

# **Estrazione e caratterizzazione della componente lipidica libera non polare del cioccolato mediante un metodo rapido di analisi**

D. NAVIGLIO, R. ROMANO  
L. SCHIAVO, F. DE GAETANO

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

A. BATTAGLIA, M. UGLIANO

DIPARTIMENTO DI SCIENZA DEGLI ALIMENTI  
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"  
MATER SOC. CONS. A R.L.

In questo lavoro viene proposta una nuova procedura analitica che permette di estrarre esclusivamente la componente non polare della frazione lipidica del cioccolato in una maniera semplice, rapida e poco dispendiosa. L'importanza di isolare la frazione lipidica contenente i trigliceridi, le cere, gli esteri degli steroli e i componenti minori quali gli steroli e le vitamine liposolubili dalla frazione polare risiede in tre motivi: analitico, nutrizionale e commerciale. In genere, per gli scopi analitici, i parametri di qualità del grasso del cioccolato fanno riferimento alla componente non polare, mentre nelle analisi di routine la componente polare non viene coinvolta e può risultare un inconveniente la sua presenza laddove è richiesta una alta purezza del campione (es. reazioni di derivatizzazione). Inoltre i parametri chimico-fisici quali il punto di fusione, l'indice di rifrazione, il colore etc. sono relativi ad una miscela di sostanze grasse non bene definita. Dal punto di vista nutrizionale, la frazione lipidica non polare è quella che dà il maggiore contributo al potere calorico del cioccolato e di conseguenza la separazione delle due frazioni può risultare utile per stimare meglio il contributo calorico totale. Per motivi economici, non ultima è da considerare la possibilità di aggiunte fraudolente di componenti lipidici di natura polare in sostituzione di quelli non polari più pregiati; tale alterazione non è rilevabile applicando solamente il metodo ufficiale. Per ottenere una più completa informazione circa la composizione del grasso del cioccolato è possibile unire i risultati ottenuti con il metodo ufficiale con quelli ottenuti dalla procedura proposta. Il nostro auspicio è che questa informazione possa essere riportata al più presto sulle etichette nutrizionali del cioccolato a tutela del prodotto e del consumatore.

## **EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF FREE NON-POLAR FRACTION OF CHOCOLATE USING A RAPID ANALYTICAL PROCEDURE**

*This article deals with a new analytical procedure allowing the simultaneous extraction and purification of the non-polar chocolate lipid fraction in a simple, fast and very cheap way. The importance of obtaining the lipid fraction containing triglycerides, wax esters, sterol esters and minor components such as sterols and liposoluble vitamins from the polar one represented by glycolipids, phospholipids etc. lies in three reasons: analytical, nutritional and commercial. For analytical purposes, the fat quality parameters usually refer to the non-polar components, while the polar ones are not usually considered in routine analysis, and may result unpleasant when highly purified samples are required (e.g. derivatization reactions). Chemical and physical parameters, as much as melting point, refraction index, color are related to a not well defined mix of fat substances. From the nutritional point of view, the non-polar lipid fraction is the one that gives the major contribution to the caloric power of foods, and then a distinction between both fraction can be more suitable for estimating the overall caloric value. Moreover, the possibility of fraudulent addition of non-polar lipids in place of the polar ones is to be considered, and this cannot be pointed out by the official method. The integration between the results of the standard method and those obtained from the proposed one allows to obtain a more complete information about the fat composition of chocolate. Our hope is that this information can be shown, as soon as, on the nutritional labels of chocolate for consumer and product protection.*

## **INTRODUZIONE**

Il cioccolato è un alimento che trova impiego sia come prodotto finito che come ingrediente in diversi tipi di dolci e di gelati. La sua produzione annua si aggira intorno alle 270.000 tonnellate con un fatturato complessivo di circa mille miliardi di lire. Il suo consumo va sempre più aumentando nei paesi industrializzati dato il suo carattere edonistico. L'Italia è il quinto paese europeo nella produzione e consumo del cioccolato [1].

Il grasso, pur essendo rappresentato ponderalmente in una quantità minore rispetto ai carboidrati, è la componen-

te che dà il contributo energetico maggiore mediamente 300 Kcal contro lo 200 Kcal dei carboidrati per ogni cento grammi di prodotto [2]. La componente lipidica assume un ruolo importante anche per quanto concerne la struttura del cioccolato conferendogli la giusta consistenza e permettendone la lavorazione nei più disparati prodotti dolciari.

