

Determinazione rapida del grasso nelle farine e nelle semole mediante tecniche strumentali

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

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

M. DI MATTEO

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA CHIMICA - UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI - SALERNO

RAPID EVALUATION OF FAT CONTENT WHEAT FLOUR BY MEANS OF INSTRUMENTAL TECHNIQUES

A new analytical methodology which allows to determine fat content in wheat flour more rapidly than the actual available techniques has been developed. Fat extraction is carried out letting 10 ml of

1,1,2-trifluorotrichloroethane percolate, under pressure through an HPLC column of 5 cm perched with a known amount of semolina.

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

Therefore semolina requires a preliminary milling stage which isn't necessary for the commercial flour as it already passes an adequate granulometry. The amount of fats content of flour 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 (sample treatment with water, soxhlet extraction, heating to constant weight, etc.). 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-trifluorotrichloroetano attraverso una colonnina per HPLC da 5 cm impaccata con una quantità nota di sfarinato. La granulometria dello sfarinato ha evidenziato una influenza notevole sull'efficienza dell'estrazione che è apparsa quantitativa per particelle aventi una granulometria $<70 \mu$ per cui le semole richiedono una molitura preliminare che, invece, non è necessaria per le farine del commercio in quanto presentano già una granulometria opportuna.

Il dosaggio della sostanza grassa degli sfarinati può essere condotto 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 (trattamento del campione con acqua, estrazione al soxhlet, portata a peso costante) 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 nelle farine e nelle semole rappresenta un importante parametro per la valutazione della qualità degli sfarinati.

Attualmente il metodo più utilizzato dai laboratori di controllo è quello riportato dall'A.O.A.C. (1).

Tale metodo prevede il trattamento del campione con acqua per allontanare il materiale interferente di natura non lipidica, l'essiccazione del residuo, l'estrazione, per sei ore in soxhlet con etere etilico o etere di petrolio e, dopo l'allontanamento del solvente, la determinazione gravimetrica del grasso estratto.

La metodica, così come configurata, non consente un'acquisizione rapida del risultato. Il metodo, di tipo cromatografico, proposto nel presente lavoro prevede l'estrazione del grasso mediante un opportuno solvente che, sotto pressione, percola attraverso lo sfarinato impaccato in una colonna per HPLC.

L'eluato viene poi analizzato spettrofotometricamente all'I.R. o, in alternativa, mediante il rivelatore per HPLC a "light scattering". Comunque, in mancanza di un'adeguata strumentazione, il grasso estratto può essere determinato per pesata. Questa procedura prevede il recupero quantitativo e l'analisi della sostanza grassa in appena 15 minuti: tutte le fasi lente previste dalla metodica convenzionale vengono evitate.

PARTE SPERIMENTALE

Per tutte le procedure il campione è stato essiccato in stufa a 130 °C per un'ora e, successivamente, macinato ad una granulometria $<70 \mu$. A differenza delle semole, le farine del commercio hanno già, usualmente, l'opportuna granulometria.

► Materiale occorrente per le varie procedure

- Colonna in acciaio per HPLC, lunga cm 25, con d.i. di mm 4,6 e munita di filtro da 0,2 μ ;
- Colonna in acciaio per HPLC, lunga cm 5, con d.i. di mm 4,6, munita di filtro da 0,2 μ ;
- 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-triclorofluoroetano.

► 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 all'I.R.**

Preparazione della curva di taratura

1. Porre 200 g di farina o di semola, preventivamente essicata, in una beuta da 500 ml, aggiungere 400 ml di etere etilico e tenere sotto agitazione per circa 10 min;
2. filtrare il surnatante, allontanare il solvente su bagnomaria 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-triclorofluoroetano comprese tra 100 e 400 mg/l;
4. posizionare lo spettrofotometro al numero d'onda di 2925 cm⁻¹ 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.

Modo di operare

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-triclorofluoroetano 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⁻¹;

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 sfarinato secco, è dato dalla seguente espressione:

$$\%(p/p) = \frac{A \cdot V}{10 \cdot P}$$

in cui:

- A è la concentrazione della soluzione incognita, espressa in mg/l desunta dalla curva di taratura;
 V è il volume finale, espresso in ml, della soluzione incognita;
 P è il peso, espresso in mg, dello sfarinato secco utilizzato per l'analisi.

