

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:

Gascromatografo per colonne capillari fornito di rilevatore 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. Della 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 sovranatante, il filtrato ottenuto é 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 é 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 introdurla 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 µl 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 µl 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, Il 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 è 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 *Gas Cromatografo 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:

$$MG \text{ (g / 100 g)} = \frac{Area_{tot}}{Area_{st}} \times St \times F_1 \times 2,5$$

$$DG \text{ (g / 100 g)} = \frac{Area_{tot}}{Area_{st}} \times St \times F_2 \times 2,5$$

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 di 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 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 si 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

$$\text{Polifosfati aggiunti (mg / 100 g o 100 ml)} = \text{Anidride fosforica in eccesso} \times 1.42$$

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.