Il metodo ufficiale [3] per l'estrazione del grasso prevede una idrolisi acida del campione di cioccolato e una successiva estrazione mediante Soxhlet utilizzando come solvente etere di petrolio. Questo metodo permette di estrar-

re la componente lipidica totale che può essere sottoposta a successive analisi di caratterizzazione del grasso; il metodo ufficiale risulta essere lungo e laborioso. In genere, le determinazioni analitiche riguardanti la genuinità dei corpi grassi, mirano ad analizzare le categorie di composti appartenenti alla componente lipidica libera non polare, cui appartengono i trigliceridi, le cere, gli esteri degli steroli e componenti minori che vengono compresi in questa frazione per la loro lipofilità, come gli steroli, i caroteni, le vitamine liposolubili etc. Il grasso estratto mediante il metodo ufficiale viene analizzato tal quale senza nessuna separazione preventiva.

L'etichetta nutrizionale del cioccolato riporta come percentuale di grasso il risultato ottenuto utilizzando il metodo ufficiale. A nostro parere questa informazione non è completa se non si discrimina tra la frazione polare e quella non polare. Per motivi nutrizionali, la componente lipidica libera e non polare del grasso di cioccolato è quella che dà il maggiore contributo energetico al grasso totale; di conseguenza è auspicabile che l'etichetta nutrizionale del cioccolato riporti con maggiore dettaglio, non solo il contenuto ponderale del grasso totale, ma anche la distribuzione del grasso nelle sue due componenti principali. Infine, per motivi commerciali, la differenziazione tra le due componenti risulta necessaria per rivelare possibili aggiunte fraudolente di grassi di natura polare in sostituzione di quelli non polari più pregiati e costosi.

## MATERIALI E METODI

Materiale occorrente:

- acido tricloroacetico (Carlo Erba, Milano, Italia)
- n-esano (Fluka, Buchs, Switzerland)
- n-pentano (Fluka, Buchs, Switzerland)
- 1-pentanol (Fluka, Buchs, Switzerland), tutti i reattivi sono di un grado di purezza analitico;
- centrifuga da banco mod. PK 131 (ALC International, Milano, Italia)
- evaporatore rotante
- azoto in bombola.

## Strumentazione

- Gas cromatografo Autosystem XL (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) equipaggiato con iniettore PSS e rivelatore FID e collegato al sistema di acquisizione dei dati Turbochrom versione 4.1
- Gas cromatografo DANI 8521-a (DANI, Monza, Italia) equipaggiato con iniettore PTV e rivelatore FID e collegato con un integratore HP mod. 8890 A (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA)

## Condizioni gascromatografiche

- **Analisi dei trigliceridi**
- Colonna: fase stazionaria 65% fenil metilsilicone HT (TG), RTX 65-TG (Restek, Bellefonte, CA, USA); l=30 m; i.d.=0,25 mm; f.t. 0,25 µ
- Programmata iniettore: 70 °C per 12 sec, incremento di 999 °C/min fino a 370 °C, tenere per 5 min
- Programmata camera: 250 °C per 2 min., incremento di 5 °C/min. fino a 360 °C, tenere per 5 min
- Temperatura del rivelatore: 370 °C;
- Flusso: 1,5 ml/min.
- Split: 1:80

È stato utilizzato il sistema di azzeramento della deriva (Background) dovuta all'aumento della temperatura, calibrando con tre acquisizioni della linea di base del segnale al fine di permettere una integrazione dei picchi dei trigliceridi più semplice.

**Procedura:** pesare circa 50 mg di grasso in una provetta ed aggiungere 1 ml di n-esano; agitare fino alla completa dissoluzione del grasso; iniettare 0,5 ml della soluzione nel gascromatografo. Integrare i trigliceridi raggruppati per numero totale di atomi di carbonio.

