti sciacquare con acqua. Coprire poi lo strato di agarosio con la soluzione colorante (3.14), attendere 10 minuti e quindi decolorare con la soluzione (3.16) fino ad ottenere delle bande colorate su fondo chiaro.

6. Espressione dei risultati

Le bande di precipitazione, che si possono apprezzare visibilmente dopo la colorazione, permettono di stabilire la presenza o assenza di gliadina nel prodotto con un limite di sensibilità dell'ordine di 7 ppm.

Riferimenti bibliografici

BELLOMONTE, G. BONIGLIA, C. Gluten et maladie coeliaque. *Pharmeuropa* 1992, 4(3): 163-164.

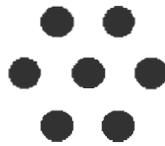


Figura 1. - *Disposizione dei pozzetti sulla piastra di agarosio*

GRASSI ESTRANEI NEL GRASSO DI LATTE

Metodo gascromatografico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile al latte ed ai prodotti lattiero caseari.

2. Metodo

Procedere come indicato nella Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea L 46 dell'1/3/1995 - Regolamento CEE n. 454/95 relativo alle modalità di applicazione degli interventi sul mercato del burro e della crema di latte. Allegati III. Metodo di riferimento per la rilevazione di grassi estranei nel grasso del latte mediante analisi gascromatografica dei trigliceridi.

* Mauro Di Pasquale

IODIO NEL SALE

Metodo titrimetrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo permette la determinazione del contenuto di iodio, aggiunto al sale alimentare sotto forma di ioduro e/o iodato di potassio, a concentrazioni superiori a 2 mg/kg espresso come I⁻.

2. Principio del metodo

Determinazione dello iodio libero, ottenuto in quantità equivalente allo iodato in soluzione previa aggiunta di acido fosforico e ioduro di potassio, mediante titolazione con tiosolfato di sodio in presenza di salda d' amido.

Nel caso di sale alimentare addizionato di ioduro di potassio o di ioduro e di iodato di potassio, la determinazione è effettuata dopo l'ossidazione dello ioduro a iodato con acqua di bromo.

3. Reattivi

- 3.1 *Soluzione di rosso di metile allo 0.05% (m/v).* - In un pallone tarato da 100 ml sciogliere 0.05 g di rosso metile con 75 ml di etanolo al 95 % (v/v) e portare a volume con acqua.
- 3.2 *Acido cloridrico diluito, 0.1 N*
- 3.3 *Acqua di bromo, soluzione satura.* - Preparare al momento dell' impiego
- 3.4 *Acido formico concentrato, soluzione al 90% (m/m) ($d_{20\text{ }^{\circ}\text{C}} = 1.2$ g/ml circa)*
- 3.5 *Acido fosforico concentrato, soluzione allo 85% (m/m) ($d_{20\text{ }^{\circ}\text{C}} = 1.7$ g/ml circa)*
- 3.6 *Ioduro di potassio*
- 3.7 *Salda d'amido, soluzione 0.2% (m/m) circa, preparata di recente.* - La soluzione di salda d' amido può essere preparata per diluizione delle soluzioni stabilizzate reperibili in commercio
- 3.8 *Soluzione titolata di tiosolfato di sodio 0.1 M*
- 3.9 *Soluzione titolata di tiosolfato di sodio 0.01 M.* - Trasferire 25 ml della soluzione 3.8. in un pallone tarato da 250 ml e portare a volume con acqua distillata previamente bollita. Preparare la soluzione al momento dell' uso.

