

METODI DI ANALISI PER LA VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DI COMPOSIZIONE DEL MIELE

- Conservazione del campione in attesa di analisi
Procedimento per la preparazione del campione da sottoporre ad analisi chimica, chimico-fisica e melissopalnologica
- Determinazione degli zuccheri per cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC)
- Determinazione del contenuto di acqua
- Determinazione del contenuto di sostanze insolubili in acqua
- Determinazione della conducibilità elettrica
- Determinazione di pH, acidità libera, acidità combinata (lattoni) e acidità totale
- Determinazione della attività diastolica
- Determinazione dell'idrossimetilfurfurale per cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC)

CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE IN ATTESA DI ANALISI

Il campione di miele da sottoporre ad analisi va conservato in luogo fresco, asciutto ed al riparo dalla luce. Per periodi di conservazione prolungati (indicativamente superiori ai 15 giorni) e comunque qualora debba essere determinato il contenuto in idrossimetilfurfurale e/o in enzimi, il campione va mantenuto in frigorifero ad una temperatura inferiore ai 10°C fino al momento delle analisi.

PROCEDIMENTO PER LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DA SOTTOPORRE AD ANALISI CHIMICA, CHIMICO-FISICA E MELISSOPALINOLOGICA

1. *Scopo e campo di applicazione*

La presente norma specifica un metodo per la preparazione del campione di miele destinato ad analisi, in modo che esso risulti omogeneo e che l'aliquota di prova sia rappresentativa del campione stesso.

In particolare, il presente metodo prevede il riscaldamento del miele ad una temperatura minore di 40°C, che risulta idonea al fine di mantenere inalterate alcune proprietà chimico-fisiche del campione.

Il metodo si applica a tutti i mieli da sottoporre ad analisi chimica, chimico-fisica e melissopalinoLOGICA. Tuttavia per i mieli destinati alla misurazione di enzimi e dell'idrossimetilfurfurale il campione non va sottoposto ad alcun trattamento termico.

2. *Definizioni*

2.1. Campione: Quantità di miele contenuta nella confezione integra, così come pervenuta al laboratorio.

2.2. Aliquota di prova: Quantità di campione prelevata per l'analisi.

3. *Principio*

Il principio del metodo si basa sull'omogeneizzazione meccanica del campione, eventualmente ammorbidito previo moderato riscaldamento.

4. *Apparecchiatura*

Apparecchiatura e vetreria di uso corrente nel laboratorio di analisi chimica, ed in particolare la seguente:

- 4.1. Sistema riscaldante, in alternativa uno dei seguenti:
 - 4.1.1. Bagno termostatico, in grado di mantenere la temperatura a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
 - 4.1.2. Stufa termostatica, in grado di mantenere la temperatura a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- 4.2. Spatole di acciaio inossidabile, di diverse misure.
- 4.3. Staccio di acciaio inossidabile, con maglie di luce 0,5 mm.

5. Procedimento

Prima di prelevare l'aliquota di prova procedere come segue:

- 5.1. Miele liquido. Omogeneizzare il campione mescolando accuratamente per mezzo di una spatola (4.2) di misura adeguata alla massa del campione, per almeno 3 min, con movimenti lenti e circolari in modo che la minore quantità possibile di aria venga inglobata nel campione. Prelevare quindi l'aliquota di prova.
- 5.2. Miele cristallizzato. Se il campione è cristallizzato, ma si mantiene pastoso, operare come in 5.1. Se è cristallizzato in massa dura o compatta, può essere preventivamente ammorbidito scaldandolo in stufa o in bagno termostatico (4.1.1 o 4.1.2), in recipiente chiuso ermeticamente, ad una temperatura minore di $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per il tempo strettamente indispensabile e comunque non oltre 30 min. Quindi procedere secondo 5.1.
Nota: Il trattamento termico non deve essere applicato ai mieli destinati alla misurazione di enzimi e idrossimetilfurfurale.
- 5.3. Miele liquido o cristallizzato contenente materiali estranei. Se nel campione sono presenti materiali estranei di varia natura, rimuovere i materiali più grossolani che affiorano in superficie. Passare poi il miele attraverso lo staccio di acciaio inossidabile (4.3) premendo delicatamente con la spatola (4.2) se il miele è cristallizzato. Quindi procedere secondo 5.1.
- 5.4. Miele in favo. Tagliare la parte superiore del favo e separare il miele dalla cera passandolo attraverso uno staccio di acciaio inossidabile (4.3). Quindi procedere secondo 5.1.

DETERMINAZIONE DEGLI ZUCCHERI PER CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA RISOLUZIONE (HPLC)

1. Scopo e campo di applicazione

La presente norma specifica un metodo per la determinazione nel miele di fruttosio, glucosio e saccarosio ^a.

Il metodo può essere applicato a tutti i tipi di miele.

2. Definizioni

Zuccheri (glucidi): Principali costituenti del miele di cui rappresentano circa il 95% della massa secca. I due zuccheri principali sono i monosaccaridi glucosio e fruttosio (circa il 90% del totale). In quantità minori sono presenti anche zuccheri superiori (di-, tri- e oligosaccaridi).

I glucidi conferiscono al miele numerose proprietà fisiche (tra cui stato fisico, viscosità, igroscopicità, etc.) e alimentari (valore energetico e potere dolcificante); la loro presenza percentuale varia in funzione dell'origine botanica del miele.

3. Principio

Il metodo si basa sull'impiego di un sistema cromatografico in fase liquida ad alta risoluzione dotato di rivelatore ad indice di rifrazione (RI) su soluzioni di miele filtrate. Si confrontano i picchi ottenuti con quelli di una soluzione di riferimento a concentrazione nota.

Il metodo si basa sul lavoro originale di Bogdanov e Baumann [1].

4. Reagenti

Tutti i reagenti devono essere puri per analisi.

- 4.1. Acqua bidistillata per HPLC.
- 4.2. Alcol metilico (CH₃OH) per HPLC.
- 4.3. Acetonitrile (CH₃CN) per HPLC.
- 4.4. D(-) fruttosio (levulosio) cristallino in forma piranosica.
- 4.5. D(+) glucosio (destrosio) cristallino in forma piranosica.
- 4.6. D(1) saccarosio (β-D-fruttofuranosil-α-D-glucopiranoside).
- 4.7. Soluzione di riferimento: pesare (5 ± 0,000 g di fruttosio, 1,500 g di glucosio e 0,250 g di saccarosio. Sciogliere questi tre zuccheri in circa 40 ml di acqua (4.1.), trasferire quantitativamente in un matraccio tarato da 100 ml, nel quale sono stati precedentemente aggiunti 25 ml di alcol metilico (4.2) e portare a volume con

^a Il metodo consente anche la separazione e la determinazione quantitativa di altri zuccheri eventualmente presenti nel miele, quali maltosio, isomaltosio, turanosio, trealosio, erlosio, melezzitosio, raffinosiso, maltotriosio, etc. Per questi zuccheri non sono però disponibili dati relativi alla precisione.

acqua (4.1.). Filtrare (5.6.) la soluzione prima dell'uso. La soluzione può essere conservata in fiale per cromatografia (5.8.) per quattro settimane in frigorifero, a temperatura compresa tra 0°C e +4°C, o per 6 mesi a -18°C.

- 4.8. Fase mobile: miscela acetonitrile (4.3.)/acqua (4.1.) 80:20 v/v. Degasare (5.3.) subito prima dell'uso. La soluzione può essere conservata alcuni giorni in frigorifero.