### ■ Analisi degli acidi grassi

- Colonna: fase stazionaria 90% bis-cianopropil fenilsilicone FAME (Restek, Bellefonte, CA, USA); l=50 m; i.d.=0,25 mm; f.t.=0,25 µ
- Programmata iniettore: 50 °C per 15 sec., incremento di 999 °C/min. fino a 270 °C per 3 min
- Programmata camera: 70 °C per 2 min; incremento 8 °C/min. fino a 250 °C, tenere per 3 min
- Temperatura del rivelatore: 270 °C
- Flusso 2 ml/min.
- Split: 1:80

**Procedura:** pesare circa 50 mg di grasso in una provetta da centrifuga; aggiungere 1 ml di n-pentano ed agitare fino a completa dissoluzione del grasso; aggiungere 200 ml di pentossido di sodio 2 N in pentanol ed agitare per due minuti; aggiungere 400 ml di acido cloridrico 1 N ed agitare per trenta secondi; centrifugare a 2000 rpm per 1 minuto; iniettare 0,5 ml della fase organica superiore.

## Campioni

I campioni di cioccolato sono stati reperiti in commercio e sono di note marche. I tipi di cioccolato analizzati sono stati cioccolato extra fondente, cioccolato fondente e cioccolato al latte.

## Determinazione quantitativa della frazione lipidica non polare contenuta nel cioccolato

**Procedura:** tritare finemente circa 20 grammi di cioccolato e pesarne 10 grammi (C) alla bilancia tecnica in un contenitore da 50 ml per centrifuga; aggiungere 15 ml di acido tricloroacetico al 12 % (p/v) ed agitare fino alla fluidificazione del cioccolato; aggiungere 10 ml di n-esano ed agitare vigorosamente per 3 minuti; centrifugare a 8000 rpm per 5 minuti; separare la fase esanica supernatante e trasferirla in un imbuto separatore da 50 ml; ripetere l'estrazione con altre due frazioni di n-esano e raccoglierle nell'imbuto separatore; lavare la frazione esanica separata con due frazioni da 10 ml di acqua distillata; trasferire la frazione esanica in un pallone tarato e portare a secco tramite evaporatore rotante; allontanare le ultime tracce di solvente mediante insufflaggio di azoto; pesare alla bilancia tecnica e dalla differenza del peso ottenuto rispetto alla tara risalire al peso del quantitativo di grasso estratto (L).

## Calcolo

$$\text{Lipidi semplici (\%)} = \frac{L \cdot 100}{C}$$

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Precisione ed accuratezza del metodo proposto

Il metodo proposto è stato innanzitutto valutato per la ri-

**Tabella I - Riproducibilità del metodo proposto**

Campione	Cioccolato extra	Cioccolato fondente	Cioccolato al latte
1	28,4%	24,0%	27,3%
2	28,2%	23,8%	27,4%
3	28,1%	24,1%	27,1%
4	28,3%	24,4%	27,4%
5	28,0%	24,2%	27,0%
Media	28,2%	24,1%	27,2%
Scarto max %	0,7	1,2	0,7

**Tabella III - Accuratezza del metodo proposto**

Campione	Metodo proposto	Metodo ufficiale	Etichetta	Scarto (%)
Cioccolato extra	28,2±0,2	31,3±0,2	31,3	9,9
Cioccolato fondente	24,1±0,3	27,0±0,2	27,0	10,7
Cioccolato al latte	27,2±0,2	29,5±0,2	29,5	7,8

producibilità: i tre tipi di cioccolato riportati nel paragrafo "campioni" sono stati sottoposti ad analisi in quintupla ripetizione; i risultati ottenuti sono riportati nella tabella I. Come è possibile osservare, la riproducibilità del metodo proposto è ottima per i tre tipi di cioccolato analizzati e lo scarto massimo dalla media è risultato al massimo dell'1,2%.

Al fine di valutare la completezza del recupero del grasso, tre porzioni di cioccolato provenienti dai tre tipi di cioccolato sopra riportati sono state estratte rispettivamente con due, tre e quattro frazioni di n-esano. Nella tabella II sono riportati i risultati dei recuperi per i tre tipi di cioccolato in funzione delle frazioni di esano aggiunte. I risultati ottenuti evidenziano che il recupero può essere considerato quantitativo già a partire dalla estrazione effettuata con

**Tabella II - Recupero del grasso in funzione del numero di lavaggi con n-esano**

N° frazioni	Cioccolato extra	Cioccolato fondente	Cioccolato al latte
2	95,4%	96,3%	94,1%
3	99,2%	99,4%	99,1%
4	99,9%	100,1%	99,8%

