

Un metodo rapido per la determinazione del numero delle uova nelle paste speciali

G. NOTA, D. NAVIGLIO,
R. ROMANO, D. LUONGO,
S. SPAGNA MUSSO

DIPARTIMENTO DI SCIENZA DEGLI ALIMENTI - UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI "FEDERICO II" - NAPOLI

A RAPID METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE NUMBER OF EGGS IN SPECIAL PRODUCTS

An improvement of the gas chromatographic method by Muntoni for the determination of the number of eggs used in the production of egg-containing pasta is described. The method uses HRGC or HPLC to evaluate the ratio cholesterol/ β -sitosterol, is relatively accurate and, above all, quite fast as the amount of sterols is determined directly from the fatty material previously transesterified

Viene presentato un miglioramento al metodo gascromatografico di Muntoni per la determinazione del numero delle uova utilizzate nella produzione di paste all'uovo. La metodica proposta prevede la valutazione, a mezzo HRGC o HPLC, del rapporto colesterolo/ β -sitosterolo ed è caratterizzata da un'accettabile accuratezza e, soprattutto, da un contenuto tempo di analisi in quanto gli steroli sono determinati direttamente sulla sostanza grassa, previa sua transesterificazione

INTRODUZIONE

Il continuo progresso scientifico e tecnologico nel campo della chimica analitica induce a riesaminare molte metodiche relative all'analisi dei prodotti alimentari; pertanto molte procedure, alla luce delle nuove acquisizioni, possono essere significativamente migliorate o totalmente cambiate.

Tale è il caso della determinazione del numero delle uova utilizzate nella produzione di paste all'uovo fresche o secche.

Tra i metodi proposti (1-8), quello più comunemente utilizzato, suggerito da Muntoni e coll. (9), prevede il dosaggio del numero delle uova determinando per via gascromatografica il rapporto colesterolo/campesterolo e/o colesterolo/ β -sitosterolo.

Il principio del metodo, pur con le incertezze relative alle naturali oscillazioni delle concentrazioni degli steroli nella semola e nell'uovo, è senz'altro valido; esso, però, risulta lungo e macchinoso in quanto la preparazione del campione da sottoporre all'analisi gascromatografica prevede la saponificazione del grasso, l'estrazione dell'insaponificabile e il suo frazionamento a mezzo TLC.

Nel presente lavoro viene proposta una metodica che, non prevedendo queste fasi, risulta molto più rapida e semplice. Secondo la metodica proposta, un campione di grasso, estratto mediante soxhlet, viene transesterificato e direttamente analizzato in termini di colesterolo e β -sitosterolo mediante gascromatografia o HPLC.

METODO GASCROMATOGRAFICO

Strumentazione adoperata

- Gascromatografo DANI, mod. 8521-a, dotato di PTV e di FID;
- Integratore HP 3394;
- Colonna capillare (Quadrex Co) in silice fusa legata: metilfenilsilicone 65%; l=25 m; i.d.=0,25 mm; f.t.=0,1 μ m.

Condizioni operative

- Flusso del gas vettore (He): 2 ml/min
- Programma del PTV: 60°C per 10''; 60→400°C con dT/dt=500°C/min; 400°C per 7'; raffreddamento fino a 60°C
- T della colonna: 300°C
- Tempo di analisi: 10 min circa

Procedura di analisi (Procedura A)

- 1) Estrarre in soxhlet, con etere etilico per 12 ore, 10 g di pasta essiccata e setacciata con un vaglio di almeno 600 maglie/cm² (60 mesh)

- 2) Eliminare il solvente sotto vuoto, con blando riscaldamento
- 3) Sciogliere 100 mg di grasso in 1 ml di CHCl₃ ed aggiungere 400 μ l di KOH metanolica 2 N
- 4) Aggiungere, nell'ordine, ancora 100 μ l di CH₃OH e 400 ml di HCl 2 N e, dopo agitazione, centrifugare a 4.000 rpm per 3 min
- 5) Iniettare 2 μ l della fase inferiore (cloroformica) al gascromatografo.