4. Apparecchiatura

* Massimo Baldini

4.1 Bilancia analitica

5. Procedimento

- 5.1. *Determinazione dello iodio aggiunto come ioduro di potassio, da solo o in miscela con iodato di potassio.*
- 5.1.1 Pesare 50 g di campione con la precisione di 0.01 g e scioglierli con 175 ml di acqua in una beuta da 500 ml.
- 5.1.2 Aggiungere (operare sotto cappa durante le fasi di aggiunta dell' acqua di bromo; riscaldamento e aggiunta dell' acido formico) nell' ordine: 4 gocce della soluzione di rosso metile (3.1), acido cloridrico diluito 0.1 N (3.2) sino al primo viraggio dal colore giallo al rosso-arancio e, immediatamente, 1.5 ml di acqua di bromo (3.3). Attendere 3 minuti. Riscaldare sino ad incipiente ebollizione e mantenerla per 5 minuti, agitando lentamente per evitare la cristallizzazione del cloruro di sodio. Aggiungere palline di vetro per evitare ebollizione violenta e perdite per eventuali proiezioni; dopo 1 minuto dal termine del riscaldamento, aggiungere, lentamente e con cautela, 1.0 ml di acido formico (3.4) avendo cura di bagnare completamente la parete interna della beuta. Agitare, lasciare in riposo per 1 minuto e quindi raffreddare a temperatura ambiente.
- 5.1.3 Aggiungere 1.0 ml di acido fosforico (3.5) e 0.1 ml di ioduro di potassio (3.6). Agitare e lasciare in riposo per 5 minuti esatti in un luogo al riparo dalla luce, dopo aver coperto la beuta con un vetro d' orologio. Aggiungere 1.0 ml di salda d' amido (3.7) e titolare con la soluzione di tiosolfato di sodio 0.01 M (3.9), facendola scolare goccia a goccia con ritmo regolare e agitando dopo ogni aggiunta, sino al viraggio definitivo (la soluzione deve rimanere incolore per almeno 30 secondi).
- 5.1.4 Eseguire parallelamente una prova in bianco utilizzando la stessa acqua, seguendo lo stesso procedimento ed impiegando la stessa quantità di reattivi.
- 5.2 *Determinazione dello iodio aggiunto come iodato di potassio.* - Procedere come descritto in (5.1.1), (5.1.3) e (5.1.4)

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di iodio del campione, espresso in milligrammi di I^- , per chilogrammo di sale alimentare, è calcolato in base alla seguente formula:

$$I^- (mg / kg) = (V_1 - V_2) \frac{0.2115}{m} \times 1000$$

dove:

V_1 = volume, in ml, della soluzione di tiosolfato di sodio impiegato per la titolazione della soluzione da analizzare

- V_2 = volume, in ml, della soluzione di tiosolfato di sodio impiegato per la titolazione della prova in bianco
- m = massa, in grammi, del campione usata per la preparazione della soluzione da analizzare
- 0.2115 = massa, in milligrammi, di I^- corrispondente a 1 ml della soluzione di tiosolfato (3.9.)

NITRATI NELLE ACQUE MINERALI

Metodo spettrofotometrico diretto*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque minerali naturali.
In alternativa è utilizzabile il metodo per cromatografia ionica.

2. Principio del metodo

Il metodo è basato sulla misura dell'assorbimento degli ioni nitrato all'UV a 220 nm. Poiché anche eventuali sostanze organiche disciolte possono assorbire a tale lunghezza d'onda mentre i nitrati non assorbono a 275 nm, una seconda misurazione a 275 nm è usata per correggere il valore relativo ai nitrati. Questo metodo non è raccomandato per le acque che richiedano una correzione significativa per l'assorbimento dovuto alle sostanze organiche (vedi punto 5.3).

3. Reattivi

Per la preparazione delle soluzioni utilizzare acqua bidistillata o distillata e deionizzata.