**Tabella IV - Distribuzione dei trigliceridi raggruppati per lo stesso numero di atomi di carbonio nel grasso estratto con il metodo ufficiale (A) e nel grasso estratto con il metodo proposto (B)**

(A)							
Peak #	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area BL	Area/Height [sec]
1	6.403	980.70	230.10	0.02	0.00	*BB	4.2621
2	6.608	3571.49	729.75	0.07	0.00	*BB	4.8941
3	7.001	9846.20	2173.04	0.19	0.00	*BB	4.5311
4	12.988	49802.78	2455.80	0.95	0.00	*BB	20.2797
5	14.116	75278.09	3560.24	1.43	0.00	*BB	21.1441
6	20.620	7676.81	2736.61	0.15	0.00	*BB	2.8052
7	20.795	10618.90	2673.08	0.20	0.00	*BB	3.9725
8	22.211	1065016.05	191885.29	20.28	0.00	*BB	5.5503
9	23.583	2461684.50	309441.82	46.87	0.00	*BB	7.9552
10	24.835	1505787.71	189426.62	28.67	0.00	*BB	7.9492
11	26.187	62030.37	12672.39	1.18	0.00	*BB	4.8949
		5252293.60	717984.74	100.00	0.00		
(B)							
Peak #	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area BL	Area/Height [sec]
1	6.671	1495.00	314.97	0.02	0.00	*BB	4.7465
2	7.061	3279.50	697.55	0.05	0.00	*BB	4.7015
3	10.702	3841.50	737.97	0.06	0.00	*BB	5.2055
4	11.234	3952.00	513.65	0.06	0.00	*BB	7.6940
5	13.022	68971.15	3529.88	0.99	0.00	*BB	19.5393
6	14.159	103617.80	4117.39	1.49	0.00	*BB	25.1659
7	20.654	26868.00	3977.43	0.39	0.00	*BB	6.7551
8	22.264	1415505.00	223430.18	20.37	0.00	*BB	6.3353
9	23.628	3252221.00	344247.78	46.79	0.00	*BB	9.4473
10	24.893	1986755.00	236970.95	28.59	0.00	*BB	8.3840
11	26.246	83742.50	15959.55	1.20	0.00	*BB	5.2472
		6950248.45	834497.30	100.00	0.00		