METODO HPLC

Strumentazione adoperata

- Cromatografo liquido (Knauer HPLC 64 Pump, Knauer, Berlin, Germany)
- Rivelatore spettrofotometrico Knauer
- Integratore elettronico (HP 3396, Hewlett Packard, Palo Alto, California, U.S.A.)
- Colonna analitica RP (Hypersil ODS 5 m; 250×4,6 mm)

Reattivi

- Acetonitrile per HPLC far UV (Lab-Scan Analytical Sciences, Dublin, Ireland)
- Metanolo per HPLC (Lab-Scan Analytical Sciences, Dublin, Ireland)
- Esano per HPLC (Lab-Scan Analytical Sciences, Dublin, Ireland)
- Cloruro di metilene per HPLC (Lab-Scan Analytical Sciences, Dublin, Ireland)

Condizioni operative

- Fase mobile: acetonitrile: metanolo: cloruro di metilene: n-esano (70:20:5:5 v/v)
- Flusso: 0,8 ml/min
- Lunghezza d'onda: 214 nm
- Tempo di analisi: 20 min circa.

Procedura di analisi (Procedura B)

Sottoporre il campione alle stesse operazioni indicate nella procedura A fino al punto 4:

- 5) portare a secco 100 μ l della fase cloroformica in corrente di azoto e riprendere con 400 μ l dell'eluente usato per l'analisi mediante HPLC.
- 6) Iniettare 20 μ l di soluzione nel cromatografo.

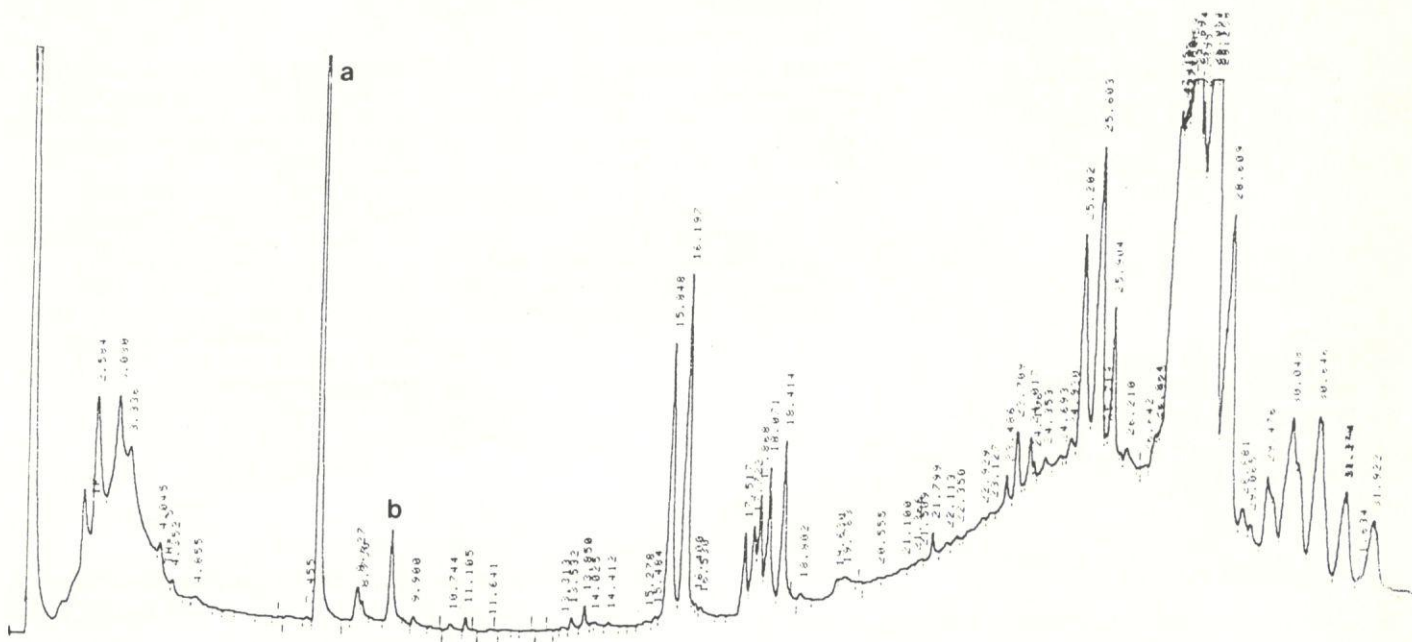


Fig. 1a - Gascromatogramma del grasso tal quale estratto da una pasta all'uovo.

