

42. F. MUNTONI e Claudia TASSI-MICCO. - Identificazione cromatografica dei coloranti sintetici nelle paste alimentari. - Nota II. (*)

Riassunto. — Gli AA. propongono un metodo di identificazione cromatografica di coloranti delle paste alimentari basato su di una estrazione di essi con etanolo di 50°, sulla fissazione del colorante estratto su glutine secco e sulla cromatografia su carta dei coloranti smontati con ammoniaca 1,5%. Il metodo è più rapido e preciso dei precedenti perchè elimina una fase della estrazione e perchè, assieme ai coloranti sintetici, non vengono estratti i pigmenti naturali. Il metodo è valido anche per le paste colorate con miscele di coloranti sintetici.

Summary. — The authors propose a chromatographic identification method of dyes in macaroni based on their extraction with 50% ethanol, the fixation of the dyes extracted on dried gluten and subsequent chromatography of the colors eluted with 1.5% ammonia. This is a quicker and more exact method than previous ones because it eliminates one phase of the extraction procedure and because the natural pigments are not extracted together with the synthetic dyes. The method is suitable also for macaroni colored with a mixture of artificial colors.

Già uno di noi ⁽¹⁾ ebbe a presentare al precedente Congresso, l'VIII, una nota sul medesimo argomento ora trattato. In essa, pur ottenendosi un miglioramento nei confronti dei metodi precedenti, restavano da risolvere alcune questioni e, più particolarmente, un perfezionamento del sistema di estrazione dei coloranti e l'identificazione di alcuni di essi che, come il giallo tramonto FCF e il giallo chinolina, non si era riusciti a individuare convenientemente con il procedimento che invece forniva ottimi risultati per gli altri coloranti.

Come ci mostra la pratica quotidiana di laboratorio, coloranti sintetici continuano ad essere adoperati per la colorazione delle paste alimentari e quindi rimangono attuali i problemi connessi con la loro ricerca e la loro identificazione, specialmente se è necessario stabilire se il colorante impiegato sia innocuo, faccia parte cioè di quelli elencati dal Decreto ministeriale del 23 dicembre 1957.

Abbiamo quindi ritenuto utile riprendere le ricerche riferite nella

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

nota accennata sia perchè il metodo di estrazione, benchè migliore dei precedenti, risultava ancora piuttosto lungo e macchinoso, sia perchè i due coloranti suddetti, la identificazione dei quali non era stata raggiunta, erano compresi nella lista dei coloranti consentiti e cioè considerati innocui.

E' ovvia infatti l'importanza della possibilità di identificare tutti i coloranti permessi perchè, mentre non è praticamente possibile, a causa del loro enorme numero, pervenire alla esatta identificazione di un colorante non permesso, e quindi presunto nocivo, è invece sufficiente stabilire con certezza che una sostanza colorante rinvenuta in un alimento non sia identificabile con nessuna di quelle ammesse per essere sicuri che essa faccia parte del grande gruppo di quelle vietate.

Ci siamo pertanto prefissi di eliminare gli inconvenienti accennati a cercare innanzitutto di ottenere estratti dei coloranti che fossero il più possibile privi di sostanze concomitanti che tanto disturbano l'identificazione per via cromatografica provocando una cattiva concentrazione delle macchie sino ad arrivare a vere e proprie scodature.

E' stato nel frattempo pubblicato da F. M. DEL BIANCO e G. TRABACCHI ⁽²⁾ un metodo per l'estrazione dei coloranti da prodotti alimentari (prevalentemente zuccherini) basato sul loro adsorbimento da parte di polvere di pelle attivata per trattamento a caldo con formaldeide. Questo preparato acquista così la proprietà di adsorbire fortemente i coloranti in ambiente acido, di non trattenere le sostanze concomitanti, consentendo un buon lavaggio, e di cedere infine facilmente i coloranti per trattamento con alcali diluito.