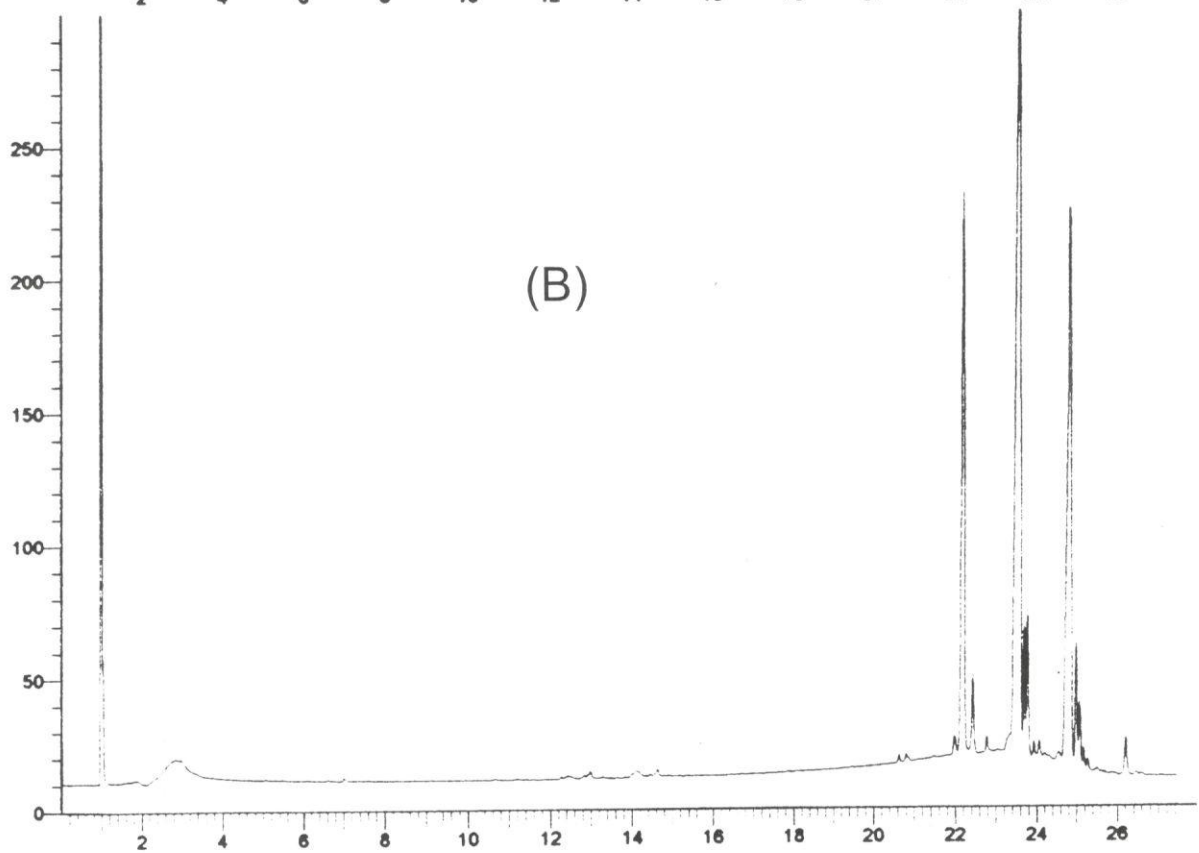
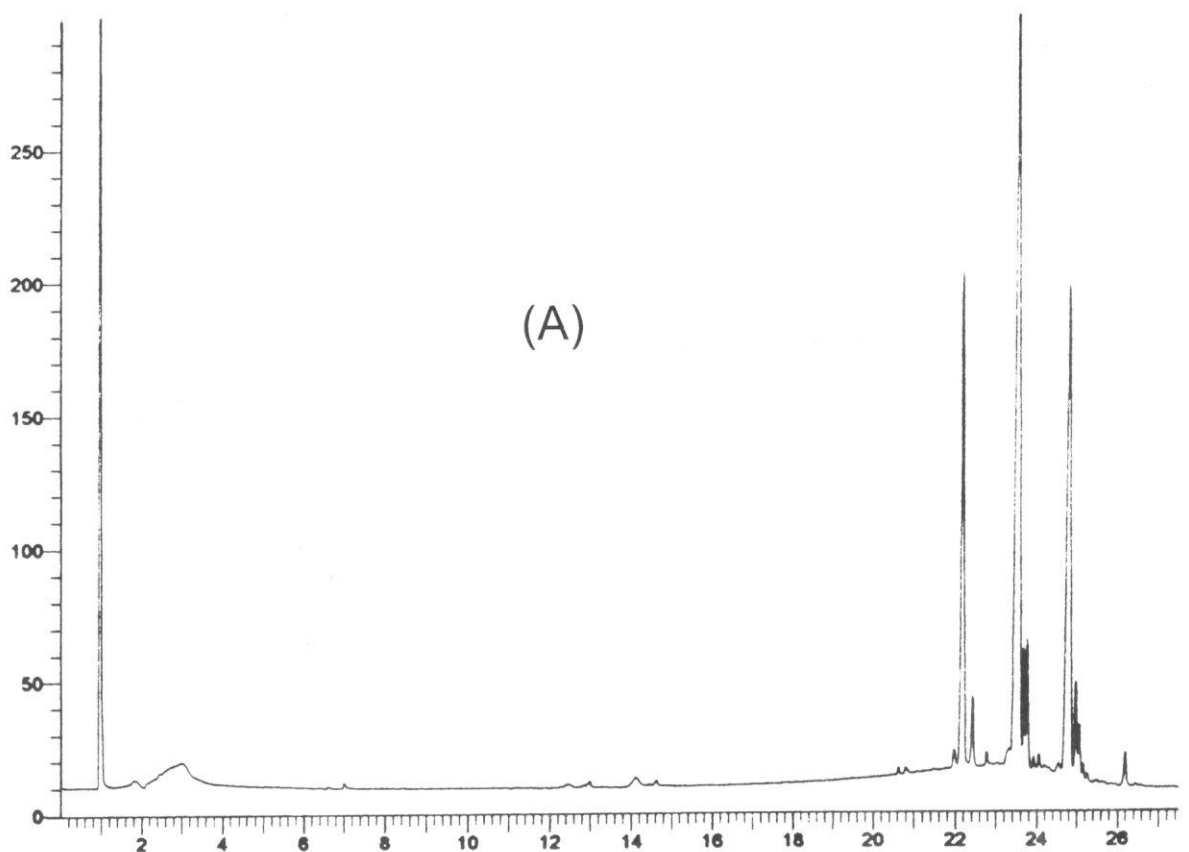


Fig. 1 - Gas cromatogrammi dei trigliceridi ottenuti analizzando il grasso separato dallo stesso campione di cioccolato fondente con il metodo ufficiale (A) e con il metodo proposto (B).

