

Idrolisi rapida degli esteri degli steroli nei grassi

G. NOTA, S. SPAGNA MUSSO, R. ROMANO

DIPARTIMENTO DI SCIENZA DEGLI ALIMENTI - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

D. NAVIGLIO

ISTITUTO DI SCIENZE DELL'ALIMENTAZIONE DEL CNR - AVELLINO

C. IMPROTA

DIPARTIMENTO DI CHIMICA - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

A RAPID HYDROLYSIS OF STERYL ESTERS

A method which allows a quantitative hydrolysis of steryl esters is described.

The gaschromatographic evaluation of total sterols amount is quite rapid as the analysis is carried out directly on the fat previously transesterified

Viene presentato un metodo che consente di ottenere steroli totali liberi mediante idrolisi quantitativa dei loro esteri.

La metodica proposta permette il dosaggio, a mezzo HRGC, del contenuto in steroli totali in un breve tempo di analisi in quanto essi sono determinati direttamente sulla sostanza grassa, previa sua opportuna transesterificazione.

INTRODUZIONE

La determinazione degli steroli riveste un'importanza primaria nell'analisi delle sostanze grasse. Essi, infatti, rappresentano un importante parametro per la valutazione della qualità di un alimento in quanto consentono sia di differenziare prodotti analoghi che abbiano subito trattamenti tecnologici diversi (burri variamente decolesterolizzati), sia di rivelare eventuali frodi commerciali (aggiunta di grassi vegetali al burro, aggiunta di oli di semi all'olio di oliva, ecc.).

Nei diversi grassi gli steroli sono contenuti sia sotto forma di alcoli liberi sia come esteri degli acidi grassi naturalmente presenti ed il rapporto tra le due forme varia in un intervallo molto ampio. I dati della letteratura, invece, riportano il tenore in steroli come steroli totali liberi, di qui la necessità della saponificazione del grasso prima dell'analisi.

Tutte le metodiche attualmente in uso richiedono una lunga fase di idrolisi che, unita ai successivi trattamenti del campione, rende le procedure eccessivamente lente e laboriose. Non fa eccezione il metodo ufficiale (1) che prevede la saponificazione a ricadere del grasso, l'estrazione dell'insaponificabile, il suo frazionamento su strato sottile e, infine, l'analisi gascromatografica.

La messa a punto di una serie di metodiche atte a dosare particolari molecole aggiunte al burro come traccianti (2, 3) e, specificamente, gli steroli intesi come indice di qualità (4) e di genuinità (5), ci ha consentito di verificare ed apprezzare l'eleganza e l'efficienza della reazione di transesterificazione dei trigliceridi proposta da Christie (6) che consente di ottenere gli EMAG in pochi minuti. Di qui l'interesse a verificare se la procedura di Christie fosse in grado di transesterificare anche gli esteri degli steroli consentendo, quindi, di ottenere questi ultimi sotto forma libera.

Prove sperimentali effettuate con esteri del colesterolo con gli acidi grassi a diversa lunghezza hanno dimostrato che il metodo di Christie non idrolizza gli esteri di acidi grassi con più di sei atomi di carbonio, mentre idrolizza solo parzialmente quelli a corta catena.

Questo comportamento è stato da noi imputato al fatto che la metodica di Christie prevede che la reazione avvenga in fase eterogenea. Infatti, variando le condizioni sperimentali, ossia lavorando in fase omogenea, abbiamo ottenuto la liberazione quantitativa degli steroli, qualunque fosse l'acido grasso esterificante.

STRUMENTAZIONE ADOPERATA

- Gascromatografo DANI, mod. 8610, dotato di PTV e di FID;
- Integratore HP 3394;
- Colonna capillare (Quadrex Co) in silice fusa: fase legata: metilfenilsilicone 65%; l=25 m; i.d.=0,25 mm; f.t.=0,1 μ

CONDIZIONI OPERATIVE

- Flusso del gas vettore (He): 1,5 ml/min
- Programma del PTV:
 - 60°C per 3 s; 60→400°C con dT/dt=500°C/min;
 - 400°C per 7 min; raffreddamento fino a 60°C
- T della colonna: 300°C;
- Tempo di analisi: 10 min circa.