5. *Apparecchiatura*

Apparecchiatura e vetreria di uso corrente nel laboratorio di analisi chimica, e in particolare la seguente:

- 5.1. Bilancia analitica con risoluzione 0,1 mg.
- 5.2. Bilancia tecnica con risoluzione 0,01 g.
- 5.3. Sistema per degasare la fase mobile (4.8.).
- 5.4. Sistema cromatografico in fase liquida ad alta risoluzione (HPLC) composto da pompa isocratica, rivelatore RJ, iniettore a volume variabile o a loop intercambiabile, sistema di acquisizione ed elaborazione dati, sistema di termostatazione per colonne in grado di mantenere la temperatura a 30°C ± 1°C.
- 5.5. Colonna cromatografica a fase polare avente dimensioni: 250 mm × 4 mm o 4,6 mm, riempita con amminopropilsilano (-NH₂), avente particelle di diametro 5 µm.
- 5.6. Filtri per siringa, con porosità 0,45 µm.
- 5.7. Siringa per cromatografia liquida.
- 5.8. Fiale per cromatografia.

6. *Preparazione del campione*

Preparare il campione di miele come indicato nel metodo "Procedimento per la preparazione del campione da sottoporre ad analisi chimica, chimico-fisica e melissopalnologica".

7. *Procedimento*

Pesare (5.2.) 5,0 g di miele in un bicchiere da 100 ml e scioglierli con circa 40 ml di acqua (4.1.). Introdurre 25 ml di alcol metilico (4.2.) in un matraccio tarato da 100 ml. Trasferire quantitativamente la soluzione di miele nel matraccio e portare a volume con acqua (soluzione campione).

Filtrare (5.6.) la soluzione campione scartando i primi 2 ml circa.

Effettuare le analisi nelle seguenti condizioni operative:

- Fase mobile (4.8.)
- Velocità di flusso: 1,3 ml/min
- Volume di iniezione: 20 µl
- Temperatura colonna: 30°C ± 1°C
- Temperatura rivelatore: 30°C ± 1°C

Lasciare condizionare la colonna e il rivelatore almeno per 1 h al flusso di esercizio prima di procedere all'analisi.

acqua (4.1.). Filtrare (5.6.) la soluzione prima dell'uso. La soluzione può essere conservata in fiale per cromatografia (5.8.) per quattro settimane in frigorifero, a temperatura compresa tra 0°C e +4°C, o per 6 mesi a -18°C.

- 4.8. Fase mobile: miscela acetonitrile (4.3.)/acqua (4.1.) 80:20 v/v. Degasare (5.3.) subito prima dell'uso. La soluzione può essere conservata alcuni giorni in frigorifero.

5. *Apparecchiatura*

Apparecchiatura e vetreria di uso corrente nel laboratorio di analisi chimica, e in particolare la seguente:

- 5.1. Bilancia analitica con risoluzione 0,1 mg.
- 5.2. Bilancia tecnica con risoluzione 0,01 g.
- 5.3. Sistema per degasare la fase mobile (4.8.).
- 5.4. Sistema cromatografico in fase liquida ad alta risoluzione (HPLC) composto da pompa isocratica, rivelatore RJ, iniettore a volume variabile o a loop intercambiabile, sistema di acquisizione ed elaborazione dati, sistema di termostatazione per colonne in grado di mantenere la temperatura a 30°C ± 1°C.
- 5.5. Colonna cromatografica a fase polare avente dimensioni: 250 mm × 4 mm o 4,6 mm, riempita con amminopropilsilano (-NH₂), avente particelle di diametro 5 µm.
- 5.6. Filtri per siringa, con porosità 0,45 µm.
- 5.7. Siringa per cromatografia liquida.
- 5.8. Fiale per cromatografia.

6. *Preparazione del campione*

Preparare il campione di miele come indicato nel metodo "Procedimento per la preparazione del campione da sottoporre ad analisi chimica, chimico-fisica e melissopalnologica".

7. *Procedimento*

Pesare (5.2.) 5,0 g di miele in un bicchiere da 100 ml e scioglierli con circa 40 ml di acqua (4.1.). Introdurre 25 ml di alcol metilico (4.2.) in un matraccio tarato da 100 ml. Trasferire quantitativamente la soluzione di miele nel matraccio e portare a volume con acqua (soluzione campione).

Filtrare (5.6.) la soluzione campione scartando i primi 2 ml circa.

Effettuare le analisi nelle seguenti condizioni operative:

- Fase mobile (4.8.)
- Velocità di flusso: 1,3 ml/min
- Volume di iniezione: 20 µl
- Temperatura colonna: 30°C ± 1°C
- Temperatura rivelatore: 30°C ± 1°C

Lasciare condizionare la colonna e il rivelatore almeno per 1 h al flusso di esercizio prima di procedere all'analisi.

DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI ACQUA

1. *Scopo e campo d'applicazione*

La presente norma specifica un metodo indiretto per la determinazione nel miele del contenuto di acqua (o umidità), parametro che ne condiziona la conservabilità e contribuisce a definirne le caratteristiche. Il metodo si applica a tutti i tipi di miele.

2. *Definizioni*

Contenuto di acqua (o umidità): valore percentuale che si ricava da un prospetto di correlazione basato sulla misurazione dell'indice di rifrazione del miele a 20°C.

3. *Principio*

Il metodo si basa sul principio secondo cui l'indice di rifrazione del miele varia in funzione del contenuto di acqua, a parità di temperatura. In particolare, tale indice diminuisce all'aumentare del contenuto d'acqua.

Il valore percentuale di acqua si ricava dal prospetto 1, ottenuto facendo riferimento alla formula di Wedmore [1] che mette in relazione l'indice di rifrazione con il contenuto di acqua determinato mediante un procedimento di essiccazione sotto vuoto [2].

4. *Apparecchiatura*

Apparecchiatura e vetreria di uso corrente nel laboratorio di analisi chimica, ed in particolare la seguente:

- 4.1. Bagno termostatico, in grado di mantenere la temperatura a $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- 4.2. Rifrattometro tipo Abbe, con risoluzione di 0,0002 unità di IR o strumento equivalente, dotato di termometro con graduazione di $0,5^{\circ}\text{C}$.
- 4.3. Provette, o altra vetreria da laboratorio con tappo a chiusura ermetica.

5. *Preparazione del campione*

Preparare il campione di miele come indicato nel metodo "Procedimento per la preparazione del campione da sottoporre ad analisi chimica, chimico-fisica e melissopalinologica".

Nel caso di miele cristallizzato, anche solo parzialmente, porre l'aliquota di prova in un recipiente chiuso a perfetta tenuta (4.3), avendo cura di riempirlo totalmente, e riscaldare in bagno termostatico (4.1) a circa $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fino a completa dissoluzione dei cristalli.

Riportare l'aliquota di prova a temperatura ambiente e miscelarla accuratamente prima della misurazione.

6. Procedimento

6.1. Preparazione del rifrattometro

Assicurarsi che il prisma del rifrattometro sia pulito e perfettamente asciutto. La taratura, verificata periodicamente, deve essere effettuata con acqua distillata a 20°C (indice di rifrazione $n_D^{20} = 1,3330$) oppure con procedimento equivalente.

6.2. Misurazione

Porre una porzione dell'aliquota di prova sul prisma del rifrattometro (4.2.) in modo che la superficie del prisma sia completamente ricoperta.

Attendere 2 min. prima di effettuare la lettura dell'indice di rifrazione e registrare la temperatura. Effettuare due letture successive e calcolare il valore medio.

7. Calcolo ed espressione dei risultati

Il contenuto di acqua si ricava dal prospetto 1 (^a), che riporta la correlazione tra l'indice di rifrazione ed il contenuto di acqua nel miele.

Se la determinazione è stata effettuata a temperatura diversa da 20°C, il valore di indice di rifrazione deve essere corretto come di seguito indicato:

- temperatura maggiore di 20°C: sommare al valore della lettura 0,00023 per ogni °C;
- temperatura minore di 20°C: sottrarre al valore della lettura 0,00023 per ogni °C.

Esprimere il risultato in grammi per 100 grammi di miele, approssimando alla prima cifra decimale.

8. Precisione

I dati disponibili sulla ripetibilità e riproducibilità del metodo riguardano prove interlaboratorio effettuate nell'ambito della European Honey Commission [3] utilizzando il rifrattometro Abbe e sono riportati in appendice.

