

Metodi generali per test ed analisi dei prodotti alimentari

Soluzioni per analisi strumentali in AAS, GC, HPLC, ICP, KF e TLC
secondo i metodi ufficiali
2016-1



Indice

Indice delle applicazioni	3
Introduzione	4-7
- Definizione di alimenti e bevande (assunzione di energia attraverso l'introduzione di liquidi e solidi)	4
- Latte	5
- Carne	6
- Analisi degli alimenti	6-7
Metodi strumentali ufficiali	8-42
Tecniche strumentali dei metodi ufficiali	43-69
Informazioni legislative	70-79

Indice delle applicazioni

Matrice/campione	Parametro	Tecnica	Norma	
Determinazione del pH in carni e prodotti a base di carne				
Carne (lonza di maiale)	pH	pHmetro/ non distruttiva	ISO 2917:1999	
Carne (salsicce)	pH	pHmetro/ distruttiva	ISO 2917:1999	
Determinazione del pH in frutta e verdura				
Succo di mela	pH	pHmetro	ISO 1842:1991	
Succo d'arancia	pH	pHmetro	ISO 1842:1991	
Marmellata di albicocche	pH	pHmetro	ISO 1842:1991	
Marmellata di carote	pH	pHmetro	ISO 1842:1991	
Contenuto di cloruri in carni e prodotti a base di carne				
Carne e prodotti a base di carne	Cloruri	Titolazione	ISO 1841-1:1996	
Esteri metilici di acidi grassi (FAME) in campioni di olio				
Olio di girasole	FAME*	GC con FID	EN ISO 12966-2:2011 EN ISO 12966-4:2015	* Esteri metilici di acidi grassi (FAME)
Determinazione del piombo e del cadmio nel pesce				
Pesce	Cadmio, piombo	AAS/GFAAS	EN 14084:2003	
Determinazione del deossinivalenolo (DON)				
Grano	DON**	HPLC	EN 15791:2009	**Deossinivalenolo
Contenuto salino in carni e prodotti a base di carne con diversi metodi				
Salumi	Sodio	AAS	EN 15505:2008	
Salumi	Cloruri	Titolazione	ISO 1841-1:1996	
Salame	Sodio	AAS	EN 15505:2008	
Salame	Cloruri	Titolazione	ISO 1841-1:1996	
Determinazione del contenuto di acqua in campioni di olio				
Olio	Acqua	Titolazione KF/ coulometria	DIN EN ISO 8534:2009	
Determinazione di elementi in tracce negli alimenti				
Carne (manzo)	Elementi in tracce***	ICP-OES	EN 13805:2002	***Fe, Mg, Ca, Na, K
Carne (pollo)	Elementi in tracce***	ICP-OES	EN 13805:2002	***Fe, Mg, Ca, Na, K
Latte	Elementi in tracce***	ICP-OES	EN 13805:2002	***Fe, Mg, Ca, Na, K
Determinazione dei pesticidi				
Pomodoro	Pesticidi	LC-MS/MS	EN 15662:2009	

Introduzione

Questa raccolta si occupa delle analisi alimentari regolamentate. Essa propone soluzioni esaurienti per le analisi strumentali regolamentate, concentrandosi su metodi generali per l'esame e l'analisi dei prodotti alimentari. Tutti i metodi evidenziati soddisfano le norme internazionali:

ISO (International Organization for Standardization)

<http://www.iso.org/iso/home.html>

DIN (Deutsches Institut für Normung)

<http://www.din.de/en>

CEN (standard europei emanati dal Comitato Europeo per la Normalizzazione)

<https://www.cen.eu/>

Per potersi occupare di analisi alimentari regolamentate, non si può prescindere dal conoscere il significato del termine "alimento", con cui si intende qualunque sostanza che venga consumata per il suo apporto nutrizionale. Il cibo contiene i principi nutritivi essenziali come grassi, proteine, vitamine e minerali.

Gli alimenti sono solitamente di origine animale o vegetale, ma anche alcuni funghi sono commestibili. Per la preparazione di alimenti fermentati e sott'aceto (pane lievitato, formaggio, ecc.) si utilizzano anche funghi e batteri ambientali. Alcune sostanze inorganiche, come il sale o il bicarbonato, vengono utilizzate per conservare o modificare chimicamente un ingrediente, cioè sono usati come additivi alimentari.

Il termine bevande indica i liquidi da bere, tra cui tè, caffè, liquori, birra, succhi o bibite analcoliche; l'acqua è generalmente esclusa. Per quanto riguarda le bibite analcoliche, le tipologie più importanti sono: bevande aromatizzate pronte (praticamente sempre gassate), bevande pronte contenenti frutta o succhi di frutta e bevande da diluire per il consumo.

Quindi gli alimenti possono essere in forma solida (frutta, carne, verdura, o anche liquidi congelati, in altri termini gelati) e liquida (bevande).

- Le bevande energetiche sono alimenti o integratori alimentari?
- Che differenza c'è tra una bevanda e un integratore alimentare?
- Quando un gelato diventa una bevanda e quando è un alimento?

È pertanto legittimo chiedersi perché differenziare tra alimenti e bevande se nello stesso tempo si usa l'abbreviazione F&B per definire il settore specializzato nella distribuzione di cibo.

Latte

Il latte è un liquido prodotto dalle ghiandole mammarie delle femmine di mammifero. Il latte può essere modificato separando parte del suo grasso o per aggiunta di crema di latte, latte concentrato, latte intero in polvere, latte scremato, latte concentrato scremato o latte scremato in polvere. Il latte può essere omogeneizzato.

Il Codex Alimentarius fornisce le seguenti definizioni:

1. Il latte è il prodotto della secrezione mammaria normale di animali da latte ottenuto mediante una o più mungiture, senza alcuna aggiunta o sottrazione, destinato al consumo diretto o ad ulteriori trasformazioni.
2. Un prodotto lattiero-caseario è un prodotto ottenuto per trattamento del latte e può contenere additivi alimentari ed altri ingredienti necessari alla sua produzione.
3. Un prodotto composto di latte è un prodotto nel quale il latte, prodotti lattiero-caseari o costituenti del latte rappresentano in termini quantitativi una parte essenziale del prodotto finito destinato al consumo, purché i costituenti non derivati dal latte non siano destinati a sostituire in parte o per intero qualche componente del latte.
4. Un prodotto di latte ricostituito è un prodotto derivante dall'aggiunta di acqua al prodotto in polvere o in forma concentrata, nella quantità necessaria a ricostituire l'appropriato rapporto acqua : solidi.
5. Un prodotto di latte ricombinato è un prodotto risultante dalla combinazione del grasso del latte e dei componenti solidi non grassi del latte nelle loro forme conservate, con o senza l'aggiunta di acqua per raggiungere l'appropriata composizione del prodotto lattiero-caseario.
6. Termini relativi al latte sono i nomi, le designazioni, i simboli, le immagini o altro che fanno riferimento o evocano, direttamente o indirettamente, il latte o i prodotti lattiero-caseari.

Solo un alimento che soddisfa la definizione al punto 1 può essere chiamato "latte". Se esso viene venduto tal quale, deve essere chiamato "latte crudo" o con un altro termine appropriato che non induca in inganno o in confusione il consumatore. Il latte la cui composizione è stata modificata per arricchimento e/o impoverimento di suoi componenti può essere identificato con una denominazione che contiene il termine "latte", purché contestualmente a tale denominazione si fornisca una chiara descrizione della trasformazione cui il latte è stato sottoposto.

L'India è il maggior produttore mondiale di latte; la Nuova Zelanda, gli stati membri dell'Unione Europea, l'Australia e gli Stati Uniti sono i maggiori esportatori di latte e di prodotti lattiero-caseari. Cina e Russia sono i maggiori importatori mondiali di latte e di prodotti lattiero-caseari.

Carne

Si definisce carne la polpa edibile di un animale, normalmente un mammifero o un uccello. La polpa dei volatili domestici viene talvolta definita pollame.

In gastronomia, si definisce carne rossa quella che è rossa da cruda e non diventa chiara una volta cotta, e carne bianca quella che è chiara sia prima che dopo la cottura.

Per la scienza, si definisce carne rossa quella che contiene più mioglobina della carne bianca, dove per carne bianca si intende quella non scura proveniente dal pollo (zampe e cosce escluse) o dal pesce.

Il maiale, per esempio, è carne rossa se si considera la definizione nutrizionale, bianca secondo quella gastronomica. *Ciò può causare confusione.*

Analisi degli alimenti

L'analisi strumentale è l'argomento principale di questa raccolta, ma nella prossima pagina troverà una panoramica che fornisce una prospettiva più ampia dell'analisi degli alimenti, con riferimenti anche al biomonitoraggio e ai test rapidi. Desideriamo, infatti, incoraggiarla a prendere in esame l'intero processo. Ciò praticamente significa che un prodotto commerciale di carne processata (per esempio una salsiccia) è influenzata non solo dal processo produttivo, ma già dal terreno dove è cresciuto il mangime di cui si è cibato il bestiame. Quindi, l'analisi degli alimenti non si limita all'analisi strumentale dei prodotti finiti. Si potrebbe, per esempio, affermare che anche l'analisi ambientale (cioè, qualità del suolo e dell'acqua, monitoraggio dell'aria, ecc.) ha a che fare con quella degli alimenti.

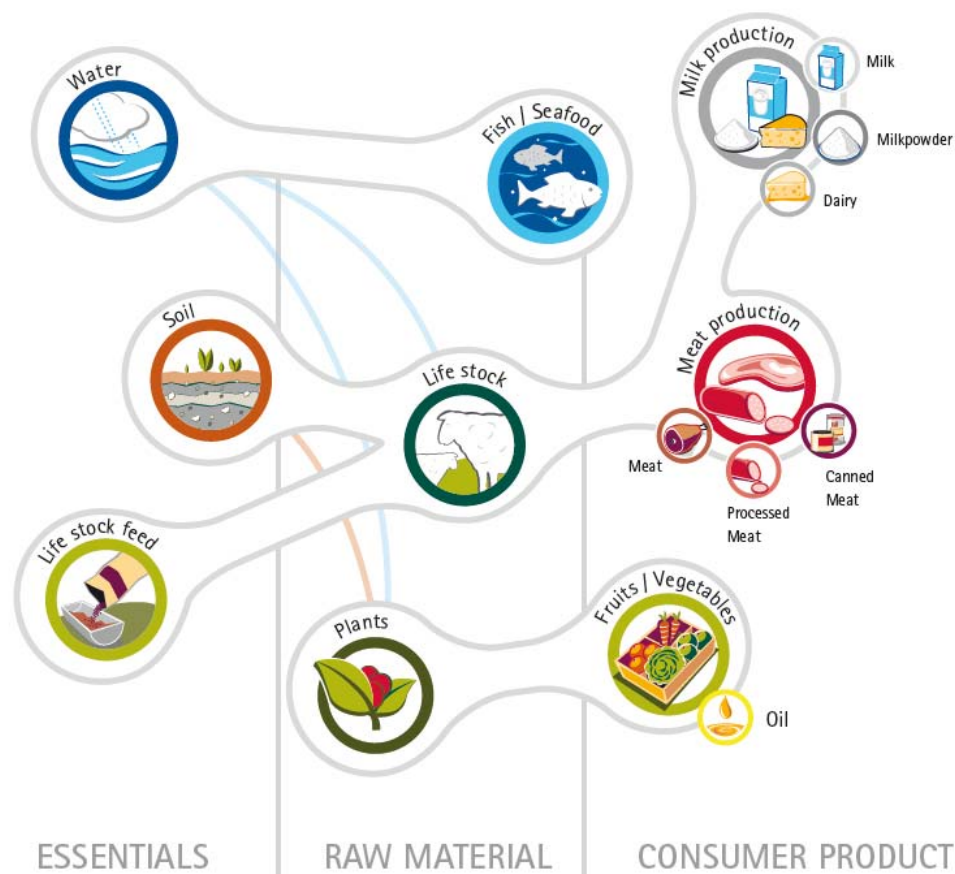
Nelle pagine che seguono troverà metodi di HPLC e UHPLC per la ricerca di tossine e pesticidi (rilevazione in MS), titolazione Karl Fischer (KF) per la determinazione dell'acqua, di spettroscopia di assorbimento atomico (AAS) e di plasma ad accoppiamento induttivo (ICP) per la determinazione del contenuto di metalli, GC per gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) e diversi esempi di titolazioni classiche.

Capitoli a parte sono dedicati alla panoramica delle diverse tecniche analitiche utilizzate e alla presentazione dei requisiti normativi aggiornati e delle diverse legislazioni in materia alimentare.

Esclusione di responsabilità:

"Merck fornisce ai suoi Clienti informazioni e consigli su tecnologie applicative e questioni legislative al meglio delle nostre conoscenze e competenze, ma senza alcun obbligo o responsabilità. È dovere dei nostri Clienti osservare in ogni caso norme e regolamenti in vigore. Ciò si riferisce anche ai diritti di terzi. Informazioni e consigli da noi forniti non sollevano i nostri Clienti dalla responsabilità di verificare l'idoneità dei nostri prodotti per lo scopo previsto. Apura®, Certipur®, Titripur®, Lichropur®, Lichrosolv®, Purospher® e Suprapur® sono tutti marchi di Merck KGaA, Darmstadt, Germania."

L'analisi degli alimenti a colpo d'occhio



Tipo di analisi	Acqua	Terreno	Mangimi	Bestiame/ verdura	Processo produttivo	Prodotti finiti
Test rapidi	Analisi delle acque reflue: COD N sotto diverse forme	Nitrati, fosforo, zolfo		Acido ascorbico, zuccheri, controllo della disinfezione, nitrati, zolfo	Acido ascorbico, zuccheri, controllo della disinfezione	Acido lattico nel latte, pH nella carne, idrossimetilfurfurale nel miele
Strumentale	pH, elementi in tracce, pesticidi	Elementi in tracce, pesticidi	Antibiotici	Pesticidi, tossine		Metalli pesanti, pesticidi, antibiotici, tossine, contenuto d'acqua, contenuto salino
Microbiologica	Solo per le acque potabili e di processo: E. Coli e coliformi		Microrganismi patogeni e responsabili del deterioramento, quali Salmonella, Listeria, E. coli patogeno, Clostridia, Enterobacteriaceae, lieviti e muffe, Aspergillus		Monitoraggio ambientale: campionamento dell'aria, monitoraggio delle superfici con piastre e lastrine da contatto, ricerca dell'ATP	Microrganismi patogeni e responsabili del deterioramento, quali Salmonella, Listeria, E. coli patogeno, Clostridia, Enterobacteriaceae, lieviti e muffe, Aspergillus

*La tabella elenca alcuni esempi tipici

Determinazione del pH in carni e prodotti di carne

ISO 2917:1999

Il metodo si basa sulla misurazione di una differenza di potenziale tra un elettrodo a vetro e un elettrodo di riferimento introdotti in un estratto del campione di carne o del prodotto di carne.

Viste le diverse tipologie di campione, si utilizzano due procedure:

1. metodo non distruttivo per la determinazione nella lonza di maiale
2. metodo distruttivo per la determinazione nelle salsicce fermentate

Reagenti (*utilizzare solo gradi analitici riconosciuti, a meno che diversamente specificato*).

L'acqua deve soddisfare almeno i requisiti del grado 3, conformemente a quanto stabilito dalla norma ISO 3696).

La norma spiega come preparare le soluzioni tampone, ma noi offriamo soluzioni pronte all'uso. Le seguenti soluzioni Certipur® sono disponibili anche con le specifiche definite a 20°C.

Soluzioni tampone

1. Acido citrico – idrossido di sodio – acido cloridrico
tracciabile agli standard di riferimento NIST e PTB a pH 4,00 (25°C) Certipur® (1.09445)
2. Fosfato di potassio monobasico – fosfato di sodio bibasico
tracciabile agli standard di riferimento NIST e PTB a pH 7,00 (25°C) Certipur® (1.09407)
3. Acido bórico – cloruro di potassio – idrossido di sodio
(tracciabile agli standard di riferimento NIST e PTB a pH 9,00 (25°C) Certipur® (1.09408)

Soluzione di idrossido di sodio

c(NaOH) = 1 mol/l (1 N) Titripur® Reag. Farm. Eu. Reag. USP (1.09137)

Lavaggio

Etanolo; 96% EMSURE® Reag. Farm. Eu. (1.59010)

Dietiletere; EMSURE® ACS, ISO, Reag. Farm. Eu. (1.00921)

Attrezzatura

- Tritatutto rotante ad alta velocità, capace di omogeneizzare il campione (non oltre i 4,0 mm di diametro)
- pH-metro con accuratezza pari a 0,01 unità pH
- Elettrodo combinato (in cui l'elettrodo indicatore e quello di riferimento sono uniti in un unico elemento)
- Omogeneizzatore ad asta (capace di operare ad una frequenza di rotazione di 20.000 giri min⁻¹)
- Agitatore magnetico

Determinazione del pH in carni e prodotti di carne

ISO 2917:1999

Il **campionamento** non è descritto in questa norma, ma un metodo viene consigliato nella norma ISO 3100-1. È importante disporre di campioni rappresentativi e si suggerisce di cominciare con almeno 200 grammi.

Calibrazione del pH-metro

Calibrare il pH-metro secondo le istruzioni del produttore con almeno due soluzioni tampone, tenendole in agitazione con l'agitatore magnetico. Se il pH-metro non prevede un sistema per la correzione della temperatura, è necessario mantenere la temperatura delle soluzioni tampone nell'intervallo 20 ± 2 °C.

Metodo non distruttivo

Perforare il campione con un coltello o una punta acuminata ed introdurre l'elettrodo. Se il pH-metro non prevede un sistema per la correzione della temperatura, è necessario mantenere la temperatura del campione nell'intervallo 20 ± 2 °C.

Per le misurazioni non distruttive, utilizzare un elettrodo a punta. Scegliere un punto del campione rappresentativo. Se si pensa che possa essere utile conoscere le differenze di pH misurate in diversi punti del campione, ripetere la determinazione in vari punti.

Metodo distruttivo

Omogeneizzare il campione di laboratorio. Fare attenzione che la temperatura del campione non superi i 25 °C. Omogeneizzare un certo peso del campione preparato in un eccesso di soluzione di cloruro di potassio (10 volte tanto) per mezzo dell'omogeneizzatore ad asta. Introdurre gli elettrodi nell'estratto del campione e impostare il sistema per la correzione della temperatura del pH-metro sulla temperatura dell'estratto. Se il pH-metro non prevede un sistema per la correzione della temperatura, è necessario mantenere la temperatura del campione nell'intervallo 20 ± 2 °C. Misurare il pH mantenendo l'agitazione con l'agitatore magnetico. Una volta raggiunto un valore costante, leggere il pH direttamente dallo strumento.

Suggerimenti

Riempire con il campione omogeneizzato un contenitore ermetico. Si raccomanda di analizzare il campione al più presto, ma comunque entro 24 ore dall'omogeneizzazione. Annotare l'ora esatta della determinazione del pH. Con la carne fresca, generalmente conservata ad una temperatura tra 0 e 5°C, è necessario usare un sistema con la correzione della temperatura.

Risultati (arrotondare il risultato alle 0,05 unità di pH più vicine).

Lonza di maiale: 5,80; 5,75; 5,90

Salsiccia fermentata: 4,95; 5,00; 4,95

Determinazione del pH in frutta e verdura

ISO 1842:1991

Il metodo si basa sulla misurazione di una differenza di potenziale tra due elettrodi immersi nel liquido in esame.

Reagenti *(utilizzare solo gradi analitici riconosciuti, a meno che diversamente specificato). L'acqua deve soddisfare almeno i requisiti del grado 3, conformemente a quanto stabilito dalla norma ISO 3696)*

La norma spiega come preparare le soluzioni tampone, ma noi offriamo soluzioni pronte all'uso.

Le seguenti soluzioni Certipur® sono disponibili anche con le specifiche definite a 20°C.

Soluzioni tampone

1. Acido citrico – idrossido di sodio – acido cloridrico
tracciabile agli standard di riferimento NIST e PTB a pH 4,00 (25°C) Certipur® (1.09445)
2. Fosfato di potassio monobasico – fosfato di sodio bibasico
tracciabile agli standard di riferimento NIST e PTB a pH 7,00 (25°C) Certipur® (1.09407)
3. Acido borico – cloruro di potassio – idrossido di sodio
(tracciabile agli standard di riferimento NIST e PTB a pH 9,00 (25°C) Certipur® (1.09408)

Attrezzatura

- pH-metro con accuratezza pari a 0,01 unità pH
- Elettrodo combinato (in cui l'elettrodo indicatore e quello di riferimento sono uniti in un unico elemento)

Determinazione del pH in frutta e verdura

ISO 1842:1991

Calibrazione del pH-metro

Calibrare il pH-metro secondo le istruzioni del produttore con almeno due soluzioni tampone, tenendole in agitazione con l'agitatore magnetico. Se il pH-metro non prevede un sistema per la correzione della temperatura, è necessario mantenere la temperatura delle soluzioni tampone nell'intervallo 20 ± 2 °C.

Preparazione dei campioni

- Prodotti liquidi: miscelare attentamente il campione di laboratorio finché non è omogeneo.
- Prodotti densi o semidensi: miscelare una parte del campione di laboratorio e macinarlo, se necessario, con un frullatore o un mortaio. Se il prodotto ottenuto è ancora troppo denso, aggiungere un uguale volume di acqua distillata e miscelare bene.

Suddivisione in aliquote

Utilizzare quale aliquota un volume di campione così preparato sufficiente ad immergervi gli elettrodi, in base all'apparecchiatura utilizzata.

Determinazione

Introdurre gli elettrodi nell'aliquota e impostare il sistema per la correzione della temperatura del pH-metro sulla temperatura del campione.

Effettuare la determinazione utilizzando la procedura appropriata per il pH-metro utilizzato. Una volta raggiunto un valore costante leggere il pH direttamente, almeno fino alle 0,05 unità di pH. Effettuare due determinazioni su due distinte aliquote.

Espressione dei risultati

Il risultato è la media aritmetica delle due determinazioni. Indicare i risultati almeno con 0,05 unità di pH.

Valori del pH dei campioni analizzati:

Succo di mela: 3,70 e 3,70	Media: 3,70
Succo d'arancia: 3,99 e 3,99	Media: 3,99
Marmellata di albicocche: 3,46 e 3,47	Media: 3,47
Marmellata di carote: 4,60 e 4,59	Media: 4,60

Contenuto di cloruri in carni e prodotti di carne

ISO 1841-1:1996

Questo metodo utilizza l'estrazione di un'aliquota del campione con acqua calda e la precipitazione delle proteine. Dopo la filtrazione e l'acidificazione, si aggiunge all'estratto un eccesso di soluzione di nitrato d'argento e si titola l'eccesso con una soluzione di tiocianato di potassio.