Temperatura della colonna: 250°C per 2'; 250→360°C con dT/dt=5°C/min; 360°C per 10'. I picchi (a), (b) corrispondono, rispettivamente, a colesterolo e β -sitosterolo.

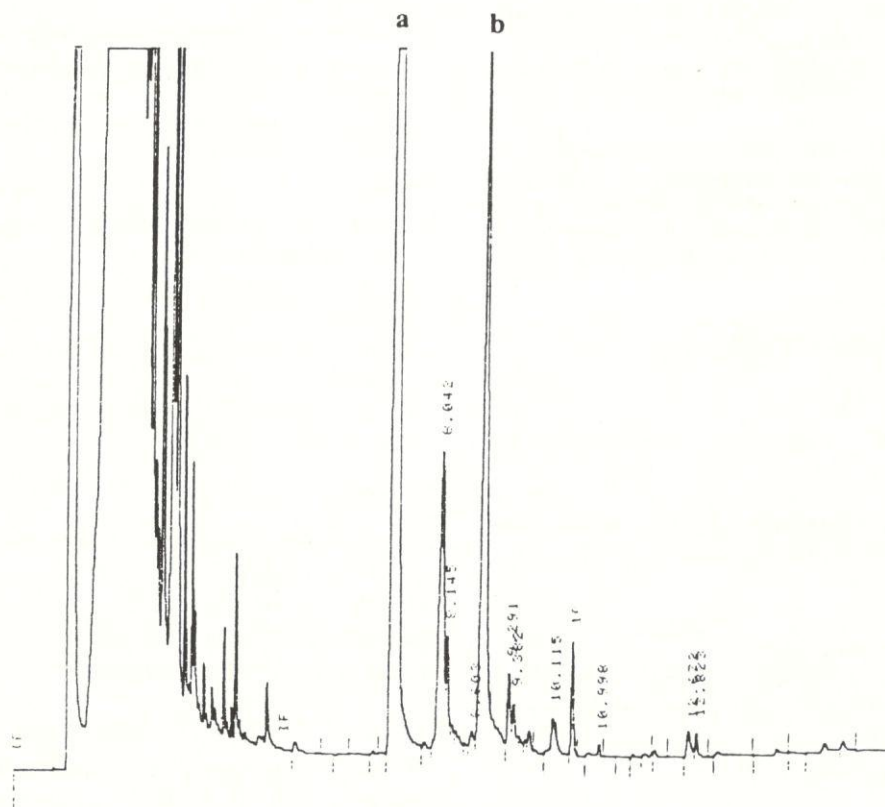


Fig. 1b - Gascromatogramma del grasso transesterificato estratto da una pasta all'uovo.

Le condizioni operative sono riportate nel testo. L'identificazione dei picchi è la stessa di quella riportata in figura 1a.

