

# Determinazione della materia grassa nei legumi secchi mediante tecniche strumentali

G. NOTA, S. SPAGNA MUSSO  
R. ROMANO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEGLI ALIMENTI - UNIVERSITA'  
DEGLI STUDI FEDERICO II - NAPOLI

D. NAVIGLIO

ISTITUTO DI SCIENZE DELL'ALIMENTAZIONE DEL CNR  
AVELLINO

C. IMPROTA

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

## RAPID EVALUATION OF FAT CONTENT OF LEGUMES BY MEANS OF INSTRUMENTAL TECHNIQUES

An analytical methodology which allows to determine fat content in legumes more rapidly than the actual available techniques has been developed.

Fat extraction is carried out letting 10 ml of 1,1,2-trifluoroethane percolate, under pressure through an HPLC column of 5 cm perched with a known amount of semolina.

The granulometry influences in a remarkable manner the efficiency of the extraction. It results quantitative for particles having size  $< 70 \mu$ .

The amount of fats content of legumes can be determined via IR spectrophotometry or by means of "light scattering" detector by using a calibration curve.

The proposed method results more convenient with respect of the gravimetric one since all the slow operative stages which compose it have been avoided. The advantages remains also in the case of using a "light scattering" detector because, being the chromatographic column not inserted between the injector and detector, the measurement is as faster as a spectrophotometric one.

In addition the results present a quite good reproducibility and they agree with those provided by the gravimetric procedure, via soxhlet, as reference considered.

In alternativa ai metodi attualmente più in uso, è stata messa a punto una metodica che consente di pervenire in maniera rapida al risultato analitico. L'estrazione viene condotta facendo percolare, sotto pressione, 10 ml di 1,1,2-trifluoroetano attraverso una colonnina per HPLC da 5 cm impaccata con una quantità nota di sfarinato.

La granulometria dello sfarinato ha evidenziato un'influenza notevole sull'efficienza dell'estrazione che è apparsa quantitativa per particelle aventi una granulometria  $< 70 \mu$ .

Il dosaggio della sostanza grassa degli sfarinati può essere condotta a mezzo di spettrofotometria I.R. o mediante l'impiego di rivelatore "light scattering" previa costruzione di una curva di taratura.

Il metodo proposto risulta molto vantaggioso, rispetto a quello gravimetrico, in quanto sono evitati gli stadi lenti che lo costituiscono. Tale caratteristica permane anche nel caso di impiego del rivelatore "light scattering" in quanto, in assenza della colonna cromatografica interposta tra l'iniettore ed il rivelatore, la misura è veloce quasi quanto una misura spettrofotometrica.

I risultati ottenuti, inoltre, presentano un'ottima riproducibilità e sono in buon accordo con quelli forniti dalla procedura gravimetrica, via soxhlet, presa come riferimento.

## INTRODUZIONE

La determinazione della sostanza grassa rappresenta un importante parametro per la valutazione della qualità degli alimenti. Per gli alimenti solidi il metodo più usato dai laboratori di controllo è quello riportato dall'A.O.A.C. (1) che prevede una serie di lunghi e laboriosi trattamenti preliminari del campione prima della definitiva determinazione della materia grassa per via gravimetrica.

Il metodo cromatografico (2), messo a punto di recente nel nostro laboratorio, consente di determinare in modo rapido ed accurato il contenuto in grasso di farine e semole evitando gli stadi lenti costituiti dal trattamento del campione con acqua per eliminare le interferenze del materiale non lipidico, dall'essiccazione del residuo, dall'estrazione per sei ore al soxhlet con etere etilico o di petrolio e dalla determinazione gravimetrica del grasso estratto.

In sintesi il metodo proposto, che consente il recupero ed il dosaggio della sostanza grassa in appena 15 minuti, prevede l'impacchettamento del campione, opportunamente macinato, in una colonna per HPLC, l'estrazione quantitativa della sostanza grassa mediante percolazione di un opportuno solvente e la sua determinazione mediante spettroscopia I.R. o mediante rivelatore per HPLC a "light scattering".

I lusinghieri risultati ottenuti con le farine e le semole ci hanno indotto a verificare la possibilità di applicare la metodica ad altri generi alimentari, lenticchie, ceci, fave e fagioli, aventi le stesse caratteristiche fisiche degli sfarinati di frumento.

## PARTE SPERIMENTALE

Per tutte le procedure il campione è stato essiccato in stufa a 130 °C per un'ora e, successivamente, macinato fino ad una granulometria  $< 70 \mu$ .