Considerando che la polvere di pelle altro non è che una miscela di proteine la quale, come altre sostanze proteiche naturali (lana, seta ecc.) ha il potere di adsorbire o legare le sostanze coloranti sintetiche, e tenuto altresì presente che la polvere di pelle è un reattivo a volte non facilmente reperibile e che richiede inoltre un trattamento preliminare piuttosto lungo, abbiamo innanzitutto cercato se fosse possibile reperire un'altra sostanza proteica che presentasse le medesime caratteristiche, possibilmente anche senza la necessità di una sensibilizzazione preliminare.

Era stato già notato da altri, tra i quali W. LHOEST ⁽³⁾, che il glutine possiede un certo potere di adsorbimento nei confronti di alcuni coloranti ed abbiamo pertanto pensato di sperimentare col glutine essiccato e polverizzato, che oltre ad essere anch'esso costituito da una miscela di proteine, è una sostanza che si ha facilmente a portata di mano in ogni laboratorio che si occupi di chimica dei cereali perchè si può utilizzare il glutine proveniente dalla sua determinazione nei prodotti molitori.

PARTE SPERIMENTALE

Per prima cosa abbiamo voluto accertare se il glutine essiccato, tal quale o attivato, possedesse la proprietà di adsorbire i coloranti. A tale scopo, adoperando glutine estratto da farina, essiccato per 20 ore a 103°C e macinato, abbiamo preparato colonnine del diametro di cm 1, munite di rubinetto, caricandole con il glutine macinato per l'altezza di cm 1.

I coloranti sperimentali sono stati tutti i gialli e i rossi elencati nel citato Decreto ministeriale e cioè:

- 1) Azorubina;
- 2) Rosso solido E;
- 3) Amaranto o Bordeaux acido B o Bordeaux S o Rosso naftolo S;
- 4) Rosso scarlatto Vittoria o Ponceau 4R o Rosso cocciniglia A;
- 5) Ponceau 6R o Scarlatto 6R;
- 6) Scarlatto GN;
- 7) Eritrosina;
- 8) Giallo tramonto FCF;
- 9) Tartrazina;
- 10) Giallo chinolina.

Oltre ai gialli, il cui impiego nelle paste è ovvio, abbiamo sperimentato anche i rossi perchè abbiamo constatato che essi venivano impiegati per colorare la frazione rossa della pasta cosiddetta « Arlecchino ».

Questi coloranti sono tutti solubili in acqua, alcool etilico e butanolo saturo d'acqua, solvente, quest'ultimo, adoperato nella precedente indagine (¹) e quindi abbiamo fatto passare per le colonnine soluzioni dei coloranti in questi tre solventi (le soluzioni in alcool etilico sono state preparate sia con alcool di 70° che di 50°).

Avendo notato che in queste condizioni si verificava un adsorbimento sensibile, ma lento, dei coloranti, abbiamo pensato di attivare il glutine secco, prima con acido tricloroacetico al 5%, quindi con acido tartarico al 2%. Quest'ultimo ha consentito di ottenere risultati soddisfacenti.

Per lo smontaggio dei coloranti fissati dal glutine abbiamo adoperato ammoniaca a 1,5%, dieci gocce della quale sono sufficienti a otte-

nere una quantità di colorante bastevole a praticare la macchia per la cromatografia su carta.

Nello sviluppo dei cromatogrammi abbiamo notato a questo punto un andamento poco soddisfacente, dovuto probabilmente alla quantità eccessiva di acido tartarico, e quindi di tartrato ammonico, che veniva ad accompagnare i coloranti.

Abbiamo quindi provato, anzichè attivare il glutine direttamente, ad acidificare debolmente con acido tartarico le soluzioni dei coloranti, adoperando ml 0,5 di acido tartarico al 2% per ogni 20 ml di soluzione. Così operando abbiamo ottenuto una fissazione immediata e completa dei coloranti sul glutine, ricavando eluati completamente incolori mentre, al tempo stesso, anche lo sviluppo dei cromatogrammi era molto soddisfacente.