Reagenti *(utilizzare solo gradi analitici riconosciuti, a meno che diversamente specificato).*

L'acqua deve soddisfare almeno i requisiti del grado 3, conformemente a quanto stabilito dalla norma ISO 3696).

Acqua, distillata ed esente da alogeni (per cromatografia; LiChrosolv® (1.15333)

Nitrobenzene, reagente ACS, $\geq 99,0\%$ (8.06770)

Acido nitrico; Suprapur® $c(\text{HNO}_3) = 4 \text{ mol/L}$ (1.00441)

Kit per la chiarifica secondo Carrez: kit di reagenti per la preparazione dei campioni nelle analisi alimentari, concentrato 5X (1.10537)

(Il kit di chiarifica secondo Carrez pronto all'uso può accelerare le analisi)

Soluzione di nitrato d'argento; Reag. Farm. Eu, Reag. USP; $c(\text{AgNO}_3) = 0,1 \text{ mol/L}$ (0,1 N) Titripur® (1.09081)

Tiocianato di potassio, EMPLURA® (1.05124)

Solfato ferrico d'ammonio, EMSURE® ACS, ISO, Reag. Farm. Eu. (1.03776)

Sciogliere in acqua circa 9,7 g di tiocianato di potassio.

Versare quantitativamente in un matraccio tarato da 1.000 ml e diluire con acqua fino a volume.

Standardizzare la soluzione con nitrato d'argento, utilizzando la soluzione di solfato ferrico d'ammonio come indicatore, arrotondando sulle 0,0001 mol/L più vicine.

Attrezzatura

Bilancia analitica

Omogeneizzatore

Matraccio tarato ad una tacca, da 200 ml

Beuta da 250 ml

Buretta da 50 ml

Bagno termostatico

Contenuto di cloruri in carni e prodotti di carne

ISO 1841-1:1996

Procedura

Pesare circa 10 g di campione (con approssimazione a 0,001 g) e trasferirli quantitativamente in una beuta (aliquota in esame)

Deproteinizzazione (eliminazione delle proteine dal campione)

1. Aggiungere 100 ml d'acqua calda all'aliquota in esame.
2. Scaldare per 15 minuti la beuta e il suo contenuto nel bagno termostatico con acqua bollente.
3. Ogni 3-5 minuti agitare il contenuto della beuta.
4. Lasciar raffreddare la beuta e il suo contenuto fino a temperatura ambiente ed aggiungere 2 ml di soluzione di Carrez I e 2 ml di Carrez II. Dopo ogni aggiunta, mescolare vigorosamente.

Lasciar riposare la beuta per 30 minuti a temperatura ambiente.

Trasferire quantitativamente il contenuto in un matraccio tarato da 200 ml e portare a volume con acqua.

Mescolare e filtrare con carta da filtro pieghettata.

Determinazione

Trasferire 20 ml del filtrato in una beuta e aggiungere 5 ml di acido nitrico diluito e 1 ml della soluzione di solfato ferrico d'ammonio come indicatore. Trasferire nella beuta 20 ml della soluzione di nitrato d'argento, quindi aggiungere 3 ml di nitrobenzene e miscelare accuratamente. Agitare vigorosamente per coagulare il precipitato. Titolare il contenuto della beuta con tiocianato di potassio fino ad ottenere una colorazione rosa persistente. Registrare il volume della soluzione di tiocianato di potassio usata, arrotondando agli 0,05 ml più vicini.

Analisi del bianco: effettuare un test in bianco usando lo stesso volume di soluzione di nitrato d'argento.

Calcolo: contenuto di cloruri = $58,44 \times (V_2 - V_1) / m \times C$

V1: volume, in millilitri, della soluzione di tiocianato di potassio usato nella determinazione

V2: volume, in millilitri, della soluzione di tiocianato di potassio usato nell'analisi del bianco

m: peso, in grammi, dell'aliquota in esame

C: concentrazione della soluzione di tiocianato di potassio in moli/ litro

Calcolo nel caso del campione analizzato (2015/34018)

V1= 16,75, V2= 19,90. m= 10,112 e c=0,1

(Suggerimento: per calcolare il contenuto salino: cloruri x 1,65)

Contenuto di cloruri=1,82 %

Contenuto salino = 3,00%

Esteri metilici di acidi grassi (FAME) in campioni di olio

EN ISO 12966-2:2011 e EN ISO 12966-4:2015

Il metodo si basa sul fatto che gli ester metilici si formano per transesterificazione con idrossido di potassio in metanolo. Utilizzando la gascromatografia capillare, gli ester metilici degli acidi grassi (FAME) vengono separati su una fase stazionaria altamente polare in base alla lunghezza della loro catena, al grado di (in)saturazione, alla geometria e alla posizione dei doppi legami.

Le suddette norme spiegano come operare e i prodotti necessari sono elencati qui di seguito.

Reagenti (*utilizzare solo gradi analitici riconosciuti, a meno che diversamente specificato*).
L'acqua deve soddisfare almeno i requisiti del grado 3, conformemente a quanto stabilito dalla norma ISO 3696).

Acqua, distillata ed esente da alogeni (per cromatografia; LiChrosolv® (1.15333)
Metanolo per gascromatografia con rivelatore ECD e FID SupraSolv® (1.06011)
Sodio bisolfato monoidrato; per analisi EMSURE® (1.06352)
Isoottano per gascromatografia con rivelatore ECD e FID; SupraSolv® (1.15440)
Idrossido di potassio in pastiglie per analisi, EMSURE® (1.05033)

FAME standard

Attrezzatura

Provette con tappo a vite da 10 ml
Boccette in vetro con i campioni
Matraci tarati ad una tacca da 50 e 100 ml

Gascromatografo con rivelatore FID dotato di:
colonna capillare GC: SLB®-IL60; L × D.I. 60 m × 0,32 mm, df 0,26 µm

Condizioni sperimentali

Gas di trasporto: elio, 2,2 ml/min; gas di combustione: idrogeno e aria; gas ausiliario: azoto
Temperatura dell'iniettore: 250 °C
Temperatura del rivelatore (FID): 300 °C
Temperatura del forno: vedere tabella
Volume d'iniezione: 1 µL

Tempo (min)	Temperatura (°C)
0-2	80
2-152	80-230 (1°C/min)
152-162	230

Esteri metilici di acidi grassi (FAME) in campioni di olio

EN ISO 12966-2:2011 e EN ISO 12966-4:2015

Procedura: (campione: olio di girasole ad elevato contenuto di acido oleico)

1. Preparazione degli ester metilici degli acidi grassi

Pipettare 60 µL del campione in esame in una provetta da 10 ml con tappo a vite.

Aggiungere 5 ml di isoottano e vortexare.

Aggiungere 400 µL di soluzione di idrossido di potassio 2 mol/L e riposizionare immediatamente il tappo, avvitare e agitare vigorosamente per 1 minuto. La soluzione diventa trasparente e subito dopo si intorbidisce di nuovo quando si separa il glicerolo. Lasciar riposare per 2 minuti circa.

Aggiungere 1 g circa di bisolfato di sodio e agitare brevemente. Separare lo strato di isoottano e trasferirlo in una boccetta per campioni. La soluzione di isoottano può essere analizzata in GC.

2. Calcoli

I singoli FAME vengono identificati in base al loro tempo di ritenzione e in confronto con gli standard di riferimento. Quando si calcola la composizione in acidi grassi, non bisogna includere nel calcolo dell'area sottesa i picchi non identificati, a meno che non sia stato confermato che essi sono acidi grassi. È anche possibile sommare i picchi non identificati come tali.

$AFFAME = AFAME / \Sigma A \times 100$ dove:

AFFAME: area percentuale dei diversi ester metilici degli acidi grassi

AFAME: area dei diversi ester metilici degli acidi grassi

ΣA: somma delle aree sottese da tutti i picchi dei diversi ester metilici degli acidi grassi

Risultati	FAME	Tempo di ritenzione (min)	%
	Metilpalmitato	68,4	4,10
	Metilpalmitoleato	70,8	0,15
	Metilottadecanoato	82,7	2,94
	Ester metilico dell'acido cis-9-oleico	84,6	83,5
	Metillinoleato	88,2	5,95
	Ester metilico dell'acido gamma-linolenico	92,8	0,11
	Ester metilico dell'acido cis-11-eicosenoico	95,6	0,42
	Metillinolenato	97,3	0,30
	Ester metilico dell'acido cis-11,14,17-eicosatrienoico	107,8	0,97
	Ester metilico dell'acido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	119,1	0,33
	Non identificato		1,21
	Somma		100,00

Determinazione del piombo e del cadmio nel pesce

EN 14084:2003

Questo metodo analizza campioni che sono stati digeriti in contenitori chiusi con l'impiego dell'acido nitrico e del forno a microonde. La soluzione risultante viene diluita con acqua e il contenuto di piombo e di cadmio vengono determinati mediante spettroscopia di assorbimento atomico con atomizzazione mediante forno di grafite (GFAAS) con modificatore di matrice.

Reagenti *(utilizzare solo gradi analitici riconosciuti, a meno che diversamente specificato). L'acqua deve soddisfare almeno i requisiti del grado 3, conformemente a quanto stabilito dalla norma ISO 3696). Utilizzare soltanto reagenti/ acqua con un livello di elementi abbastanza ridotto da non interferire con i risultati.*

Acqua, LiChrosolv® (1.15333)

Acido nitrico 65% Suprapur® (1.00441)

Nitrato di magnesio esaidrato 99,99 Suprapur® (1.05855)

Piombo (1000 mg/l Pb in HNO₃ 0,5 mol/L) tracciabile allo standard di riferimento del NIST, Certipur® (1.19776)

Cadmio (1000 mg/l Cd in HNO₃ 0,5 mol/L) tracciabile allo standard di riferimento del NIST, Certipur® (1.19777)

Attrezzatura

Tritatutto da laboratorio (es. tritatutto a lame)

Forno a microonde da laboratorio

Spettrometro ad assorbimento atomico

Provette di grafite

Lampade specifiche per i diversi elementi

Determinazione del piombo e del cadmio nel pesce

EN 14084:2003

Procedura

1. Omogeneizzare il campione con un tritatore da laboratorio.

Suggerimento: in alcuni casi, è necessario disidratare il campione in modo da non alterarne il contenuto di elementi chimici, per esempio mediante liofilizzazione.

2. Preparazione dei campioni

- Pesare in un contenitore 0,5 – 1,5 g di campione.
- Aggiungere 5,0 ml di acido nitrico. Dopo 30 minuti, aggiungere 5,0 ml di acqua distillata e miscelare delicatamente.
- Lasciare predigerire i campioni nei contenitori aperti per almeno 15 minuti prima di sigillare i contenitori e procedere con il programma di riscaldamento.

Solitamente il programma in forno a microonde comprende una fase di pochi minuti a bassa potenza in cui si verifica un incremento della temperatura, seguita da una o più fasi a maggior potenza. Si raccomanda di passare da una fase all'altra gradualmente, per evitare che all'interno dei contenitori la pressione aumenti improvvisamente.

Suggerimento: i campioni caratterizzati da un elevato tenore di carbonio (es. zuccheri, grassi) possono generare innalzamenti improvvisi della pressione durante il processo. Lasciare predigerire questo tipo di campioni per una notte.

3. Riscaldamento nel forno a microonde

Fase	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	20	Fino a 200 °C
2	20-30	200 °C
3	Da 30 in poi	Raffreddamento

Suggerimento: quando si digeriscono campioni ignoti, fare attenzione a non utilizzare quantità di campione troppo grandi che potrebbero rompere la membrana di sicurezza del contenitore per la digestione. In particolare, i campioni caratterizzati da un elevato tenore di carbonio (es. zuccheri, grassi) possono generare innalzamenti improvvisi della pressione durante il processo. In ogni caso, la quantità di campione introdotta deve soddisfare rigorosamente le indicazioni del produttore.

Determinazione del piombo e del cadmio nel pesce

EN 14084:2003

4. Determinazione con la tecnica del forno di grafite

Per la determinazione del piombo e del cadmio, è necessario ricorrere alla tecnica del forno di grafite. Utilizzare provette rivestite di carbonio pirolitico con piattaforme. Programmare l'autocampionatore per l'introduzione del volume di campione nel forno di grafite; l'assorbanza di fondo non deve superare le 0,5 unità di assorbanza.

Parametri strumentali con un volume d'iniezione di 20 µL.

Elemento	Lunghezza d'onda (nm)	Correzione del rumore di fondo	Parametro	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
Cd	228,8	Zeeman	Temp (°C)	110	450	1.000	2.500
			Incr. (°C/sec)	10	150	0	0
			Mant. (sec)	30	20	3	3
Pb	217	Zeeman	Temp (°C)	120	800	1.200	2.500
			Incr. (°C/sec)	10	150	0	0
			Mant. (sec)	10	20	3	3

5. Calcoli

Costruire una curva standard da cui ricavare la concentrazione del metallo. Calcolare il contenuto (c) come frazione del peso dell'elemento in esame, esprimendolo in µg/kg di campione:

$$c = ((a-b) \times V) / m$$

a: concentrazione nella soluzione del campione in µg/L

b: concentrazione media nel bianco in µg/L

V: volume della soluzione del campione in ml

m: peso del campione in grammi

Risultato

(per il campione 2015/33632

– specie di Patagonotothen)

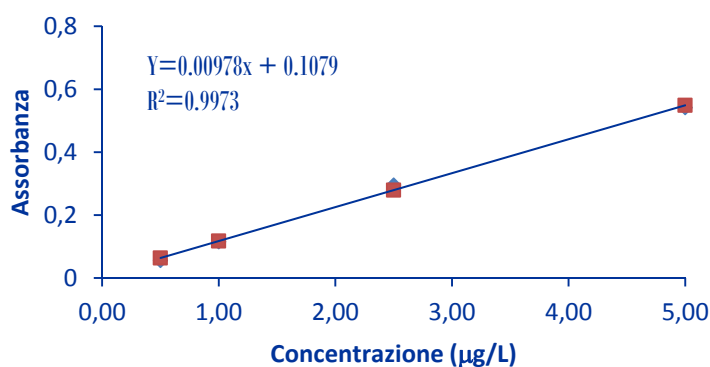
	Piombo	Cadmio
m (g)	1,0115	1,0015
a	0,8493	0,3025
b	-	-
V (mL)	100	100
C (µg/kg)	84	29,9

Determinazione del piombo e del cadmio nel pesce

EN 14084:2003

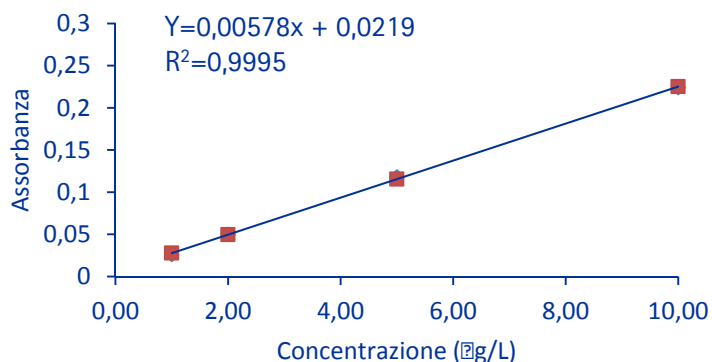
6. Dati di calibrazione – Cadmio (Cd)

Campione	"Ass (Altezza segnale)"	"Conc. (µg/L)"
Cd - Bianco	0,002	0,0000
Cd - Standard 1	0,056	0,5000
Cd - Standard 2	0,116	1,0000
Cd - Standard 3	0,296	2,5000
Cd - Standard 4	0,542	5,0000
Cd - Bianco	0,002	0,0005
Cd - Bianco	0,002	0,0065
Cd 33632	0,034	0,3025
Cd Ha94	0,191	1,6413
Cd - Std 2,5 ppb	0,296	2,4974
Cd - Bianco	0,002	0,0005



7. Dati di calibrazione – Piombo (Pb)

Campione	"Ass (Altezza segnale)"	"Conc. (µg/L)"
Pb - Bianco	0,003	0,0000
Pb - Standard 1	0,026	1,0000
Pb - Standard 2	0,050	2,0000
Pb - Standard 3	0,118	5,0000
Pb - Standard 4	0,224	10,0000
Pb - Bianco	0,003	0,0022
Pb - Bianco	0,002	-0,0218
Pb 33632	0,022	0,8493
Pb Ha94	0,036	1,4433
Cd - Std 25,0 ppb	0,122	5,2115
Pb - Bianco	0,002	-0,0524



Pb Ha94 e Cd Ha94 sono gli standard di riferimento

Determinazione del deossinivalenolo (DON)

EN 15791:2009

Il deossinivalenolo (DON) viene estratto dal campione con acqua. L'estratto acquoso viene purificato con una colonna d'immunoaffinità che rimuove le impurezze dal campione. Successivamente si determina quantitativamente il DON mediante HPLC con rivelatore UV.

La norma EN descrive la procedura completa; qui di seguito troverà i prodotti necessari.

Reagenti *(utilizzare solo gradi analitici riconosciuti, a meno che diversamente specificato).*

Metanolo grado gradiente; LiChrosolv® Reag. Farm. Eu. (1.06007)

Acqua, LiChrosolv® (1.15333)

Standard analitici del deossinivalenolo (DON)

Soluzioni di DON per la calibrazione: 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,5 µg/ml

Attrezzatura

Bilancia analitica

Omogeneizzatore

Agitatore da laboratorio

Miscelatore "Vortex"

Beute da 500 ml con tappo a vite

Imbuti

Carta da filtro

Matraci

Evaporatore a flusso di aria o azoto

Colonne di purificazione mediante immunoaffinità per DON

Sistema HPLC completo di:

colonna analitica Purospher® STAR RP-18 endcapped (5 µm), Hibar®, 125x4 mm (1.50036)

con precolonna Purospher® STAR RP-18 endcapped (5 µm) 4-4 LiChroCART® (1.50250)

Determinazione del deossinivalenolo (DON)

EN 15791:2009

1. Preparazione dei campioni

- I campioni devono essere macinati finemente e accuratamente miscelati con un tritattutto.
Come matrice noi abbiamo usato grano (id 2015/B/4586)

2. Estrazione dei campioni

Pesare un'aliquota da 25,0 g in una beuta con tappo a vite.
Aggiungere 200 ml d'acqua deionizzata, tappare e porre ad agitare nell'agitatore per 1 ora.
Preparare un imbuto con carta da filtro.
Filtrare il campione estratto in una beuta pulita da 500 ml con tappo a vite.

Consiglio: talvolta la filtrazione richiede parecchio tempo. Può essere accelerata con l'impiego di carta da filtro di due diversi gradi di filtrazione

3. Purificazione su colonna di immunoaffinità

Collegare un serbatoio alla colonna di immunoaffinità. Trasferire nel serbatoio 2,0 ml dell'estratto filtrato. Far passare la soluzione attraverso la colonna per gravità, lentamente, alla velocità di 1 - 2 gocce/sec. Quando tutto l'estratto è passato completamente attraverso la colonna da immunoaffinità, far passare 5 ml d'acqua deionizzata attraverso la colonna. Rimuovere il liquido residuo insufflando azoto o aria in colonna per 5 secondi circa. Buttare tutto l'eluato raccolto durante questa procedura di purificazione.

*Consiglio: controllare regolarmente la capacità delle colonne da immunoaffinità utilizzate.
Tale capacità non dev'essere inferiore a 2.500 ng.*

Infine, collocare un flaconcino da autocampionatore HPLC sotto la colonna ed eluire con 0,5 ml di metanolo, raccogliendo l'eluato per gravità. Dopo che le ultime gocce di metanolo sono passate attraverso la colonna, lasciare il metanolo in colonna per 1 minuto circa. Aggiungere quindi ancora 1,0 ml di metanolo e raccogliere l'eluato. Insufflare con attenzione azoto o aria in colonna, per raccogliere eventuali residui di eluato.

4. Preparazione della soluzione per l'analisi HPLC

Introdurre nell'evaporatore il flaconcino con l'eluato e, con attenzione, portare a secco sotto flusso di azoto o di aria a 50°C circa. Portare immediatamente il flaconcino da HPLC a temperatura ambiente e ricostituire il residuo con 1,0 ml di fase mobile per l'HPLC. Miscelare bene con il vortex per almeno 30 secondi, per essere sicuri di avere ridisciolti completamente il residuo. In caso di torbidità, filtrare la soluzione attraverso un filtro da siringa.