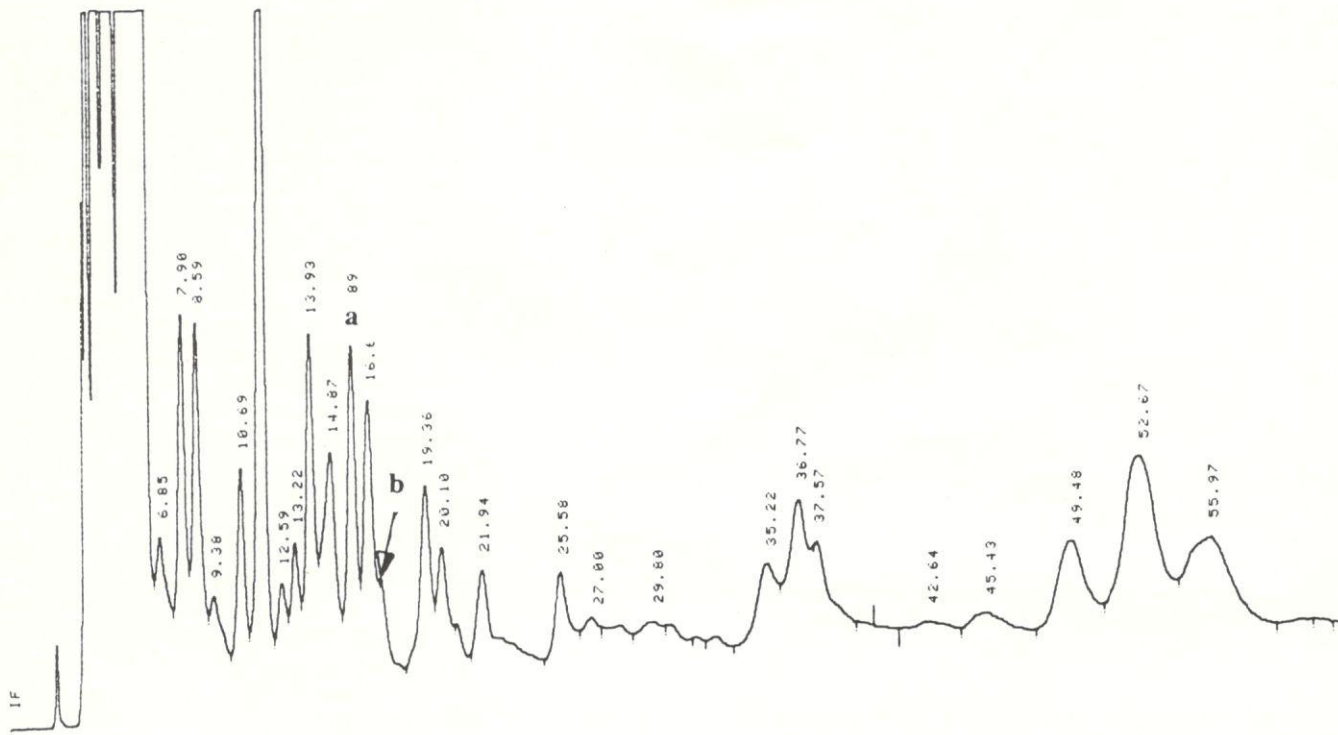


Fig. 2a - Profilo HPLC del grasso tal quale estratto da una pasta all'uovo.

Le condizioni operative sono riportate nel testo. I picchi (a), (b) corrispondono, rispettivamente, a colesterolo e β -sitosterolo.

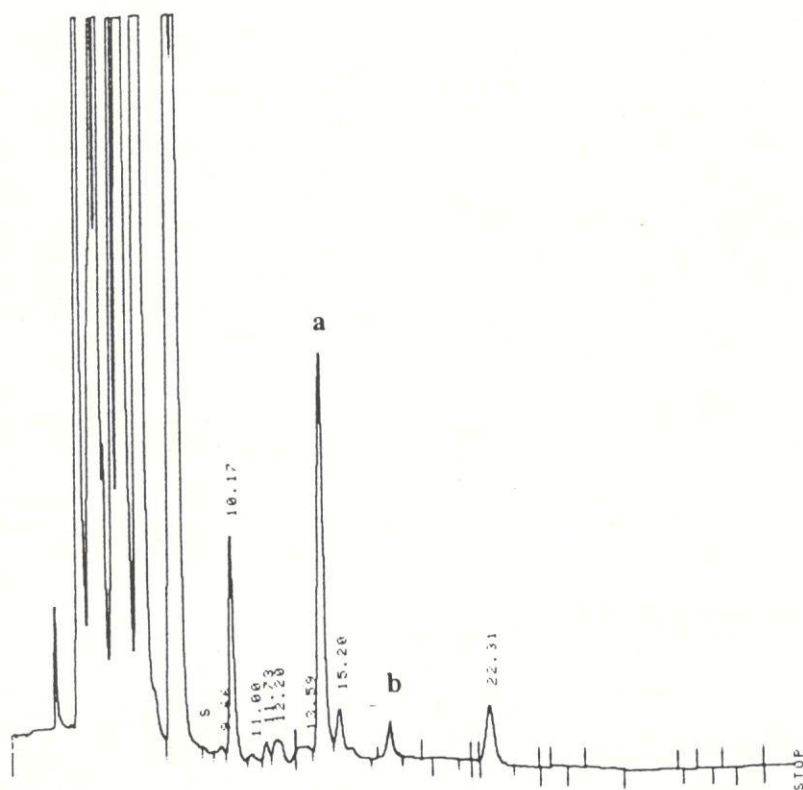


Fig. 2b - Profilo HPLC del grasso estratto da una pasta all'uovo e transesterificato.