PROCEDURA DI ANALISI

- 1) Sciogliere 20 mg di materia grassa in 400 μ l di etere etilico;
- 2) aggiungere 200 μ l di KOH metanolica 2N, agitare per 1 min e lasciare a riposo per 7 min (la soluzione si intorbida leggermente);
- 3) neutralizzare con 200 μ l di HCl 2N, agitare e lasciare a riposo fino a separazione delle fasi (le soluzioni diventano nuovamente limpide);
- 4) prelevare 2 μ l della fase etera superiore e iniettare nel gascromatografo.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La reazione di transesterificazione, nella metodica messa a punto da Christie, prevede l'impiego di esano come solvente in cui il reattivo di transesterificazione, la potassa metanolica, è poco solubile. In queste condizioni operative la liberazione degli steroli dai corrispondenti esteri non è quantitativa per cui, allo scopo di verificare se la concentrazione della potassa nell'ambiente di reazione fosse una variabile determinante per spostare l'equilibrio verso i prodotti di reazione, è stata presa in considerazione una serie di altri solventi in cui la potassa fosse più solubile che in esano.

I risultati migliori sono stati ottenuti usando cloroformio ed etere etilico. Nel primo è quantitativa la reazione di idrolisi degli esteri degli acidi grassi con catena corta e media, mentre quelli a partire dall'acido laurico risultano meno idrolizzati mano a mano che aumenta il numero degli atomi di carbonio.

Utilizzando, invece, etere etilico l'idrolisi è quantitativa, entro 7 min, anche per gli esteri degli acidi grassi a 18 o più atomi di carbonio.

Soluzioni a titolo noto degli steroli usualmente rinvenibili nei grassi di natura alimentare, esterificati con gli acidi a corta, media e lunga catena, sono stati sottoposti a transesterificazione, in etere etilico, con KOH metanolica. Dai dati ottenuti si è rilevato che le concentrazioni degli steroli liberi sono risultate equivalenti, nei limiti dell'errore sperimentale, a quelle degli esteri.

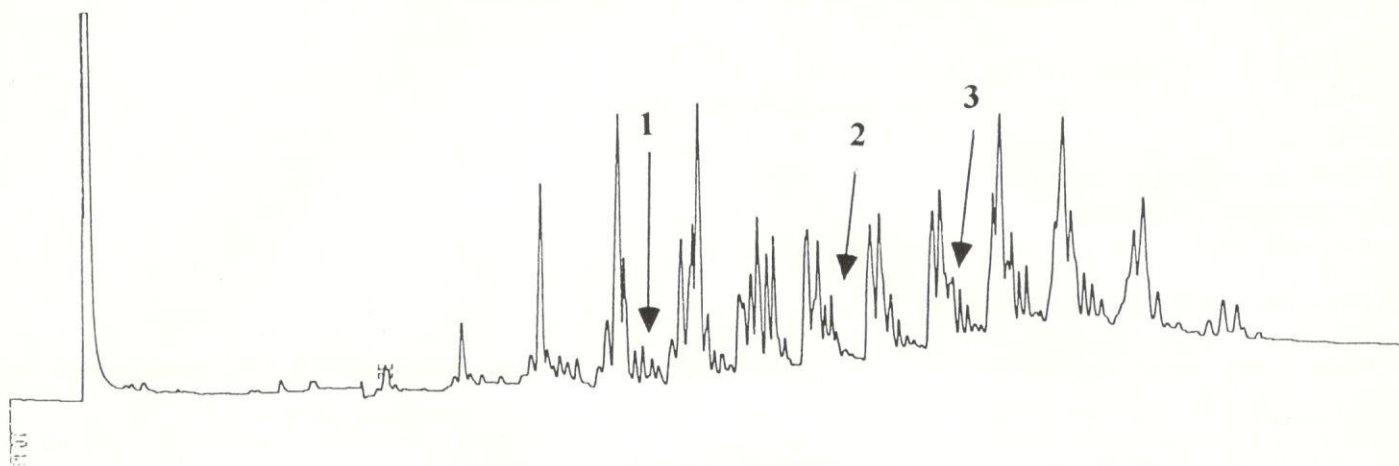


Fig. 1 - Profilo gascromatografico di un burro addizionato di laurato di colesterolo (1), palmitato di Δ^5 -avenasterolo (2) ed oleato di β -sitosterolo (3).