Determinazione del deossinivalenolo (DON)

EN 15791:2009

5. Condizioni cromatografiche

Colonna:	Purospher® STAR RP-18 endcapped (5 µm), Hibar®, 125x4 mm (1.50036)
Iniezione:	100 µl
Rivelazione:	UV, 220 nm
Velocità di flusso:	0,7 ml/min
Fase mobile:	metanolo e acqua 20:80 (v/v)
Temperatura:	25 °C
Diluente:	fase mobile
Campione:	grano
Pressione differenziale:	120 Bar

6. Calcoli

$w(\text{DON}) = c(\text{DON}) \times (V(3))/(V(2)) \times (V(1))/(m(s))$ dove

c(DON):	è la concentrazione in peso del DON determinata attraverso la retta di calibrazione
V(1):	è il volume totale del solvente di estrazione (200 ml)
V(2):	è il volume dell'aliquota di estratto sottoposta a purificazione
V(3):	è il volume totale della soluzione analizzata
m(s):	è il peso dell'aliquota estratta

Calcolo nel caso del campione 2015/B/4586

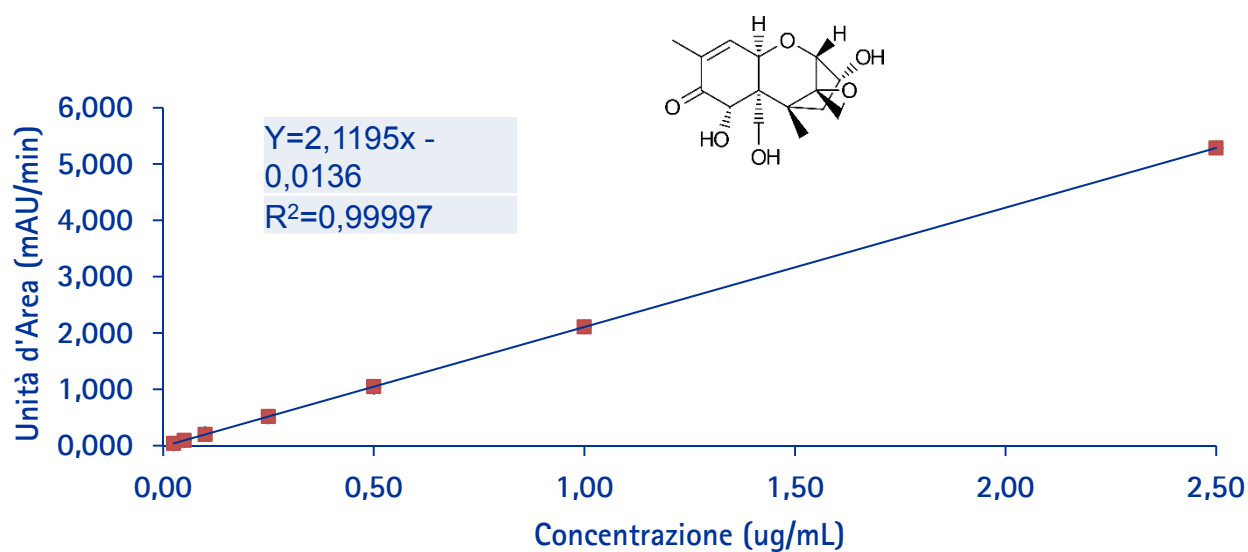
c(DON):	1,221
V(1):	200 ml
V(2):	2 ml
V(3):	1 ml
m(s):	25 g

$w(\text{DON}):$ 4,9 mg/kg

Quindi, nel campione analizzato sono stati riscontrati 4,9 mg/kg di deossinivalenolo (DON)

Determinazione del deossinivalenolo (DON)

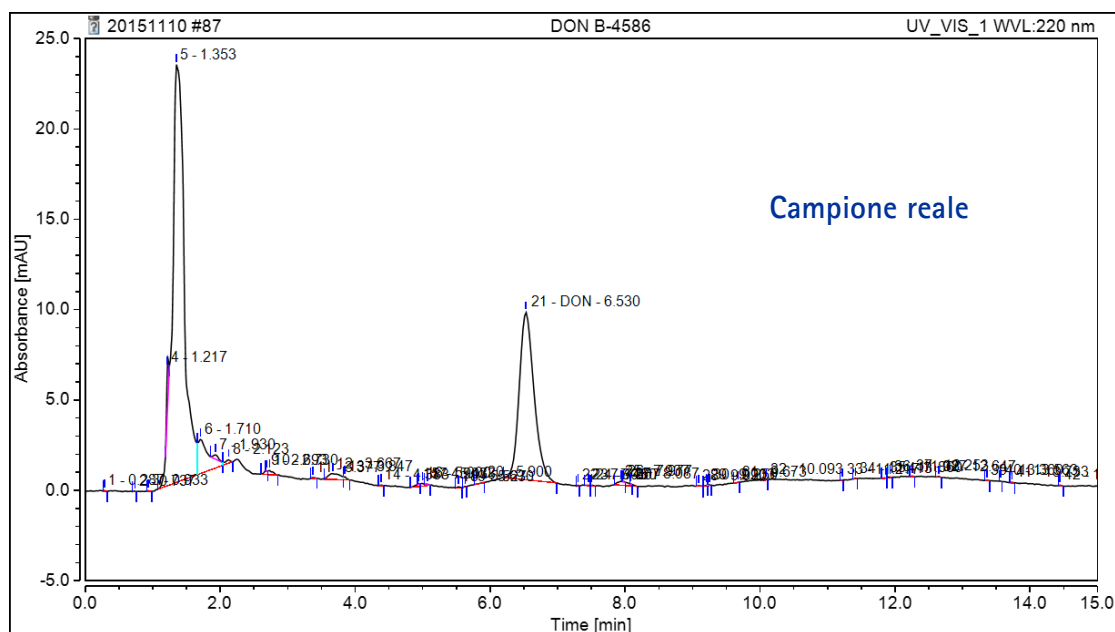
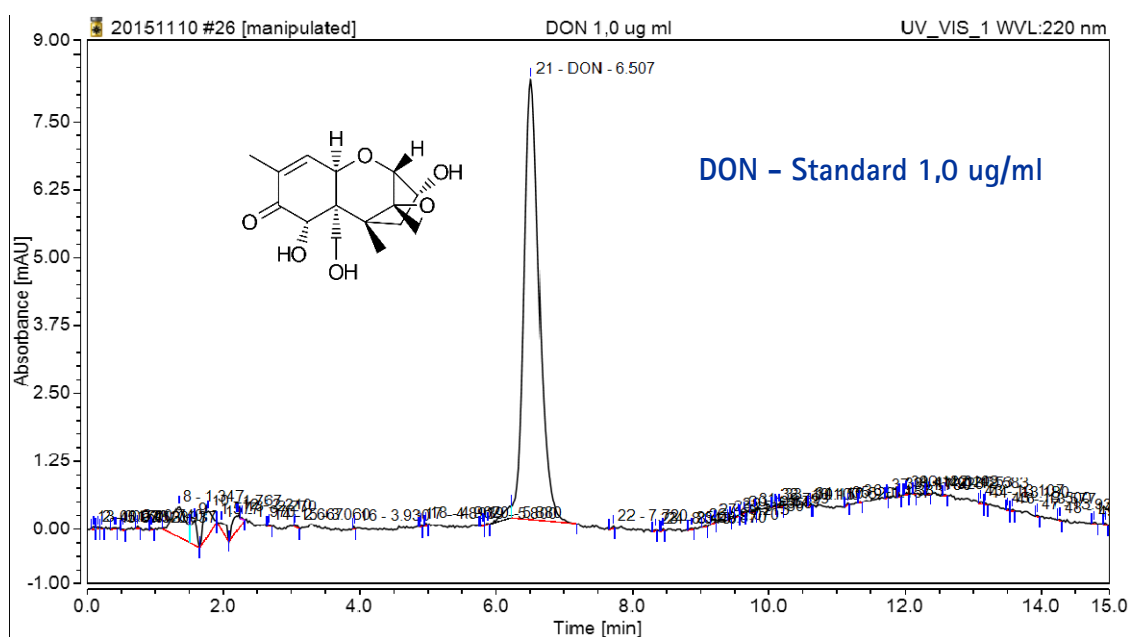
EN 15791:2009



Risultati della calibrazione				
ID	Livello	Concentrazione (ug/ml)	Area (mAU/min)	Altezza (mAU)
DON 2,5 ug/ml	04	2,5000	5,286	18,75
DON 1,0 ug/ml	05	1,0000	2,109	8,107
DON 0,5 ug/ml	01	0,5000	1,034	4,127
DON 0,25 ug/ml	02	0,2500	0,509	1,777
DON 0,1 ug/ml	03	0,1000	0,219	0,961
DON 0,05 ug/ml	06	0,0500	0,092	0,398
DON 0,025 ug/ml	07	0,0250	0,034	0,176

Determinazione del deossinivalenolo (DON)

EN 15791:2009



		Tr (min)	Ampiezza 50% (min)	Risoluzione (EP)	Asimmetria (EP)	Piatti (EP)
1	DON	6,5	0,23	5,1	1,2	4285

Diversi metodi per lo stesso campione

Nelle pagine seguenti sono riportati diversi esempi di determinazione del contenuto salino di alcuni campioni (un tipo di salume italiano ed un salame) con diverse tecniche analitiche. Il contenuto di sodio viene determinato mediante spettroscopia di assorbimento atomico, quello di cloruri per titolazione.

Per quanto riguarda i valori nutrizionali, secondo il regolamento della UE N°1169/2011, l'etichetta del prodotto deve indicare il contenuto salino (prima veniva riportato solo il sodio).

Secondo questa norma, il contenuto salino può essere calcolato esclusivamente a partire dal sodio (contenuto salino=sodio x 2,5). Altre normative prescrivono limiti in termini di sodio-cloruro, senza indicare quale tipo di determinazione deve essere applicato (in base ai cloruri o in base al sodio).

Il vantaggio di un metodo basato sulla determinazione dei cloruri è la velocità (molto più veloce), oltre al fatto di non richiedere un grande investimento di capitali nella strumentazione. Solitamente tutti i laboratori interni dell'industria delle carni utilizzano il metodo basato sui cloruri. Tuttavia, la titolazione è un metodo meno esatto, con un maggior grado di incertezza.

Nel caso della determinazione del sodio, è necessario disporre dell'apposita strumentazione, ma questa fornisce un metodo più preciso, a cui è necessario, per altro, ricorrere nel caso si debbano determinare i valori nutrizionali.

L'esperienza del mondo industriale è che, specialmente nel settore della carne, sono utilizzati diversi additivi che apportano sodio al di là del sale stesso (es. nitrito di sodio). In tal caso, il contenuto salino determinato sulla base del tenore di sodio risulta solitamente più alto rispetto alla determinazione sulla base dei cloruri.

Quest'affermazione è dimostrata nell'esempio delle pagine seguenti in cui si è registrata una differenza dello 0,22 e dello 0,14% rispettivamente nel contenuto salino dell'affettato italiano e del salame.

Contenuto di cloruri in carni e prodotti di carne

ISO 1841-1:1996

Questo metodo utilizza l'estrazione di un'aliquota del campione con acqua calda e la precipitazione delle proteine. Dopo la filtrazione e l'acidificazione, si aggiunge all'estratto un eccesso di soluzione di nitrato d'argento e si titola l'eccesso con una soluzione di tiocianato di potassio.

Reagenti *(utilizzare solo gradi analitici riconosciuti, a meno che diversamente specificato).*

Acqua, distillata ed esente da alogeni (per cromatografia; LiChrosolv® (1.15333). *L'acqua deve soddisfare almeno i requisiti del grado 3, conformemente a quanto stabilito dalla norma ISO 3696).*

Nitrobenzene, $\geq 99,0\%$ (8.06770)

Acido nitrico; Suprapur® c(HNO₃) = 4 mol/L (1.00441)

Kit per la chiarifica secondo Carrez: kit di reagenti per la preparazione dei campioni nelle analisi alimentari, concentrato 5X (1.10537)

(Il kit di chiarifica secondo Carrez pronto all'uso può accelerare le analisi)

Soluzione di nitrato d'argento; Reag. Farm. Eu, Reag. USP; c(AgNO₃) = 0,1 mol/L (0,1 N) Titripur® (1.09081)

Solfato ferrico d'ammonio, EMSURE® ACS, ISO, Reag. Farm. Eu. (1.03776)

Tiocianato di potassio, soluzione volumetrica std E EMPLURA®, c(KSCN)=0,1 mol/L; (1.05124)

Sciogliere in acqua circa 9,7 g di tiocianato di potassio.

Versare quantitativamente in un matraccio tarato da 1.000 ml e diluire con acqua fino a volume.

Standardizzare la soluzione con nitrato d'argento, utilizzando la soluzione di solfato ferrico d'ammonio come indicatore, arrotondando sulle 0,0001 mol/L più vicine.

Attrezzatura

Bilancia analitica

Omogeneizzatore

Matraccio tarato ad una tacca, da 200 ml

Beuta da 250 ml

Buretta da 50 ml

Bagno termostatico

Contenuto di cloruri in carni e prodotti di carne

ISO 1841-1:1996

Procedura

Pesare circa 10 g di campione (con accuratezza di 0,001 g) e trasferirlo quantitativamente in una beuta (aliquota in esame)

Deproteinizzazione (eliminazione delle proteine dal campione)

1. Aggiungere 100 ml d'acqua calda all'aliquota in esame.
2. Scaldare per 15 minuti la beuta e il suo contenuto nel bagno termostatico con acqua bollente.
3. Ogni 3-5 minuti agitare il contenuto della beuta.
4. Lasciar raffreddare la beuta e il suo contenuto fino a temperatura ambiente ed aggiungere 2 ml di soluzione di Carrez I e 2 ml di Carrez II. Dopo ogni aggiunta, mescolare vigorosamente.

Lasciar riposare la beuta per 30 minuti a temperatura ambiente.

Trasferire quantitativamente il contenuto in un matraccio tarato da 200 ml e portare a volume con acqua. Mescolare e filtrare con carta da filtro pieghettata.

Determinazione

Trasferire 20 ml del filtrato in una beuta e aggiungere 5 ml di acido nitrico diluito e 1 ml della soluzione di solfato ferrico d'ammonio come indicatore.

Trasferire nella beuta 20 ml della soluzione di nitrato d'argento, quindi aggiungere 3 ml di nitrobenzene e miscelare accuratamente. Agitare vigorosamente per coagulare il precipitato.

Titolare il contenuto della beuta con tiocianato di potassio fino ad ottenere una colorazione rosa persistente. Registrare il volume della soluzione di tiocianato di potassio utilizzata, arrotondando agli 0,05 ml più vicini.

Analisi del bianco: effettuare un test in bianco usando lo stesso volume di soluzione di nitrato d'argento.

6. Calcoli

Contenuto di cloruri = $58,44 \times (V_2 - V_1) / m \times C$

V1: volume, in millilitri, della soluzione di tiocianato di potassio usato nella determinazione

V2: volume, in millilitri, della soluzione di tiocianato di potassio usato nell'analisi del bianco

m: peso, in grammi, dell'aliquota in esame

C: concentrazione della soluzione di tiocianato di potassio in moli/ litro (L)

Contenuto di cloruri in carni e prodotti di carne

ISO 1841-1:1996

Campioni

ID 2015/P/20298 (affettato italiano)

ID 2015/36814 (salame)

Risultati

Contenuto di cloruri = $58,44 \times (V2 - V1) / m \times C$

Contenuto salino = contenuto di cloruri $\times 1,65$

	Campione 2015/P/20298 (affettato)	Campione 2015/36814 (salame)
V1	18,4	15,7
V2	19,9	19,9
m	10,0514	10,0597
C	0,1	0,1
Contenuto di cloruri (%)	0,87	2,43
Contenuto salino (%)	1,43	4,01

Determinazione del contenuto di sodio nella carne

EN 15505:2008

I campioni vengono digeriti in contenitori chiusi con l'impiego dell'acido nitrico e del forno a microonde. La soluzione risultante viene diluita con acqua e il contenuto di sodio viene determinato mediante spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione a fiamma, usando un Reagenti *(utilizzare solo gradi analitici riconosciuti, a meno che diversamente specificato).*

Utilizzare soltanto reagenti/ acqua con un livello di elementi abbastanza ridotto da non interferire con i risultati.

Acqua, LiChrosolv® (1.15333)

L'acqua deve soddisfare almeno i requisiti del grado 3, conformemente a quanto stabilito dalla norma ISO 3696)

Acido nitrico 65% Suprapur® (1.00441)

Sodio (1.000 mg/l di Na in HNO₃ 0,5 mol/l) tracciabile allo standard di riferimento del NIST; Certipur® (1.70238)

Cloruro di cesio 99,995 Suprapur® (1.02039)

Attrezzatura

(Tutta la vetreria e l'attrezzatura in plastica devono essere lavate e risciacquate con cura, per evitare contaminazioni crociate. Il metodo esatto per il lavaggio è descritto nello standard EN 13804.)

Tritatutto da laboratorio (es. tritatutto a lame)

Forno a microonde da laboratorio

Spettrometro ad assorbimento atomico

Lampade specifiche per i diversi elementi:

per il sodio si utilizzano lampade con lunghezza d'onda di 589,0 nm.

(Consiglio: il sodio può essere determinato anche mediante spettrometria atomica di emissione.)

Acetilene di qualità appropriata.

Aria

Determinazione del contenuto di sodio nella carne

EN 15505:2008

Procedura

1. Omogeneizzare il campione con un tritatutto da laboratorio

Suggerimento: in alcuni casi, è necessario disidratare il campione in modo da non alterarne il contenuto di elementi chimici, per esempio mediante liofilizzazione.

2. Preparazione dei campioni

- Pesare in un contenitore da 1,0 a 2,5 g campione.
- Aggiungere 5,0 ml di acido nitrico. Dopo 30 minuti, aggiungere 5,0 ml di acqua distillata e mescolare delicatamente.
- Lasciare predigerire i campioni nei contenitori aperti per almeno 15 minuti prima di sigillare i contenitori e procedere con il programma di riscaldamento.

Consigli: nel caso i campioni presentino un elevato contenuto di grassi, ridurre l'aliquota da esaminare a 0,5-1,0 g. Se i campioni presentano un elevato tenore d'acqua, l'aliquota può essere accresciuta fino a 2,0 - 3,0 g. I campioni caratterizzati da un elevato tenore di carbonio (es. zuccheri, grassi) possono causare innalzamenti improvvisi della pressione durante il processo. Lasciare predigerire questo tipo di campioni per una notte.

3. Riscaldamento nel forno a microonde

Fase	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	0-15	Fino a 190 °C
2	15-35	200 °C
3	Da 35 in poi	Raffreddamento

4. Diluizione

Pipettare un volume idoneo della soluzione del campione, aggiungere 1 ml della soluzione di Cs e diluire (praticamente a 500 ml) questo volume con acido nitrico al 2,7 %, in modo che la concentrazione finale del Na sia compresa nell'intervallo di misura dell'elemento.

5. Spettrometria di assorbimento atomico

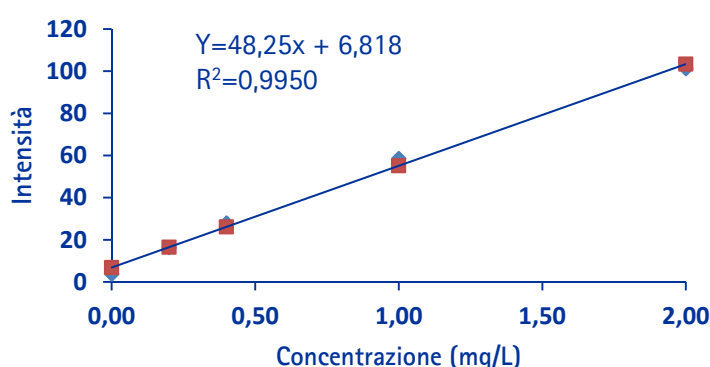
Prima di ogni determinazione, regolare lo strumento come specificato nel manuale d'uso fornito dal produttore. Le impostazioni esatte del nostro strumento sono allegate in un file a parte.

Determinazione del contenuto di sodio nella carne

EN 15505:2008

6. Calibrazione – Sodio

Campione	"Intensità" (Altezza)"	"Conc (mg/L)"
Bianco	3,7	0,0000
Std1	16,3	0,2000
Std2	28	0,4000
Std3	58,6	1,0000
Std4	101,2	2,0000
P-20298	50,4	0,8246
36814	55,1	0,9231



7. Calcoli

$c = (a \times V \times F) / m$ dove

c: frazione del peso del sodio in milligrammi per kilo

a: contenuto dell'elemento, in mg/l

V: volume della soluzione di digestione, in ml

F: fattore di diluizione della soluzione analizzata

m: peso del campione iniziale, in grammi

	Campione 2015/P/20298 (affettato)	Campione 2015/36814 (salame)
a (mg/L)	0,8246	0,9231
V (ml)	500	500
F (diluizione)	25	50
m (g)	1,5713	1,3890
Contenuto di sodio (%)	0,66	1,66
Contenuto salino (%)	1,65	4,15

Determinazione del contenuto di acqua in campioni di olio

DIN EN ISO 8534:2009

Il grasso disciolto viene titolato con una soluzione di iodio e l'anidride solforosa (SO₂) viene ossidata dallo iodio alla presenza di acqua. L'alcol reagisce con SO₂ e una base azotata (RN) formando quale intermedio di reazione un alchilsolfito che viene quindi ossidato dallo iodio ad alchilsolfato. Questa reazione di ossidazione consuma l'acqua contenuta nel campione.

Reagenti per analisi Karl Fischer

(Utilizzare solo gradi analitici riconosciuti, a meno che diversamente specificato).

CombiCoulomat frit (1.09255.0500)

Reagente monocomponente: contiene tutti i reattivi nella soluzione titolante

Standard acquoso (1.88052.0010, 1%)

Strumento: per esempio, Cou-Lo Aquamax

Determinazione

1. Controllare lo strumento misurando uno standard (iniettare 0,5 ml)
2. Se il risultato cade in un intorno del $\pm 10\%$, lo strumento è utilizzabile
3. Iniettare il campione nel recipiente di titolazione (campione 0,5 ml)
4. Registrare il peso
5. Impostare il peso del campione nello strumento
6. Lo strumento calcolerà il risultato finale
7. Titolare il campione due volte, quindi considerare la media dei due risultati
8. La differenza tra le due misure non deve superare il 10%

Risultati

	Standard	Campione 1	Campione 2
Peso complessivo (g)	3,3128	2,9408	2,9561
Peso del campione (g)	0,4561	0,4657	0,4786
Risultato (mg/kg)	9767,38	292,53	292,17

Determinazione di elementi in tracce

EN 13805:2002

Questo metodo consente di determinare ferro, magnesio, potassio, sodio e calcio negli alimenti. Il campione viene mineralizzato grazie alla digestione con acido nitrico in pressione. Ferro, magnesio, potassio, sodio e calcio vengono quindi quantificati nella soluzione risultante mediante spettrometria di emissione atomica con plasma accoppiato induttivamente (ICP-OES).

Reagenti

(Utilizzare solo gradi analitici riconosciuti, a meno che diversamente specificato). La concentrazione di ferro, magnesio, potassio, sodio e calcio nei reagenti e nell'acqua utilizzati dev'essere abbastanza ridotta da non interferire con i risultati delle determinazioni)

Acqua, LiChrosolv® (1.15333)

Acido nitrico 65% Suprapur® (1.00441)

Soluzione stock multi-elemento - Standard Certipur® multi-elemento (IV) in soluzione per ICP (1.11355.0100)

$\rho(\text{Fe}) = 1000 \text{ mg/L}$

$\rho(\text{Mg}) = 1000 \text{ mg/L}$

$\rho(\text{K}) = 1000 \text{ mg/L}$

$\rho(\text{Na}) = 1000 \text{ mg/L}$

$\rho(\text{Ca}) = 1000 \text{ mg/L}$

Standard multi-elemento e soluzioni di calibrazione

Le soluzioni standard e di calibrazione vengono preparate dalla soluzione stock per diluizione in matracci di vetro. Per la calibrazione, preparare almeno cinque soluzioni di calibrazione di diverse concentrazioni. La concentrazione dell'acido deve coincidere con quella della soluzione analizzata. Qui di seguito forniamo un esempio di come preparare soluzioni

con $\rho(\text{Fe, Mg, K, Na, Ca}) = 0,5 \text{ mg/L, } 1,0 \text{ mg/L, } 2,5 \text{ mg/L, } 5,0 \text{ mg/L, } 10,0 \text{ mg/L}$ per ICP-OES.

Riempire cinque matracci da 100 ml con 10–20 ml d'acqua, aggiungere 10 ml di acido nitrico e mescolare. Lasciare che le soluzioni vadano a temperatura ambiente e pipettare esattamente 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 ml della soluzione stock multi-elemento per preparare nei cinque matracci da 100 ml le diverse soluzioni di calibrazione aventi, rispettivamente, concentrazione di 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,5 mg/L, 5,0 mg/L e 10,0 mg/L. Mescolare le soluzioni e portarle a volume con acqua.

Le soluzioni di calibrazione qui descritte hanno puro valore esemplificativo. Le concentrazioni preparate devono essere comprese nell'intervallo lineare di misura dello strumento utilizzato e la concentrazione dell'acido delle soluzioni deve coincidere con quella della soluzione del campione.