Le condizioni operative sono riportate nel testo. I picchi (a), (b) corrispondono, rispettivamente, a colesterolo e β -sitosterolo.

Costruzione della retta di taratura

- 1) Preparare 4 campioni di pasta all'uovo contenenti, per ogni kg di semola, 2; 4; 6 e 8 uova, rispettivamente (il peso medio di un uovo sgusciato deve essere di 50 g).
- 2) Trattare i campioni come previsto nel paragrafo "procedura A" o "procedura B" a seconda della tecnica da adoperare.

- 3) Riportare in grafico, in funzione del numero delle uova, il rapporto tra l'area del colesterolo e quella del β -sitosterolo desunte dai cromatogrammi.

Calcolo del numero delle uova

Il numero delle uova/kg di semola nel campione in esame

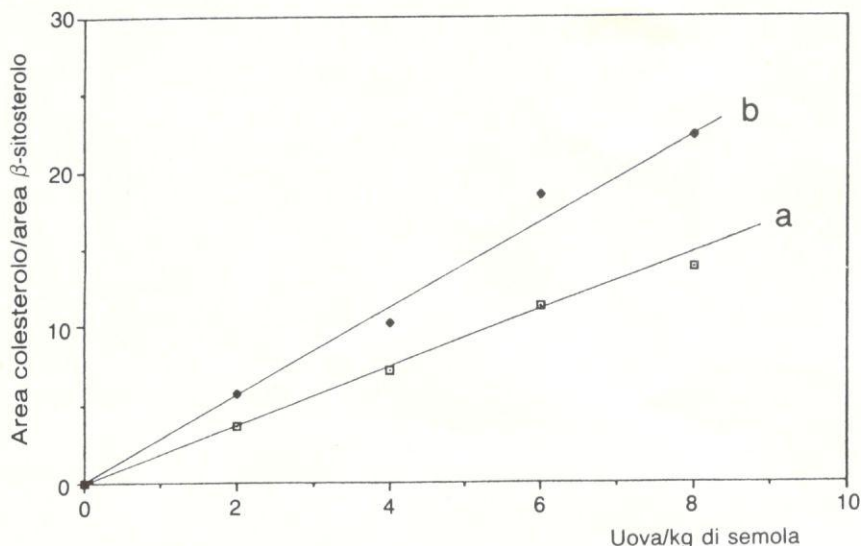


Fig. 3 - Andamento del rapporto relativo alle aree del colesterolo e del β -sitosterolo in funzione del numero delle uova per kg di semola.

Le rette (a) e (b) sono relative, rispettivamente, al metodo per HRGC ed HPLC

viene determinato confrontando i valori del rapporto area colesterolo/area β -sitosterolo con quelli usati per la retta di calibrazione.

RISULTATI E DISCUSSIONI

Nelle figure 1a e 1b vengono riportati i gascromatogrammi relativi ad un campione di grasso estratto da una pasta all'uovo, rispettivamente, prima e dopo la transesterificazione. Come si può osservare, il gascromatogramma relativo al grasso

TABELLA I - Valutazione della riproducibilità dei dati relativi ai rapporti tra le aree del colesterolo e del β -sitosterolo ottenuti per GLC

Numero delle uova kg di semola	Numero delle misure	Media di area colesterolo area β -sitosterolo	Deviazione standard	Deviazione standard relativa %
2	5	6,41	0,19	2,9
4	5	12,50	0,40	3,2
6	5	19,80	0,20	1,0
8	5	24,00	0,50	2,1