- 3.1 *Soluzione madre di nitrato di sodio* (100 mg/l NO_3^-). - Solubilizzare con acqua 0.1371 g di nitrato di sodio, essiccato a 105 °C per 24 ore, e portare a volume a 1000 ml.
- 3.2 *Soluzione standard di nitrato di sodio* (10 mg/l NO_3^-). - Diluire 10 ml della soluzione madre (3.1) a 100 ml con acqua
- 3.3 *Acido cloridrico 1 N*

4. Apparecchiatura

- 4.1 *Spettrofotometro*
- 4.2 *Filtri a membrana da 0.45 μm*
- 4.3 *Bilancia analitica*

* Maurizio Mosca

5. Procedimento

- 5.1 *Preparazione del campione.* - A 50 ml di campione filtrato (4.2), diluito se necessario, aggiungere 1 ml di acido cloridrico (3.3) e mescolare accuratamente. Preparare parallelamente un bianco addizionando 1 ml di acido cloridrico a 50 ml di acqua.
- 5.2 *Allestimento della curva di taratura.* - Preparare a partire dalla soluzione standard di nitrato di sodio (3.2), 3-5 soluzioni standard di lavoro con una concentrazione compresa tra 1 e 10 mg/l di NO_3^- . Prelevare 50 ml e trattare in modo analogo al campione (5.1).
- 5.3 *Determinazione spettrofotometrica.* - Effettuare le letture a 220 nm contro bianco per ottenere i valori relativi al nitrato e a 275 nm per determinare le interferenze dovute alla materia organica disciolta.
Sottrarre il doppio dell'assorbanza letta a 275 nm dalla lettura effettuata a 220 nm per ottenere l'assorbanza relativa al nitrato.
Se il valore di correzione supera il 10% della lettura a 220 nm, non usare questo metodo.
Allestire la curva di taratura riportando le assorbanze in funzione della concentrazione di ione nitrato espressa in mg/l NO_3^- .

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di ione nitrato del campione, espresso in mg/l di NO_3^- è ricavato dalla curva di taratura tenendo conto delle eventuali operazioni di diluizione.

Riferimenti bibliografici

418 A Ultraviolet Spectrophotometric Screening Method In: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 16. Ed. American Public Health Association, Port City Press, Baltimore, 1985, 392-393.

NITRITI NELLE ACQUE MINERALI

Metodo spettrofotometrico*

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque minerali naturali.
In alternativa è utilizzabile il metodo per cromatografia ionica.

2. Principio del metodo

Il metodo è basato sulla diazotazione dell'acido solfanilico (acido p-amino-benzensolfonico) con lo ione nitrito per formare acido p-diazo-benzensolfonico. Questo acido reagendo con l'1-naftilammina, forma l'azonaftilammina dell'acido p-benzensolfonico di colore rosso-viola.

Il metodo è adatto per la determinazione degli ioni nitrito presenti in concentrazioni comprese tra 0.005 e 0.5 mg/l

3. Reattivi

Per la preparazione delle soluzioni utilizzare acqua bidistillata o distillata e deionizzata.

- 3.1 *Acido acetico glaciale* (d. 1.05 g/ml)
- 3.2 *Soluzione di acido solfanilico*. - Scaldare 1 g di acido solfanilico con 50 ml di acido acetico glaciale (3.1) e 50 ml di acqua e solubilizzare diluendo con 200 ml di acqua calda. Conservare in recipiente di vetro scuro a +4 °C.
- 3.3 *Soluzione di 1-naftilammina*. - Solubilizzare 0.2 g di 1-naftilammina in 50 ml di acido acetico e 100 ml di acqua, quindi diluire con altri 150 ml di acqua.
- 3.6 *Soluzione madre di nitrito di sodio* (100 mg/l NO_2^-). - Solubilizzare in acqua 0.150 g di nitrito di sodio, precedentemente essiccato a 105 °C per 1 ora, e portare a volume a 1000 ml. Standardizzare la soluzione utilizzando una soluzione di permanganato di potassio 0.05 N e controllare il titolo settimanalmente (7.2).
- 3.7 *Soluzione standard di nitrito di sodio 1* (10 mg/l NO_2^-). - Diluire 10 ml della soluzione madre (3.6) in un matraccio tarato da 100 ml con acqua. Preparare al momento dell'uso.
- 3.8 *Soluzione standard di nitrito di sodio 2* (1 mg/l NO_2^-). - Diluire 10 ml della soluzione madre (3.6) in un matraccio tarato da 1000 ml con acqua. Preparare al momento dell'uso.