Determinazione di elementi in tracce

EN 13805:2002

Soluzione del bianco

La soluzione del bianco contiene acqua e acido nitrico in quantità corrispondente alla concentrazione nelle soluzioni in esame, per esempio 10 ml di acido nitrico in 100 ml d'acqua.

Strumentazione

Sistema di reazione a microonde
ICP- OES (torcia assiale)

Digestione del campione

Mineralizzare il campione mediante digestione in pressione in conformità alla norma EN 13805:2002. I parametri per la digestione vengono scelti in base alle specifiche fornite dal produttore dello strumento, alla reattività del campione, alla massima pressione sopportata dal contenitore di digestione e alla temperatura raggiungibile.

Pesare esattamente 0,8-0,9 g di campione nel contenitore per la digestione e miscelarli con 5 ml di acido nitrico e 1 ml d'acqua. Secondo la suddetta norma, la soluzione derivante dalla digestione in pressione può essere utilizzata direttamente, oppure diluita per la successiva determinazione quantitativa di ferro, magnesio, potassio, sodio e calcio.

Spettrometria di emissione atomica con plasma accoppiato induttivamente (ICP – OES)

Accendere lo strumento e lasciarlo stabilizzare, quindi ottimizzarlo secondo le specifiche del produttore e cominciare le determinazioni. Utilizzare il bianco per misurare lo zero dello strumento, quindi introdurre nel plasma, una alla volta, le soluzioni di calibrazione in ordine ascendente e misurare le emissioni dell'elemento da determinare.

Valutazioni

La tabella che segue fornisce le linee analitiche per le determinazioni in ICP – OES e le quantità limite.

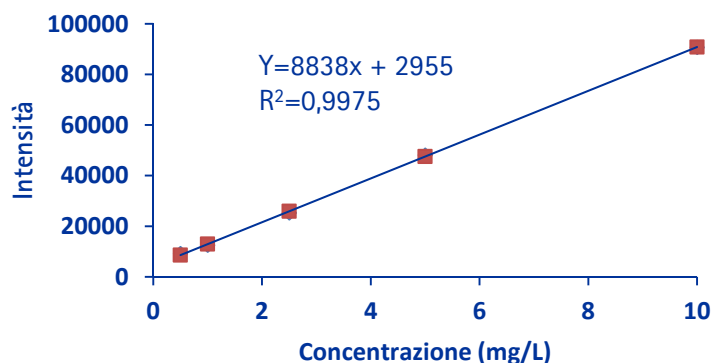
Elemento	Lunghezza d'onda d'emissione (nm)	Quantità limite (mg/kg)
Fe	239.562	2,0
Mg	280.271	1,0
Ca	315.887	3,0
Na	589.592	3,0
K	766.490	1,5

Determinazione di elementi in tracce

EN 13805:2002

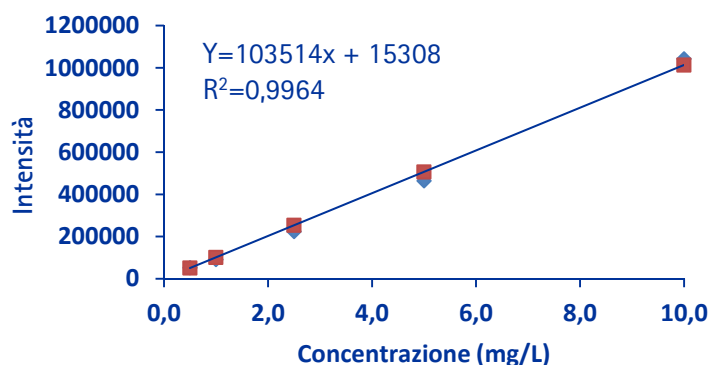
Dati di calibrazione – Calcio (Ca)

Campione	"Intensità" (Altezza)"	"Conc. (mg/L)"
1	9208	0,5
2	12475	1,0
3	25234	2,5
4	48070	5,0
5	90670	10,0



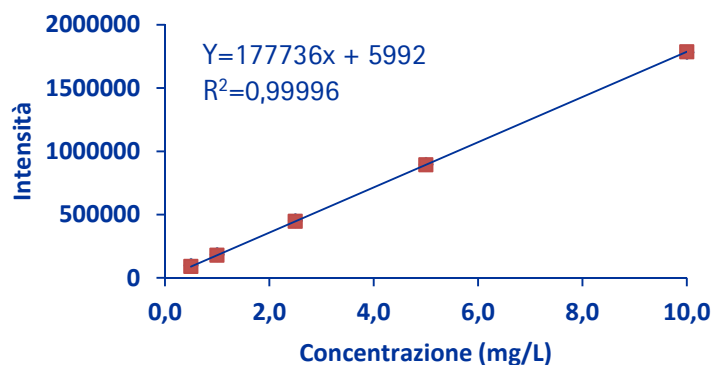
Dati di calibrazione – Sodio (Na)

Campione	"Intensità" (Altezza)"	"Conc. (mg/L)"
1	52753	0,5
2	91055	1,0
3	224058	2,5
4	464668	5,0
5	1042380	10,0



Dati di calibrazione – Magnesio (Mg)

Campione	"Intensità" (Altezza)"	"Conc. (mg/L)"
1	98003	0,5
2	184064	1,0
3	453123	2,5
4	895895	5,0
5	1781856	10,0

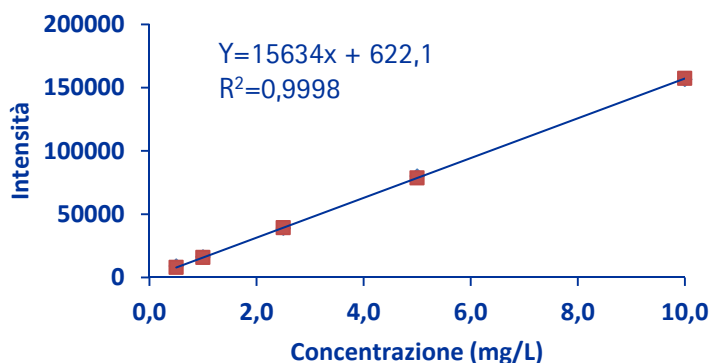


Determinazione di elementi in tracce

EN 13805:2002

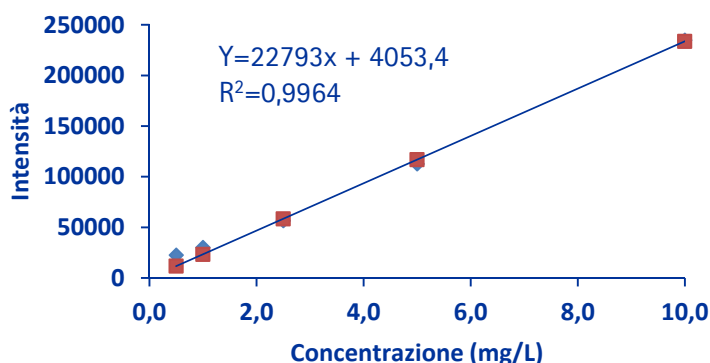
Dati di calibrazione – Ferro (Fe)

Campione	"Intensità" (Altezza)"	"Conc. (mg/L)"
1	9052	0,5
2	16226	1,0
3	38950	2,5
4	80062	5,0
5	156491	10,0



Dati di calibrazione – Potassio (K)

Campione	"Intensità" (Altezza)"	"Conc. (mg/L)"
1	22605	0,5
2	30335	1,0
3	56651	2,5
4	112827	5,0
5	234966	10,0



Risultati: la tabella che segue presenta i valori medi di ferro (Fe), magnesio (Mg), calcio (Ca), sodio (Na) e potassio (K) riscontrati in tre diversi tipi di campione.

Campione	Fe	Mg	Ca	Na	K
	(mg/Kg)				
Manzo	31,04	246,3	69,34	921,8	2692,5
Pollo	4,996	364,8	38,91	499,9	2946,3
Latte	1,329	123,5	402,2	402,2	1284,3

Residui

Definizione

Pesticidi

1. La definizione di pesticidi si riferisce a qualunque sostanza o miscela di sostanze destinata a prevenire, distruggere o controllare qualunque specie vegetale o animale indesiderata che causi danno o in qualche modo interferisca con la produzione, la lavorazione, la conservazione, il trasporto o la distribuzione dei prodotti tal quali. Con questo nome si designano anche sostanze utilizzate come regolatori della crescita, defoglianti o essiccanti e qualunque sostanza applicata al raccolto prima o dopo la raccolta per proteggerlo dal deterioramento durante la conservazione e il trasporto.
2. I pesticidi vengono comunemente utilizzati in agricoltura e piccoli quantitativi (detti residui) possono rimanere su frutta, verdura, granaglie e altri alimenti. Per essere certi che il cibo sia sicuro per il consumo, enti ufficiali come la Environmental Protection Agency (EPA) statunitense, regolamentano le quantità di ciascun pesticida tollerabili negli e sugli alimenti.
3. I pesticidi sono suddivisi in quattro classi principali: erbicidi, fungicidi, insetticidi e battericidi.

Antibiotici

1. Durante la loro vita, gli animali possono richiedere la somministrazione di diversi medicinali, per la prevenzione o la cura di malattie. Negli animali destinati alla produzione alimentare, come bovini, suini, pollame e pesci, ciò può causare la presenza di residui delle sostanze somministrate agli animali nei prodotti alimentari da essi derivanti (carne, latte, uova). I residui, tuttavia, non devono rappresentare una minaccia per il consumatore. Per garantire un elevato livello di protezione del consumatore, la legislazione richiede che, prima di autorizzare l'impiego di una sostanza medicinale negli animali destinati alla produzione alimentare, venga presa in esame la tossicità dei potenziali residui. Se lo si ritiene necessario, si stabiliscono i limiti massimi di residui (MRL) e, in alcuni casi, l'impiego della sostanza in questione viene proibito.

Altro materiale sui residui di pesticidi e antibiotici:

<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/Pesticides/default.htm>

<http://www.epa.gov/pesticides/index.htm>

<http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/>

http://ec.europa.eu/food/food/index_en.htm

http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm

http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm

<http://en.wikipedia.org/wiki/Pesticide>

Pesticidi

I pesticidi sono sostanze o miscele di sostanze biologiche (come virus, batteri, antimicrobici o disinfettanti) o chimiche intese a prevenire, distruggere, respingere o attenuare qualunque organismo nocivo. Tra gli organismi bersaglio dei pesticidi ci sono insetti, agenti patogeni, erbe infestanti, molluschi, uccelli, mammiferi, pesci, nematodi (ascaridi) e microrganismi capaci di rovinare le caratteristiche, disturbare, diffondere o veicolare malattie.

Attualmente sono 507 i pesticidi per cui sono stati stabiliti i limiti massimi di residui da parte dell'Unione Europea. Molti di loro sono difficili da analizzare utilizzando i metodi tradizionali. Per esempio, il cloromequat e il mepiquat sono due pesticidi molto idrofili, ampiamente utilizzati come regolatori di crescita delle piante. Essi agiscono inibendo la crescita vegetativa e promuovendo la fioritura in un'ampia gamma di alberi da frutto, ortaggi, cereali e nel cotone. Nel suolo vengono eliminati attraverso processi microbiologici il cui prodotto finale è l'anidride carbonica, ma possono accumularsi in piante, animali e uomini. La Environmental Protection Agency statunitense (US-EPA) ha elencato questi prodotti tra quelli che devono essere misurati.



In queste due raccolte di metodi applicativi può trovare altri protocolli per lo screening dei residui.

Determinazione dei pesticidi

EN 15662:2009

Questo è un metodo per l'analisi dei residui di pesticidi negli alimenti di origine vegetale, come frutta (anche frutta secca), verdura, cereali e loro derivati. Esso consente di analizzare 300 molecole contemporaneamente, utilizzando l'estrazione/frazionamento in acetonitrile e il metodo QuEChERS – SPE per la purificazione dei campioni, seguito dall'analisi in GC-MS e/o LC-MS/MS.

In questo esempio, tuttavia, sono stati determinati solo 10 componenti.

Reagenti

(Utilizzare solo gradi analitici riconosciuti, a meno che diversamente specificato)

Acqua (1.15333)
Acetonitrile (1.00029)
Metanolo, grado LC-MS
Formiato d'ammonio, grado LC-MS
Acido formico (1.00264.1000)
Solfato di magnesio anidro (1.06067)
Cloruro di sodio (1.06404)
Bondesil PSA, 40 µm, 100 g
Carbone per SPE, flacone da 25 g

Standard di pesticidi

Azossistrobina
Buprofezina
Fenpiroximate
Exitiazox
Miclobutanil
Penconazolo
Tetraconazolo
Tolilfluanide
Triflossistrobina
Triflumizolo

Determinazione dei pesticidi

EN 15662:2009

Preparazione dei campioni (pomodori)

1. Prendere un campione rappresentativo (10 g) e introdurlo in un contenitore adatto
2. Aggiungere 10 ml di acido formico: acetonitrile (1:1 volume/volume-%) e omogeneizzare
3. Aggiungere una miscela di sali-tampone, omogeneizzare
 - Solfato di magnesio (4 g)
 - Cloruro di sodio (1 g)
 - Centrifugare a 4.200 rpm, 2,5 min
4. Prelevare la maggior parte possibile della fase superiore (4 mL)
5. Aggiungere a questa fase la miscela salina di adsorbimento, omogeneizzare
 - Carbone per SPE (35,0 mg)
 - Bondesil-PSA (113,0 mg)
 - Solfato di magnesio (652,0 mg)
 - Centrifugare a 4.200 rpm, 2.5 min
6. Trasferire 1 ml della fase superiore in una fialetta

Analisi LC-MS/MS (utilizzare un sistema UHPLC appropriato)

Rivelatore MS-MS: sistema Q Trap MS/MS o simile

Colonna HPLC: "fused core" C18 (10 cm x 3,0 mm, 2,7 µm)

Precolonna: "fused core" C18 (0,5 cm x 3,0 mm, 2,7 µm)

Eluente: A: formiato d'ammonio 1 mmol/l con acido formico allo 0,1% in acqua
B: metanolo

Velocità di flusso: 500 µL/min

Iniezione: 20 µL

Temperatura: 40 °C

Gradiente:

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
2,0	65	35
8,5	5	95
15,0	5	95
16,0	95	5
20,0	95	5

Determinazione dei pesticidi

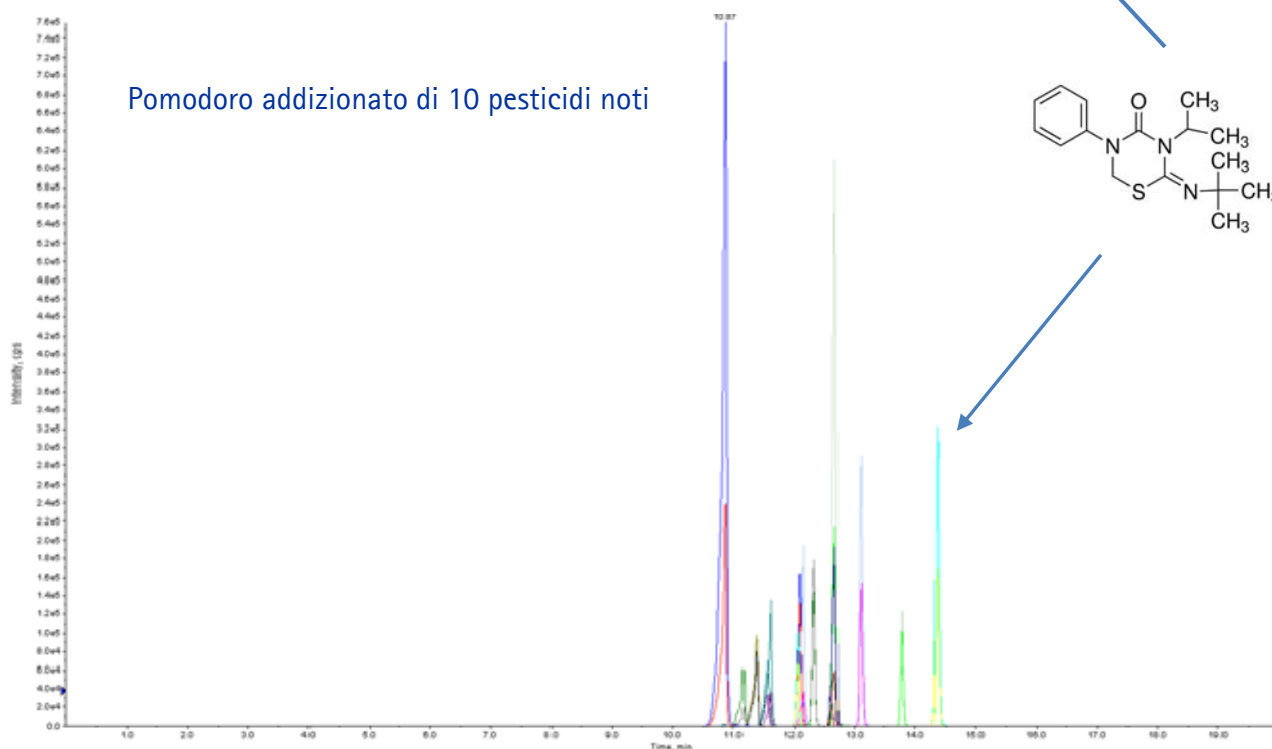
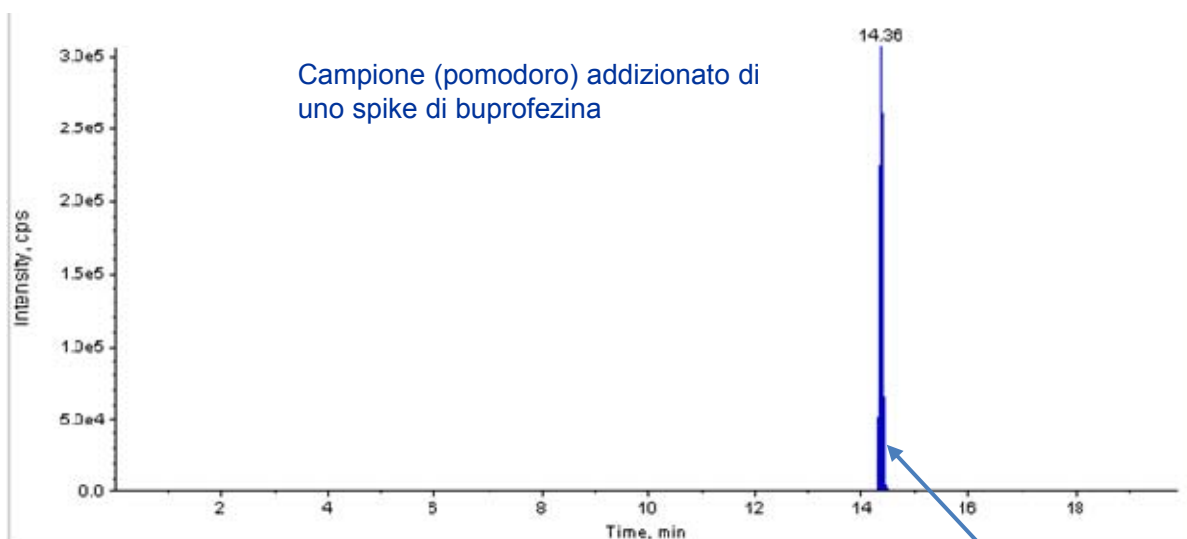
EN 15662:2009

Parametri MS-MS	
Polarità	+
CUR	40 psi
CAD	Elevata
IS	5500 V
Temp	400 °C
GS1	35 psi
GS2	45 psi

	Q1	Q3	DP-(V)	EP- (V)	CE- (V)	CXP-(V)	RT (min)
Azossistrobina 1	404,1	372,3	31	6,5	19	6	11,04
Azossistrobina 2	404,1	344,2	31	6,5	25	6	11,04
Buprofezina 1	306,1	201,3	50	4	17	4	13,34
Buprofezina 2	306,1	106,0	50	4	31	4	13,34
Fenpiroximate 1	422,3	366,3	46	6	21	4	14,62
Fenpiroximate 2	422,3	135,2	46	6	45	4	14,62
Exitiazox 1	353,3	228,0	41	6,5	19	4	14,02
Exitiazox 2	353,3	168,3	41	6,5	31	4	14,02
Miclobutanil 1	289,1	70,2	41	5,5	31	4	11,56
Miclobutanil 2	289,1	125,1	41	5,5	39	4	11,56
Penconazolo 1	284,2	159,1	36	5,5	35	4	12,28
Penconazolo 2	284,2	70,2	36	5,5	29	4	12,28
Tetraconazolo 1	372,1	159,0	46	4	39	4	11,79
Tetraconazolo 2	372,1	70,1	46	4	39	4	11,79
Tolilfluanide 1	347,2	137,2	41	5,5	37	4	12,23
Tolilfluanide 2	347,2	238,0	41	5,5	15	4	12,23
Triflossistrobina 1	409,3	186,1	41	4	23	4	12,85
Triflossistrobina 2	409,3	206,3	41	4	19	4	12,85
Triflumizolo 1	346,2	278,3	36	4	15	4	12,89
Triflumizolo 2	346,2	73,1	36	4	23	4	12,89

Determinazione dei pesticidi

EN 15662:2009



Tecniche strumentali dei metodi ufficiali

In questa raccolta prendiamo in esame diversi parametri che devono essere controllati dall'industria alimentare: le materie prima (non solo gli ingredienti, ma anche i mangimi e l'ambiente) e il processo produttivo, per essere certi di portare in tavola del cibo sicuro.

Questa raccolta propone esempi in cui metodi ufficiali sanciti da organizzazioni mondiali o da autorità locali vengono applicati per la determinazione di diversi parametri. Ma come sono stati scelti questi metodi e, ci sono alternative?

Le norme seguono lo sviluppo delle tecniche analitiche, ma, per la loro stessa natura, lo fanno lentamente. Una nuova tecnica dev'essere testata e saggiata per quanto riguarda l'affidabilità e l'effettiva possibilità d'impiego.

Un altro fattore importante è che l'elenco dei parametri critici e gli intervalli delle concentrazioni di alcuni componenti citati nelle norme cambiano nel tempo. Il numero delle molecole per cui si è dimostrata la pericolosità va aumentando a causa delle nuove tecnologie, dell'introduzione di nuovi materiali artificiali, ma anche grazie ad una conoscenza sempre più approfondita delle malattie. Ciò significa che dobbiamo sviluppare tecniche di determinazione per nuovi materiali, ma anche sviluppare tecniche innovative per nuove matrici o per intervalli di concentrazione molto ridotti.

Prima di cominciare una determinazione quantitativa, bisogna essere certi che la molecola o l'elemento bersaglio si trovi in una forma misurabile, che i nostri risultati non verranno influenzati da legami fisici o chimici e che la quantità determinata derivi effettivamente soltanto dal composto in esame. Nel caso degli alimenti, questo può spesso essere un processo problematico. Ecco perché, dove possibile, nell'industria alimentare si preferiscono metodi meno sensibili nei confronti dei contaminanti e che richiedono una procedura semplice per la preparazione dei campioni.