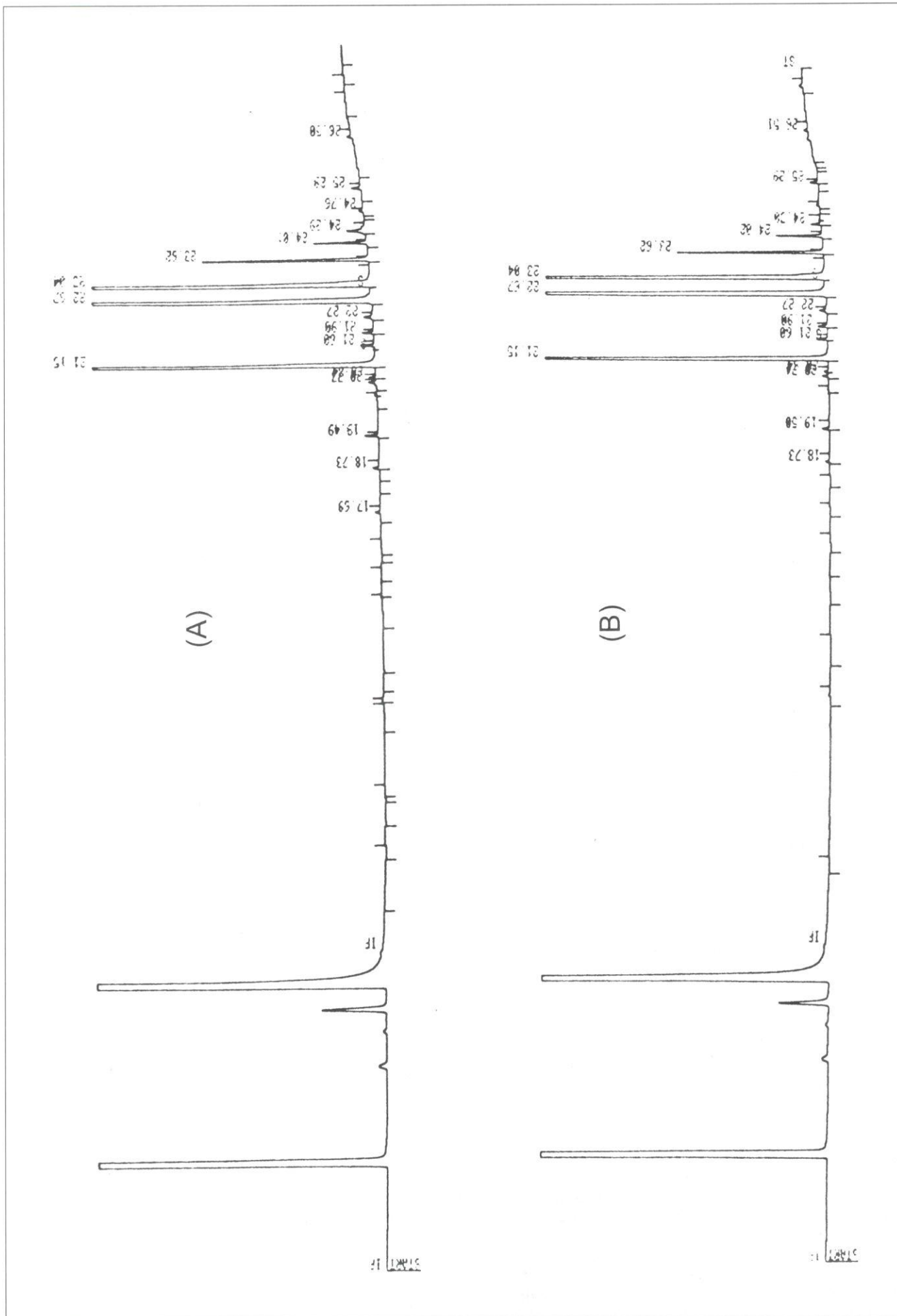


Fig. 2. - Gas cromatogrammi degli esteri pentilici degli acidi grassi ottenuti analizzando il grasso separato dallo stesso campione di cioccolato fondente con il metodo ufficiale (A) e con il metodo proposto (B).