### ► Materiale occorrente per le varie procedure

- Colonna d'acciaio per HPLC, lunga 25 cm, con d.i. di 4,6 mm e munita di filtro da 0,2  $\mu$ ;
- colonna d'acciaio per HPLC, lunga 5 cm, con d.i. di 4,6 mm e munita di filtro da 0,2  $\mu$ ;
- apparecchio per HPLC;
- stufa;
- bilancia analitica;
- spettrofotometro I.R. con cuvette in quarzo con percorso ottico da 1 cm;
- termostato operante tra 35 e 40 °C
- etere etilico;
- 1,1,2-triclorotrifluoroetano.

### ► Procedura per la determinazione gravimetrica

- Pesare accuratamente la colonna vuota da 25 cm, impaccarla sotto vibrazione con circa 2 g del campione, preventivamente essiccato, e pesare nuovamente;
- collegare la colonna alla pompa per HPLC ed eluire con 15 ml di etere etilico, con portata di 1 ml/min, raccogliendo l'eluato in un pallone tarato;
- svaporare e portare a peso costante in stufa a 100 °C;
- riportare la quantità di grasso a 100 g di sostanza secca.

### ► Procedura per la determinazione spettrofotometrica nell'I.R.

#### • Preparazione della retta di taratura

- 1) Porre 200 g di campione, preventivamente essiccato, in una beuta da 500 ml, aggiungere 200 ml di etere etilico e tenere sotto agitazione per circa 10 minuti;

- 2) filtrare il surnatante, allontanare il solvente su bagno maria e porre la beuta in stufa a 100 °C per 1 ora per eliminare le ultime tracce di etere;
- 3) preparare, con il grasso recuperato, 4 soluzioni a titolo noto di grasso in 1,1,2-triclorotrifluoroetano comprese tra 100 e 400 mg/l;
- 4) posizionare lo spettrofotometro al numero d'onda di 2925 cm<sup>-1</sup> ed azzerare con lo stesso solvente;
- 5) leggere l'assorbanza di ciascuna soluzione e riportarla in grafico in funzione della concentrazione del grasso, espressa in mg/l.

• **Procedura**

- 1) Impaccare accuratamente, sotto vibrazione, una colonna di acciaio da 5 cm con una quantità di campione, esattamente pesata, prossima a 200 mg ed inserire un batuffolo di lana di roccia;
- 2) collegare la colonna alla pompa per HPLC tramite un capillare d'acciaio per cromatografia, avvolto a spirale, della lunghezza di circa 1,5 m;
- 3) immergere la colonna ed il capillare in un bagno termostatico tra 35 e 40 °C;
- 4) dopo qualche minuto eluire con 10 ml di 1,1,2-triclorotrifluoroetano con una portata di 1 ml/min;
- 5) raccogliere l'eluato in un matraccio da 10 ml e, se necessario, portare a volume;
- 6) posizionare lo spettrofotometro al numero d'onda di 2925 cm<sup>-1</sup>;
- 7) azzerare con lo stesso solvente utilizzato per l'eluizione e misurare l'assorbanza dell'estratto;
- 8) desumere dalla curva di taratura la concentrazione in grasso della soluzione.

• **Calcolo**

Il contenuto di sostanza grassa, espresso in % in peso di campione secco, è dato dalla seguente espressione:

$$\% (p/p) = \frac{A \times V \times f}{10 \times C}$$

in cui:

- A = concentrazione della soluzione incognita, espressa in mg/l desunta dalla retta di taratura;
- V = volume finale, espresso in ml, della soluzione incognita;
- C = peso, espresso in mg, del campione secco utilizzato per l'analisi;
- f = fattore di diluizione.

► **Procedura mediante l'uso del rivelatore "Light scattering"**

• **Preparazione della retta di taratura**

Procedere, come previsto per il metodo spettrofotometrico, fino al punto 3 incluso, utilizzando etere etilico invece del solvente alogenato;

- 4) collegare direttamente la valvola campionatrice per l'HPLC al rivelatore mediante un capillare;
- 5) iniettare, per 5 volte, 25 µl di ogni soluzione a titolo noto e riportare i risultati mediati in grafico in funzione della concentrazione espressa in mg/l.