^a I valori contenuti nel prospetto 1 sono ricavati dalla seguente formula di Wedmore [1]:

$$A = \frac{1,7319 - \log (IR - 1)}{0,002243}$$

dove:

A è il contenuto di acqua, in g/100 g di miele;

1,7319 è uguale al logaritmo di 0,53939, numericamente pari a - 0,26810;

IR è l'indice di rifrazione.

Appendice

Risultati delle prove interlaboratorio condotte nell'ambito dell'European Honey Commission.

Media (g/100g)	ripetibilità (r)	riproducibilità (R)	dev. st. relativa di R (RSD _R %)
16,4	0,13	0,48	1,05
17,3	0,15	0,52	1,07
18,1	0,15	0,68	1,34
20,0	0,11	0,68	1,21

Prospetto 1 - Correlazione tra l'indice di rifrazione e il contenuto di acqua nel miele, approssimato alla prima cifra decimale

Indice di Rifrazione	Umidità (g/100g)						
1,5044	13,0	1,4997	14,8	1,4950	16,6	1,4903	18,5
1,5043	13,0	1,4996	14,8	1,4949	16,7	1,4902	18,5
1,5042	13,1	1,4995	14,9	1,4948	16,7	1,4901	18,6
1,5041	13,1	1,4994	14,9	1,4947	16,7	1,4900	18,6
1,5040	13,1	1,4993	14,9	1,4946	16,8	1,4899	18,6
1,5039	13,2	1,4992	15,0	1,4945	16,8	1,4898	18,7
1,5038	13,2	1,4991	15,0	1,4944	16,9	1,4897	18,7
1,5037	13,3	1,4990	15,1	1,4943	16,9	1,4896	18,7
1,5036	13,3	1,4989	15,1	1,4942	16,9	1,4895	18,8
1,5035	13,3	1,4988	15,1	1,4941	17,0	1,4894	18,8
1,5034	13,4	1,4987	15,2	1,4940	17,0	1,4893	18,9
1,5033	13,4	1,4986	15,2	1,4939	17,0	1,4892	18,9
1,5032	13,4	1,4985	15,3	1,4938	17,1	1,4891	18,9
1,5031	13,5	1,4984	15,3	1,4937	17,1	1,4890	19,0
1,5030	13,5	1,4983	15,3	1,4936	17,2	1,4889	19,0
1,5029	13,6	1,4982	15,4	1,4935	17,2	1,4888	19,1
1,5028	13,6	1,4981	15,4	1,4934	17,2	1,4887	19,1
1,5027	13,6	1,4980	15,5	1,4933	17,3	1,4886	19,1
1,5026	13,7	1,4979	15,5	1,4932	17,3	1,4885	19,2
1,5025	13,7	1,4978	15,5	1,4931	17,4	1,4884	19,2
1,5024	13,8	1,4977	15,6	1,4930	17,4	1,4883	19,3
1,5023	13,8	1,4976	15,6	1,4929	17,4	1,4882	19,3
1,5022	13,8	1,4975	15,6	1,4928	17,5	1,4881	19,3
1,5021	13,9	1,4974	15,7	1,4927	17,5	1,4880	19,4
1,5020	13,9	1,4973	15,7	1,4926	17,6	1,4879	19,4
1,5019	13,9	1,4972	15,8	1,4925	17,6	1,4878	19,5
1,5018	14,0	1,4971	15,8	1,4924	17,6	1,4877	19,5
1,5017	14,0	1,4970	15,8	1,4923	17,7	1,4876	19,5
1,5016	14,1	1,4969	15,9	1,4922	17,7	1,4875	19,6
1,5015	14,1	1,4968	15,9	1,4921	17,8	1,4874	19,6
1,5014	14,1	1,4967	16,0	1,4920	17,8	1,4873	19,7
1,5013	14,2	1,4966	16,0	1,4919	17,8	1,4872	19,7
1,5012	14,2	1,4965	16,0	1,4918	17,9	1,4871	19,7
1,5011	14,3	1,4964	16,1	1,4917	17,9	1,4870	19,8
1,5010	14,3	1,4963	16,1	1,4916	18,0	1,4869	19,8
1,5009	14,3	1,4962	16,1	1,4915	18,0	1,4868	19,9
1,5008	14,4	1,4961	16,2	1,4914	18,0	1,4867	19,9
1,5007	14,4	1,4960	16,2	1,4913	18,1	1,4866	19,9
1,5006	14,4	1,4959	16,3	1,4912	18,1	1,4865	20,0
1,5005	14,5	1,4958	16,3	1,4911	18,2	1,4864	20,0
1,5004	14,5	1,4957	16,4	1,4910	18,2	1,4863	20,1
1,5003	14,6	1,4956	16,4	1,4909	18,2	1,4862	20,1
1,5002	14,6	1,4955	16,4	1,4908	18,3	1,4861	20,1
1,5001	14,6	1,4954	16,5	1,4907	18,3	1,4860	20,2
1,5000	14,7	1,4953	16,5	1,4906	18,4	1,4859	20,2
1,4999	14,7	1,4952	16,5	1,4905	18,4	1,4858	20,3
1,4998	14,8	1,4951	16,6	1,4904	18,4	1,4857	20,3

Indice di rifrazione	Umidità (g/100g)	Indice di rifrazione	Umidità (g/100g)	Indice di rifrazione	Umidità (g/100g)
1,4856	20,3	1,4817	21,9	1,4778	23,5
1,4855	20,4	1,4816	21,9	1,4777	23,5
1,4854	20,4	1,4815	22,0	1,4776	23,6
1,4853	20,5	1,4814	22,0	1,4775	23,6
1,4852	20,5	1,4813	22,1	1,4774	23,6
1,4851	20,5	1,4812	22,1	1,4773	23,7
1,4850	20,6	1,4811	22,1	1,4772	23,7
1,4849	20,6	1,4810	22,2	1,4771	23,8
1,4848	20,7	1,4809	22,2	1,4770	23,8
1,4847	20,7	1,4808	22,3	1,4769	23,8
1,4846	20,7	1,4807	22,3	1,4768	23,9
1,4845	20,8	1,4806	22,3	1,4767	23,9
1,4844	20,8	1,4805	22,4	1,4766	24,0
1,4843	20,9	1,4804	22,4	1,4765	24,0
1,4842	20,9	1,4803	22,5	1,4764	24,0
1,4841	20,9	1,4802	22,5	1,4763	24,1
1,4840	21,0	1,4801	22,5	1,4762	24,1
1,4839	21,0	1,4800	22,6	1,4761	24,2
1,4838	21,1	1,4799	22,6	1,4760	24,2
1,4837	21,1	1,4798	22,7	1,4759	24,2
1,4836	21,1	1,4797	22,7	1,4758	24,3
1,4835	21,2	1,4796	22,7	1,4757	24,3
1,4834	21,2	1,4795	22,8	1,4756	24,4
1,4833	21,3	1,4794	22,8	1,4755	24,4
1,4832	21,3	1,4793	22,9	1,4754	24,4
1,4831	21,3	1,4792	22,9	1,4753	24,5
1,4830	21,4	1,4791	22,9	1,4752	24,5
1,4829	21,4	1,4790	23,0	1,4751	24,6
1,4828	21,5	1,4789	23,0	1,4750	24,6
1,4827	21,5	1,4788	23,1	1,4749	24,7
1,4826	21,5	1,4787	23,1	1,4748	24,7
1,4825	21,6	1,4786	23,1	1,4747	24,7
1,4824	21,6	1,4785	23,2	1,4746	24,8
1,4823	21,7	1,4784	23,2	1,4745	24,8
1,4822	21,7	1,4783	23,3	1,4744	24,9
1,4821	21,7	1,4782	23,3	1,4743	24,9
1,4820	21,8	1,4781	23,4	1,4742	24,9
1,4819	21,8	1,4780	23,4	1,4741	25,0
1,4818	21,9	1,4779	23,4	1,4740	25,0

Bibliografia

1. Wedmore E, 1955 - The accurate determination of the water content of honeys. Bee World, 36: 197-206.
2. Chataway HD, 1932 - Determination of moisture in honey. Can J Res, 6: 532-547.
3. Bogdanov S, Martin P, Lüllmann C, 1997 - Harmonised methods of the European Honey Commission. Apidologie, Extra issue.

DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI SOSTANZE INSOLUBILI IN ACQUA

1. *Scopo e campo di applicazione*

La presente norma specifica un metodo per la determinazione del contenuto di sostanze insolubili in acqua nel miele.

Il metodo si applica a tutti i tipi di miele.

2. *Definizioni*

Sostanze insolubili in acqua: materiale di varia natura che viene separato per filtrazione da una soluzione acquosa di miele. Nella frazione insolubile sono contenuti elementi figurati naturalmente presenti nel miele (granuli pollinici ed elementi indicatori di melata) e particelle solide di varia natura estranee alla sua composizione (cera, polvere, frammenti di insetti).

Questo parametro rappresenta un mezzo per la valutazione della pulizia del prodotto.

3. *Principio*

Il metodo si basa sulla determinazione gravimetrica delle sostanze insolubili in acqua separate per filtrazione da una soluzione acquosa di miele.

4. *Reagenti*

4.1. Acqua distillata riscaldata a circa 80°C.

5. *Apparecchiatura*

Apparecchiatura e vetreria di uso corrente nel laboratorio di analisi chimica, ed in particolare la seguente:

5.1. Bilancia analitica, con risoluzione 0,1 mg.

5.2. Stufa termostatica, in grado di mantenere la temperatura a 110°C ± 5°C o a 135°C ± 5°C.

5.3. Sistema per filtrazione in aspirazione, con crogiolo di vetro, il cui fondo è costituito da setto poroso in vetro sinterizzato e diametro dei pori compreso tra 15 µm e 40 µm o, in alternativa, con membrana filtrante in cellulosa per analisi quantitativa, a porosità di 20-25 µm ^(a).

5.4. Essiccatore contenente gel di silice quale essiccante.

^a I valori ottenuti con i due tipi di sistemi filtranti sono risultati non significativamente diversi per precisione (test F) ed accuratezza (test t) [1].

6. Preparazione del campione

Preparare il campione di miele come indicato nel metodo "Procedimento per la preparazione del campione da sottoporre ad analisi chimica, chimico-fisica e melissopalinoologica".

7. Procedimento

7.1. Operazioni preliminari

Prima della misura il supporto per la filtrazione, crogiolo in vetro o filtro in cellulosa (5.3.), va portato a massa costante, porre in stufa (5.2.) a 135°C (crogiolo di vetro) o a 110°C (filtro in cellulosa) per 1 h, pesare (5.1.) e porre nuovamente in stufa procedendo a intervalli di 30 min. fino a massa costante. Porre quindi il supporto per filtrazione in essiccatore (5.4.) fino al raggiungimento della temperatura ambiente. Annotare il valore alla quarta cifra decimale (m_2).

7.2. Misurazione

Pesare (5.1.) in un bicchiere da 250 ml circa 20g di miele, annotando il valore alla quarta cifra decimale (m_0), sciogliere con circa 200 ml di acqua (4.1.) e mescolare accuratamente. Filtrare sotto aspirazione (5.3.) la soluzione di miele e lavare accuratamente con acqua calda (4.1.) fino ad eliminazione degli zuccheri^b. Trasferire il filtro o il crogiolo (5.3.) in stufa (5.2.) ed operare come per il supporto (7.1), portandolo a massa costante e annotando il valore finale alla quarta cifra decimale (m_1).

8. Calcolo ed espressione dei risultati

Il contenuto percentuale di sostanze insolubili in acqua nel miele (SI) si ricava dalla seguente formula:

$$SI = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \cdot 100$$

dove:

m_0 è la massa del campione, in grammi;

m_1 è la massa del filtro più le sostanze insolubili, in grammi;

m_2 è la massa del filtro, in grammi.

Esprimere il risultato in grammi per 100 grammi di miele, approssimando alla seconda cifra decimale.

^b Per saggiare l'eliminazione degli zuccheri trasferire una parte del filtrato in un tubo da saggio e aggiungere fluoroglucina all'1% in etanolo. Mescolare e fare scorrere lungo le pareti del tubo qualche goccia di acido solforico concentrato. Se ci sono zuccheri residui, all'interfaccia si produce una colorazione giallo-bruna.

9. Precisione

I dati disponibili sulla ripetibilità e riproducibilità del metodo, desunti da uno studio collaborativo condotto nel Regno Unito [2] sono riportati in appendice.

Appendice

Risultati delle prove interlaboratorio desunti da uno studio condotto nel Regno Unito.

Media (g/100g)	ripetibilità (r)	riproducibilità (R)	dev. st. relativa di R (RSD _R %)
0,009	0,016	0,016	63,49
0,011	0,010	0,026	84,42
0,021	0,016	0,021	35,71
0,031	0,023	0,023	26,50

Bibliografia

1. Carpana. E., Marcazzan G.L., Zucchi P., 2001 - Determinazione nel miele delle sostanze insolubili in acqua. *Industrie Alimentari*, XL: 1238-1240.
2. Lord D.W., Scotter M.J., Whittaker A.D, Wood R., 1988 - The determination of acidity, apparent reducing sugar and sucrose, hydroxymethylfurfural, mineral, moisture, water-insoluble solids contents in honey; collaborative study, *J. Assoc. Publ. Anal. (UK)*, 26: 51-76.

DETERMINAZIONE DELLA CONDUCIBILITÀ ELETTRICA

1. Scopo e campo di applicazione

La presente norma specifica un metodo per la determinazione della conducibilità elettrica del miele.

Il metodo si applica a tutti i tipi di miele.

2. Definizioni

Conducibilità elettrica del miele: la conducibilità elettrica è la proprietà delle soluzioni acquose contenenti specie ioniche di condurre la corrente elettrica e viene determinata attraverso la misura della resistenza elettrica, di cui è il reciproco. Essa è direttamente correlabile alla componente minerale solubile, presente in diversa misura nelle varie tipologie di miele uniflorale [1]. Il valore della conducibilità elettrica del miele è generalmente compreso tra 0,1 e 2,0 mS/cm.

3. Principio

Il metodo si basa sulla misura della resistività specifica di una soluzione acquosa di miele, effettuata con un conduttimetro.

Il metodo si basa sul lavoro originale di Vorwöhler [2,3] modificato da Louveaux et al. [4].

4. Reagenti

Tutti i reagenti devono essere puri per analisi.

- 4.1. Acqua bidistillata avente conducibilità minore di 0,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$.
- 4.2. Cloruro di potassio (KCl).
- 4.3. Soluzione di cloruro di potassio 0,1 N: pesare (5.1.) 7,46 g di cloruro di potassio (4.2.), precedentemente essiccato in stufa termostatica (5.7.) a 130°C; sciogliere in acqua (4.1.), trasferire quantitativamente in matraccio tarato da 1000 ml e portare a volume. La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso^(a).

5. Apparecchiatura

Apparecchiatura e vetreria di uso corrente nel laboratorio di analisi chimica, e in particolare la seguente:

- 5.1. Bilancia analitica con risoluzione 0,1 mg.
- 5.2. Bilancia tecnica con risoluzione 0,01 g.
- 5.3. Conduttimetro con risoluzione 0,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ sulla scala di lettura più bassa.

^a Esistono in commercio soluzioni di riferimento per misure di conducibilità, aventi il valore di conducibilità richiesto.