* Maurizio Mosca

4. Apparecchiatura

4.1 *Bilancia analitica*

4.2 *Spettrofotometro*

5. Procedimento

5.1 *Determinazione colorimetrica.* - A 100 ml di campione aggiungere 4 ml di una miscela in parti uguali della soluzione di acido solfanilico (3.2) e di quella di 1-naftilammina (3.3) e mescolare accuratamente. Preparare parallelamente un bianco reattivi utilizzando acqua al posto del campione.

Lasciare a riposo per 2 ore al buio e misurare l'estinzione a 530 nm contro bianco.

Per concentrazioni di NO_2^- comprese tra 0.005 e 0.02 mg/l effettuare le letture utilizzando cuvette di cammino ottico da 5 cm, per concentrazioni comprese tra 0.02 e 0.5 mg/l utilizzare cuvette da 1 cm.

5.2 *Allestimento della curva di taratura.* - Preparare a partire dalle soluzioni standard 1 (3.7) e 2 (3.8), 3-5 soluzioni di lavoro con concentrazione di NO_2^- compresa tra 0.005 e 0.02 mg/l o tra 0.02 e 0.5 mg/l in funzione del contenuto presunto di ione nitrito nel campione. Prelevare 100 ml e trattare in modo analogo al campione (5.1).

Allestire la curva di taratura riportando i valori dell'assorbanza in funzione delle concentrazioni di NO_2^- espresse in mg/l.

6. Espressione dei risultati

Il contenuto di ione nitrito del campione, espresso come mg/l di NO_2^- , è ricavato direttamente dalla curva di taratura.

Riferimenti bibliografici

Nitrite. Spectrophotometric analysis with sulphanilic acid and 1-naphthyl-amine. In *Water analysis*, Fresenius W., Quentin K.E. and Schneider W. (Eds.), Springer Verlag, Berlin 1988, 26-229.

419 Nitrogen (nitrite). In *Standard Methods for the examination of Water and Wastewater*, 16th Ed., American Public Health Association, Port City Press, Baltimore, 1985, 404-406.

ALLEGATO I**ELENCO DELLE RACCOLTE DI METODI UFFICIALI****1. Oli di oliva e di sansa d'oliva**

Regolamento CEE n° 2568/91 della Commissione dell' 11/07/1991 relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e di sansa d' oliva nonchè ai metodi ad essi attinenti. Gazzetta Ufficiale CEE L 248 del 05/09/1991.

Regolamento CEE n° 183/93 della Commissione del 29/01/1993 (allegato IV) caratteristiche degli oli d'oliva

- Acidità
- Numero di perossidi
- Contenuto di cere mediante gascromatografia con colonna capillare
- Composizione e contenuto di steroli mediante gascromatografia con colonna capillare
- Eritrodiole e uvaolo
- Acidi grassi in posizione 2 nel trigliceride
- Trilinoleina
- Analisi spettrofotometrica nell' ultravioletto
- Analisi gascromatografica degli esteri metilici degli acidi grassi. Preparazione degli esteri metilici di acidi grassi
- Tenore dei solventi alogenati
- Valutazione organolettica dell' olio di oliva vergine
- Prova della raffinazione
- Tenore in olio di oliva delle sanse
- Numero di iodio

2. Formaggi

Approvazione dei metodi ufficiali d' analisi per i formaggi. Gazzetta Ufficiale Supplemento al n. 229 del 02/10/1986.