Una volta accertata l'applicabilità del procedimento ai coloranti puri, abbiamo cercato di ottenere dalle paste estratti dei coloranti che permettessero l'utilizzazione di esso anche in questo caso, che rappresenta il vero scopo del nostro lavoro.

Preparati quindi in laboratorio campioni di paste contenenti rispettivamente per ogni kg di semola mg 5 e mg 10 dei singoli coloranti sperimentati, abbiamo provato ad estrarre dalla pasta macinata i coloranti con gli stessi solventi adoperati nelle prove di adsorbimento e smontaggio dei coloranti stessi.

Abbiamo subito scartato l'acqua perchè non estrae che quantità minime di coloranti e il butanolo saturo d'acqua perchè esso estrae, oltre ai coloranti sintetici, tutti i pigmenti naturali del frumento che vengono poi sia trattiene dal glutine che smontati con l'ammoniaca, di modo che, nell'effettuazione dei cromatogrammi non si riesce ad ottenere macchie ben distinte mentre si accentua la formazione di scodature.

Ci siamo quindi dedicati ad osservare in quali condizioni un estratto ottenuto con alcool etilico ci consentisse di pervenire alla soluzione dei problemi che ci eravamo prefissi. Come si è detto, nella fase preliminare avevamo impiegato alcool etilico a 50° e 70°. Entrambe le gradazioni estraevano soddisfacentemente i coloranti, ma quella di 50°, oltre ad estrarne una quantità più elevata, presentava anche il vantaggio di estrarre solo quantità trascurabili di sostanze concomitanti e precisamente solo tracce di grassi e minime quantità di proteine. Siamo perciò venuti nella determinazione di sviluppare il metodo che proponiamo usando come liquido estrattore l'alcool di 50°.

Il metodo da noi sperimentato si articola come segue:

g 10 di pasta finemente macinata si introducono in una beuta da 150 ml e si aggiungono ml 25 di alcool etilico a 50°. Si agita per qualche minuto sino a scomparsa dei grumi e, dopo riposo di 10 minuti si cen-

trifuga a 5000 giri per 10 minuti. L'estratto alcoolico così ottenuto si decanta in una capsula di porcellana e si acidifica con 8/10 gocce di una soluzione di acido tartarico al 2%.

Si fa quindi defluire lentamente attraverso una colonnina di vetro del diametro di cm 1, munita di rubinetto, nella quale sia stato precedentemente deposto uno strato di glutine secco macinato dell'altezza di circa un centimetro. Nel caso che il liquido defluisse troppo lentamente si può ricorrere a una debole aspirazione.

Dopo che il liquido d'estrazione è completamente defluito il colorante resta adsorbito nello strato superiore del glutine. Si eluisce allora con ammoniaca a 1,5%, della quale sono di solito sufficienti circa 10 gocce. Le prime gocce eluite, che sono incolori, si scartano, e non appena l'eluato comincia a passare colorato si raccoglie il liquido che serve a praticare le macchie sulla carta da cromatografia.

Per quanto riguarda il tipo di carta usato e le dimensioni delle vaschette, sono state applicate le medesime modalità esposte da DE GIULI, MUNTONI e TURI-JACOBELLI ⁽¹⁾; come solvente abbiamo adoperato una miscela di butanolo, etanolo e acqua nelle proporzioni di 2:1:1.

Per confrontare gli R_f degli estratti con quelli dei coloranti puri, si preparano soluzioni diluite di essi in alcool di 50° che, acidificate come detto sopra con acido tartarico al 2%, vengono sottoposte al medesimo procedimento degli estratti, facendole defluire attraverso colonnine caricate con glutine secco e smontando quindi i coloranti con ammoniaca a 1,5%.