- 5.4. Cella di conducibilità ad immersione con elettrodi di platino platinato aventi superficie di 1 cm² e posti alla distanza di 1 cm.
- 5.5. Bagno termostatico in grado di mantenere la temperatura a 20°C ± 1°C.
- 5.6. Termometro con graduazione di 0,1°C.
- 5.7. Stufa termostatica in grado di mantenere la temperatura a 130°C ± 5°C.

6. Preparazione del campione

Preparare il campione di miele come indicato nel metodo "Procedimento per la preparazione del campione da sottoporre ad analisi chimica, chimico-fisica e melissopalnologica".

7. Procedimento

- 7.1. Determinazione della costante di cella
Se non si dispone del valore della costante della cella di conducibilità ^(b) (5.4.) occorre procedere alla sua determinazione.
Introdurre in un bicchiere un'aliquota della soluzione di cloruro di potassio (4.3.) e portare a 20°C in bagno termostatico (5.5.). Risciacquare accuratamente la cella (5.4.) con la stessa soluzione, porla nel bicchiere facendo attenzione che gli elettrodi siano completamente immersi ed eseguire la lettura.
Calcolare la costante della cella con la seguente formula:

$$K = 11,691 \cdot \frac{1}{G}$$

dove:

K è la costante della cella in cm⁻¹;

G è la conducibilità elettrica misurata in milliSiemens;

11,691 è la conducibilità elettrica della soluzione di cloruro di potassio 0,1 N (4.3.) a 20°C.

- 7.2. Determinazione della conducibilità elettrica del miele
Pesare (5.2.) in un bicchiere da 100 ml una quantità di miele equivalente a 20,0 g di massa secca. La quantità di miele da pesare si può calcolare utilizzando la seguente formula [4]:

$$M = 20 \cdot \frac{100}{100 - A}$$

dove:

M è la massa di miele da pesare, in grammi;

^b La maggior parte dei conduttimetri disponibili in commercio consente oggi di determinare automaticamente la costante di cella, che in genere è comunque già nota e indicata nelle specifiche della fornitura. Hanno inoltre altre funzioni tra cui la possibilità di compensazione della temperatura e il calcolo automatico della conducibilità in funzione della costante di cella (K).

- 20 è la massa teorica nominale del miele;
A è l'umidità del miele (Vedi metodo "Determinazione del contenuto di acqua")

Sciogliere il miele con un piccolo volume di acqua (4.1.), trasferire quantitativamente in un matraccio tarato da 100 ml, e portare a volume (soluzione campione).

Introdurre in un bicchiere circa 50 ml della soluzione campione e portare a 20°C in bagno termostatico (5.5.). Risciacquare accuratamente la cella (5.4.) con la soluzione campione, immergerla nel bicchiere contenente la stessa soluzione ed eseguire la lettura.

8. Calcolo ed espressione dei risultati

Calcolare la conducibilità elettrica della soluzione di miele usando la seguente formula (vedi nota 1, pag. 2):

$$G_M = K \cdot G$$

dove:

- G_M è la conducibilità elettrica della soluzione di miele, in milliSiemens per centimetro;
K è la costante della cella in cm^{-1} ;
G è il valore misurato in milliSiemens.

Esprimere il risultato in mS/cm, approssimando alla seconda cifra decimale.

9. Precisione

I dati sulla ripetibilità e riproducibilità del metodo, desunti da una prova interlaboratorio DIN [5], sono riportati da Bogdanov et al. [6].

Il limite di ripetibilità (ovvero il valore al di sotto del quale si situa, o a cui equivale, con una probabilità del 95% lo scarto tra due singoli risultati ottenuti da misurazioni effettuate dallo stesso operatore, nello stesso laboratorio, con la stessa apparecchiatura, in un breve intervallo di tempo) non deve essere maggiore del 5% del valore della misura.

Il limite di riproducibilità (ovvero il valore al di sotto del quale si situa, o a cui equivale, con una probabilità del 95% lo scarto tra due singoli risultati ottenuti da misurazioni effettuate da operatori differenti, in laboratori differenti, con apparecchiature differenti) non deve essere maggiore del 10% del valore della misura.

Bibliografia

1. Piazza M.G., Accorti M., Persano Oddo L., 1991 - Electrical conductivity, ash, colour and specific rotatory power in Italian unifloral honeys. *Apicoltura*, 7: 51-63.
2. Vorwohl G., 1964 - Messung der elektrischen Leitfähigkeit des Honigs und der Messwerte zur Sortendiagnose und zum Nachweis von Verfälschungen mit Zuckerfütterungshonig. *Z Bienenforsch*, 7: 37-47.
3. Vorwohl G., 1964 - Die Beziehung zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachmassiger Herkunft. *Ann Abeille*, 7: 301-309.
4. Louveaux M.J, Pourtallier M.P, Vorwohl M.G., 1973 - Mesure de la conductivité du miel, *Bull. Tech. Apicole*, XVI (2): 7-11.
5. DIN Norm 10753, 1991 - Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit von Honig.
6. Bogdanov S., Martin P., Lüllmann C., 1997 - Harmonised methods of the European Honey Commission, *Apidologie*, Extra Issue.

DETERMINAZIONE DI pH, ACIDITÀ LIBERA, ACIDITÀ COMBINATA (LATTONI) E ACIDITÀ TOTALE

1. *Scopo e campo di applicazione*

La presente norma specifica un metodo per la determinazione del pH, dell'acidità libera e dell'acidità combinata (lattoni). Dalla somma dell'acidità libera e dei lattoni si ricava l'acidità totale.

Il metodo si applica a tutti i tipi di miele.

2. *Definizioni*

- 2.1. pH: è il pH di una soluzione acquosa di miele, preparata come di seguito descritto (7.2).
- 2.2. Acidità libera: acidità di una soluzione acquosa di miele titolabile con una soluzione di idrossido di sodio (NaOH) fino a pH 8,5.
- 2.3. Acidità combinata (lattoni): acidità di una soluzione acquosa di miele che non è direttamente titolabile, ma lo diviene a seguito di idrolisi prodotta con l'aggiunta di alcali.
- 2.4. Acidità totale: valore che si ottiene dalla somma dell'acidità libera (2.2.) e dei lattoni (2.3.).
L'acidità del miele è dovuta alla presenza di acidi organici in quantità diversa in funzione dell'origine botanica del miele. Tali acidi si trovano in uno stato di equilibrio variabile tra forma libera e forma combinata (lattoni); a causa di ciò i valori di 2.2. e 2.3. risentono di una variabilità maggiore rispetto alla somma delle due (2.4.) (vedi paragrafo 9 e appendice).
I parametri definiti in 2.1., 2.2., 2.3. e 2.4. sono utili per la diagnosi dell'origine botanica e per la valutazione della qualità del miele [1].
- 2.5. Titolazione potenziometrica a punto finale: titolazione nella quale l'erogazione del titolante viene interrotta a pH prefissato.

3. *Principio*

Il metodo si basa sul principio della misura potenziometrica del pH e sulla neutralizzazione acido-base, effettuata con due successive titolazioni potenziometriche a punto finale condotte con un dispositivo automatico o manuale: l'acidità libera si misura per titolazione diretta, i lattoni si idrolizzano in seguito all'aggiunta di alcali alla soluzione di miele e vengono quindi determinati mediante retrotitolazione.

Il metodo si basa sul lavoro originale di White [2, 3].

4. Reagenti

Tutti i reagenti devono essere puri per analisi.

- 4.1. Acqua distillata esente da anidride carbonica (CO_2), ottenuta come segue: immediatamente prima dell'uso far bollire l'acqua distillata per 5 min. e lasciare raffreddare a temperatura ambiente in recipiente chiuso.
- 4.2. Soluzioni tampone di riferimento a pH 4,0 e a pH 9,0.
- 4.3. Soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 0,05 N a titolo noto.
- 4.4. Soluzione di acido cloridrico (HCl) 0,05 N a titolo noto.