Nei capitoli che seguono, troverà una panoramica ed una breve presentazione delle tecniche citate in questa raccolta. Quella che proponiamo è una descrizione a grandi linee con alcuni accenni agli aspetti prima menzionati.

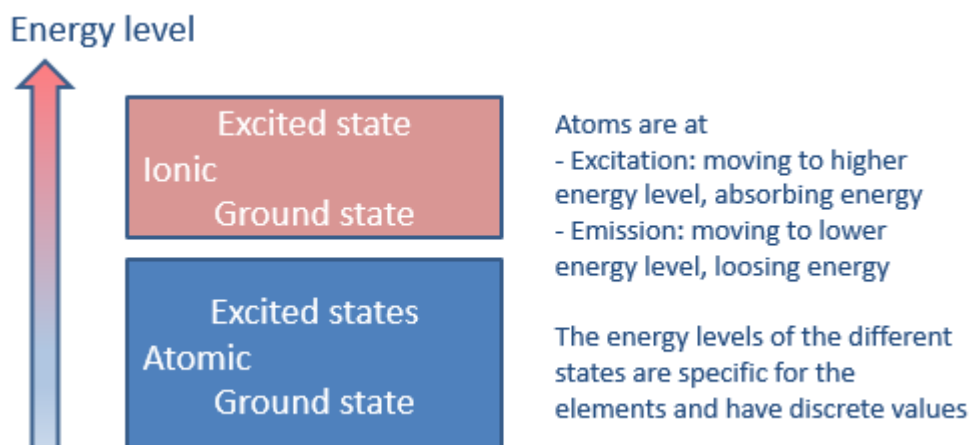
Tecniche strumentali

Spettroscopia atomica

Con la spettroscopia atomica possiamo effettuare determinazioni qualitative e quantitative degli elementi sulla base di una delle loro caratteristiche a livello atomico. La spettroscopia atomica può essere:

- di assorbimento (AAS)
- di emissione (ICP)

In entrambi i casi, per effettuare la determinazione dobbiamo portare l'elemento in esame in forma atomica.



La spettroscopia ottica è nata con Newton nel 17° secolo, ma c'è voluto parecchio perché si capisse che le linee di emissione e gli spettri di assorbimento fossero di origine atomica e si sviluppasse il loro impiego nelle tecniche analitiche.

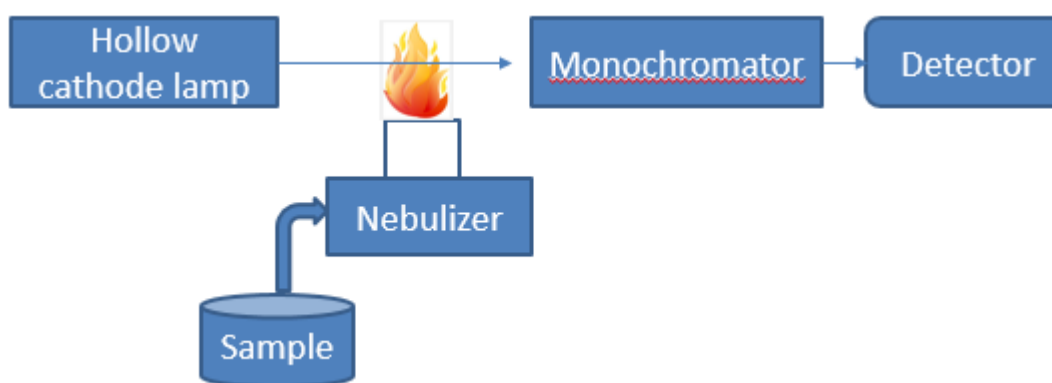
I primi passi furono mossi nella spettroscopia di emissione atomica e consentirono la scoperta di diversi nuovi elementi, come il cesio, il rubidio, il tallio, l'indio e il gallio.

Oggi, nella maggior parte dei casi la AAS o la ICP vengono utilizzate per la determinazione del contenuto di elementi.

Tecniche strumentali

Spettroscopia di assorbimento atomico (AAS)

L'assorbimento atomico quantifica l'assorbimento degli atomi allo stato energetico fondamentale in stato gassoso. Per effettuare una transizione ad un livello energetico superiore, gli atomi assorbono luce nell'intervallo del visibile o dell'UV. Utilizzando una curva di calibrazione, è possibile determinare la loro concentrazione in base all'assorbimento.



Si differenziano strumenti a singolo raggio e a doppio raggio. Negli strumenti a doppio raggio, la luce emessa dalla lampada viene suddivisa nel raggio "campione" e nel raggio di "riferimento". Normalmente, come sorgente di luce si utilizza una lampada a catodo cavo (HCL) o una lampada a scarica senza elettrodo (EDL).

L'atomizzazione è la separazione delle particelle, in questo caso fino a livello atomico, ottenuta esponendo l'analita a temperature elevate. Si differenziano sistemi a:

- fiamma
- tubo di grafite
- generatore di idruri gassosi

Questi atomizzatori aspirano il campione nel percorso del fascio di luce dove esso viene illuminato dalla lampada. La lampada è specifica per ogni elemento ed emette alla sua lunghezza d'onda caratteristica. Per le analisi quantitative sono necessari un bianco ed una curva di calibrazione.

Questo metodo è utilizzabile con 70 elementi circa. Limitazioni sono imposte dalla lunghezza d'onda: generalmente si può operare a lunghezze d'onda superiori a 200 nm, ma la linea di risonanza dell'idrogeno e di alcuni altri elementi è inferiore a 200 nm.

Tecniche strumentali

Spettroscopia di assorbimento atomico (AAS)

- Atomizzatore a fiamma

Per la fiamma è necessaria una miscela di un gas comburente e uno combustibile (come aria - acetilene, con una temperatura tipica intorno a 2.200 °C o N₂O-acetilene a circa 2.700 °C).

In media, solo il 5 -15 % del campione nebulizzato raggiungerà la fiamma.

Il volume del campione dev'essere intorno a 0,5 - 1,0 ml.

- Fornetto di grafite

Per la vaporizzazione, si utilizza un fornello nel quale il campione, introdotto nel tubo rivestito di grafite, viene riscaldato grazie al passaggio di corrente elettrica. Non richiede preparazione del campione e consente l'esame di piccoli campioni e l'analisi diretta di solidi. Il sistema è in grado di atomizzare l'intero campione e mantiene il campione atomizzato nel cammino ottico per un periodo di tempo prolungato, aumentando la sensibilità della tecnica. Questa tecnologia consente la determinazione soltanto di una quarantina di elementi, ma con volumi del campione nell'ordine dei microlitri e con limiti di rilevazione solitamente 100 -1.000 migliori rispetto a quelli dei sistemi con atomizzatore a fiamma.

- Generatore di vapori

Per separare l'analita dalla matrice del campione, possiamo utilizzare il metodo chimico della generazione di vapori, in cui una specie gassosa viene generata in seguito ad una reazione chimica. Possiamo distinguere tra:

1. metodo dei vapori freddi (CVAAS) per la determinazione del mercurio (Hg) e
2. metodo della generazione di idruri (HGAAS) per gli elementi che formano idruri covalenti gassosi (As, Bi, Ge, In, Pb, Sb, Se, Sn o Te).

Nella pratica si possono verificare interferenze da ionizzazione, da matrice, chimiche o del rumore di fondo che possono aumentare o ridurre l'intensità del segnale. Poiché esse possono influenzare significativamente i risultati, è necessario tenerne conto durante lo sviluppo del metodo.

Un buon esempio è quello del Cd (228.802 nm) e dell'As (228.812 nm). In questi casi è necessario cambiare la lunghezza d'onda o rimuovere uno dei due elementi.

Tecniche strumentali

Plasma accoppiato induttivamente (ICP)

Il plasma (dal greco "cosa modellata") è uno dei quattro stati fondamentali della materia, insieme a solido, liquido e gassoso e, rispetto ad essi, ha caratteristiche differenti. È possibile creare un plasma riscaldando un gas o sottoponendolo ad un forte campo elettromagnetico.

Il plasma accoppiato induttivamente (ICP) è una sorgente di atomizzazione in cui l'energia viene fornita da correnti elettriche prodotte per induzione elettromagnetica, cioè da campi magnetici variabili nel tempo.*

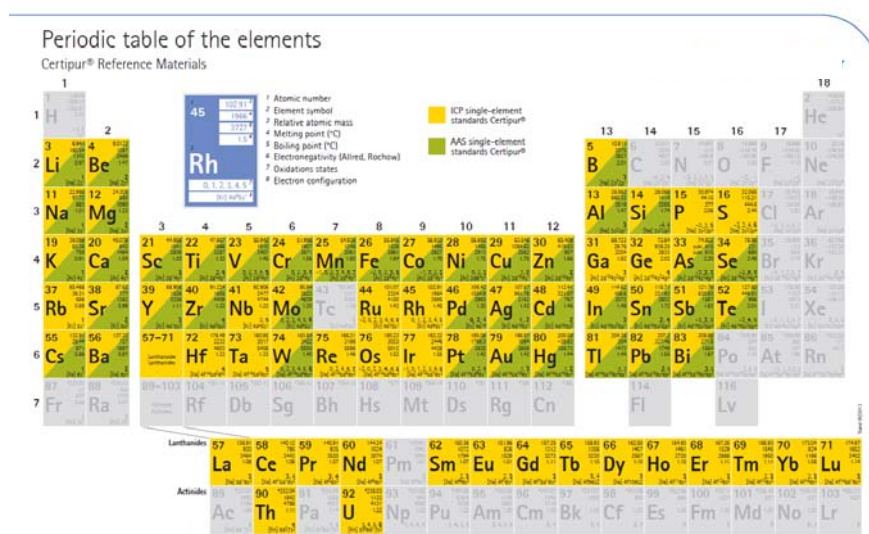
**[A. Montaser and D. W. Golightly, eds. (1992). Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry. VCH Publishers, Inc., New York]*

La spettrometria di emissione al plasma accoppiato induttivamente (ICP-ES) si basa sulla emissione energetica caratteristica degli atomi e degli ioni degli elementi contenuti nel campione che passano da uno stato eccitato a quello fondamentale.

Per questo processo si utilizza un plasma ad alta temperatura (un plasma di argon può raggiungere i 10.000 K). Per la rilevazione della luce emessa, si posizionano fisicamente uno o più tubi fotomoltiplicatori per la rilevazione di specifiche lunghezze d'onda o, nei sistemi più moderni, la rilevazione viene operata da fotorivelatori a semi-conduttore (dispositivi ad accoppiamento di carica, CCD).

Per calcolare la concentrazione degli elementi nel campione in esame le intensità misurate vengono confrontate con le intensità generate da standard a concentrazione nota. Anche con questa tecnica, determinate combinazioni di elementi possono causare interferenze. Nella maggior parte dei casi esse possono essere corrette da speciali software degli strumenti.

Periodic table of the elements
Certipur® Reference Materials



Legend:

- ICP single-element standards Certipur®
- AAS single-element standards Certipur®

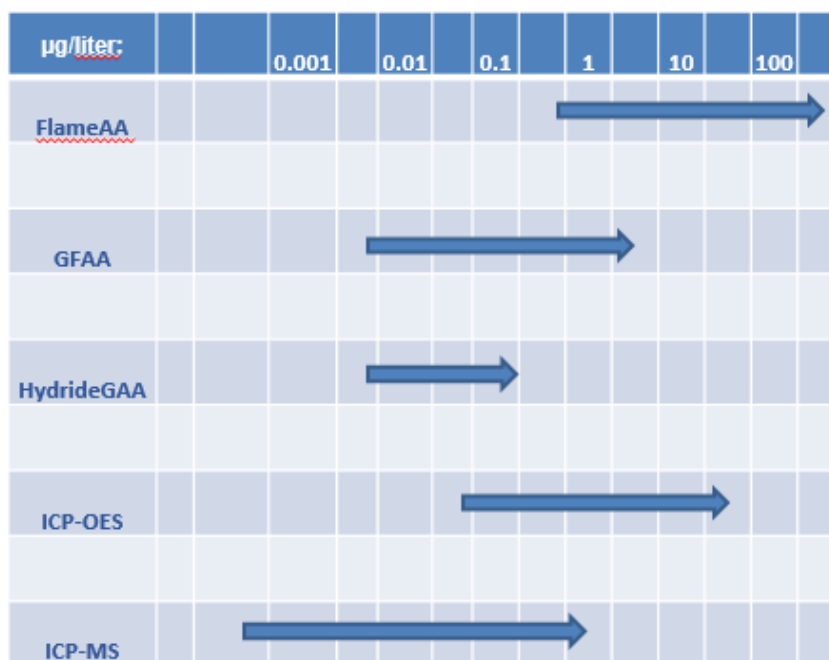
Tecniche strumentali

Spettrometria di massa con sorgente al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS)

Una speciale forma di ICP è la sua combinazione con la spettrometria di massa (ICP-MS) dove una sorgente a ICP ad alta temperatura è combinata con uno spettrometro di massa. Gli elementi contenuti nel campione vengono convertiti in ioni dall'ICP e quindi separati e rilevati dallo spettrometro di massa. Ciò fornisce numerosi vantaggi:

- matrici semplici e complesse possono essere analizzate con ridotte interferenze ad opera della matrice, grazie all'elevata temperatura della sorgente a ICP
- i limiti di rilevabilità sono solitamente comparabili o migliori di quelli ottenuti con la spettroscopia di assorbimento atomico in fornello di grafite (GFAAS)
- ottime capacità di rilevazione rispetto alla ICP-AES con la stessa produttività in termini di campioni
- maggiore capacità produttiva rispetto alla GFAAS
- è possibile ottenere informazioni isotopiche

La tabella mostra gli intervalli di rilevabilità tipici delle diverse tecniche di spettroscopia atomica:



Tecniche strumentali

pH

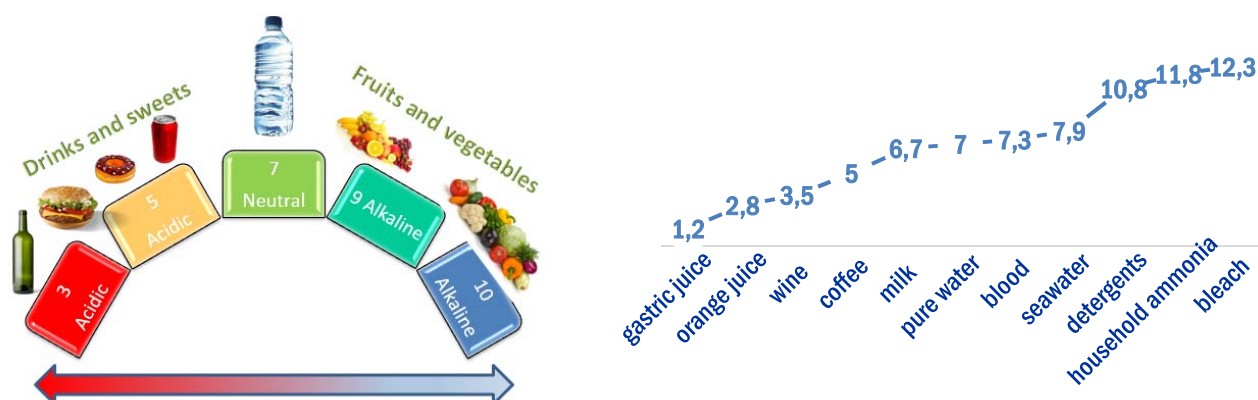
Il pH è un parametro rapidamente determinabile che consente di ottenere le prime informazioni sulla qualità di diversi tipi di materie prime alimentari o di alimenti trasformati.

Se, per esempio, consideriamo il latte, il suo pH è di circa 6,8 ed esso viene misurato al momento della mungitura e nel punto finale della distribuzione. In diversi processi, come la sterilizzazione, il pH viene controllato regolarmente, perché un valore più basso aiuta a velocizzare la procedura. Tuttavia, livelli di pH bassi possono anche indicare, ad esempio, che il bestiame è affetto da infezioni leucocitarie.

Un altro esempio è la carne. Il pH delle carcasse rappresenta un importante test iniziale per determinare le condizioni dell'animale prima della macellazione, la qualità dell'allevamento e eventuali segni di stress durante la macellazione. Il valore di pH tipico, compreso tra 5,4 e 7,0, può fornire indicazioni anche sull'adeguata conservazione della carne fresca, perché il pH varia tra le diverse parti dell'animale in base alla massa muscolare (ad esempio, il lombo presenta valori di pH più bassi).

Valori di pH troppo elevati sono indice di una perdita di aroma cui corrisponde un aspetto più scuro e, quindi, un ridotto valore di mercato. Oltre alla carne cruda, gli ingredienti usati per la produzione di prosciutto e salsicce vengono spesso refrigerati. Semplicemente controllando il pH al punto d'ingresso ed a quello di drenaggio del liquefattore, è possibile determinare se si sono verificate fuoriuscite di ammoniaca.

Alcuni tipici esempi dei valori di pH negli alimenti:



Tecniche strumentali

pH

Il concetto di pH fu introdotto per la prima volta nel 1909 dal chimico danese Søren Peder Lauritz Sørensen presso il Laboratorio Carlsberg e fu rivisto nel 1924 quando nacque la definizione moderna di pH. L'esatto significato di "p" nel termine "pH" è oggetto di discussione. Secondo la fondazione Carlsberg, pH sarebbe l'abbreviazione di "potere dell'idrogeno". Un'altra ipotesi è che rimandi alle espressioni latine pondus hydrogenii (quantità di idrogeno) o potentia hydrogenii (capacità dell'idrogeno), oppure a potential hydrogen (idrogeno potenziale).

Attualmente in chimica p ha il significato di "logaritmo negativo in base dieci", come nel termine pKa utilizzato per le costanti di dissociazione acida. Per definizione, il pH è una misura dell'acidità o dell'alcalinità di una soluzione acquosa. L'acidità o l'alcalinità di una soluzione acquosa è determinata dal numero relativo di ioni idrogeno (H^+) o idrossile (OH^-) presenti.

Solitamente si definisce il pH come il logaritmo negativo della concentrazione di ioni idrogeno:
 $pH = -\log_{10} [H^+]$.

Concentrazione di H^+ (mol/L)	Concentrazione di OH^- (mol/L)	pH
1	0,00000000000001	0
0,1	0,0000000000001	1
0,01	0,000000000001	2
0,001	0,00000000001	3
0,0001	0,0000000001	4
0,00001	0,000000001	5
0,000001	0,00000001	6
0,0000001	0,0000001	7
0,00000001	0,000001	8
0,000000001	0,00001	9
0,0000000001	0,0001	10
0,00000000001	0,001	11
0,000000000001	0,01	12
0,0000000000001	0,1	13
0,00000000000001	1	14

In questo modo si è ideata una semplice scala che va da 0 a 14: la scala del pH.
 Essa è logaritmica, pertanto il pH è una quantità adimensionale.

Tecniche strumentali

pH

In realtà, noi parleremo più precisamente di attività degli ioni idrogeno (H^+). Misurando il pH si determina soltanto la concentrazione degli ioni idrogeno attivi in una soluzione, non la loro concentrazione totale. Solo nelle soluzioni diluite tutti gli anioni ed i cationi sono così lontani l'uno dall'altro che la concentrazione e l'attività degli ioni H^+ sono identiche.

Questo è il motivo per cui il pH osservato cambia nell'acqua pura al variare della temperatura. Se la temperatura dell'acqua pura sale, aumenta la dissociazione in ioni idrogeno e ioni idrossile. Poiché il pH è correlato alla concentrazione dei soli ioni idrogeno dissociati, il valore di pH diminuisce, benché l'acqua sia sempre neutra.

Secondo l'equazione di Nernst:

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln(a_{H^+}) = E^0 - \frac{2.303RT}{F} pH$$

E è un potenziale misurato,
 E^0 è il potenziale d'elettrodo standard
 R è la costante dei gas,
 T è la temperatura in Kelvin,
 F è la costante di Faraday.

Nel caso degli ioni H^+ , il numero di elettroni trasferito è uguale a uno.

Ciò significa che il potenziale d'elettrodo è proporzionale al pH quando il pH è definito in termini di attività e il pH di un campione dato cambierà al variare della temperatura del campione stesso.

Solitamente per determinare il pH si utilizzano cartine indicatrici o strumenti di misura che utilizzano un elettrodo a vetro sensibile al pH, un elettrodo di riferimento e un sensore di temperatura. Oppure, i due elettrodi possono essere riuniti in uno solo, detto "combinato".

L'elettrodo per il pH è costruito utilizzando un vetro di formulazione particolare, sensibile al pH una volta a contatto con la soluzione, che sviluppa un potenziale (vtaggio) proporzionale al pH della soluzione. L'elettrodo di riferimento serve a mantenere un potenziale costante a qualunque temperatura.

Tecniche strumentali

pH

Nella determinazione del pH, la calibrazione dell'elettrodo è molto importante: il potenziale è proporzionale al pH, ma per conoscerne il valore assoluto dobbiamo usare delle soluzioni di calibrazione, meglio se nell'intervallo o vicino all'intervallo di pH del nostro campione.

La maggior parte degli strumenti offre il calcolo automatizzato della curva di calibrazione con l'impiego di 2 o 3 tamponi di calibrazione.

Misurare il pH sembra semplice, ma diversi fattori potrebbero indurre in errore:

- qualità del tampone di calibrazione
- problemi nel processo di calibrazione
- frequenza di calibrazione
- errori dovuti al funzionamento dell'elettrodo a pH alti o bassi (errore alcalino, errore acido)
- correttezza della compensazione della temperatura
- età dell'elettrodo



Certipur® Standard reference materials and buffers

Not all reference materials
are the same ...