Abbiamo ripetutamente sperimentato il procedimento proposto su paste confezionate in laboratorio con l'aggiunta dei coloranti elencati. Nella Tabella I riportiamo la sintesi dei risultati conseguiti e cioè il confronto degli R_f determinati con gli estratti dalle paste con quelli dei

TABELLA I

Solvente: butanolo : etanolo : acqua = 2:1:1

COLORANTE	R_f		
	Colorante puro fissato e smontato	Estratto da pasta con mg 5/kg	Estratto da pasta con mg 10/kg
Azorubina	0,43	0,43	0,43
Rosso solido E	0,33	0,35	0,34
Amaranto	0,16	0,17	0,16
Rosso scarlatto Vittoria	0,19	0,19	0,19
Ponceau 6R	0,04	0,04	0,04
Scarlatto GN	0,53	0,53	0,53
Giallo tramonto FCF	0,36	0,36	0,36
Tartrazina	0,14	0,13	0,14
Giallo chinolina	0,23	0,24	0,25

coloranti puri assoggettati al medesimo trattamento. Come si rileva dalla tabella, risulta possibile identificare tutti i coloranti gialli e rossi consentiti, al di fuori della eritrosina, sul comportamento della quale ci riserviamo di indagare ulteriormente.

Come si può osservare dai risultati esposti nella Tabella I, il metodo proposto consente di raggiungere con precisione l'identificazione dei coloranti elencati. Anche un controllo effettuato con macchie costituite da una miscela dell'estratto con soluzione del colorante ha dimostrato la validità del procedimento in quanto si sono sempre ottenute macchie singole, che non hanno mostrato alcuna divisione.

Dato che abbiamo constatato nella pratica che talvolta si impiega una miscela di due coloranti, un rosso e un giallo, nella sofisticazione delle paste, abbiamo preparato alcuni campioni con l'aggiunta, appunto, di due diversi coloranti.

Come appare dalla Tabella II, anche in questo caso il metodo proposto si rivela efficace, consentendo l'identificazione dei coloranti adoperati.

TABELLA II

Solvente: butanolo : etanolo : acqua = 2:1:1

PASTA COLORATA CON:	R _f	
	Coloranti fissati e smontati	Estratto di pasta
Giallo chinolina e Azorubina	0,25 + 0,42	0,25 + 0,43
Giallo tramonto FCF e Rosso scarlatto Vittoria	0,37 + 0,18	0,35 + 0,18
Tartrazina e Rosso solido E	0,14 + 0,34	0,13 + 0,35

Il confronto con i coloranti puri, assoggettati al medesimo trattamento di adsorbimento e smontaggio degli estratti, è sempre necessario perchè nel corso del trattamento si aggiungono piccole quantità di reattivi ai coloranti, ciò che può a volte causare piccole variazioni dello R_f. Questa avvertenza vale anche per il fatto che, anche per piccole variazioni di temperatura si verificano spostamenti del valore degli R_f, di modo che, per evitare dubbi, è sempre opportuno praticare ogni volta le macchie di confronto.

Possiamo quindi concludere che con il metodo proposto è possibile identificare tutti i coloranti gialli consentiti, mentre per i rossi resta l'esclusione della sola eritrosina. Ciò non deve però preoccupare eccessivamente poichè è probabile che in un prossimo futuro l'eritrosina possa venire esclusa dall'elenco dei coloranti permessi.

Il metodo presenta il notevole vantaggio, rispetto a quelli precedenti, di una rapidità sensibilmente maggiore a causa dell'eliminazione della necessità di evaporare il solvente di estrazione e di una più grande precisione, dovuta al fatto che nell'estrazione dei coloranti, che resta sempre la fase più delicata di questi procedimenti, siamo riusciti a ridurre in maniera decisiva l'estrazione delle sostanze concomitanti e, soprattutto, quella dei pigmenti naturali.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Chimica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) DE GIULI G., MUNTONI F. e TURI-JACOBELLI C. - L'Italia e i cereali, 13: 461 (1958).
 - (²) DEL BIANCO F. M. e TRABACCHI G. - Rassegna Chimica, 13: 17 (1961).
 - (³) LHOEST W. - J. Pharm. Belg., 35: 119 (1953).
-