5. Apparecchiatura

Apparecchiatura e vetreria di uso corrente nel laboratorio di analisi chimica, ed in particolare la seguente:

- 5.1. pH-metro, con risoluzione di 0,01 unità di pH, con elettrodo a membrana combinato.
- 5.2. Titolatore automatico o, in alternativa, burette con graduazione da 0,02 ml, anche a lettura digitale.
- 5.3. Bilancia tecnica, con risoluzione 0,01 g.
- 5.4. Bicchieri per titolazione con capacità di almeno 150 ml.

6. Preparazione del campione

Preparare il campione di miele come indicato nel metodo "Procedimento per la preparazione del campione da sottoporre ad analisi chimica, chimico-fisica e melissopalnologica".

7. Procedimento

- 7.1. Taratura dell'elettrodo
L'elettrodo di misura deve essere tarato a pH 4,0 e a pH 9,0 con le soluzioni tampone di riferimento (4.2.) prima di ciascuna serie di misure.
- 7.2. Misurazione
Pesare (5.3.) 10,0 g di miele direttamente nel bicchiere per titolazione (5.4.), scioglierlo con 75 ml di acqua (4.1.) e procedere immediatamente alla misura.
Per la misura del pH immergere l'elettrodo (5.1.) nella soluzione di miele, mantenendola sotto agitazione, ed effettuare la lettura annotando il valore.
Per la determinazione dell'acidità libera titolare (5.2.) con la soluzione di idrossido di sodio (4.3.) fino a pH 8,5, mantenendo la soluzione sotto agitazione, e annotare il volume di titolante impiegato.

Per la determinazione dell'acidità combinata aggiungere 10 ml della soluzione di idrossido di sodio (4.3.) e retrotitolare immediatamente con la soluzione di acido cloridrico (4.4.) fino a pH 8,3, sempre sotto agitazione, e annotare il volume di titolante impiegato.

N.B.: Per ottenere una buona ripetibilità della misura è necessario che entrambe le titolazioni vengano effettuate erogando il reattivo titolante a velocità costante (velocità consigliata: 5 ml/min) ed è importante terminare ciascuna titolazione entro due minuti circa. In caso di utilizzo del titolatore automatico, impostare i parametri in modo da rispettare i tempi operativi richiesti.

8. Calcolo ed espressione dei risultati

8.1. pH

Esprimere i valori di pH alla seconda cifra decimale.

8.2. Acidità

I valori di acidità, espressi come milliequivalenti di idrossido di sodio necessari per titolare 1 kg di miele (meq/kg), vengono calcolati secondo le seguenti formule:

$$\text{Acidità libera (meq/kg)} = \frac{V \cdot N}{M} \cdot 1000$$

dove:

V è il volume in ml di idrossido di sodio impiegato nella titolazione;

N è la normalità della soluzione di idrossido di sodio;

M è la massa del campione, in grammi.

$$\text{Acidità combinata o lattoni (meq/kg)} = \frac{(10,00 - V) \cdot N}{M} \cdot 1000$$

dove:

V è il volume in ml di acido cloridrico impiegato nella titolazione;

N è la normalità della soluzione di acido cloridrico;

M è la massa del campione, in grammi;

10,00 è il volume in ml di idrossido di sodio aggiunto in eccesso.

$$\text{Acidità totale (meq/kg)} = \text{acidità libera} + \text{lattoni}$$

Approssimare i risultati alla prima cifra decimale.

9. Precisione

Dati sulla ripetibilità e riproducibilità del metodo sono riportati in appendice, e riguardano prove interlaboratorio effettuate nell'ambito dell'European Honey Commission [4] e in Italia [5].

Appendice

pH. Risultati di prove interlaboratorio condotte nell'ambito dell'European Honey Commission.

media	ripetibilità (r)	riproducibilità (R)	dev. st. relativa di R (RSD _R %)
3,6	0,18	0,75	7,44
3,8	0,24	1,00	9,40
4,0	0,15	0,79	7,05
4,0	0,11	0,50	4,46
4,0	0,11	0,45	4,02
4,1	0,14	0,67	5,84
4,3	0,15	0,47	3,90

Acidità libera. Risultati di prove interlaboratorio condotte in Italia

media (meq/kg)	ripetibilità (r)	riproducibilità (R)	dev. st. relativa di R (RSD _R %)
10,3	1,39	8,09	28,05
15,3	1,51	9,15	21,36
24,2	1,93	15,04	22,20
26,0	1,13	4,99	6,85
26,1	2,03	5,18	7,09
32,2	3,21	14,27	15,83

Acidità combinata (lattoni). Risultati di prove interlaboratorio condotte in Italia

media (meq/kg)	ripetibilità (r)	riproducibilità (R)	dev. st. relativa di R (RSD _R %)
1,7	2,02	2,99	62,82
1,8	1,35	3,91	77,58
2,0	1,46	4,15	74,11
3,4	2,72	5,71	59,98
6,2	1,74	10,77	62,04
6,6	1,44	12,38	66,99

Acidità totale. Risultati di prove interlaboratorio condotte in Italia

media (meq/kg)	ripetibilità (r)	riproducibilità (R)	dev. st. relativa di R (RSD _R %)
11,7	1,45	5,28	16,12
18,6	2,75	5,80	11,14
27,7	2,76	5,58	7,19
28,3	2,76	6,23	7,86
30,3	1,91	6,00	7,07
38,8	3,62	8,25	7,59

Bibliografia

1. Persano Oddo L., Baldi E., Piazza M.G., 1986 - Acidità e pH nei principali mieli italiani. *Apicoltura*, 2: 145-154.
2. White J.W., 1958 - The composition of honey. II. Lactone content. - *Assoc. Off. Agr. Chem. Jour.* 41: 194-197.
3. AOAC, 1990 - Official methods of analysis. Honey. 962.19: 1033.
4. Bogdanov S., Martin P., Lüllmann C., 1997. Harmonized methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, Extra issue.
5. Conte L., Persano Oddo L., Cozzoli O., Piana M.L., (a cura di) 2001 - Armonizzazione e validazione delle metodologie analitiche concernenti il miele. Atti del convegno "Il ruolo della ricerca in apicoltura. Bologna, marzo 2001: 263-268.

DETERMINAZIONE DELLA ATTIVITÀ DIASTASICA

1. Scopo e campo di applicazione

La presente norma specifica un metodo per la determinazione dell'attività della diastasi (o amilasi) nel miele.

Il metodo si applica a tutti i tipi di miele.

2. Definizioni

- 2.1. Diastasi (o amilasi): α e β - transglucosidasi, enzimi naturalmente contenuti nel miele; essi sono presenti in quantità variabile nel miele appena estratto e diminuiscono gradatamente durante la conservazione o in seguito a trattamenti termici.
- 2.2. Attività diastatica del miele: esprime l'attività della diastasi in millilitri di salda d'amido all'1% idrolizzato dall'enzima contenuto in 1 g di miele, in 1 ora, a 40°C, nelle condizioni analitiche stabilite^(a) [1].

3. Principio

Il metodo si basa sull'impiego di un substrato insolubile costituito da amido cui è legato un gruppo cromoforo blu. Attraverso l'idrolisi enzimatica, si liberano frammenti solubili colorati, il cui assorbimento a 620 nm viene determinato spettrofotometricamente. L'assorbanza della soluzione è direttamente proporzionale all'attività diastatica del campione. Il presente metodo prevede l'utilizzo di un reattivo commerciale e si basa sul metodo originale di Siegenthaler [2] modificato da Bogdanov [3, 4] e da Persano e Pulcini [5].

4. Reagenti e soluzioni

Tutti i reagenti devono essere puri per analisi.

- 4.1. Kit costituito da amido modificato con cromoforo blu e con tampone fosfato^(b).
- 4.2. Acqua distillata.
- 4.3. Soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 0,5M.
- 4.4. Acetato di sodio triidrato ($\text{NaCOOCH}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).