Merck Millipore is a division of  MERCK

Tecniche strumentali

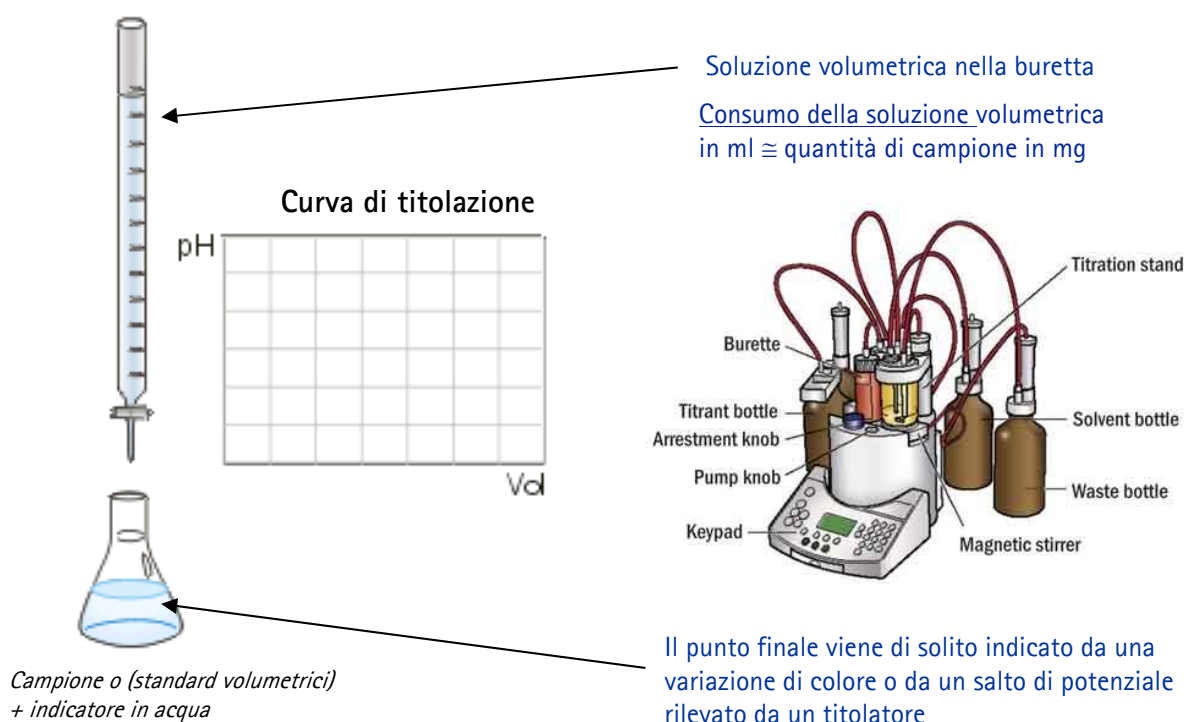
Titolazione

Per i campioni alimentari, la titolazione è un metodo assai diffuso per la determinazione dei diversi ingredienti.

La titolazione può essere effettuata manualmente o con l'impiego di strumenti. Può essere facilmente adattata alle esigenze aziendali, a seconda del numero e della diversità dei campioni, del tempo, del budget e delle competenze del personale a disposizione del laboratorio.

Principio

La titolazione è una tecnica analitica che consente di determinare quantitativamente una determinata sostanza (analita) sciolta in un campione.

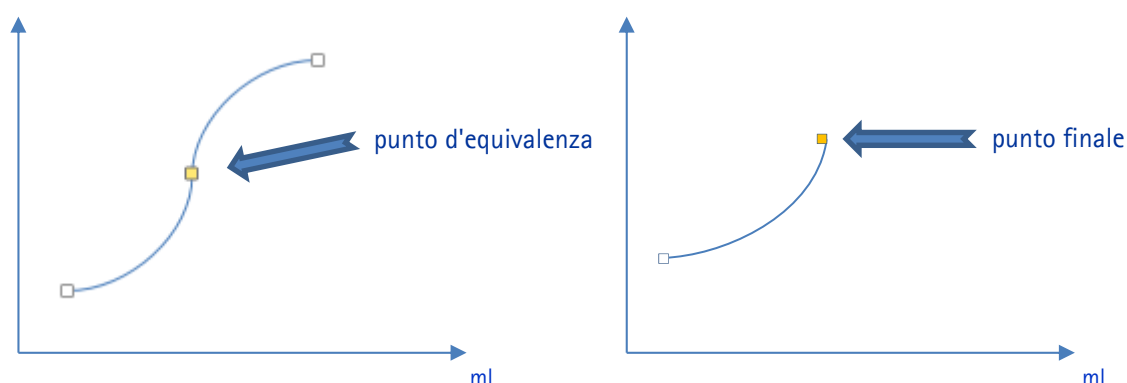


La titolazione volumetrica si basa su una reazione chimica completa tra l'analita e un reagente (titolante) a concentrazione nota che viene aggiunto al campione.

Tecniche strumentali

Titolazione

Si possono distinguere diversi tipi di titolazione sulla base del tipo di reazione, del metodo di rilevazione, o sul tipo di curva di titolazione desiderata (punto d'equivalenza o punto finale).



Le titolazioni classiche venivano effettuate usando un indicatore di viraggio (vedere esempi per la titolazione acido/ base in tabella).

Attualmente è più comune utilizzare un elettrodo per la rilevazione anche nelle titolazioni manuali.

Indicatore	Colore forma acida	Intervallo di viraggio	Colore forma basica
Violetto di metile	Giallo	0,0-1,6	Violetto
Blu di bromofenolo	Giallo	3,0-4,6	Blu
Metilarancio	Rosso	3,1-4,4	Giallo
Rosso metile	Rosso	4,4-6,3	Giallo
Tornasole	Rosso	5,0-8,0	Blu
Blu di bromotimolo	Giallo	6,0-7,6	Blu
Fenolftaleina	Incolore	8,3-10,0	Rosa
Giallo di alizarina	Giallo	10,1-12,0	Rosso

Tecniche strumentali

Titolazione

Alcuni esempi di tipiche titolazioni di campioni alimentari sono:

- acido/base valore di saponificazione, con un elettrodo a vetro per pH
- redox contenuto di vitamina C, con un elettrodo redox al platino
- complessometriche contenuto di calcio, con sensore fotometrico o ione-selettivo
- termometriche contenuto salino (come sodio), con un sensore di temperatura
- precipitometriche contenuto di sale (come cloruri), con un elettrodo ad anello d'argento

Titolante

Possiamo capire l'importanza della concentrazione esatta del titolante (il cosiddetto titolo), se pensiamo che il nostro risultato viene calcolato sulla sua base.

La stabilità del titolante nel tempo deve essere presa in considerazione caso per caso. Diversi fattori possono causare uno scostamento del titolo:

- inaccurata preparazione del titolante
- purezza del titolante utilizzato
- variazioni dovute ad instabilità

Titripur®
The Measure of all Things
Titration Guide for
Titer Determination



Merck Millipore is a division of MERCK

Un esempio di quest'ultimo caso sono i titolanti basici, come gli idrossidi.

Essi nel tempo assorbono anidride carbonica dall'aria e la loro molarità cambia. Un altro esempio è la nota titolazione secondo Karl Fischer in cui è praticamente inevitabile che dell'umidità ambientale raggiunga il titolante.

Un'efficace determinazione della concentrazione è possibile grazie alla determinazione del titolo, cioè alla titolazione di una sostanza di cui si conosce esattamente la concentrazione, solitamente uno standard primario.

Tecniche strumentali

Tracciabilità di soluzioni volumetriche e standard volumetrici agli standard di riferimento (SRM) del NIST

Metodo volumetrico	Standard di riferimento (SRM)	Soluzione volumetrica	Standard volumetrici Merck Millipore
Acidimetria	Tris-(idrossimetil)amminometano (NIST)	HCl	Standard volumetrico di tris-(idrossimetil)-aminometano, standard secondario per acidimetria, tracciabile allo standard di riferimento (SRM) del NIST Certipur® Reag. USP 1.02408.0080
		HCl	Standard volumetrico di carbonato di sodio, standard secondario per acidimetria, tracciabile allo SRM del NIST Certipur® Reag. Farm Eu 1.02405.0080
Alcalimetria	Idrogenoftalato di potassio (NIST)	NaOH	Standard volumetrico di carbonato di sodio, standard secondario per acidimetria, tracciabile allo SRM del NIST Certipur® Reag. Farm Eu 1.02405.0080
	Acido benzoico (NIST)	NaOH	Standard volumetrico di idrogenoftalato di potassio, standard secondario per alcalimetria, tracciabile allo SRM del NIST Certipur® Reag. Farm. Eu. Reag.. USP 1.02400.0080
Argentometria	Cloruro di potassio (NIST)	Soluzione di AgNO ₃	Standard volumetrico di acido benzoico, standard secondario per alcalimetria, tracciabile allo SRM del NIST Certipur® Reag. Farm. Eu. Reag.. USP 1.02401.0060
Reduttometria	Diclorato di potassio (NIST)	Soluzione di tiosolfato di sodio	Standard volumetrico di cloruro di sodio, standard secondario per argentometria, tracciabile allo SRM del NIST Certipur® 1.02406.0080
		Soluzione di tiosolfato di sodio	Standard volumetrico di bicromato di potassio, standard secondario per titolazioni redox, tracciabile allo SRM del NIST Certipur® Reag. USP 1.02403.0100
Ossidometria	Ossalato disodico (NIST)	Soluzione di permanganato di potassio	Standard volumetrico di solfato di etilendiammonio ferroso (II), standard secondario per titolazioni redox, tracciabile allo SRM del NIST Certipur® 1.02402.0080
		Soluzione di permanganato di potassio	Standard volumetrico di ossalato disodico, standard secondario per titolazioni redox, tracciabile allo SRM del NIST Certipur® Reag. USP 1.02407.0060
Complessometria	Zinco (NIST)	EDTA (soluzione di Titrplex III)	Standard volumetrico di zinco, standard secondario per complessometria, tracciabile allo SRM del NIST Certipur® Reag Farm Eu 1.02409.0100
		EDTA (soluzione di Titrplex III)	Standard volumetrico di carbonato di calcio, standard secondario per complessometria, tracciabile allo SRM del NIST Certipur® Reag. USP 1.02410.0100

Tecniche strumentali

Titolazione

Altri possibili cause d'errore:

Sensore

- Quando si effettua una titolazione al punto finale di pH, è necessario fare attenzione a tutti i fattori citati nel capitolo dedicato al pH
- In generale, per poter contare sui livelli di sensibilità e tempi di risposta richiesti, è necessario operare un'adeguata manutenzione dell'elettrodo

Temperatura

- Quando si effettua una titolazione al punto finale di pH, è necessario fare attenzione a tutti i fattori citati nel capitolo dedicato al pH
- In generale, qualunque titolazione volumetrica è influenzata dalle variazioni di densità dovute al variare della temperatura e dalle conseguenti variazioni di concentrazione (ad esempio, in estate, effettuando una titolazione al mattino a 22°C e ripetendola al pomeriggio quando la temperatura del laboratorio sarà salita fino a 32°C, si otterrà un titolo decisamente diverso)

Condizionamento di strumenti/ attrezzatura

Fare attenzione ad utilizzare la vetreria appropriata e a non dimenticare della regolare manutenzione

Trattamento dei campioni

Per poter contare su risultati affidabili, è necessario passare in rassegna l'intera procedura di titolazione, inclusi campionamento, trattamento/ stoccaggio dei campioni, determinazione dei pesi (e quindi taratura della bilancia).



Tecniche strumentali

Titolazione Karl Fischer

Un particolare tipo di titolazione è la cosiddetta titolazione Karl Fischer per la determinazione del contenuto di acqua, parametro che riveste un ruolo importante per la qualità e la durata della maggior parte dei prodotti alimentari.

Ma come si può determinare in maniera specifica il contenuto di acqua, in tutte le sue forme, ma senza altri prodotti di decomposizione? Ciò è possibile con strumentazioni grandi e costose (GC, NMR, ecc.), oppure con la titolazione KF specifica per l'acqua.

La reazione



Nella reazione, l'acqua e lo iodio vengono consumati in quantità equimolari, il che significa che conoscendo la quantità di I_2 consumata, si conoscerà anche la quantità d'acqua che era presente nel campione.

Solitamente il punto finale viene determinato con un metodo bipotenziometrico.

Si distinguono il metodo volumetrico e quello coulometrico.

	Volumetrico	Coulometrico
Per campioni con	Elevato contenuto di acqua	Acqua nell'ordine delle ppm
Titolazione	Bipotenziometrico	Bipotenziometrico
Generazione di iodio	Introdotta con i reagenti	Generato elettroliticamente

Regola empirica

Campioni con acqua > 1% = metodo volumetrico

Campioni con acqua < 1% = metodo coulometrico

Tecniche strumentali

Titolazione Karl Fischer

Nella maggior parte dei casi, l'unica procedura necessaria per la preparazione dei campioni è l'omogeneizzazione che può essere operata con un omogeneizzatore direttamente nel recipiente di titolazione.

In generale, nelle titolazioni KF è necessario tenere conto di alcune reazioni collaterali se sono presenti aldeidi e chetoni; tuttavia, nei campioni alimentari solitamente la concentrazione di queste molecole è molto ridotta e non può influenzare in modo significativo il risultato della titolazione.

Durante la titolazione, è bene ricordare alcuni aspetti importanti:

- il campione può contenere acqua in diverse forme (superficie, massa interna, complessi); pertanto, bisogna sapere cosa si misura
- scegliere il metodo adatto al contenuto d'acqua atteso
- verificare se il titolo è ancora corretto
- pH e temperatura possono influire sul risultato



Apura[®]
For highest standards.

Water determination according to Karl Fischer



Merck Millipore is a division of  MERCK

Tecniche strumentali

Cromatografia

Cromatografia è un termine collettivo con cui si designano diverse tecniche per la separazione di miscele. Un vettore/carrier, detto fase mobile, trasporta la miscela campione attraverso un supporto fisso con/senza del materiale modificato chimicamente, detto fase stazionaria. I diversi costituenti del campione interagiscono diversamente con la fase stazionaria e si muovono a velocità differenti, separandosi. La separazione si basa su una diversa ripartizione tra fase mobile e fase stazionaria.

Diverse sono le possibilità di scelta per quanto riguarda:

- materiale della fase stazionaria
- composizione della fase mobile
- parametri fisici (temperatura, pressione, lunghezza, diametro)

In base alla fase mobile e a quella stazionaria possiamo distinguere diverse tecniche cromatografiche.

- | | |
|--|-------------------|
| - Gascromatografia (GC): | gas + colonna |
| - Cromatografia liquida (LC): | liquido + colonna |
| - Cromatografia su strato sottile (TLC): | liquido + lastra |

Se si ha un grosso numero di campioni con una matrice complessa e si desidera una procedura minima per la preparazione dei campioni, si può ricorrere alla cromatografia su strato sottile. Quando i prodotti di interesse sono volatili, la tecnica preferita è la gascromatografia. Se si desidera cercare contaminanti in concentrazioni ridotte, la cromatografia liquida ad ultra/alte prestazioni (HPLC/UHPLC) è un'alternativa possibile perché offre un'efficienza di separazione molto alta ed eluisce le molecole in esame in picchi affilati che consentono grande sensibilità nella rivelazione.

Dopo la separazione cromatografica deve esserci uno strumento per la rivelazione e la determinazione quantitativa dei composti. Tipologie differenti di molecole e diversi livelli di concentrazione richiedono tecniche di rivelazione differenti.

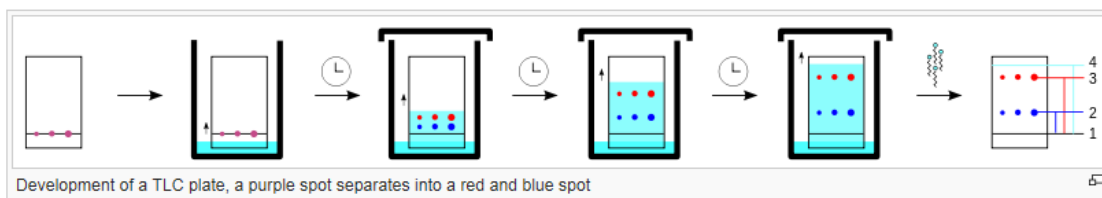
Per scegliere il metodo di rivelazione più appropriato, bisogna tenere in considerazione diversi parametri importanti: natura chimica degli analiti, possibili interferenze, limite di rivelazione (LOD) e limite di quantificazione (LOQ) richiesti, intervallo di linearità, disponibilità e/o costo del rivelatore.

Tecniche strumentali

Cromatografia su strato sottile (TLC)

La cromatografia su strato sottile (TLC) è una tecnica nella quale i composti vengono separati su un sottile strato di materiale adsorbente, solitamente gel di silice su una lastra di vetro, un foglio di alluminio o una lamina di plastica.

La TLC è una tecnica immediata ed estremamente economica, perché permette di operare la preparazione dei campioni e la separazione cromatografica in una sola fase grazie ad una estrema tolleranza nei confronti della matrice dei campioni.



Si deposita su una lastra una macchiolina di soluzione contenente il campione. Si versa in una camera di separazione una piccola quantità di un appropriato solvente (eluente). Quindi, si introduce nella camera la lastra da TLC, in modo che la(e) macchia(e) del campione non tocchino la superficie dell'eluente nella camera e si chiude il coperchio. Il solvente risale nella lastra per capillarità, raggiunge il campione e lo trasporta verso l'alto lungo la lastra.

I composti della miscela si separano a causa delle diverse affinità per la fase stazionaria e della differenza di solubilità nel solvente. In alcuni casi, quando si ha a che fare con composti colorati, è possibile visualizzarli sulla lastra. Le opzioni più comuni sono:

1. impiego di soluzioni specifiche che reagiscono con l'analita generando colore (ad es. lo iodio)
2. luce UV (366 nm per alcuni composti organici fluorescenti o 254 nm con lastre ricoperte di un adsorbente fluorescente a questa lunghezza d'onda su cui le macchie di analita smorzano la fluorescenza)
3. dopo l'eluizione, si può utilizzare un'altra tecnica analitica per identificare i composti (come la MS)

La TLC è spesso utilizzata in modalità manuale, ma esistono diverse possibilità per automatizzare l'applicazione dei campioni, la rivelazione o l'esame dei risultati e la documentazione.

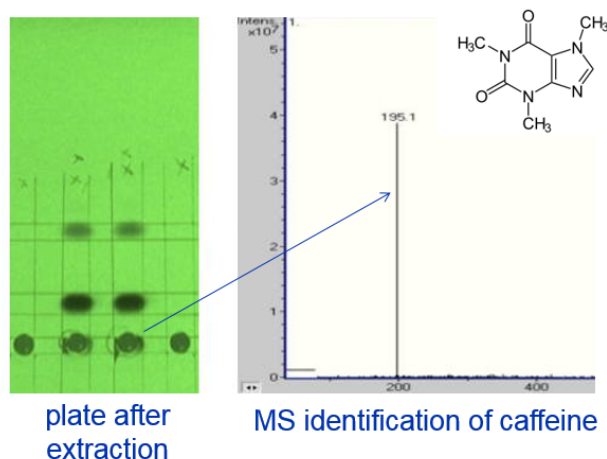
Tecniche strumentali

Cromatografia su strato sottile accoppiata alla rivelazione in spettrometria di massa (TLC-MS)

Negli ultimi anni, sono emerse diverse tecniche di accoppiamento con la spettrometria di massa che consentono di ampliare l'ambito di questa applicazione, consentendo un'inequivocabile identificazione delle sostanze.

La tecnica più comunemente utilizzata per accoppiare TLC e MS è il campionamento basato sull'eluizione. Un sistema semiautomatico estrae gli analiti dalla lastra per TLC e li trasferisce on-line nello spettrometro di massa. È utilizzabile con tutti i tipi di lastre e con qualunque eluente compatibile con la LC-MS. L'interfaccia può essere facilmente connessa a qualunque tipo di spettrometro di massa accoppiato alla LC. Pertanto i campi di applicazione sono molto vasti.

Forse il maggior punto di forza dell'accoppiamento basato sull'eluizione è la sua completa autonomia dallo spettro-metro di massa: qualunque sistema MS può essere utilizzato, in teoria. Inoltre, è possibile anche l'estrazione off-line in provette, se si intende effettuare ulteriori analisi (per esempio con l'NMR). Nella TLC-MS on-line, l'interfaccia si trova tra la pompa dell'HPLC e il sistema MS ed è di fatto un dispositivo "plug and play". Si può ben dire che tali sistemi rappresentano il minore degli ostacoli all'impiego dei sistemi TLC-MS e possono essere utilizzati con quasi tutti i tipi di lastre.



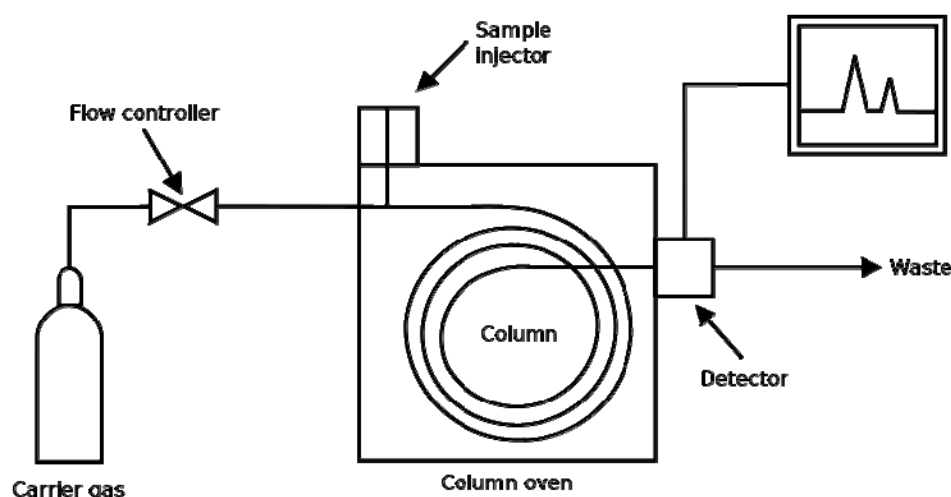
Tecniche strumentali

Gascromatografia (GC)

La gascromatografia (GC) è una tecnica che consente la separazione di composti volatili, termicamente stabili. È una tecnica semplice, facile da utilizzare e facilmente automatizzabile.

Nella gascromatografia si utilizza un gas per trasportare una miscela attraverso un letto di fase stazionaria, utilizzando come forza la pressione. Pertanto il sistema comprende una sorgente di gas (bombola o generatore di gas) completa di dispositivi per il controllo del flusso di gas. I gas di trasporto più comuni sono elio, idrogeno e azoto.

Servono, inoltre, un forno, un iniettore per l'introduzione del campione, la colonna e un rivelatore. L'iniezione deve avvenire in pressione. La fase stazionaria è una colonna capillare la cui superficie interna può essere soggetta a diverse modificazioni.



I rivelatori più comunemente utilizzati sono quelli a ionizzazione di fiamma (FID) e a conducibilità termica (TCD).

I rivelatori TCD sono praticamente universali e possono essere utilizzati per rivelare qualunque componente che non sia il gas di trasporto (purché abbia una conducibilità termica diversa da quella del gas di trasporto e modifichi, quindi, la temperatura del rivelatore), mentre i rivelatori FID sono sensibili prevalentemente nei confronti degli idrocarburi.

Negli ultimi anni, l'impiego della massa (MS) accoppiata alla GC è diventata sempre più comune, perché conferisce alle analisi grande efficacia e sensibilità, anche con piccoli quantitativi di campione.

Tecniche strumentali

Cromatografia liquida (LC)

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) è una tecnica di separazione in cui si sceglie la modalità di separazione più opportuna in base alla solubilità del campione e a come gli analiti in esame si differenziano dagli altri composti o dalla matrice del campione. Nella modalità a fase inversa (RP), la fase mobile è polare e la fase stazionaria non polare. La maggiore caratteristica distintiva degli analiti è la loro idrofobicità; i campioni devono essere solubili in acqua o in un solvente organico polare.