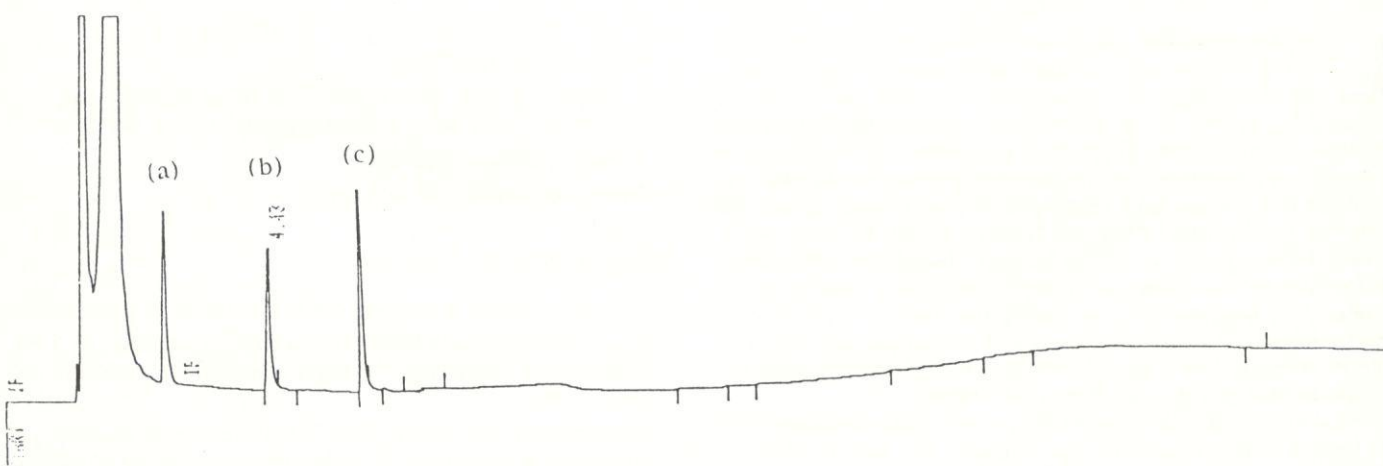


Fig. 2 - Gascromatogramma degli steroli liberi ottenuti per transesterificazione del campione di cui alla figura 1. I picchi (a), (b) e (c) corrispondono, rispettivamente, a Δ^5 -avenasterolo, colesterolo e β -sitosterolo.

Infine, per verificare se la matrice trigliceridica potesse influire sull'aspetto quantitativo della reazione, si è proceduto a transesterificare con la procedura proposta un burro, sicuramente genuino, addizionato di esteri a lunga catena di colesterolo, Δ^5 -avenasterolo e β -sitosterolo.

Come si può notare dai cromatogrammi riportati nelle figure 1 e 2, la reazione è risultata quantitativa sia a livello dei trigliceridi che degli esteri sterolici.

In conclusione la procedura proposta, per la quale è in corso una sperimentazione per spiegare il meccanismo di reazione, è, a parità di risultati, molto più conveniente della metodica ufficiale in quanto più semplice e rapida non prevedendo le lunghe fasi di idrolisi, estrazione e purificazione.

BIBLIOGRAFIA

- 1) MAF, «Metodi ufficiali di analisi per gli oli, grassi e derivati», Supplemento n. 3, Istituto Poligrafico dello Stato, Roma, 1972.
- 2) G. NOTA, R. SACCHI, D. LUONGO, S. SPAGNA MUSSO, F. ADDEO, C. IMPROTA, H. GLAESER, Riv. Ital. Sostanze Grasse, 69, 547-553 (1992).
- 3) G. NOTA, D. NAVIGLIO, R. SACCHI, R. ROMANO, S. SPAGNA MUSSO, C. IMPROTA, Riv. Ital. Sostanze Grasse, 70, 605-608 (1993).
- 4) G. NOTA, D. NAVIGLIO, R. ROMANO, D. LUONGO, S. SPAGNA MUSSO, Riv. Ital. Sostanze Grasse, 71, 417-420 (1994).
- 5) G. NOTA, D. NAVIGLIO, R. ROMANO, D. LUONGO, M. DI MATTEO, C. IMPROTA, Riv. Ital. Sostanze Grasse, 72, 73-76 (1995).
- 6) W.W. CHRISTIE, «Lipid Analysis», 2nd ed., Pergamon Press, Oxford, UK, 1992, p. 53.