

41. F. MUNTONI e Maria G. DI CARLO-MALAGODI. — **Identificazione diretta per via cromatografica della riboflavina usata come colorante nelle paste alimentari. (*)**

Riassunto. — Per la identificazione della riboflavina, aggiunta a scopo di colorazione nelle paste alimentari, si propone un metodo che per la prima volta consente una identificazione diretta. Esso è basato sulla estrazione della riboflavina con acetone all'80%, sulla purificazione dell'estratto per eliminazione delle sostanze interferenti con etere etilico e sulla individuazione cromatografica per mezzo di una cromatografia ascendente su carta, solvente isobutanolo:piridina:acido acetico:acqua = 33:33:1:33. Alla temperatura di 20°C lo R_f della riboflavina è pari a 0,655.

Summary. — A method is described which allows direct identification of riboflavin added as a colorant to macaroni. It is based on the extraction of riboflavin with 80% acetone, purification of the extract by elimination of the impurities with ethylic ether, and paper chromatographic separation using as a solvent isobutanol:pyridine:acetic acid:water in the proportions 33:33:1:33. At a temperature of 20° the R_f of the riboflavin is equal to 0.655.

La ricerca della riboflavina nelle paste alimentari con essa colorate è stata oggetto di studio di altri Autori i quali hanno messo a punto vari metodi. Così ad esempio G. NEBBIA ⁽¹⁾ si basa sull'apparizione di una fluorescenza di color gialloverde negli estratti acquosi neutri, mentre F. DI STEFANO e D. RENZI ⁽²⁾ osservano estratti acquosi acidi irradiati con radiazioni ultraviolette che, trasformando la riboflavina in lumicromo, fanno apparire in tali estratti una fluorescenza di color azzurro, dovuta appunto al lumicromo.

Il compito che ci siamo prefissi consiste nella messa a punto di un metodo che consenta una identificazione diretta della riboflavina, aggiunta a scopo di colorazione nelle paste alimentari, in base a un dato più obiettivo della semplice osservazione del colore di una fluorescenza o della misura della sua intensità.

(*) Comunicazione al IX Congresso Nazionale di Chimica tenuto congiuntamente con la Société Suisse de Chimie (Napoli 27 maggio-2 giugno 1962).

Si poteva infatti pensare a misure fluorimetriche, come proposto da altri Autori ⁽³⁾, ma abbiamo voluto seguire altri sistemi, abbiamo voluto cioè osservare se anche in questo caso fosse possibile utilizzare quei metodi cromatografici che uno di noi ⁽⁴⁾ ha già applicato all'identificazione di altri coloranti.

Siamo addivenuti a questo ordine di idee anche perchè l'impiego di metodi spettrofotometrici, quale ad esempio quello di C. DAGLISH, N. BAXTER e F. WOKES ⁽⁵⁾ che, dimostratosi perfettamente efficiente nel caso di prodotti farmaceutici, è invece di difficilissima applicazione nel caso delle paste sia per la difficoltà di isolare la riboflavina dagli altri componenti degli estratti ottenuti con i diversi solventi, sia per la piccolezza della quantità di essa che, minima per la composizione naturale, non superando 0,1 mg/kg ⁽⁶⁾, assomma solo a pochi mg/kg nel caso della aggiunta per colorazione.

Infatti i solventi che meglio estraggono la riboflavina dalle paste, estraggono anche i pigmenti carotenolici naturali del frumento, i quali interferiscono fortemente in una determinazione spettrofotometrica perchè in loro presenza si ha una deformazione della curva di assorbimento della riboflavina ed è praticamente impossibile sfruttare per il riconoscimento i massimi caratteristici di questa vitamina.

Indirizzatici quindi, in base alle considerazioni precedenti, verso l'impiego di un procedimento cromatografico, abbiamo sperimentato quelli già noti in letteratura ed allestiti per la ricerca della riboflavina in altri prodotti, applicandoli a un estratto di pasta colorata con riboflavina, che abbiamo cercato di ottenere il più possibile privo di sostanze interferenti.

E' infatti da porre sempre nella massima evidenza che, nel caso dell'applicazione di metodi cromatografici per la ricerca di additivi negli alimenti, la fase più delicata del procedimento è rappresentata appunto dall'idoneità del metodo di estrazione prescelto, che, oltre ad essere efficace, deve essere anche di esecuzione il più possibile semplice. Abbiamo quindi cercato di escludere processi di estrazione complicati, come ad esempio quello di B. GASSMAN ⁽⁷⁾ che prevede idrolisi sia acide che diastasiche per eliminare i componenti interferenti.