**Tabella V - Distribuzione degli acidi grassi nel grasso di cioccolato fondente estratto con il metodo ufficiale e con il metodo proposto**

Acidi grassi	Metodo proposto		Metodo ufficiale	
	Tempo di ritenzione	Area %	Tempo di ritenzione	Area %
Acido palmitico	21,15	26,3	21,15	26,0
Acido stearico	22,67	34,3	22,67	35,8
Acido oleico	23,04	34,2	23,04	33,7
Acido linoleico	23,62	3,0	23,62	3,2
Acido linolenico	24,01	1,0	24,02	1,0
Altri		1,2		0,3

tre frazioni di esano. Mentre per due estrazioni la perdita di grasso è mediamente attorno al 5%, la differenza fra tre e quattro frazioni recupera circa l'1% rimanente rendendo completa l'estrazione.

Per valutare l'accuratezza del metodo proposto i tre campioni di cioccolato sono stati sottoposti ad analisi della materia grassa mediante la procedura ufficiale [3]; le analisi sono state condotte in triplice ed il risultato medio è stato confrontato con il risultato medio ottenuto per le prove di riproducibilità riportate nella tabella I. Nella tabella III viene mostrato lo scarto percentuale riscontrato per i tre campioni rispetto al valore ottenuto con il metodo ufficiale che è risultato in perfetto accordo con il valore del quantitativo di sostanza grassa riportato in etichetta per ciascun campione.

La differenza tra il quantitativo di materia grassa ottenuta con il metodo proposto rispetto al metodo ufficiale rappresenta la frazione polare dei lipidi liberi costituita da fosfolipidi e glicolipidi. Per avere una conferma di quanto supposto, il grasso recuperato mediante estrazione con il metodo ufficiale è stato sottoposto a frazionamento su TLC utilizzando una lastra di gel di silice preparativa ed eluendo con esano ed etere etilico 4:1 (v/v) [4]. La banda corrispondente alla frazione lipidica polare è stata recuperata, purificata ed analizzata ponderalmente per ciascun tipo di cioccolato. I risultati sono stati corrispondenti allo scarto percentuale riportato nella tabella III nei limiti degli errori sperimentali.

#### *Analisi della frazione lipidica libera non polare*

Il grasso estratto con il metodo proposto è stato sottoposto ad analisi qualitativa in termini di trigliceridi e di acidi grassi. Nella figura 1 sono riportati rispettivamente i gascromatogrammi dei trigliceridi ottenuti per il grasso estratto dal cioccolato fondente con il metodo ufficiale e per il grasso estratto dallo stesso campione di cioccolato utilizzando il metodo proposto. Nella tabella IV sono riportati i risultati delle integrazioni dei trigliceridi raggruppati per numero di atomi di carbonio totale. Come è possibile osservare le percentuali dei raggruppamenti dei trigliceridi ottenute per il grasso ricavato secondo il metodo ufficiale sono uguali a quelle ottenute per il grasso estratto secondo la procedura proposta nei limiti degli errori sperimentali. Nella figura 2 sono riportati i gascromatogrammi degli esteri pentilici degli acidi grassi ottenuti con la procedura riportata in un nostro precedente lavoro [5] e riportata nei "materiali e metodi"; la scelta di utilizzare la transesterificazione con pentanolo in alternativa agli altri alcoli riportati in letteratura è ben esemplificata nel lavoro di cui sopra; in effetti la sostituzione dell'alcol a più lunga catena come reattivo transe-

sterificante non trova nessuna controindicazione nell'analisi stessa; le condizioni gas cromatografiche sono identiche e l'unica variabile da ritoccare è l'aumento di 20 °C della camera sia nella isoterma iniziale che in quella finale e di conseguenza anche l'iniettore viene aumentato di 20 °C.