TABELLA II - Valutazione della riproducibilità dei dati relativi ai rapporti tra le aree del colesterolo e del β -sitosterolo ottenuti per HPLC

Numero delle uova kg di semola	Numero delle misure	Media di area colesterolo area β -sitosterolo	Deviazione standard	Deviazione standard relativa %
2	5	5,55	0,15	2,7
4	5	10,81	0,31	2,9
6	5	18,36	0,53	2,8
8	5	23,80	0,71	3,0

esterificato presenta solamente i picchi del colesterolo e del β -sitosterolo che vengono eluiti in circa 10 minuti; gli esteri metilici degli acidi grassi formati per transesterificazione, avendo un peso molecolare molto più basso dei trigliceridi di origine, nelle nostre condizioni sperimentali escono praticamente con il volume morto.

Il cromatogramma relativo al grasso non transesterificato mostra, dopo i picchi del colesterolo e del β -sitosterolo, una serie di altri picchi relativi ai trigliceridi che allungano di molto il tempo necessario per la completa eluizione del campione.

Le stesse considerazioni valgono per i cromatogrammi riportati nelle figure 2a e 2b, ottenuti per HPLC, relativi allo stesso campione di grasso tal quale e transesterificato, rispettivamente.

La procedura di transesterificazione adottata nel presente lavoro è alquanto diversa da quella di Christie (10). La transesterificazione in cloroformio, invece che in esano, si è resa necessaria per via della scarsa solubilità degli steroli in esano. L'aggiunta, inoltre, di metanolo all'ambiente di reazione garantisce che la formazione degli esteri degli steroli venga resa trascurabile.

L'analisi diretta del transesterificato mediante HPLC porta a cromatogrammi con picchi degli steroli larghi e quindi difficili da integrare; ciò è dovuto alla troppo bassa velocità di dissoluzione del campione nell'eluente usato per l'HPLC; risultati soddisfacenti si sono ottenuti portando a secco il transesterificato e riprendendo con lo stesso eluente usato per la corsa cromatografica.

In figura 3 vengono riportate le tipiche curve di taratura ottenute mediante GLC e HPLC; l'andamento è lineare e, come previsto, l'intercetta è zero.

In tabella I sono riportati i risultati ottenuti analizzando, per via gascromatografica, cinque volte dei campioni di grasso estratti da paste con differenti contenuti di uova; in tabella II sono riportati i risultati relativi agli stessi campioni analizzati per HPLC. Con entrambe le tecniche l'errore è al massimo del 3% rispetto alla media.

Il metodo proposto risulta, sia nella versione per GLC che in quella per HPLC, molto più rapido della procedura proposta da Muntoni in quanto le lunghe e noiose fasi della saponificazione, dell'estrazione dell'insaponificabile e della sua purificazione su TLC vengono eliminate.

Infine è certamente di interesse per l'operatore poter optare sia per la procedura gascromatografica, sia per la procedura mediante HPLC.

BIBLIOGRAFIA

- 1) H. HADORN, H. MOSTERTMAN, *Trav. Chim. Anal.*, **56**, 95-101 (1965)
- 2) *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, **37**, 92-97 (1954)
- 3) *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, **38**, 573-575 (1955)
- 4) TH. DE FELENBERG, *Trav. Chim. Anal.*, **21**, 205-208 (1930)
- 5) E. PHILIPPE, M. HENZI, *Trav. Chim. Anal.*, **27**, 262-266 (1936)
- 6) H. HADORN, R. JUNGKUNZ, *Trav. Chim. Anal.*, **43**, 45-48 (1952)
- 7) H. HADORN, K. ZURCHER, *Trav. Chim. Anal.*, **56**, 71-74 (1965)
- 8) K. KOBREHEL, P. FEILLET, *Ann. Technol.*, **20**, 153-156 (1971)
- 9) F. MUNTONI, E. TISCORNIA, C. TASSI-MICCO, *Rass. Dir. Tecnica Alimentaz.*, **6**, 29-33 (1966)
- 10) W.W. CHRISTIE, «Lipid Analysis», 2nd ed. Pergamon Press, Oxford, UK, 1982, pp. 53