- Prelievo e preparazione dei campioni
- Materia secca nel formaggio
- Materia secca nella ricotta
- Materia grassa nel formaggio
- Materia grassa nella ricotta
- Sostanze azotate totali
- Sostanze azotate solubili a pH 4.6
- Sostanze azotate solubili in acqua
- Lattosio
- Ceneri
- Alcalinità delle ceneri
- Calcio
- Cloruri
- Fosforo
- Emulsionanti fosfatici
- Citrati

- Emulsionanti a base di citrati
- Acidità titolabile
- Acido L - lattico
- Acido D - lattico
- pH
- Sodio
- Potassio
- Nitrati
- Nitriti
- Fosfatasi
- Riconoscimento del latte vaccino nei formaggi di pecora

3. Latte crudo e latte trattato termicamente

Attuazione della decisione n° 91/180/CEE concernente la fissazione di metodi di analisi e prova relativi al latte crudo e al latte trattato termicamente. Gazzetta Ufficiale Supplemento al n. 90 del 16/04/1992.

- Disposizioni generali
- Campionamento del latte crudo e del latte trattato termicamente
- Punto di congelamento
- Attività fosfatase
- Attività perossidase
- Numerazione dei microrganismi - Conteggio in piastra a 30 °C
- Numerazione dei microrganismi - Conteggio in piastra a 21 °C
- Numerazione dei coliformi - Conteggio delle colonie a 30 °C
- Numerazione delle cellule somatiche
- Antibiotici e sulfamidici
- Tenore liposaccaride batterico - Saggio LPS

4. Cereali e derivati

Approvazione dei metodi ufficiali d'analisi dei cereali e derivati. Gazzetta Ufficiale Supplemento n.4 al n. 186 del 10/08/1994.

- Sostanze azotate nei cereali e derivati
- Glutine secco nel grano e negli sfarinati - Metodo manuale
- Glutine secco negli sfarinati - Metodo meccanico
- Sostanze grasse totali - Metodo per idrolisi acida
- Steroli nelle paste alimentari preparate con aggiunta di uova
- Fibra alimentare totale nei cereali e derivati
- Acido ascorbico (vitamina C) nelle farine
- Impurità solide negli sfarinati e nei prodotti di trasformazione (Filt-Test)
- Modello del certificato d'analisi per la determinazione delle impurità solide
- Difetti del riso semigreggio o lavorato

5. Conserve vegetali

Approvazione dei metodi ufficiali di analisi per le conserve vegetali. Gazzetta Ufficiale n. 168 del 20/07/1989

- Esame microscopico ed organico della merce
- Esame microscopico
- Peso netto
- Peso del prodotto sgocciolato

- Solidi totali o sostanza secca
- Umidità
- Umidità nei prodotti disidratati
- Residuo secco solubile per via refrattometrica (residuo ottico)
- Solidi insolubili in acqua
- Solidi solubili in acqua
- Peso specifico
- A) metodo del picnometro
- B) metodo della bilancia idrostatica
- C) metodo della bilancia di Westphal
- D) metodo del densimetro
- Impurità minerali
- Ceneri
- Alcalinità delle ceneri
- Acidità totale
- Acidità volatile
- pH (concentrazione idrogenionica)
- Zuccheri
- A) dosaggio degli zuccheri riduttori (metodo di Luff-Schoorl)
- B) dosaggio degli zuccheri riduttori (metodo volumetrico Fehling)
- C) dosaggio del saccarosio
- C1) metodo volumetrico Fehling
- C2) metodo polarimetrico
- D) dosaggio del lattosio in presenza di altri zuccheri riduttori
- E) determinazione dei mono e disaccaridi mediante HPLC
- Ricerca della saccarina
- A) saggio organolettico
- B) trasformazione in acido salicilico
- Saccarina
- Ciclammati
- Ciclammati di sodio e di calcio
- Aspartame mediante HPLC
- Presenza di coloranti artificiali
- Coloranti naturali
- A) ricerca ed identificazione dei coloranti naturali idrosolubili
- B) ricerca ed identificazione dei coloranti naturali liposolubili
- Ricerca globale di alcuni conservanti
- Acidi benzoico e sorbico mediante HPLC (in assenza di p-drossibenzoato)
- Esteri dell' acido p-idrossibenzoico mediante HPLC
- Anidride solforosa
- A) determinazione dell' anidride solforosa per distillazione
- B) determinazione dell' anidride solforosa per via calorimetrica
- Nisina per diffusione in agar
- Pectina
- Cloruro di sodio
- Metalli
- Altre determinazioni