^a L'attività diastatica corrisponde numericamente alle unità Gothe (o unità Schade) per grammo di miele. Una unità Gothe è definita come la quantità di enzima che idrolizza 0,01 g di amido, al punto finale fissato, in un'ora, ad una temperatura di 40°C, nelle condizioni analitiche stabilite. L'attività diastatica viene indicata anche come "indice diastatico" (ID) o "numero di diastasi" (ND).

^b Nella determinazione dei parametri di precisione di questo metodo è stato utilizzato il reattivo commerciale Phadebas® Amylase Test. Questa informazione non costituisce un'approvazione di tale prodotto. Altri substrati analoghi possono essere impiegati purché garantiscano le stesse caratteristiche di precisione.

- 4.5. Acido acetico glaciale (CH_3COOH).
- 4.6. Tampone acetato 0,1 M, pH 5,2: pesare (5.7.) 13,6 g di acetato di sodio triidrato (4.4.) e sciogliere in 800 ml di acqua distillata. Regolare il pH della soluzione (5.5.) al valore 5,2 con l'aggiunta di acido acetico glaciale (4.5.); trasferire quantitativamente la soluzione in un matraccio tarato da 1000 ml e portare a volume con acqua distillata.

5. *Apparecchiatura*

Apparecchiature e vetreria di uso corrente nel laboratorio di analisi chimica, e in particolare la seguente:

- 5.1. Spettrofotometro che consenta la misura alla lunghezza d'onda di 620 nm.
- 5.2. Bagno termostatico in grado di mantenere la temperatura a $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.
- 5.3. Cronometro da laboratorio.
- 5.4. Agitatore per provette.
- 5.5. pH-metro, con risoluzione di 0,01 unità di pH.
- 5.6. Bilancia analitica, con risoluzione di 0,1 mg.
- 5.7. Bilancia tecnica, con risoluzione di 0,01 g.
- 5.8. Cuvette aventi 1 cm di cammino ottico.
- 5.9. Centrifuga da laboratorio che consenta di raggiungere $1500 \times g$ (accelerazione centrifuga relativa) o in alternativa filtri di carta di uso comune in laboratorio.

6. *Preparazione del campione*

Poiché l'attività diastatica del miele può variare durante la conservazione del prodotto, il campione da sottoporre a prova deve essere conservato a temperatura minore a 10°C .

Preparare il campione di miele come indicato nel metodo "Procedimento per la preparazione del campione da sottoporre ad analisi chimica, chimico-fisica e melissopalnologica", senza sottoporre a riscaldamento.

7. *Procedimento*

Pesare (5.6.) 1,00 g di miele, sciogliere in circa 20 ml di tampone acetato (4.6.), trasferire quantitativamente in un matraccio tarato da 100 ml e portare a volume con tampone acetato. Trasferire 5,0 ml di tale soluzione in una provetta (campione). Porre in un'altra provetta 5,0 ml di tampone acetato (4.6.) (bianco). Collocare entrambe le provette in bagno termostatico (5.2.) già alla temperatura di 40°C e lasciare riscaldare per 5 min esatti. Aggiungere sia al bianco che al campione una unità del kit (4.1.), utilizzando le pinzette, e agitare per 10 sec (5.4.).

Nota: Fare attenzione a non contaminare i reagenti con saliva o sudore.

Porre nuovamente le provette in bagno termostatico alla temperatura di 40°C agitando ogni 5 min per 5 sec e fermare la reazione dopo 15 min esatti, aggiungendo ad ogni provetta 1,0 ml di NaOH (4.3.). Agitare meccanicamente (5.4.) per 5 sec.

Centrifugare (5.9.) le soluzioni per 5 min a 1500 ×g o filtrarle su filtro di carta; trasferire il surnatante o il filtrato in una cuvetta (5.8.) ed effettuare la lettura spettrofotometrica (5.1.) del bianco e del campione a 620 nm contro acqua.

L'assorbanza della soluzione di bianco va sottratta da quella del campione (ΔA_{620}).

Se l'assorbanza è maggiore di 1, diluire il campione con acqua distillata (4.2.) tenendo poi conto del fattore di diluizione nei calcoli.

8. Calcolo ed espressione dei risultati

L'attività diastasica si calcola con due formule diverse a seconda che l'assorbanza del campione (ΔA_{620}) sia maggiore o minore di 0,45.

Nel caso di valori maggiori di 0,45, si utilizza la seguente formula [4]:

$$\text{Attività diastasica} = 28,2 \cdot \Delta A_{620} + 2,64$$

Per valori minori di 0,45 si utilizza invece la formula [5]:

$$\text{Attività diastasica} = 35,17 \cdot \Delta A_{620} + 0,46$$

Le formule sono state ricavate dalla simultanea determinazione, in un numero significativo di campioni a diverso contenuto di diastasi, dell'attività diastasica con il metodo qui descritto e con il metodo di Schade [4, 6]. In entrambi i casi è stata rilevata una buona correlazione lineare tra i due metodi (per la prima formula $r = 0,987$; per la seconda $r = 0,963$).

Approssimare i risultati alla prima cifra decimale.

9. Precisione

I dati disponibili sulla ripetibilità e riproducibilità del metodo, riportati in appendice, riguardano prove interlaboratorio effettuate nell'ambito della European Honey Commission [4].

Nota: In alternativa al metodo qui riportato, possono essere impiegate altre metodiche purché rispondenti alle stesse caratteristiche di precisione di cui al paragrafo 9.

Appendice

Attività diastatica. Risultati delle prove interlaboratorio condotte nell'ambito dell'European Honey Commission.

media (A_{620})	ripetibilità (r)	riproducibilità (R)	dev. st. relativa di R ($RSD_R\%$)
0,21	0,03	0,11	18,03
0,31	0,03	0,13	15,24
0,41	0,03	0,16	13,89
0,59	0,04	0,20	12,27
0,70	0,05	0,27	13,85
0,71	0,04	0,31	15,75
0,73	0,05	0,25	12,16
0,97	0,07	0,34	12,37
1,29	0,06	0,43	11,81

Bibliografia

1. Codex Alimentarius Commission, 1969 - Standard for honey (CAC/RS 12 1969). FAO - OMS, Roma.
2. Siegenthaler U., 1975 - Bestimmung der Amylase in Bienenhonig mit einem handelsüblichen, farbmarkierten Substrat. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 66: 393-399.
3. Bogdanov S., 1984 - Honigdiastase, Gegenüberstellung verschiedener Bestimmungsmethoden. Mitt. Geb. Lebensmittelunters Hyg., 75: 214-220.
4. Bogdanov S., Martin P., Lüllmann C., 1997 - Harmonized methods of the European Honey Commission. Apidologie, Extra issue: 31-37.
5. Persano Oddo L., Pulcini P., 1999 - A scientific note on the Phadebas method for honeys with low enzyme content. Apidologie, 30: 347-348.
6. Schade J.E., Marsh G.L., Eckert J.E., 1958 - Diastase activity and hydroxymethylfurfural in honey and their usefulness in detecting heat adulterations. Food Res., 23: 446-463.

DETERMINAZIONE DELL'IDROSSIMETILFURFURALE PER CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA RISOLUZIONE (HPLC)

1. *Scopo e campo di applicazione*

La presente norma specifica un metodo per la determinazione del contenuto di idrossimetilfurfurale (HMF) nel miele.

Il metodo si applica a tutti i tipi di miele.

2. *Definizioni*

Idrossimetilfurfurale (HMF), 5-idrossimetilfuran-2-carbaldeide: sostanza che si forma per degradazione degli zuccheri, in particolare del fruttosio, in ambiente acido. Esso è assente o presente in bassissima concentrazione nel miele appena estratto e aumenta gradatamente durante la conservazione o in seguito a trattamenti termici.

3. *Principio*

La determinazione dell'HMF si effettua in soluzioni di miele filtrate mediante impiego di un sistema cromatografico in fase liquida ad alta risoluzione dotato di rivelatore UV, operando in fase inversa. Il segnale viene confrontato con quello di soluzioni di riferimento a concentrazione nota. Il metodo si basa sul lavoro originale di Jeuring e Kuppers [1].