Nella modalità in fase diretta (NP), la fase mobile è apolare, mentre la fase stazionaria è più polare; gli analiti si distinguono soprattutto per la loro NON idrofobicità; il campione deve essere solubile in un solvente idrofobico come l'esano e la fase mobile è un solvente di forza debole-moderata nei confronti del campione.

Nella modalità HILIC, le fasi mobili sono le stesse della fase inversa, ma la loro forza di eluizione è opposta. Gli analiti si differenziano per la loro idrofilia e il campione dev'essere solubile in un solvente organico polare o in miscele solvente organico-acqua. Per i composti polari e idrofili, l'approccio tradizionale prevedeva l'impiego della cromatografia di coppia ionica a fase inversa, utilizzato per gli analiti ionici o ionizzabili. In questo caso, la fase mobile contiene un tampone, un controione e un solvente organico polare. Controioni tipici sono gli alchilsolfonati (acido eptansolfonico, acido ottansolfonico) per le basi e ammine quaternarie (tetrabutilammonio cloruro) per gli acidi.

Scelta della colonna per HPLC opportuna

La risoluzione cromatografica è influenzata prevalentemente dalla selettività (α). Cambiare la composizione della fase mobile o della fase stazionaria è il modo più efficace per ottimizzare la selettività, mentre dimensioni delle particelle e dei pori, lunghezza della colonna e forza della fase mobile influiscono molto meno. Pertanto, se i risultati sono insoddisfacenti o non si verifica alcuna ritenzione, è meglio modificare la selettività, cambiando la tipologia di colonna e/o la fase mobile.

La risoluzione (R_s o R) può essere espressa sulla base di tre parametri (k , α e N) direttamente correlati alle condizioni sperimentali: k è il fattore di ritenzione medio per le due bande, N è il numero dei piatti della colonna e α è il fattore di separazione (o fattore di selettività). I parametri k e α sono determinati dalle condizioni sperimentali (composizione della fase mobile; chimica della fase stazionaria e temperatura), mentre N dipende dalla lunghezza della colonna, dalle dimensioni delle particelle e da quelle dei pori.

Tecniche strumentali

Cromatografia liquida (LC)

Scelta della colonna del giusto formato

Scegliere la configurazione della colonna migliore, che offra una durata minima delle analisi con efficienza e risoluzione elevate. Tener conto degli obiettivi del metodo analitico, per essere certi che il formato prescelto sia in grado di offrire la risoluzione adeguata per la propria applicazione, ad es. scegliere la lunghezza, il diametro interno, la dimensione delle particelle e dei pori giusta. Se si desidera una maggiore capacità di carico della colonna, scegliere una colonna più grande (sia in lunghezza che per il diametro) che possa contenere una massa maggiore. Se si lavora con rivelatori tradizionali come UV, RI, FL ecc, sono adatte le colonne con d.i. di 4,6 o 3,0 mm, mentre per la MS generalmente si consigliano d.i. di 2 mm o inferiori.

Se si è raggiunta una risoluzione sufficiente, si potrebbe provare a velocizzare la separazione aumentando il flusso o riducendo la lunghezza della colonna. Le fasi stazionarie a base di silice sono fisicamente robuste e, essendo compatibili con un'ampia gamma di solventi polari e apolari, non sono soggette a contrazione e rigonfiamento; pertanto, rappresentano spesso la prima scelta. La maggior parte delle colonne a base di silice sono stabili tra pH 2 e 7,5; tradizionalmente, le fasi stazionarie polimeriche, offrono maggiore stabilità ai pH estremi. Le fasi stazionarie polimeriche sono comprimibili e con alcuni solventi possono contrarsi o rigonfiarsi. Pertanto, se si utilizza una colonna polimerica è necessario prestare attenzione; inoltre, la contropressione massima sopportabile sarà minore rispetto alle corrispondenti fasi stazionarie a base di silice. Le più recenti fasi stazionarie a base di silice ad elevata purezza, come la Purospher STAR, sono stabili tra pH 1,5 e 10,5, grazie ai diversi punti di attacco dei gruppi funzionali superficiali sulle particelle di silice ottenuti tramite una modificazione polimerica.

Dimensioni delle particelle

Particelle di dimensioni minori offrono maggiore efficienza nella separazione e migliore risoluzione cromatografica rispetto alle particelle più grandi. Tuttavia, le particelle più grandi assicurano flussi più veloci con minore contropressione e sono meno sensibili all'intasamento e, quindi, più tolleranti nei confronti della matrice del campione. Normalmente le particelle hanno diametro compreso tra 3 e 20 μm , ma sono disponibili anche nuove particelle da 2 μm che sulle colonne Purospher Star più corte consentono di massimizzare la risoluzione. Le particelle da 5 μm rappresentano il miglior compromesso tra efficienza e contropressione per la maggior parte delle applicazioni che richiedono una normale capacità produttiva.

Contenuto di carbonio

Per le fasi inverse a base di silice, il contenuto di carbonio indica la quantità di gruppi funzionali legati al materiale di supporto. Le fasi con un minore contenuto di carbonio sono più debolmente idrofobiche, il che può ridurre in modo significativo i tempi di ritenzione rispetto alle fasi con contenuto di carbonio maggiore. Tuttavia, un maggior contenuto in carbonio conferirà alla colonna maggiore capacità e migliore risoluzione, specialmente per i composti con idrofobicità simile. Il contenuto di carbonio non è un parametro rilevante per le colonne utilizzate in fase diretta o in modalità HILIC.

Tecniche strumentali

Cromatografia liquida (LC)

Dimensioni dei pori

Scegliere pori abbastanza ampi da poter racchiudere completamente la molecola in esame. Se la molecola è più grande dei pori, si verificheranno fenomeni di esclusione dimensionale e la ritenzione sarà difficile se non impossibile. In generali, materiali per l'impaccamento con dimensioni dei pori inferiori presentano maggiori aree superficiali e maggiori capacità rispetto a quelli con pori di maggior diametro. Un'area superficiale maggiore normalmente è indice di un più alto numero di pori e, quindi, di una maggiore capacità complessiva. Aree superficiali più piccole sono più rapide da equilibrare, il che è importante per le eluizioni su gradiente. Pori più grandi sono preferibili per l'interazione con molecole di grandi dimensioni, come le proteine.

Endcapping

Le fasi inverse a base di silice presentano silanoli liberi che interagiranno con i composti polari. La loro disattivazione mediante "endcapping" minimizzerà tali reazioni secondarie. Se non si desiderano interazioni con i composti polari, scegliere fasi stazionarie "endcapped". Se si desidera aumentare la selettività polare, per una maggiore ritenzione dei composti organici polari, scegliere fasi "non encapped".

Scelta della fase mobile: solventi e tamponi

La forza del solvente della fase mobile è una misura della sua capacità di eluire gli analiti dalla colonna. Essa è generalmente controllata dalla concentrazione del solvente di forza maggiore; per esempio, nell'HPLC a fase inversa con fasi mobili acquose, il solvente forte sarà il modificatore organico; in fase normale e HILIC, sarà il più polare. Vale la pena di notare che per le separazioni in fase diretta è più semplice lavorare con le fasi stazionarie che legano gruppi ciano rispetto a quelle in silice tal quale. L'obiettivo è quello di trovare la concentrazione giusta del solvente forte. Con un gran numero di campioni, ci sarà un intervallo di forze del solvente utilizzabile entro i suddetti limiti di capacità. Anche altri fattori (come il pH) possono influenzare la ritenzione complessiva degli analiti.

Rivelazione

Per le analisi in tracce si possono utilizzare rivelatori a fluorescenza, elettrochimici o spettrometri di massa. I rivelatori UV sono i più comunemente utilizzati perché questa tecnica di rivelazione è robusta, economica e versatile. Moltissimi composti assorbono la luce, soprattutto alle basse lunghezze d'onda dello spettro UV. È possibile utilizzare un rivelatore a scansione rapida a serie di diodi (DAD) e consentire il monitoraggio di più lunghezze d'onda contemporaneamente. Il lato negativo sta nel fatto che i rivelatori UV non sono specifici nei confronti dell'analita e sono utilizzabili solo se l'analita assorbe più luce della matrice del campione alla lunghezza d'onda stabilita.

Ulteriori informazioni sono disponibili nel nostro Chrombook.

Tecniche strumentali

Spettrometria di massa (MS)

La spettrometria di massa è oggi considerata una tecnica di rivelazione di routine consolidata. Gli spettrometri di massa possono essere accoppiati a diverse tecniche di separazione come la cromatografia liquida (LC), la cromatografia su strato sottile (TLC) o la gascromatografia (GC); tra queste l'accoppiamento con la LC è di gran lunga la situazione più comune. A differenza dei rivelatori più semplici (UV, RI FL, ecc), lo spettrometro di massa fornisce informazioni sui pesi molecolari e dettagli sulla struttura degli analiti e offre quindi la possibilità di discriminare tra picchi coeluenti se utilizzata in modalità SIM (monitoraggio di ioni selezionati). Anche se ciò riduce i requisiti per quanto riguarda la ritenzione e la risoluzione cromatografica prima della rivelazione, è tuttavia sempre meglio riuscire e ritenere gli analiti ed a risolvere i picchi completamente, per evitare fenomeni di soppressione o di accrescimento ionico.

Gli analizzatori di massa possono essere a quadrupolo, magnetici, a tempo di volo, a trappola ionica o a risonanza ionica ciclotronica. L'analizzatore a quadrupolo è costituito da quattro barre parallele cui sono applicati potenziali continui (DC) e alternati a radiofrequenza (RF). Il sistema HPLC separa gli analiti disciolti a pressione ambiente (760 Torr) e trasmette il campione allo spettrometro MS dove ha luogo la rivelazione del campione ionizzato allo stato gassoso in condizioni di vuoto spinto (10⁻⁵-10⁻⁶ Torr). Il trasferimento della soluzione dell'analita dalla LC alla MS viene ottenuta tramite un'interfaccia. L'interfaccia gradualmente converte il campione in aerosol, lo ionizza e rimuove il solvente. Gli ioni vengono poi focalizzati e fatti passare lungo la parte centrale del quadrupolo. I loro movimenti dipendono dai campi elettrici, così che solo gli ioni aventi un particolare rapporto massa su carica (m/z) compiranno un percorso stabile fino al rivelatore. La RF varia, in modo che ioni di diverso m/z possano raggiungere il rivelatore e generare uno spettro di massa.

A seconda delle caratteristiche fisiche e del peso molecolare delle molecole, si possono utilizzare diversi tipi di interfaccia che si distinguono l'una dall'altra per la modalità di ionizzazione delle molecole e la pressione applicata durante il processo. Attualmente tutte le comuni tecniche di ionizzazione operano a pressione ambiente: elettro-nebulizzazione (ESI), ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI), desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice (MALDI) e la meno nota fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI). La ionizzazione ESI e APCI sono di gran lunga le più utilizzate nella LC-MS. La ionizzazione elettronica (EI) e la ionizzazione chimica (CI) avvengono in condizioni di vuoto spinto con il vantaggio di essere utilizzabili in GC-MS. Gli spettrometri di massa a quadrupolo possono venire accoppiati ad un sistema di cromatografia liquida in due configurazioni: o un semplice sistema a quadrupolo singolo, oppure un sistema tandem. L'ultimo sistema, lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo, consente di eseguire studi di frammentazione ionica (spettrometria di massa tandem o MS/MS).

Tecniche strumentali

Spettrometria di massa (MS)

Elettronebulizzazione (ESI)

In modalità ESI, soluzioni liquide di sostanze polari o dotate di carica, veicolate da un sistema HPLC, vengono nebulizzate grazie a un capillare metallico (ago) e ad un gas nebulizzatore (azoto) nello spettrometro di massa. Le goccioline risultanti vanno incontro a desolvatazione (evaporazione del solvente) ed i singoli ioni dell'analita volatilizzati vengono trasferiti al rivelatore. Lo stress termico è molto ridotto, quindi le molecole dell'analita non si decompongono. L'ESI non presenta quasi alcun limite per quanto concerne le dimensioni molecolari ed è utilizzabile per le molecole da mediamente a fortemente polari, come ammine, acidi carbossilici e solfonici, composti eteroaromatici. Si utilizza l'ESI quando non si desidera la frammentazione, ma si devono determinare i pesi molecolari di biomolecole. La ESI-MS è ottima per l'accoppiamento con la LC e, purché il flusso non superi la velocità massima di 1-2 mL/min, si può ottenere una sensibilità molto alta; più comunemente si utilizzano flussi di 1-500 µL/min.

Nella soluzione liquida, le molecole o sono già ionizzate oppure vengono protonate o deprotonate da additivi contenuti nella soluzione campione e nella fase mobile. A vantaggio della sensibilità massima, le fasi mobili dovrebbero avere un pH al quale gli analiti sono ionizzati; la regola generale è quella di utilizzare un pH da neutro a basico pH (7-9) per gli acidi, mentre per i composti basici è consigliabile un pH più acido (3-4). Se gli analiti in esame hanno diversi pKa e possono, quindi, cambiare il proprio stato di ionizzazione, altri valori di pH possono essere più utili, sia in termini di ionizzazione dell'analita che di comportamento della colonna. A seconda del solvente e degli additivi scelti, si può utilizzare la modalità ESI positiva e/o negativa. Solitamente la modalità positiva viene applicata alle molecole più basiche, mentre i composti acidi sono analizzati in modalità negativa. In modalità ESI positiva, comunemente si aggiunge alla fase mobile acido formico allo 0,1% che abbassa il pH (pH 3) per protonare gli analiti. Gli analiti acidi in queste condizioni vengono neutralizzati; pertanto, per questi si preferisce la modalità ESI negativa e si consiglia una fase mobile con pH più alto. Per deprotonare gli analiti, si utilizzano tamponi volatili, come acetato o formiato d'ammonio, nell'intervallo di pH 4,5 - 7; per alti pH si possono usare carbonato d'ammonio o idrossido d'ammonio (ammoniaca acquosa).

Per la ESI, sia negativa, sia positiva, sono presupposti essenziali che tutti i solventi e gli additivi siano volatili, per evitare la contaminazione dello spettrometro di massa, e che la forza ionica complessiva della fase mobile sia adeguata (solitamente 2-25 mM), per prevenire evitabili fermi macchina per la pulizia del rivelatore. Gli acidi forti, come l'acido cloridrico o nitrico, non possono essere utilizzati per due motivi: formano coppie ioniche con gli analiti (soppressione del segnale) e si comportano da ossidanti forti. L'acido trifluoroacetico (TFA) è un caso speciale: è ampiamente utilizzato come agente di coppia ionica per migliorare la separazione in cromatografia liquida dei peptidi e delle proteine. D'altra parte, in spettrometria di massa, il TFA può causare una forte soppressione ionica (soprattutto in modalità ESI negativa) e, inoltre, contamina il sistema LC-MS.

Tecniche strumentali

Spettrometria di massa (MS)

Sfortunatamente non è possibile fornire una stima quantitativa di questi effetti, nè raccomandazioni generali, perché la loro intensità dipende significativamente dal sistema MS utilizzato. Un additivo alternativo, la trietilammina, si comporta in maniera simile. Se l'impiego del TFA è inevitabile, si può aggiungere all'eluente un acido debole (come acido propanoico) o isopropanolo, per ridurre la soppressione del segnale.

I tamponi, non solo regolano il pH dell'eluente e causano la ionizzazione di una molecola in esame, ma possono anche formare addotti con l'analita. Gli addotti $[M + \text{tampone}]$, come quelli che si formano ad esempio con ammonio, alcali, alogeni, formiato o acetato, genereranno un picco aggiuntivo nello spettro di MS; si può verificare anche la completa soppressione del segnale dell'analita, se la tensione di vapore dell'addotto risultante (soprattutto con gli alcali) è significativamente ridotta. Per questo e per mantenere pulita la sorgente ESI, si raccomanda l'impiego di tamponi volatili. I sali non volatili, come fosfati, borati, solfati o citrati, precipiterebbero nella sorgente dello spettrometro MS, la bloccherebbero e richiederebbero noiose procedure di pulizia.

Ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI)

Questa tecnica è complementare all'ESI e anch'essa utile per l'accoppiamento LC-MS. Alla fase mobile non sono richieste proprietà di conducibilità, mentre è possibile usare come solventi acetone o esteri dell'acido acetico il che consente di accoppiare l'APCI con la cromatografia in fase diretta. Con la ionizzazione in modalità APCI, la soluzione dell'analita viene vaporizzata prima della ionizzazione. In seguito le molecole di solvente (acquoso-organico, es. metanolo, propanolo, acetonitrile, acetone, ecc. in combinazione con un tampone organico volatile 2 – 20 mM, come acido formico o acido acetico, acetato d'ammonio, formiato d'ammonio o trietilammina) vengono ionizzate con un ago a corona dove la loro carica viene trasferita alle molecole dell'analita tramite trasferimento o estrazione di protone. L'APCI è utilizzabile per l'analisi delle sostanze meno polari, scarsamente ionizzabili, con peso molecolare basso o medio (analiti senza gruppi funzionali acidi o basici, come idrocarburi, alcoli, aldeidi, chetoni, esteri) ed è quindi complementare all'ESI, purché il campione sia stabile termicamente e vaporizzabile. Con l'APCI generalmente si osserva frammentazione. La sensibilità massima si ottiene con acetonitrile, metanolo o acqua come solvente e quando il grado di ionizzazione dell'analita può essere ottimizzato tramite il pH dell'eluente.

Come nel caso dell'ESI, può essere tollerata una velocità di flusso massima di 1-2 mL/min.

Legislazione e analisi alimentare

L'analisi chimica degli alimenti è un presupposto per tutelare la corretta etichettatura degli alimenti e per proteggere i consumatori dall'adulterazione e dalle etichette non conformi. Naturalmente, perché tali obiettivi vengano raggiunti sono necessari anche una legislazione alimentare adeguata, maggiori controlli delle autorità competenti, continui studi da parte degli enti preposti alla sicurezza alimentare e delle università per incrementare le conoscenze sugli alimenti e sui loro processi produttivi e, infine, una maggiore responsabilità dell'industria alimentare. Quest'ultima è agevolata dai sistemi di gestione della qualità alimentare, come l'HACCP, nel prevenire e/o controllare il rischio chimico, microbiologico e fisico nell'ambito della catena d'approvvigionamento alimentare. Tali procedure di garanzia della qualità richiedono l'esecuzione di analisi chimiche attraverso l'intera catena produttiva alimentare, cominciando dalle materie prime fino al prodotto alimentare finito e etichettato [1]. Per garantire che il cibo soddisfi un certo standard minimo, molto spesso si applicano agli ingredienti standard qualitativi da rispettare e si impongono limiti minimi per alcuni componenti, composizione nutrizionale inclusa [2, 3, 4]. Talvolta questi standard comprendono anche le procedure analitiche da utilizzare. Esempi di questi standard qualitativi omnicomprensivi sono gli standard d'identità USA o quelli del Codex Alimentarius [2, 3].

Le informazioni nutrizionali riportate sulle confezioni di cibo sono necessarie per aiutare i consumatori a scegliere gli alimenti in base alle proprie esigenze nutritive e per ridurre le malattie legate alla dieta [6, 7, 8, 34]. Di conseguenza, le norme per l'etichettatura descrivono in dettaglio i requisiti per le indicazioni nutrizionali (sostanze nutritive, quantità e calorie) da riportare sulle confezioni [5, 6]. A garanzia di dichiarazioni nutrizionali conformi, i produttori alimentari devono effettuare analisi aggiuntive per sostanze nutritive quali zuccheri, acidi organici, polialcoli, grassi e acidi grassi, proteine e sodio, oltre che per vitamine e minerali [5].

Tutte le suddette misure atte a garantire la sicurezza alimentare, la distribuzione di cibo salutare e la protezione del consumatore dall'adulterazione e da etichette non conformi richiedono informazioni affidabili ottenute grazie all'analisi chimica degli alimenti. Risultati analitici affidabili sono essenziali anche per facilitare il commercio internazionale degli alimenti.

Esclusione di responsabilità

"Merck fornisce ai Clienti informazioni e consigli su tecnologie applicative e questioni legislative al meglio delle nostre conoscenze e competenze, ma senza alcun obbligo o responsabilità. È dovere dei nostri Clienti osservare in ogni caso norme e regolamenti in vigore. Ciò si riferisce anche ai diritti di terzi. Informazioni e consigli da noi forniti non sollevano i nostri Clienti dalla responsabilità di verificare l'idoneità dei nostri prodotti per lo scopo previsto."

Impiego dei sistemi di gestione della qualità nei laboratori e accreditamento dei laboratori

L'affidabilità delle informazioni chimiche dipende in modo significativo da come esse sono state ottenute. L'introduzione di un sistema per la gestione della qualità per i laboratori è una misura approvata a salvaguardia del fatto che l'attrezzatura tecnica e i metodi analitici siano adatti allo scopo e riproducibili [9] e che il personale abbia una qualifica adeguata e l'esperienza necessaria per i compiti assegnati.

Quindi, l'accREDITAMENTO di un laboratorio secondo un sistema riconosciuto a livello internazionale è una pre-condizione per l'elaborazione di dati analitici affidabili e accettati su scala internazionale [9].

Lo standard più importante per i laboratori è la norma internazionale DIN ISO 17025 'Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura' [9, 10] che è anche uno degli standard più importanti per la globalizzazione internazionale del commercio. Esso si occupa delle competenze tecniche dei laboratori per l'esecuzione delle prove ed è utilizzato in tutto il mondo dagli enti di accreditamento dei laboratori come requisito fondamentale [9, 10]. Lo standard DIN ISO 17025 comprende cinque elementi: 'Scopo e campo di applicazione', 'Riferimenti normativi', 'Termini e definizioni', 'Requisiti gestionali' e 'Requisiti tecnici' [9]. Il capitolo 'Requisiti tecnici' comprende fattori che determinano la correttezza e l'affidabilità delle prove e delle calibrazioni effettuate in laboratorio, come i fattori umani, il luogo di lavoro e le condizioni ambientali, i metodi di prova e di taratura, la convalida dei metodi, le apparecchiature, la tracciabilità delle misure, il campionamento, il trattamento degli oggetti da sottoporre a test e calibrazione [9].

Regolamento CE 882/2004 – Conseguenze per l'accREDITAMENTO dei laboratori di analisi alimentari

Nell'ambito dell'Unione Europea, i laboratori ufficiali (cioè i laboratori che effettuano le analisi di campioni raccolti durante controlli ufficiali da parte delle autorità alimentari competenti di ciascuno stato membro) devono essere accreditati conformemente alla norma DIN ISO 17025, come richiesto dal regolamento CE 882/2004 [11]. Tuttavia, l'accREDITAMENTO può essere relativo a specifiche prove o gruppi di prove.