6. Mosti, vini, agri di vino (aceti) e sottoprodotti della vinificazione

Approvazione dei metodi ufficiali di analisi per i mosti, i vini, gli agri di vino (aceti) e i sottoprodotti della vinificazione. Gazzetta Ufficiale n.161 del 14/07/1986.

- 6.1 *Mosti e vini*
- Considerazioni generali
 - Esame organolettico
 - Esame microscopico
 - Saggio di stabilità
 - Potere rotatorio
 - Glucosio
 - Fruttosio
 - Pentosi e pentosani
 - Mannitolo e sorbitolo
 - Sorbitolo
 - Glicerolo e 2,3 butandiolo
 - Acido malico
 - Acido L(—) malico
 - Acido lattico
 - Acido L(+) lattico e D(—) lattico
 - Acido succinico
 - Solfati
 - Cloruri
 - Fosfati
 - Nitrati
 - Borati
 - Acido etilendiamminotetracetico e suoi sali
 - Acido metatartarico
 - Basi piridiniche
 - Azoto totale
 - Azoto ammoniacale
 - Azoto amminico
 - Prolina
 - Litio
 - Calcio
 - Magnesio
 - Zinco
 - Piombo
 - Sostanze fenoliche totali
 - Diglucoside malvosidico
 - Caratteristiche cromatiche
 - Materie coloranti estranee
 - Caramello
 - Edulcoranti sintetici
 - Pressione afrometrica
 - Radiocarbonio
 - Antifermentativi
 - Acido deidroacetico
 - Derivati monoalogenati dell' acido acetico
 - Acidi alogenocarbossilici
 - Cloro organico
 - Bromo
 - Iodio
 - Fluoro
 - Dietilcarbonato
 - Acido azotidrico

- Cloropicrina
- Metanolo
- 6.2 *Agri di vino (aceti)*
 - Esame organolettico
 - Acidità totale
 - Acidità fissa
 - Acidità volatile
 - Titolo alcolometrico volumetrico
 - Estratto secco totale
 - Aldeide acetica
 - Acetilmetilcarbinolo
 - Indice di iodio
- 6.3 *Sottoprodotti della vinificazione*
 - Umidità
 - Titolo alcolometrico
 - Zuccheri riduttori
 - Acido tartarico nelle vinacce
 - Acido tartarico nelle fecce

7. Birre

Metodi ufficiali di analisi della birra. Gazzetta Ufficiale n. 105 del 28/04/1971.

- Esame organolettico
- Limpidità: determinazione del grado di torbidità
- Peso specifico
- Grado alcolico
- Estratto
- Grado saccarometrico
- Acidità totale
- Acidità volatile
- Ceneri e loro alcalinità
- Anidride carbonica
- Anidride solforosa
- Acido l-ascorbico

8. Miele

Metodi ufficiali di analisi per il controllo delle caratteristiche di composizione del miele.

Gazzetta Ufficiale n 282 del 12/10/1984

- Contenuto apparente di zuccheri riducenti
- Saccarosio apparente
- Acqua
- Sostanze insolubili in acqua
- Ceneri
- Acidità
- Indice diastatico
- Idrossimetilfurfurale

*Direttore reggente dell'Istituto Superiore di Sanità
e Responsabile scientifico: Aurelia Sargentini*

Direttore responsabile: Vilma Alberani

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, dicembre 1996 (n. 4) 1° Suppl.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*