Nella tabella V vengono riportati i risultati delle integrazioni degli acidi grassi della frazione lipidica libera non polare del cioccolato fondente estratta con il metodo ufficiale e con il metodo proposto. I risultati sono in ottimo accordo tra di loro. Lo stesso confronto è stato realizzato anche per il cioccolato extra fondente e per il cioccolato al latte; anche per queste altre due matrici le analisi gascromatografiche della frazione grassa estratta con i due metodi porta ai medesimi risultati, sia in termini di trigliceridi che di acidi grassi. L'identità dei risultati dell'analisi qualitativa della componente lipidica libera non polare del grasso di cioccolato ottenuta utilizzando il metodo ufficiale ed il metodo proposto indica che il grasso non è in alcun modo compromesso dal contatto con l'acido tricloroacetico nella procedura proposta.

#### *Valutazione dell'effetto dell'acido tricloroacetico nella separazione della frazione lipidica libera non polare*

L'acido tricloroacetico possiede una capacità complessante e disidratante nei confronti delle molecole polari. Esso associa alla caratteristica di acidità organica una azione complessante dovuta alla grandezza dello ione tricloroacetato. Sottraendo molecole di acqua al mezzo fa sì che le sostanze polari si aggregino e si separino sotto forma di solido. L'importanza di questa azione è evidenziata dal fatto che se l'acido tricloro acetico viene sostituito dall'acido trifluoroacetico quest'ultimo non porta agli stessi risultati. Inoltre, provando con un acido minerale è stato evidenziato che il cioccolato a freddo non viene fluidificato immediatamente e di conseguenza l'aggiunta di n-esano non sortisce l'effetto voluto della separazione della frazione libera apolare.

Ciò che si nota aggiungendo l'acido tricloroacetico al cioccolato è un immediato effetto fluidificante che già di per sé libera il grasso; infatti la centrifugazione del cioccolato sciolto in n-esano ha portato alla separazione del grasso come fase separata supernatante; l'aggiunta dell'esano serve ad aiutare il recupero quantitativo del grasso nonché a lavare la matrice solida.

#### **CONCLUSIONI**

L'analisi del grasso del cioccolato che viene effettuata mediante il metodo ufficiale [3] porta alla estrazione dei li-

pidi totali contenuti in esso. Questo è il metodo utilizzato dai produttori di cioccolato per riportare in etichetta il contenuto lipidico. È possibile sottoporre la componente grassa estratta a frazionamento su TLC per differenziare la componente lipidica libera non polare da quella polare; tale procedura risulta però lunga e laboriosa. Utilizzando il metodo proposto in questo lavoro è possibile non solo ottenere a monte la frazione lipidica non polare separata dal resto della matrice, ma anche, per differenza con il metodo ufficiale, il risultato in termini di frazione libera polare. In questo modo l'informazione sul contenuto della materia grassa contenuta nel cioccolato diventa più completa e sarebbe auspicabile che i produttori riportassero in etichetta il contenuto di grasso separato nelle due componenti.

Infine, la quantizzazione della frazione non polare permette di ottenere informazioni di tipo economico e di tipo nutrizionale mentre la separazione a monte della matrice del cioccolato riveste una importanza a livello analitico.

#### *Ringraziamenti*

Si ringrazia la Mater Soc. cons. a r.l. ed il M.U.R.S.T. per

la collaborazione e per il finanziamento alla realizzazione di questo lavoro nell'ambito dell'iniziativa "Ricerca, sviluppo tecnologico ed alta formazione", progetto "Mediterraneo e Salute - Esperti nella valorizzazione dei prodotti tipici della dieta mediterranea" cod. 1768.

#### *BIBLIOGRAFIA*

- [1] Relazione economico statistica sull'andamento del settore dolciario in Italia nel 1996. XXXI Assemblea AIDI, Milano. *Tecnologie Alimentari*, 6, 46-53 (1997).
- [2] F. FIDANZA, G. LIGUORI, "Nutrizione umana", Idelson Editore, 1995.
- [3] AOAC, *Official Methods of Analysis*, vol II, 31, pag. 10, 1995.
- [4] E. PAGANI, S. CHERUBIN, M.F. CARBONI, G. LERCKER, "La composizione della frazione lipidica dell'uovo", *Riv. It. Sost. Grasse*, 70, 433-437 (1993).
- [5] G. NOTA, D. NAVIGLIO, R. ROMANO, V. SABIA, S. SPAGNA MUSSO "Evaluation and improvement of transesterification methods of triglycerides", *Anal. Lett.* 31 (14) 2499-2512 (1998).