4. *Reagenti*

Tutti i reagenti devono essere puri per analisi.

- 4.1. Acqua bidistillata per HPLC.
- 4.2. HMF puro per analisi. Il composto va conservato alla temperatura compresa tra 4 - 8°C. Il composto è altamente igroscopico.
- 4.3. Soluzione madre di HMF: pesare (5.4.) annotando la massa alla terza cifra decimale circa 0,1 g di HMF (4.2.) e discioglierlo in acqua (4.1.). Trasferire quantitativamente in un matraccio tarato da 100 ml e portare a volume. Questa soluzione può essere conservata a -20°C per tre mesi.

- 4.4. Soluzione di riferimento di HMF: prelevare (5.6.) 0,5 ml della soluzione madre (4.3.), trasferirli in un matraccio tarato da 100 ml e portare a volume con acqua (4.1.). Questa soluzione va preparata lo stesso giorno del suo utilizzo (*).
- 4.5. Alcol metilico per HPLC.
- 4.6. Fase mobile: miscela acqua (4.1.) - alcol metilico (4.5.) 90:10 v/v. La soluzione va degasata prima del suo utilizzo (5.8.).

5. Apparecchiatura

Apparecchiatura e vetreria di uso corrente nel laboratorio di analisi chimica, in particolare la seguente:

- 5.1. Sistema cromatografico in fase liquida ad alta risoluzione (HPLC) composto da: pompa isocratica, rivelatore UV, iniettore a volume variabile o a loop intercambiabile, sistema di acquisizione ed elaborazione dati.
- 5.2. Colonna cromatografica a fase inversa avente dimensioni: 250 × 4 o 4,6 mm, riempita con octadecilsilano (C₁₈), avente particelle di diametro 5 µm.
- 5.3. Filtri per siringa, con porosità 0,45 µm.
- 5.4. Bilancia analitica con risoluzione 0,1 mg.
- 5.5. Bilancia tecnica con risoluzione 0,01 g.
- 5.6. Micropipette.
- 5.7. Siringa per cromatografia liquida.
- 5.8. Sistema per degasare la fase mobile (4.6.).
- 5.9. Spettrofotometro che consenta la misura a 285 nm.
- 5.10. Cuvette in quarzo o monouso aventi 1 cm di cammino ottico.

6. Preparazione del campione

Poiché la concentrazione dell'HMF può variare durante la conservazione del prodotto, il campione da sottoporre a prova deve essere conservato a temperatura minore di 10°C. Preparare il campione di miele come indicato nel metodo "Procedimento per la preparazione del campione da sottoporre ad analisi chimica, chimico-fisica e melissopalnologica".

* La concentrazione della soluzione di riferimento può essere controllata [2] misurandone allo spettrofotometro (4.3.9) l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 285 nm contro acqua in cuvette da 1 cm (4.3.10). Si procede quindi al calcolo:

$$C = \frac{A}{l \cdot 133,57} \cdot 1000$$

dove:

C è la concentrazione della soluzione di riferimento espressa in mg/l.

A è l'assorbanza della soluzione di riferimento.

133,57 è l'assorbanza specifica ($a_{1cm}^{1\%}$) della soluzione di HMF

l è il cammino ottico relativo alla cuvetta di misura, espresso in cm.

1000 è il fattore di conversione di grammi in milligrammi.

7. Procedimento

Pesare (5.5.) 10,0 g di miele in un bicchiere da 100 ml, sciogliere con circa 25 ml di acqua (4.1.), trasferire quantitativamente in un matraccio tarato da 50 ml e portare a volume (soluzione campione). Filtrare la soluzione campione con un filtro da 0,45 µm (5.3.), scartando i primi millilitri (circa 2 ml).

Effettuare le analisi nelle seguenti condizioni operative:

- Fase mobile (vedi 4.6.)
- Velocità di flusso: 1,0 ml/min.
- Volume di iniezione: 10-50 µl.
- Lunghezza d'onda: 285 nm.

Lasciare condizionare la colonna per almeno 30 minuti al flusso di esercizio, prima di procedere con l'analisi.

Verificare la risposta strumentale iniettando (5.7.) la soluzione di riferimento (4.4.) il numero di volte necessario ad ottenere una risposta stabile. Iniettare quindi la soluzione campione. La misurazione deve essere effettuata entro 1 h dallo scioglimento del miele. Se si effettuano più misure è opportuno verificare periodicamente la risposta strumentale iniettando la soluzione di riferimento.

Nota: Nel miele in soluzione la concentrazione di HMF tende a diminuire col tempo. Questo fenomeno, che avviene con tempi diversi nei diversi tipi di miele, può essere evitato preparando la soluzione campione come segue: Pesare (5.5.) 10,0 g di miele in un bicchiere da 100 ml, sciogliere con circa 25 ml di acqua (4.1.) e trasferire quantitativamente in un matraccio tarato da 50 ml. Aggiungere 0,5 ml di soluzione Carrez I ^(b) ed agitare; aggiungere quindi 0,5 ml di soluzione Carrez II ^(c), agitare e portare a volume con acqua (4.1.). Filtrare la soluzione su carta da filtro eliminando i primi millilitri del filtrato (circa 10 ml). Filtrare ancora la soluzione campione con un filtro da 0,45 µm (5.3.), scartando i primi millilitri (circa 2 ml) e procedere con l'analisi. Questo procedimento è raccomandato qualora fra lo scioglimento del miele e la misurazione debba intercorrere un intervallo di tempo superiore ad 1 ora.

8. Calcolo ed espressione dei risultati

La concentrazione di HMF nel campione viene calcolata confrontando l'area del picco della soluzione campione con quella della soluzione di riferimento, tenendo conto del fattore di diluizione del miele e del titolo effettivo della soluzione di riferimento (4.4.). Si ottiene così la seguente relazione:

$$\text{HMF (mg/kg)} = \frac{A_c \cdot C_s \cdot f_d}{A_s}$$

dove:

A_c è l'area della soluzione campione.

^b Soluzione Carrez I: pesare (5.5.) 15,0 g di potassio ferrocianuro ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$), sciogliere in acqua (4.1.), trasferire quantitativamente in un matraccio tarato da 100 ml e portare a volume.

^c Soluzione Carrez II: pesare (5.5.) 30,0 g di acetato di zinco ($Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$), sciogliere in acqua (4.1.), trasferire quantitativamente in un matraccio tarato da 100 ml e portare a volume.

- Cs è la concentrazione della soluzione di riferimento espressa in mg/l; è pari ai milligrammi di HMF pesati (4.3.) e moltiplicati per 0,05.
 fd è il fattore di diluizione del miele, pari a 5.
 As è l'area della soluzione di riferimento.

I risultati vanno espressi in milligrammi di HMF per chilogrammo di miele, approssimando alla prima cifra decimale.

9. Precisione

I dati disponibili sulla ripetibilità e riproducibilità del metodo, riportati in appendice, riguardano prove interlaboratorio effettuate nell'ambito della European Honey Commission [2].

Nota: In alternativa al metodo qui riportato, possono essere impiegate altre metodiche purché rispondenti alle stesse caratteristiche di precisione di cui al paragrafo 9.

Appendice

Risultati delle prove interlaboratorio condotte nell'ambito dell'European Honey Commission.

media (mg/kg)	ripetibilità (r)	riproducibilità (R)	dev. st. relativa di R (RSD _R %)
5,20	0,40	1,60	10,99
22,80	1,20	4,90	7,68
42,30	2,10	7,30	6,16

Bibliografia

1. Jeuring J., Koppers F., 1980 - High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63:1215.
2. White, J. W., 1979 - Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 62 (3): 509-514.
3. Bogdanov S., Martin P., Lüllmann. C., 1997 - Harmonised methods of the European Honey Commission, Apidologie, Extra issue: 23-24.

03A09206