PARTE SPERIMENTALE

Abbiamo innanzitutto preparato in laboratorio campioni di pasta colorati per mezzo dell'aggiunta di mg 10 di riboflavina a un kg di semola, ciò che rappresenta la quantità di solito adoperata a questo scopo.

Il procedimento di estrazione si effettua ponendo in una beuta da ml 250, con tappo a smeriglio, g 25 di pasta finemente macinata e ml 60 di una miscela composta dall'80% di acetone e dal 20% d'acqua, che si lasciano a contatto per 30 minuti, agitando di quando in quando. Allorchè il liquido sovrastante è giallo, mentre la pasta è quasi completamente decolorata, si filtra per filtro a pieghe. A questo punto, se si ha a che fare con campione il cui colorante sia incognito, occorre osservare il filtrato giallo alla luce di Wood per accertare la presenza della fluorescenza dovuta probabilmente alla riboflavina, dato che il colore giallo da solo non è sufficiente a indicarne la presenza, poichè in gran parte esso è dovuto ai pigmenti carotenolici naturali.

Una volta accertata la presenza della fluorescenza, si concentra il filtrato su bagno maria, ottenendo un residuo formato dalla riboflavina, da sostanze lipoidiche e dai pigmenti naturali. Questo residuo quasi secco si riprende con ml 20 di acqua distillata e si filtra entro imbuto separatore. Si aggiungono quindi ml 20 di etere etilico, nel quale la riboflavina è insolubile, mentre esso scioglie facilmente sia i lipoidi residui che i pigmenti naturali.

Lo strato acquoso, che ormai contiene solo la riboflavina, si concentra a bagno maria sino a ottenere poche gocce, con le quali si praticano le macchie di partenza per la cromatografia ascendente su carta.

Sono stati proposti per tali procedimenti diversi solventi, con i quali tutti si ottengono R_f caratteristici per la riboflavina; noi abbiamo sperimentato quelli proposti da K. JAMAGIRI ⁽⁸⁾ lutidina:butanolo:acqua = 4:1:5, da A. HEYNDRIKX ⁽⁹⁾: n-propanolo: HCl 0,1N = 2:1, da K. V. GIRI e P. R. KRISHNASWANY ⁽¹⁰⁾: butanolo:acido acetico:acqua = 4:1:5 e da A. GAUDIANO e E. CINGOLANI ⁽¹¹⁾: isobutanolo:piridina:acido acetico:acqua = 33:33:1:33.

Con quest'ultimo solvente abbiamo ottenuto i risultati migliori, operando in vaschetta piccola con carta Whatman 1 (fogli da cm 12 × 12) alla temperatura di circa 20°C. Per la determinazione dello R_f il cromatogramma sviluppato si osserva alla luce di Wood per meglio determinare la posizione della macchia. Lo R_f osservato in queste condizioni per la riboflavina estratta dalla pasta e confrontata con riboflavina pura ha il valore di 0,655.

In conclusione possiamo affermare di essere pervenuti alla elaborazione di un metodo che per la prima volta consente la identificazione diretta della riboflavina aggiunta a scopo di colorazione alle paste alimentari.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) NEBBIA G. - Boll. Lab. chim. prov., 2: 11 (1951).
 - (²) DI STEFANO F. e RENZI D. - Rend. Ist. sup. Sanità, 19: 294 (1956).
 - (³) EULER H. e ADLER E. - Z. physiol. Chem., 223: 103 (1934).
KOSHARA W. - ibid., 232: 101 (1935).
 - (⁴) DE GIULI G., MUNTONI F. e TURI-JACOBELLI C. - L'Italia e i Cereali, 13: 461 (1958);
MUNTONI F. e TASSI-MICCO C. - Rend. Ist. sup. Sanità.
 - (⁵) DAGLISH C., BAXTER N. e WOKES F. - Quart. J. Pharm. Pharmacol., 21: 244 (1948).
 - (⁶) DE CARO L. - Quaderni Nutriz., 3: 171 (1936).
 - (⁷) GASSMAN B. - Nahrung, 4: 140 (1960).
 - (⁸) JAMAGIRI K. - Vitamin, 13: 519 (1957).
 - (⁹) HEYNDRIKX A. - J. amer. pharm. Ass. Sci. Ed., 42: 680 (1953).
 - (¹⁰) KRISHNASWANY P. R. - J. Indian. Inst. Sci., 38: 232 (1956).
 - (¹¹) GAUDIANO A. e CINGOLANI E. - Boll. Soc. it. Biol. sper., 30: 637 (1954).
-