• **Procedura**

Procedere come previsto per il metodo spettrofotometrico al punto 1;

- 2) mediante la pompa per HPLC eluire, a temperatura ambiente, con 10 ml di etere etilico con un flusso di 1 ml/min;

**TABELLA I - Risultati relativi al recupero ed all'accuratezza della determinazione del grasso, dosato gravimetricamente previa estrazione con etere etilico via soxhlet e mediante tecnica cromatografica, da sfarinati di legumi**

| Ø delle particelle<br>µ | Numero delle particelle | Soxhlet                            |                                    | Metodo cromatografico              |                       |
|-------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|
|                         |                         | V <sub>m</sub> <sup>(a)</sup><br>% | S <sub>2</sub> <sup>(b)</sup><br>% | V <sub>m</sub> <sup>(a)</sup><br>% | S <sup>(b)</sup><br>% |
| <b>Ceci</b>             |                         |                                    |                                    |                                    |                       |
| 300                     | 3                       | 3,540                              | 0,3                                | 3,552                              | 0,3                   |
| 200                     | 3                       | 4,105                              | 0,3                                | 4,263                              | 0,3                   |
| 71                      | 3                       | 5,599                              | 0,4                                | 5,600                              | 0,2                   |
| 55                      | 3                       | 5,603                              | 0,4                                | 5,602                              | 0,4                   |
| 35                      | 3                       | 5,600                              | 0,2                                | 5,601                              | 0,4                   |
| <b>Fagioli</b>          |                         |                                    |                                    |                                    |                       |
| 300                     | 3                       | 1,310                              | 0,4                                | 1,181                              | 0,3                   |
| 200                     | 3                       | 1,551                              | 0,3                                | 1,542                              | 0,3                   |
| 71                      | 3                       | 1,700                              | 0,3                                | 1,702                              | 0,4                   |
| 55                      | 3                       | 1,698                              | 0,2                                | 1,700                              | 0,2                   |
| 35                      | 3                       | 1,700                              | 0,2                                | 1,701                              | 0,2                   |
| <b>Fave</b>             |                         |                                    |                                    |                                    |                       |
| 300                     | 3                       | 0,540                              | 0,2                                | 0,513                              | 0,4                   |
| 200                     | 3                       | 0,833                              | 0,3                                | 0,862                              | 0,4                   |
| 71                      | 3                       | 1,410                              | 0,3                                | 1,410                              | 0,3                   |
| 55                      | 3                       | 1,407                              | 0,4                                | 1,412                              | 0,3                   |
| 35                      | 3                       | 1,411                              | 0,3                                | 1,411                              | 0,2                   |
| <b>Lenticchie</b>       |                         |                                    |                                    |                                    |                       |
| 300                     | 3                       | 0,871                              | 0,4                                | 0,643                              | 0,3                   |
| 200                     | 3                       | 1,103                              | 0,3                                | 0,812                              | 0,4                   |
| 71                      | 3                       | 1,298                              | 0,3                                | 1,305                              | 0,2                   |
| 55                      | 3                       | 1,310                              | 0,2                                | 1,305                              | 0,2                   |
| 35                      | 3                       | 1,316                              | 0,3                                | 1,313                              | 0,3                   |

(a) Valore medio delle determinazioni, espresso in % in peso sul campione secco; (b) deviazione relativa in % rispetto al valore medio.

- 3) raccogliere l'eluato in un matraccio da 10 ml e, se necessario, portare a volume;
- 4) iniettare nel rivelatore, per 5 volte, 25 µl dell'eluato;
- 5) mediare i risultati e desumere la concentrazione della soluzione della retta di taratura.

• **Calcolo**

Per il calcolo della concentrazione del grasso nel campione utilizzare l'espressione riportata nella procedura spettrofotometrica all'I.R.

**RISULTATI E DISCUSSIONE**

► **Estrazione della sostanza grassa**

La verifica del comportamento sperimentale degli sfarinati di legumi per il recupero della sostanza grassa è risultato facilitato dall'esperienza fatta sulle farine e le semole (2) per cui ci è sembrato conveniente applicare lo stesso protocollo di analisi essendo i legumi, dopo essiccazione e macinazione, assimilabili agli sfarinati di frumento per quanto riguarda le caratteristiche fisiche.

Al fine di verificare l'influenza delle dimensioni dei granuli sul recupero del grasso, i legumi, dopo macinazione, sono stati classificati, mediante setacciatura, in frazioni con Ø delle particelle da 0,3 mm, taglia maggiormente impiegata nelle comuni procedure d'analisi a 0,055 mm. Le varie frazioni sono state sottoposte ad estrazione mediante etere etilico utilizzando, in parallelo, il metodo cromatografico e quello via soxhlet; il grasso estratto è stato, in entrambi i casi, determinato per via gravimetrica che, essendo la più accurata, è stata presa come tecnica di riferimento.