I laboratori a contratto o conto terzi devono essere accreditati secondo questo standard se i risultati da loro ottenuti sono dati legalmente sostenibili, cioè se sono usati o destinati ad essere usati in caso di disputa tra un'autorità alimentare competente ed un operatore/ produttore alimentare. Tuttavia, come indiretta conseguenza di questa norma, il mercato alimentare europeo non accetta più per le analisi alimentari laboratori a contratto non accreditati [10].

Accreditamento negli USA come richiesto dal Food Safety Modernization Act

Nel 2011, gli USA hanno promulgato il Food Safety Modernization Act (FSMA) [12]. Si tratta di un enorme programma di riforme inteso ad aumentare la sicurezza alimentare e ad evitare adulterazioni intenzionali e preterintenzionali degli alimenti nell'ambito dell'intera catena di distribuzione, laboratori per le analisi degli alimenti inclusi. Il FSMA si divide in quattro parti principali. Nella seconda parte del FSMA ('Improving capacity to detect food safety problems') tratta dell'identificazione di problemi di sicurezza alimentare nell'ambito della catena distributiva. La sezione 202 comprende regole intese a garantire che i laboratori di analisi alimentari (inclusi i laboratori indipendenti privati, i laboratori stranieri e quelli che operano per conto di enti governativi federali, statali e locali) soddisfino gli standard di qualità prescritti.

La FDA deve stabilire i criteri per l'accREDITAMENTO dei laboratori e sviluppare gli standard che i laboratori devono soddisfare per ottenere l'accREDITAMENTO. La FDA ha mancato la scadenza stabilita per il 2013, ma suoi funzionari hanno affermato che un gruppo di lavoro sta sviluppando una bozza e una proposta di legge verrà pubblicata nei primi mesi del 2016.

Allo stesso modo, la FDA deve costituire enti di accREDITAMENTO che si occupino dell'accREDITAMENTO dei laboratori [12]. Deve, inoltre, istituire registri pubblici degli enti di accREDITAMENTO [12]. Secondo la Sezione 202 del FSMA gli standard FDA che devono essere soddisfatti dai laboratori accREDITATI comprendono, tra l'altro che:

- vengano utilizzate tecniche di campionamento appropriate
- le procedure analitiche siano adeguate per lo scopo prefisso
- le relazioni sulle analisi siano certificate
- venga stabilito e mantenuto un sistema interno della qualità
- esistano procedure di esame dei reclami e di risposta
- i tecnici siano qualificati per formazione ed esperienza.

Tali requisiti sono più o meno gli stessi descritti dalla norma DIN ISO 17025 per l'accREDITAMENTO dei laboratori e quindi già piuttosto abituali per numerosi laboratori di tutto il mondo. L'intenzione è che i produttori/ operatori alimentari ricorrano a laboratori accREDITATI dalla FDA almeno per:

- qualunque prova richiesta da norme e regolamenti in risposta ad un problema di sicurezza alimentare identificato o sospetto
- qualunque prova richiesta dalla FDA in risposta ad un problema di sicurezza alimentare identificato o sospetto
- qualunque prova richiesta a sostegno dell'autorizzazione ad importare prodotti alimentari
- qualunque prova in caso di allarme per prodotti di importazione che richieda il superamento di una serie di prove consecutive.

Un requisito fondamentale della sezione 202 è che i laboratori accreditati debbano fornire i risultati di queste prove direttamente alla FDA [12]. Probabilmente la ragione di ciò è che, viste le altre disposizioni del FSMA, il numero dei campioni alimentari necessari aumenterà in modo significativo. D'altra parte la FDA non dispone delle risorse necessarie per far fronte ad un così repentino aumento nel numero di campioni alimentari da analizzare. Pertanto, la FDA conferisce ai produttori/ operatori alimentari la responsabilità di affidare le analisi dei campioni a terzi, come i laboratori di analisi a contratto [14].

L'impiego di metodi ufficiali nell'analisi alimentare

Nell'analisi alimentare, è soprattutto la complessità delle matrici ad influenzare le prestazioni e l'affidabilità dei metodi analitici e delle procedure utilizzate [5]. Le matrici alimentari sono costituite prevalentemente da composti chimici quali proteine, carboidrati e lipidi che possono influire significativamente sulle prestazioni dei metodi analitici. Per esempio, alimenti con un elevato tenore di grassi o di zuccheri possono causare diversi tipi di interferenze rispetto a cibi a ridotto tenore di grassi e zuccheri [5]. L'applicazione di procedure di estrazione e di digestione, sebbene, da una parte sia un presupposto per l'ottenimento di risultati analitici accurati, non solo richiede spesso parecchio tempo, ma talvolta rischia di portare a informazioni artefatte [15]. Pertanto, i metodi analitici per le analisi alimentari devono sempre tener conto delle caratteristiche e della composizione delle diverse matrici alimentari.

Diverse organizzazioni (scientifiche) no-profit, come la Association of Analytical Communities (AOAC), sviluppano, standardizzano e promuovono metodi ufficiali per l'analisi alimentare. Tali metodi svolgono un ruolo importante nell'analisi dei prodotti alimentari, per garantire che un alimento soddisfi i requisiti normativi. Di conseguenza ci sono, ad esempio negli USA, disposizioni di legge che richiedono l'impiego di un metodo analitico ben preciso [16]. Inoltre, i metodi ufficiali consentono la comparazione dei risultati prodotti da laboratori diversi che seguono le medesime procedure e la valutazione dei dati ottenuti con procedure nuove o più rapide [5].

Metodi ufficiali di OMS/FAO e Codex Alimentarius

La Commissione del Codex Alimentarius, fondata nel 1962 dalla FAO (Organizzazione per l'Alimentazione e l'Agricoltura) e dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità), sviluppa standard internazionali e procedure di sicurezza per gli alimenti ed i prodotti agricoli (il cosiddetto Codex Alimentarius).

Il Codex Alimentarius comprende requisiti generali, codici di procedura e standard [17].

Gli standard merceologici del Codex comprendono metodi per l'analisi dei relativi beni di consumo. Nel Volume 13, il Codex comprende una lista di metodi ufficiali per l'analisi e il campionamento. Tali metodi sono ordinati in base al tipo di bene di consumo per la quale possono essere applicati (ad es. cereali, oli e grassi, prodotti per l'infanzia, ecc.). Ci sono poi alcuni metodi che possono essere usati per tutti i tipi di alimenti, come, ad esempio, il metodo per l'identificazione e la quantificazione del dolcificante ciclamato [18].

Il Codex raccomanda l'impiego dei metodi elencati in applicazione della norma DIN ISO 17025 [18].

I metodi del Codex vengono elaborati da comitati internazionali che si occupano di un alimento specifico o di una classe di alimenti e selezionati dalla Commissione del Codex per le analisi [19]. Nell'ambito di questa selezione, ottengono la preferenza quei metodi analitici che soddisfano i criteri del Comitato sui Metodi di Analisi e Campionamento per quanto concerne accuratezza, precisione, selettività, limite di rilevabilità, sensibilità, ecc. La scelta dei metodi tiene conto anche della praticabilità e dell'applicabilità nelle normali condizioni di laboratorio. Di conseguenza, verranno preferiti i metodi utilizzabili nelle analisi di routine e applicabili uniformemente a diversi gruppi di beni di consumo [19]. Dobbiamo far cenno al fatto che la maggior parte dei metodi analitici citati tra gli standard del Codex sono quelli della AOAC [22]. Ciò è dovuto al fatto che la AOAC svolge il ruolo di osservatore ufficiale nel Codex Alimentarius sin dalla sua istituzione e contribuisce allo sviluppo degli standard del Codex [22].

Il Comitato congiunto di esperti FAO/OMS sugli Additivi Alimentari (JECFA) stabilisce gli standard di purezza degli additivi alimentari. Esso fornisce una raccolta di specifiche degli additivi alimentari comprendente quattro volumi [20]. I primi tre volumi sono le specifiche degli additivi alimentari vere e proprie in ordine alfabetico, mentre l'ultimo volume comprende i metodi analitici riveduti e aggiornati, le procedure analitiche e le soluzioni di laboratorio utilizzate e citate nelle specifiche. Le specifiche JECFA comprendono linee guida sui metodi analitici da utilizzare per analisi conformi alle specifiche stesse. Ogni volta che è possibile, ciò avviene con riferimenti al quarto volume della raccolta che include i metodi analitici riveduti e aggiornati [20]. Altrimenti i dettagli sulle procedure analitiche sono forniti nelle monografie specifiche.

Poiché le specifiche JECFA sono state elaborate per un impiego universale, i metodi cui fanno riferimento richiedono l'impiego di strumenti ed attrezzatura disponibili nella maggior parte dei laboratori [20]. Secondo il modus operandi del Comitato JECFA, i metodi che prevedono l'impiego di tecniche o di attrezzature nate solo recentemente non verranno in linea di massima menzionati finché non saranno state accettate universalmente e disponibili a costi ragionevoli. Tenendo in considerazione i progressi della chimica analitica, JECFA di tanto in tanto riesamina i metodi analitici. In linea di principio, è possibile discostarsi dai metodi JECFA, purché i metodi alternativi o i metodi JECFA modificati utilizzati forniscano risultati di accuratezza e specificità equivalenti a quelli riportati nelle corrispondenti specifiche JECFA [20].

Metodi ufficiali per la analisi alimentari negli USA

La FDA ha stabilito definizioni e standard alimentari che sono stati pubblicati nel CFR 21 100-169 [2, 21] e che comprendono standard di identità e qualità. Gli standard di identità sono stati definiti per una gran varietà di prodotti alimentari stabilendo specificamente gli ingredienti che un cibo deve contenere con i livelli minimi per gli ingredienti costosi e massimi per gli ingredienti economici (ad es. l'acqua). Quegli standard specificano soprattutto i metodi analitici ufficiali da utilizzare per le analisi. Tali metodi sono stati elaborati da enti scientifici internazionali come la AOAC o da organizzazioni USA come la AACC (American Association of Cereal Chemists) o la AOCS (American Oil Chemists Society).

La raccolta dei metodi analitici ufficiali di AOAC International contiene oltre 3.000 metodi adottati dall'AOAC appropriati per una gran varietà di prodotti alimentari e di altri materiali [2, 22]. La sezione 2.19 del CFR 21 definisce i metodi AOAC "metodi ufficiali" che devono essere utilizzati dalla FDA nel caso in un regolamento non sia descritto alcun metodo analitico [22, 23]. Di conseguenza, la FDA e il Food Safety and Inspection Service (FSIS) del Ministero dell'Agricoltura Statunitense (USDA) utilizzano i metodi AOAC per controllare se gli alimenti soddisfano i relativi requisiti legali, come le informazioni nutrizionali in etichetta, la presenza o l'assenza di residui indesiderabili o i livelli dei residui [21]. La AOAC riesamina, seleziona e sviluppa i metodi. Una volta che un metodo è stato scelto dalla AOAC, esso viene sottoposto alla convalida da parte di un solo laboratorio e ad uno studio congiunto completo che coinvolge 8-10 laboratori [22]. Superati con successo questi esami e approvato dalla Commissione Metodi Ufficiali di AOAC, il metodo AOAC sarà pubblicato nella raccolta e nella rivista di AOAC [22].

Il Food chemicals codex (FCC) è una raccolta di standard per l'identificazione e la purezza di additivi alimentari e prodotti chimici noti (comprendente anche le disposizioni per i relativi metodi analitici) utilizzati negli alimenti negli Stati Uniti o nel resto del mondo. Sebbene gli standard del FCC siano stati sviluppati in cooperazione con la FDA e il mondo industriale statunitense e straniero, il FCC non fornisce informazioni sulla posizione legislativa di additivi e prodotti chimici ad uso alimentare [24]. Tuttavia, alcuni paesi al di fuori degli USA (come Australia, Canada, Nuova Zelanda) riconoscono gli standard FCC quali requisiti normativi per gli additivi alimentari [24]. Le monografie del FCC comprendono notizie generali sull'uso dell'additivo alimentare in esame, informazioni chimiche, standard minimi per l'identità, la purezza e la qualità dell'additivo e metodi analitici convalidati per verificare la purezza e la qualità dell'additivo considerato.

Metodi ufficiali per la analisi alimentari in Europa

Per quanto riguarda i metodi ufficiali dell'Unione Europea si può consultare, ad esempio, la raccolta ufficiale tedesca dei metodi per le analisi alimentari secondo il § 64 del Codice tedesco per le derrate alimentari e i mangimi (la cosiddetta Raccolta ufficiale dei metodi secondo il § 64 del LFGB) comprendente più di 1300 procedure analitiche per le analisi alimentari [25, 26]. Esperti provenienti dal controllo alimentare, dal mondo scientifico e dall'industria alimentare sviluppano procedure analitiche e valutano prestazioni, affidabilità e comparabilità di tali metodi. Inoltre, decidono per quali campi d'applicazione i metodi debbano essere usati. Prima di venire incluso nella Raccolta ufficiale, un metodo viene sottoposto a test statistici da parte di qualche laboratorio nell'ambito di un test di confronto inter-laboratorio e standardizzato [26].

In Germania, la Raccolta ufficiale dei metodi secondo il § 64 del LFGB può essere applicata senza ulteriori giustificazioni [25, 26]. Tuttavia, se un laboratorio desidera utilizzare un metodo differente, la scelta di un metodo alternativo deve essere giustificata.

Nella legislazione europea, le normative che si riferiscono a prodotti alimentari particolari specificano spesso metodi ufficiali, per essere certi che venga mantenuto un certo standard qualitativo. Ad esempio, il 'Regolamento 2548/91 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti' contiene diversi metodi ufficiali [27].

Tuttavia, nella legislazione alimentare europea, l'approccio tradizionale per le analisi alimentari che prevede l'impiego di tali metodi ufficiali o di routine è sempre più accantonato a vantaggio del cosiddetto approccio dei criteri di efficienza.

L'approccio dei Criteri di efficienza nell'Unione Europea

In seguito ai progressi della chimica analitica, il concetto di metodi di routine e di metodi di riferimento è sempre più rimpiazzato dal cosiddetto approccio dei Criteri di efficienza, nel quale si stabiliscono criteri di rendimento per il metodo analitico e procedure di convalida dei metodi di screening e di conferma [11, 28].

Tale cambio di modello è preso in esame nel Regolamento europeo 882/2004 [28]. Questo regolamento descrive i requisiti di principio per il campionamento ed i metodi analitici utilizzati dai laboratori ufficiali degli stati membri. I laboratori implicati nell'analisi di campioni ufficiali devono operare in accordo a procedure approvate a livello internazionale (es. DIN, CEN, ISO, IUPAC, Codex Alimentarius) o agli standard dei criteri di efficienza e utilizzare metodi analitici convalidati in conformità, ad esempio, alle linee guida IUPAC armonizzate [11].

Ciò si riflette già nei Regolamenti europei 401/2006 [29], 333/2007 [30], 1882/2006 [31] per il campionamento ed i metodi analitici di contaminanti come nitrati, metalli pesanti, benzo(a)pirene e 3-MCPD. Mentre descrivono nei dettagli le procedure di campionamento (requisiti per il personale, il numero di campioni per lotto, le precauzioni da prendere, ecc.), queste normative non includono (esplicitamente) raccomandazioni per i metodi analitici, ma definiscono requisiti ben precisi per i criteri di efficienza come precisione, tasso del recupero, incertezza delle determinazioni ecc. che devono essere soddisfatti dai metodi analitici convalidati utilizzati. Comprendono, inoltre, requisiti per il sistema di gestione della qualità del laboratorio.

Per i residui farmacologicamente attivi di farmaci veterinari autorizzati e non autorizzati, come alcuni antibiotici (es. cloramfenicolo) o sostanze ad azione anabolizzante (es. clenbuterolo), i metodi analitici possono essere scelti dai laboratori, ma devono essere convalidati e soddisfare i criteri di efficienza definiti dalla Decisione della Commissione Europea 2002/657 [32, 33]. Il laboratorio stesso deve soddisfare le norme qualitative richieste dal Regolamento europeo 882/2004. Tuttavia, i laboratori di riferimento nazionali sviluppano e convalidano metodi analitici idonei che possono essere utilizzati per l'analisi di residui di farmaci veterinari negli alimenti, come descritto dalla legislazione europea pertinente [33].

Le misure sopra descritte hanno lo scopo di assicurare l'affidabilità dei risultati analitici nelle analisi alimentari. Questa compilazione descrive alcune applicazioni analitiche che possono contribuire all'affidabilità dei risultati analitici, semplificando la preparazione dei campioni.

Riferimenti bibliografici e link utili

La legislazione alimentare è estremamente dinamica. Pertanto, le norme alimentari cambiano frequentemente e vengono spesso modificate. I link qui forniti per la legislazione alimentare potrebbero in alcuni casi non fornire la versione più aggiornata della normativa. Per la legislazione più aggiornata consultare i siti governativi opportuni.

- [1] "Regolamento (CE) N° 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio sull'igiene dei prodotti alimentari", Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea, L139/1, 2004 e successivi emendamenti.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32004R0852:EN:NOT>
- [2] "United States Government Regulations and Standards", Nielsen, S.S. in "Food Analysis", Springer US, USA, 4° ed, 2010, 15-33.
- [3] Standards of the Codex Alimentarius, www.codexalimentarius.org
- [4] [Deutsches Lebensmittelbuch](#),
- [5] "Introduction to food analysis" Nielsen, S.S. in: "Food Analysis, Springer US, USA, 4° ed, 2010, 5-13.
- [6] "Regolamento (CE) N° 1169/2011 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori", Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea, L304/18, 2011.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:EN:PDF>
- [7] "Obesity and overweight", Foglio informativo N°311, Organizzazione Mondiale della Sanità, 2011
- [8] "Diabetes", Foglio informativo N°312, Organizzazione Mondiale della Sanità, 2011.
- [9] Accreditation – ISO/IEC 17025, Kaus, R. in „Quality Assurance in Analytical Chemistry“, Springer-Verlag, Germany 2010.
- [10] „Akkreditierung von amtlichen und nichtamtlichen Prüflaboratorien im Bereich Lebensmittel und Futtermittel“, Kirchhoff, E., in „Handbuch für Lebensmittelchemiker und –Technologen“, Springer, Germany, 3° ed, 2010, 225-251.
- [11] "Regolamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali", Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea, L165/1, 2004, e successivi aggiornamenti.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32004R0853:EN:NOT>
- [12] "FDA Food Safety Modernization Act", 21 USC 2201, dicembre 2015.
Online: <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/PLAW-111publ353/pdf/PLAW-111publ353.pdf>
- [14] "FSMA and labs", Paez, V., Food Quality Magazine, dic/gen. 2012, USA, Wiley Periodicals, scaricato da <http://www.foodquality.com/view/0/issueArchiveList.html>
- [15] "Quantitative determination of beta-carotene stereoisomers in carrot juices and vitamin supplemented (ATBC) drinks" Marx, M. et al. Food Chemistry, 70, 2000, 403-408.
"United States Government Regulations and Standards", Nielsen, S.S. in "Food Analysis, Springer US, USA, 4° ed, 2010, 15-33.
- [16] Standards of identity
- [17] „Comprendere il Codex Alimentarius, Segretariato del programma congiunto FAO/OMS per gli standard alimentari, FAO, Roma, 3° ed, 2006.
- [18] "Metodi raccomandati per il campionamento e l'analisi, parte A e B", Standard del Codex 234-1999, Codex Alimentarius, Segretariato del programma congiunto FAO/OMS per gli standard alimentari, FAO, Roma, 2011.
- [19] "Manuale di procedure", Commissione del Codex Alimentarius, Segretariato del programma congiunto FAO/OMS per gli standard alimentari, FAO, Roma, 20° ed, 2011.
- [20] "Combined compendium of food additives", Comitato congiunto di esperti FAO/OMS sugli Additivi Alimentari, FAO, Roma 2006
- [21] "Food labelling", Curtis P. and Dunlap, W. in "Guide to food laws and regulations" Blackwell Publishing, USA, 2005, 85-111.
- [22] Homepage di AOAC International, <http://www.aoac.org/>
- [23] Code of Federal Regulations (CFR), <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm>

- [24] Food Chemicals Codex, United States Pharmacopeia, 8° ed ,2013.
- [25] § 64 Lebensmittel und Futtermittelgesetzbuch, Bundesgesetzblatt I, 1770.2012 and subsequent updates.
<http://www.gesetze-im-internet.de/lfgb/>
- [26] "Official collection of methods of Analysis", German Federal Office of Consumer Protection and Food Safety, 2013.
http://www.bvl.bund.de/EN/09_Laboratories/01_Tasks/04_official_collection_methods_analysis/official_collection_methods_analysis_node.html
- [27] Regolamento (CEE) N° 2568/91 dell'11 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti, Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea, L 248, 1991 e successivi aggiornamenti.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1991R2568:20081001:EN:PDF>
- [28] „und –Technologen“, Springer, Germany, 3° ed, 2010, 1–29.
- [29] Regolamento (ECEU, EG Rechtsordnung und Lebensmittelkontrolle", Gallhof, G. and Rimkus, G.G. in "Handbuch für Lebensmittelchemiker") N° 401/2006 del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari, Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L70/12, 2006 e successivi aggiornamenti.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:070:0012:0034:EN:PDF>
- [30] Regolamento (CE) N° 333/2007 del 28 marzo 2007 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-MCPD e benzo(a)pirene nei prodotti alimentari, Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L88/29, 2007 e successivi aggiornamenti.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:088:0029:0038:EN:PDF>
- [31] Regolamento (CE) N° 1882/2006 del 19 dicembre 2006 che stabilisce metodi di campionamento ed analisi per il controllo ufficiale del tenore di nitrati in alcuni prodotti alimentari, Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L364/25, 2006 e successivi aggiornamenti.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32006R1882:en:NOT>
- [32] Decisione della commissione del 12 agosto 2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati, Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea L221/8, 2002.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF>
- [33] Direttiva 96/23/CE del 29 aprile 1996 concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti, Gazzetta Ufficiale L 125, 1996 e successivi aggiornamenti.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31996L0023:EN:NOT>
- [34] Regolamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 20 dicembre 2006, relativo alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti alimentari.
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A02006R1924-20121129>

Unione europea

Eurlex:

<http://eur-lex.europa.eu>

Questo sito web consente di accedere alla Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea e ai testi dei regolamenti (anche in versione consolidata).

Commissione europea:

http://ec.europa.eu/food/food/index_en.htm

Autorità europea per la sicurezza alimentare

http://ec.europa.eu/food/efsa_en.htm

USA

Homepage della FDA (Food)

<http://www.fda.gov/Food/default.htm>

Homepage della US-DA La US-DA è responsabile della sicurezza degli alimenti derivanti dall'agricoltura

http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome?navid=FOOD_SAFETY

Fabbricato da Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germania
www.merckmillipore.com/food-analysis

Distribuito da EMD Millipore Corporation, 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA