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

Preparazione della curva 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 al punto 1. nel "Modo di operare" del metodo spettrofotometrico sopra riportato;
2. mediante la pompa per HPLC eluire, a temperatura ambiente, con 10 ml di etere etilico con un flusso di 1 ml/min;
 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 dalla curva di taratura.

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, di una semola e di una farina

Ø delle particelle mm	Numero delle misure	Soxhlet			Metodo cromatografico		
		Vm ^(a) %	S ^(b)	S ₂ ^(c) %	Vm ^(a)	S ^(b)	S ₂ ^(c) %
SEMOLA							
0,3	3	0,467	0,002	0,4	0,464	0,002	0,4
0,2	3	0,995	0,002	0,2	0,998	0,004	0,4
0,071	3	1,316	0,003	0,2	1,310	0,004	0,3
0,055	3	1,310	0,004	0,3	1,305	0,004	0,3
0,035	3	1,316	0,004	0,3	1,313	0,004	0,3
FARINA							
0,071	3	1,089	0,004	0,4	1,083	0,004	0,3
0,055	3	1,085	0,003	0,3	1,085	0,004	0,4
0,035	3	1,087	0,003	0,3	1,085	0,004	0,4

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

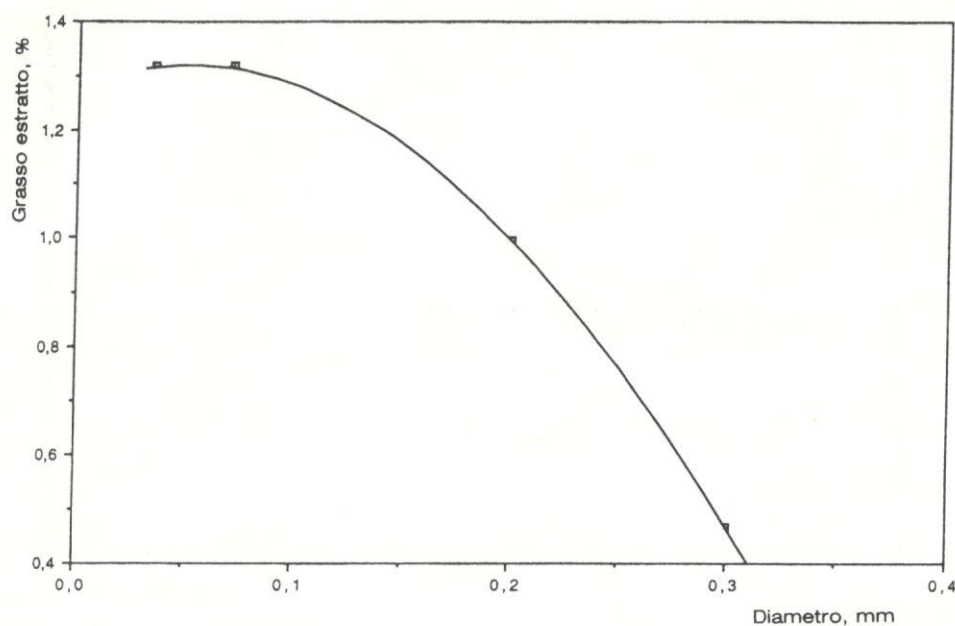


Fig. 1a - Grasso estratto al soxhlet in funzione del diametro delle particelle.

$$y = 1,2757 + 1,6602x - 16,893x^2 + 7,9106x^3 \quad R^2 = 1,000$$

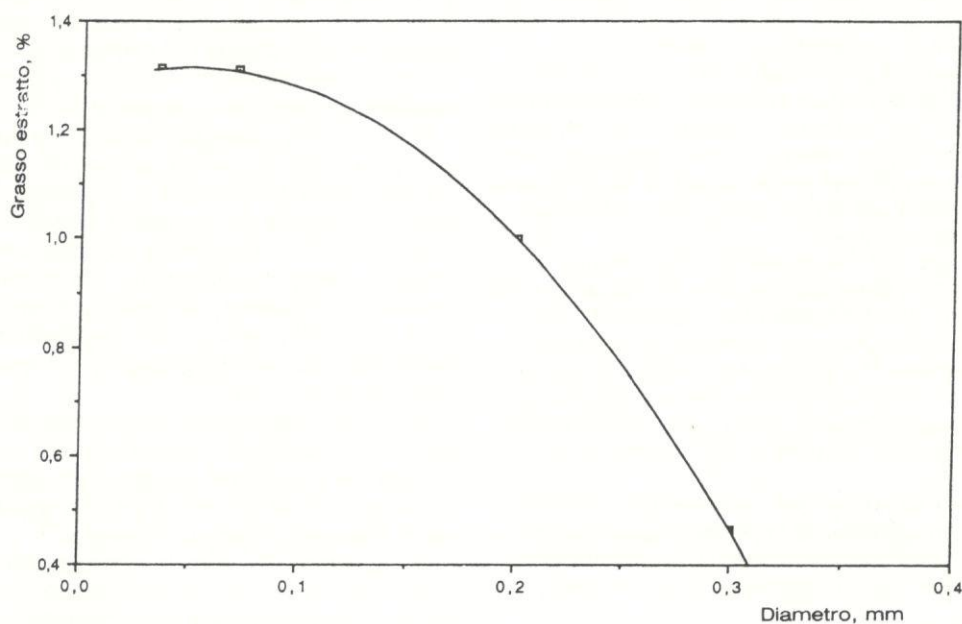


Fig. 1b - Grasso estratto con il metodo cromatografico in funzione del diametro delle particelle.

$$y = 1,2806 + 1,3488x - 14,269x^2 + 2,3304x^3 \quad R^2 = 1,000$$

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

L'estrazione della sostanza grassa mediante soxhlet risulta quantitativa solo se il campione viene sottoposto ad almeno 50 cicli nell'arco di 6-8 ore (2). Quando 2 g di sfarinato, con densità di 0,7 g/ml, vengono impaccati in una colonna per HPLC, lunga cm 25, con d.i. di mm 4,6, presentano un volume interstiziale di 1,3 ml e sono sufficienti 15 ml di solvente

per estrarre quantitativamente il grasso da questo in 15 min, cioè bastano solo 11 cicli.

Nel sistema cromatografico si verifica un impiego più efficiente del solvente in quanto esso è costretto ad un contatto più intimo con lo sfarinato e l'estrazione avviene non solo per diffusione ma anche per trascinamento.

Al fine di verificare il comportamento generale degli sfarinati sono state analizzate le più comuni marche di farine e di semole reperibili in commercio. Nella tabella I sono riportati i risultati relativi ad un campione di farina ed uno di semola sottoposti ad estrazione in triplo sia in soxhlet, sistema preso come riferimento, sia mediante la procedura cromatografica usando, come solvente, etere etilico ed analizzati gravimetricamente.

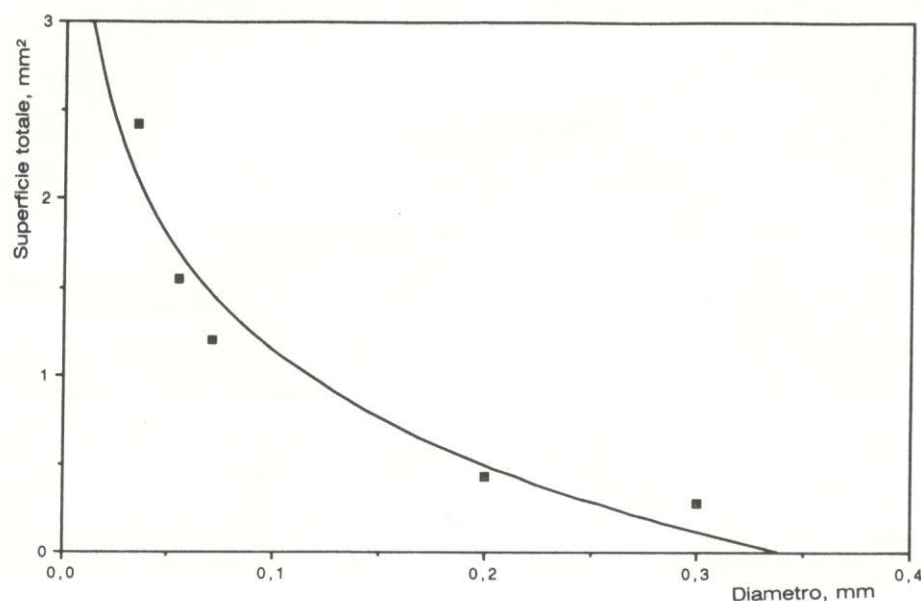


Fig. 2 - Sviluppo superficiale specifico del campione in funzione del diametro delle particelle.

$$y = 1,0112 + -2,1471 \cdot \text{LOG}(x) \quad R^2 = 0,928$$

I risultati ottenuti con la metodica proposta mostrano non solo un'ottima riproducibilità ma anche un eccellente accordo con i risultati relativi all'estrazione in soxhlet.

Nella procedura cromatografica, oltre l'etere etilico, è stato testato anche l'1,1,2-triclorotrifluoroetano in quanto siamo interessati ad eluire con solventi privi di idrogeno: a temperatura ambiente questo solvente presenta un rendimento di estrazione di circa il 60% rispetto all'etere. Abbiamo allora testato l'influenza della temperatura sul recupero della materia grassa mediante solvente alogenato.

In tabella II sono riportati i valori dei recuperi ottenuti in un intervallo di temperatura compreso fra 20 e 40 °C, relativi ad un campione di farina ed uno di semola. I risultati riportati indicano che l'eluizione del grasso è quantitativa già a 35 °C.

L'esperienza e la teoria alla base del principio cromatografico ci hanno indotti a verificare l'efficienza del recupero del grasso al variare delle dimensioni delle particelle di sfarinato allo scopo di minimizzare i tempi di estrazione ed i volumi di solvente.

Si è iniziata la sperimentazione con particelle da 0,3 mm, che rappresenta la taglia maggiormente impiegata; successivamente è stato utilizzato materiale con diametri di particelle via via minori fino a 0,035 mm. Questi campioni sono stati analizzati

gravimetricamente, in parallelo, via soxhlet e mediante procedura cromatografica. I risultati riportati nelle figure 1a e 1b mostrano che al diminuire del diametro delle particelle aumenta la percentuale di grasso estratto, fino ad arrivare ad un valore costante per campioni con particelle di 0,071 mm.

Il solvente impiegato per l'estrazione non riesce a diffondere in profondità al granulo, pertanto il recupero diventa tanto maggiore quanto più piccolo è il granulo; in altre parole lo sviluppo superficiale del campione gioca un ruolo determinante.

Nella figura 2 è riportata la variazione dello sviluppo superficiale specifico del campione in funzione del diametro delle particelle considerate, per semplicità, sferiche e lisce. L'andamento di questa curva, di tipo logaritmico, bene spiega l'aumento del recupero del grasso in funzione del diametro delle particelle di sfarinato.

La determinazione del grasso nelle farine non richiede un particolare trattamento di macinazione in quanto le farine del commercio presentano già un'adatta granulometria; per contro, le semole devono essere opportunamente macinate prima di essere sottoposte ad analisi.

Per le farine i dati sono in accordo con quelli riportati in letteratura (2) mentre per le semole la corrispondenza sussiste per granuli delle dimensioni di circa 0,3 mm, ma si ottengono valori circa doppi quando si estraggono semole amminutate fino a 0,071 mm, nel qual caso i tenori in grasso sono superiori a quelli delle farine, contrariamente a quanto riportato in letteratura.

TABELLA II - Recupero della sostanza grassa, mediante metodo cromatografico, da una farina e da una semola a contenuto noto in grasso, a varie temperature ed usando come solvente 1,1,2-triclorotrifluoroetano

Temperatura di estrazione °C	Farina		Semola	
	Grasso estratto %	Grasso teorico %	Grasso estratto %	Grasso teorico %
18	0,530		0,700	
22	0,890		1,050	
30	1,020		1,250	
35	1,075		1,324	
40	1,083	1,080	1,325	1,325

N.B. La farina non è stata sottoposta ad alcun trattamento di macinazione né di setacciatura. Per la semola, dopo la macinazione, è stata utilizzata la frazione con ϕ delle particelle $\leq 0,071$ mm

► Determinazione del grasso

La tecnica proposta consente un recupero rapido del grasso; il tempo necessario è di circa 15 min; dopo la fase di estrazione, la determinazione quantitativa può essere effettuata gravimetricamente, come previsto dalla tecnica convenzionale. Questo stadio lento e noioso può essere eliminato se si dispone di uno spettrofotometro I.R.

Siamo stati indotti a tentare la via spettrofotometrica all'infrarosso in quanto questa tecnica è relativamente aspecifica e, inoltre, perché i gascromatogrammi o, più ancora, gli spettri I.R. relativi a numerosi grassi estratti da semole e da farine sono risultati perfettamente identici. Nelle figure 3 vengono riportati i gascromatogrammi e gli spettri I.R. di un grasso e di una farina.

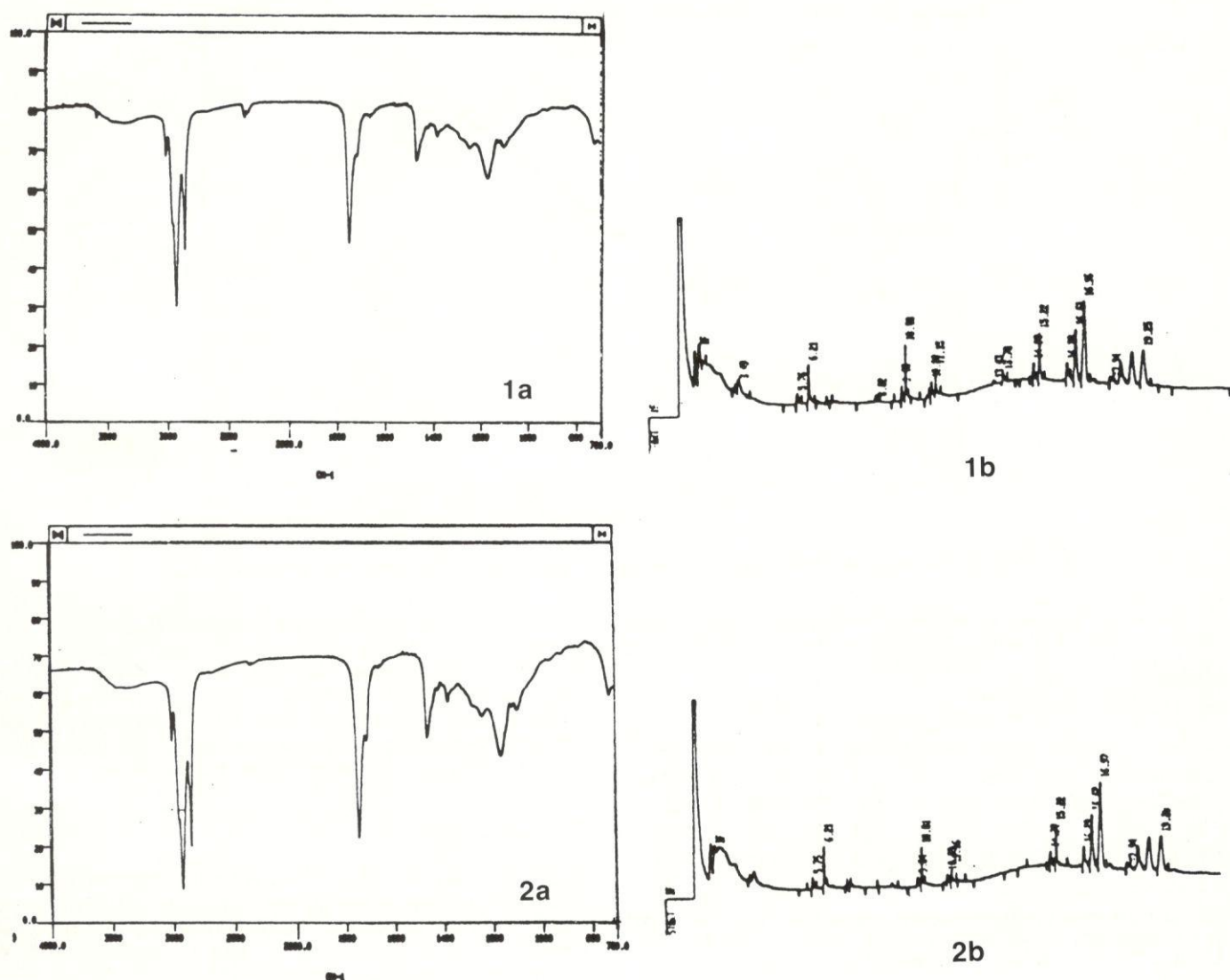


Fig. 3 - Profili I.R. e gascromatogrammi di grasso estratto da una farina (a) e da una semola (b).

Soluzioni a titolo noto, compreso tra 100 e 400 mg/l, sono state preparate con grasso estratto da due farine e due semole in 1,1,2-triclorotrifluoroetano; le assorbance di queste soluzioni, normalizzate ad 1 g/l di grasso, misurate a 2925 cm^{-1} e riportate in tabella III, indicano che tutti i grassi hanno la stessa assorbance nelle nostre condizioni sperimentali e che la legge di Beer è rispettata almeno fino ad una concentrazione di 400 mg/l; una sola curva di taratura è sufficiente sia per le farine che per le semole; 200 mg di sfarinato di opportuna granulometria, estratti con 1,1,2-triclorotrifluoroetano tra 35 e 40 °C, forniscono una soluzione con una concentrazione di grasso che cade nel tratto lineare della curva di taratura.

Nella tabella IV sono riportati i risultati relativi a due campioni di semola e due di farina, analizzati 3 volte. Lo scarto massimo in %, rispetto alla media, è minore dell'1,36% sia per la farina che per la semola. Misure spettrofotometriche effettuate nell'U.V. hanno dimostrato che grassi provenienti da farine e semole diverse hanno un comportamento nettamente differente e, pertanto, non adatto per misure quantitative.

Il principio di funzionamento e la disponibilità del rivelatore per HPLC a "light scattering" ci hanno indotto a verificare la possibilità di impiegare questo dispositivo per il dosaggio del grasso come alternativa alla procedura spettrofotometrica.

La valvola campionatrice di un apparecchio per HPLC viene collegata direttamente al rivelatore tramite un capillare; que-

TABELLA III - Misure spettrofotometriche all'I.R., a 2925 cm^{-1} , di soluzioni di grasso in 1,1,2-triclorotrifluoroetano

Campione	A g/l di grasso	Valore medio	S(a)	S(b) %
Semola 1	2,293	2,267	0,026	1,20
Semola 2	2,242		0,025	1,10
Farina 1	2,285	2,267	0,018	0,84
Farina 2	2,249		0,018	0,84

a = deviazione assoluta rispetto al valore medio; b = deviazione relativa in % rispetto al valore medio

st'ultimo viene alimentato con lo stesso solvente (etere etilico) usato per l'estrazione del grasso. In queste condizioni la soluzione da analizzare viene iniettata 5 volte per migliorare l'accuratezza della misura; questa procedura non allunga il tempo di analisi in quanto, in mancanza della colonna cromatografica tra iniettore e rivelatore, la misura è veloce quasi quanto una misura spettrofotometrica.

Per larghi intervalli di concentrazione la risposta del rivela-

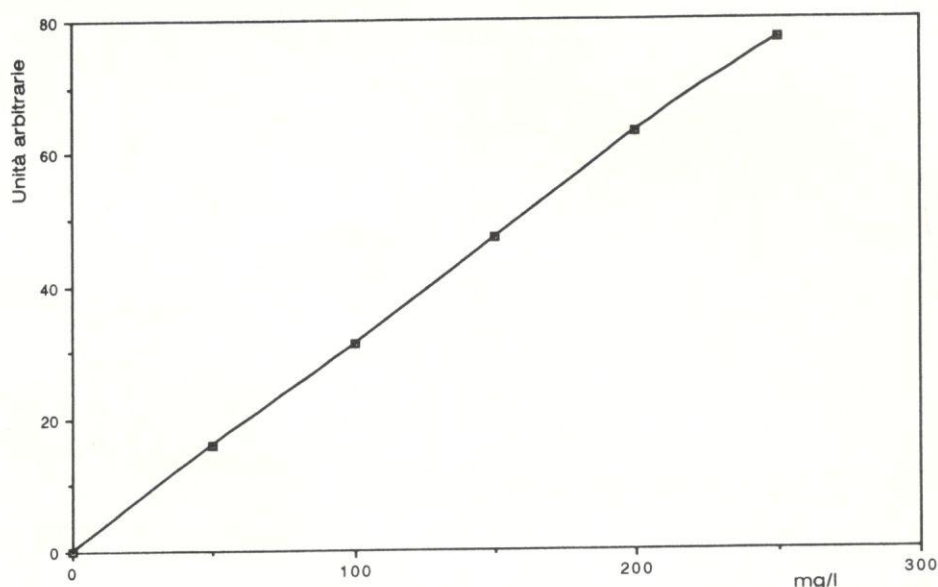


Fig. 4 - Curva di taratura mediante rivelatore "light scattering" (solvente etere etilico).

TABELLA IV - Determinazione all'I.R. del grasso estratto da campioni di semola e di farina mediante procedura cromatografica

Campione	Numero delle misure	Vm ^(a) %	S ^(b)	S ^(c) %
Semola 1	3	1,28	0,017	1,33
Semola 2	3	1,33	0,018	1,35
Farina 1	3	1,03	0,014	1,36
Farina 2	3	1,10	0,015	1,36

a = valore medio delle determinazioni, espresso in % in peso sul campione secco; b = deviazione assoluta rispetto al valore medio; c = deviazione relativa in % rispetto al valore medio

TABELLA V - Determinazione mediante rivelatore "light scattering" del grasso estratto da campioni di semola e di farina mediante procedura cromatografica

Campione	Numero delle misure	Vm ^(a) %	S ^(b)	S ^(c) %
Semola 1	3	1,26	0,016	1,27
Semola 2	3	1,33	0,018	1,35
Farina 1	3	1,04	0,014	1,35
Farina 2	3	1,10	0,015	1,36

a = valore medio delle determinazioni, espresso in % in peso sul campione secco; b = deviazione assoluta rispetto al valore medio; c = deviazione relativa in % rispetto al valore medio

tore "light scattering" è di tipo esponenziale; lavorando in un intervallo di concentrazione molto ristretto, come nel nostro caso, l'andamento può essere considerato lineare. In figura 4 viene riportata una tipica curva di taratura nell'intervallo di concentrazione previsto.

In tabella V vengono riportati i risultati relativi a due campioni di farina e due di semola analizzati in triplo. Lo scarto massimo in %, rispetto alla media, è minore dell'1,36% sia per la semola che per la farina. Questa procedura presenta come vantaggio rispetto alla tecnica I.R. un recupero quantitativo della materia grassa a temperatura ambiente in quanto prevede l'impiego dell'etere etilico come solvente.

CONCLUSIONI

La procedura cromatografica per l'estrazione del grasso, richiedendo appena 15 minuti, risulta più rapida e conveniente della procedura via soxhlet. La disponibilità di uno spettrofotometro I.R. o di un rivelatore a "light scattering" consente di eliminare la lunga e tediosa procedura gravimetrica prevista dalla metodica convenzionale.

Il recupero della materia grassa risulta quantitativo solo per dimensioni delle particelle non superiori a 0,07 mm per cui le farine possono essere analizzate direttamente mentre per le semole è richiesta una idonea macinazione preliminare.

I risultati ottenuti con la metodica proposta sono in ottimo accordo con la procedura gravimetrica, via soxhlet, presa come riferimento.

Prove effettuate su campioni a granulometria < 0,07 mm sia con estrazione a mezzo soxhlet sia in colonna cromatografica hanno fornito, per le farine, tenori in grasso in linea con quelli della letteratura (2) mentre, per le semole, si sono ottenuti valori nettamente più alti e paragonabili a quelli delle farine.

BIBLIOGRAFIA

- 1) A.O.A.C., «Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th edition», Arlington, Virginia, USA, 1995.
- 2) D. MARINI, F. BALESTRIERI, «Analisi chimica dei prodotti alimentari». Athena, Milano, 1990.