I risultati riportati nella tabella I indicano che i legumi si comportano esattamente come le farine e le semole; il recupero del grasso, con entrambe le procedure, aumenta al ridursi del  $\phi$  delle particelle fino a diventare costante per valori del diametro  $< 0,071$  mm.

Nella procedura cromatografica, oltre all'etere etilico, è stato testato anche l'1,1,2-triclorotrifluoroetano in quanto la possibilità di determinare il grasso mediante spettroscopia I.R. è condizionata dall'impiego di eluenti non idrogenati.

Mentre l'etere etilico, a temperatura ambiente, estrae il grasso in maniera quantitativa, il solvente alogenato consente un recupero di circa il 60%; l'estrazione, però, diventa quantitativa già a 35°C.

#### ► Determinazione del grasso

La tecnica cromatografica proposta consente il recupero quantitativo del grasso in circa 15 minuti; la sostanza grassa può, poi, essere dosata per via gravimetrica, come previsto dalla tecnica convenzionale (1) o, più rapidamente, a mezzo di spettroscopia I.R.

Come per gli sfarinati di frumento, siamo stati indotti a tentare la via I.R. sia perchè questa tecnica è relativamente aspecifica, sia in quanto i gascromatogrammi e gli spettri I.R. di grasso estratto da numerosi campioni di legumi in analisi sono risultati praticamente uguali.

Soluzioni a titolo noto, compreso tra 150 e 400 mg/l, sono state preparate con grasso estratto dai vari legumi in 1,1,2-triclorotrifluoroetano; le assorbanze di queste soluzioni, normalizzate a 1 g/l, hanno evidenziato valori uguali a  $2925 \text{ cm}^{-1}$ ; ciò indica che i grassi dei vari legumi hanno, nelle nostre condizioni sperimentali, la stessa assorbanza, che la legge di Beer è rispettata, almeno, fino ad una concentrazione di 400 mg/l e, soprattutto, che una sola curva di taratura è utilizzabile per i vari legumi considerati.

In particolare va precisato che, mentre per fave, lenticchie e fagioli 200 mg di sfarinato secco forniscono soluzioni con concentrazioni in grasso che ricadono nel tratto lineare della curva, per i ceci, avendo un contenuto in grasso circa triplo di quello degli altri legumi, l'estratto deve essere opportunamente diluito.

Misure spettrofotometriche effettuate nell'U.V. hanno dimostrato che grassi provenienti da cultivars di legumi diverse hanno comportamenti nettamente differenti e che, pertanto, tale tecnica non è utilizzabile per misure quantitative.

Il principio di funzionamento e la disponibilità del rivelatore per HPLC a "light scattering" ci hanno, poi, indotto a verificare la possibilità di estendere agli sfarinati di legumi l'uso di questo dispositivo come alternativo alla procedura spettrofotometrica.

La valvola campionatrice di un HPLC viene collegata direttamente al rivelatore tramite un capillare che viene alimentato con lo stesso solvente (etere etilico) usato per l'estrazione di grasso. Per migliorare l'accuratezza della misura la soluzione da analizzare viene iniettata 5 volte; questa iterazione, comunque, non comporta un sostanziale allungamento dei tempi di analisi in quanto, in mancanza della colonna cromatografica tra l'iniettore ed il rivelatore, la misura è veloce quasi quanto una determinazione spettrofotometrica.

Questa procedura presenta, rispetto alla tecnica I.R., il vantaggio di consentire il recupero quantitativo della materia grassa a temperatura ambiente.

#### CONCLUSIONI

La procedura cromatografica proposta appare molto conveniente rispetto alla metodica convenzionale in quanto consente l'estrazione quantitativa del grasso in un tempo massimo di 15 minuti purchè si amminuti il campione fino a ridurlo in particelle  $< 0,071$  mm.

Il dosaggio del grasso fornisce valori sufficientemente accurati sia utilizzando la tecnica I.R. sia il rivelatore a "light scattering" ottenendosi, comunque, scarti, rispetto alla media, inferiori allo 0,4%.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) A.O.A.C., «Official methods of analysis of AOAC International». 16th Edition, Arlington, Virginia, 1995.
- 2) G. NOTA, S. SPAGNA MUSSO, D. NAVIGLIO, R. ROMANO, M. DI MATTEO, Riv. Ital. Sostanze Grasse, in corso di stampa.