

Metodi analitici per la determinazione degli additivi alimentari

Corso Gli additivi alimentari: sicurezza alimentare e produttiva, Arezzo, 4 ottobre 2013



Prof. Alessandro Bagno
Università di Padova

<http://www.chimica.unipd.it/alessandro.bagno>
alessandro.bagno@unipd.it



Additivi alimentari: cosa sono e perché si usano

Additivi: sostanze aggiunte **intenzionalmente** agli alimenti durante il ciclo produttivo, per raggiungere un obiettivo tecnologico

La crescente domanda di cibi preparati richiede:

- Aumento della durata di conservazione: **antimicrobici, antiossidanti**
- Incremento del valore nutritivo: **vitamine, sali minerali, amminoacidi**
- Incremento/stabilizzazione del valore sensoriale (pH, colore, aroma, sapore, consistenza): **pigmenti, aromi, esaltatori di sapidità, emulsionanti**

L'uso di conservanti in realtà è antico (sale, olio, aceto, alcool, fumo...)

L'uso è regolato per legge in tutti i Paesi, con limiti qualitativi e quantitativi

- La loro necessità tecnologica deve essere dimostrata
- Gli additivi e i loro prodotti di degradazione non debbono essere tossici (es. nitriti)
- Non devono indurre il consumatore in errore

Additivi nelle etichette e nella pubblicità

BEVANDA ANALCOLICA CON EDULCORANTI. INGREDIENTI: ACQUA, ANIDRIDE CARBONICA, COLORANTE: E150d, EDULCORANTI: ASPARTAME E ACESULFAME K, ACIDIFICANTI: ACIDO ORTOFOSFORICO E ACIDO CITRICO, CORRETTORE DI ACIDITÀ: CITRATO TRISODICO, AROMI, CAFFEINA. CONTIENE UNA FONTE DI FENILALANINA. IMBOTTIGLIATA CON AUTORIZZAZIONE

Le nostre mortadelle sono fatte di solo suino. Non vi è aggiunta di: polifosfati caseinati, glutammati, aromi di sintesi, emulsioni di grasso o di cotenna, zuccheri, latte in polvere, acqua.

Questo prodotto è particolarmente indicato per ragazzi in fase di crescita.

INGREDIENTI

Riso, zucchero, sale, estratto di malto, vitamine (PP, B6, B2, B1, folacina, B12) e ferro.

SENZA GRASSI AGGIUNTI

SENZA COLORANTI E ADDITIVI

INGREDIENTI: EDULCORANTI: SORBITOLO, ISOMALTO, MANNITOLE, XILITOLE, SCIROPPLO DI MALTILOLO, ASPARTAME, ACESULFAME K - GOMMA BASE - AROMI - COLORANTE: E171 - ADDENSANTE: GOMMA ARABICA - STABILIZZANTE: GLICEROLO - CARBONATO ACIDO DI SODIO (BAKING SODA) (0,4%) - ENZIMA: GLUCOSIO OSSIDASI (0,25U.I.) - AGENTE DI RIVESTIMENTO: CERA DI CARNAUBA - ANTIOSSIDANTE: E320.

ISOMALT 

Principali categorie di additivi

Categoria	Esempio
Aromi naturali e artificiali	Vanillina
Esaltatori di sapidità, sostituti dello zucchero	Glutammato monosodico, maltolo, xilitolo
Edulcoranti	Aspartame, saccarina, acesulfame K
Conservanti: antimicrobici	SO ₂ , nitriti, acido benzoico etc.
Conservanti: antiossidanti	BHT, acido ascorbico etc.
Minerali (come additivi)	Iodio (I), ferro (Fe), calcio (Ca), magnesio (Mg), rame (Cu), zinco (Zn) etc.
Coloranti	Tartrazina, riboflavina, caramello etc.

Panoramica sui metodi analitici. 1

Tecniche cromatografiche:

Gas Cromatografia (GC), Cromatografia liquida (LC, HPLC, High-Performance Liquid Chromatography)

Come funzionano:

- I componenti di una miscela vengono separati tramite interazione tra gas/liquido (GC), o liquido/liquido (LC)
- Ciascun componente ha un “*tempo di ritenzione*” caratteristico delle condizioni adottate
- Analisi quantitativa

Prestazioni:

- Alta sensibilità, strumentazione relativamente poco costosa
- Molto versatili
- Tecniche principali per l'analisi delle sostanze organiche (quindi la maggior parte degli additivi)



GC: sostanze volatili e termicamente stabili

LC: sostanze non volatili o poco stabili termicamente

Panoramica sui metodi analitici. 2

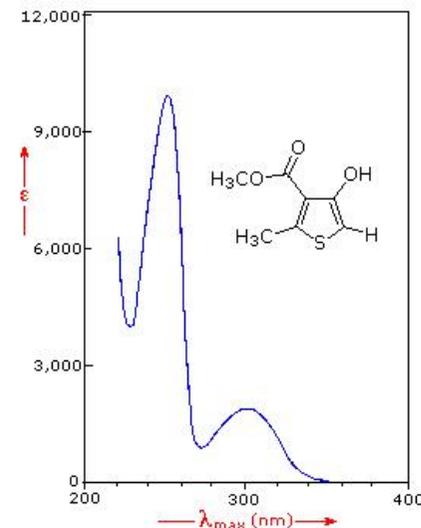
Spettrofotometria di assorbimento molecolare UV/visibile

Come funziona:

- Viene misurato l'assorbimento della radiazione UV/visibile, emessa da una lampada, da parte delle molecole per transizioni elettroniche tra i livelli più esterni
- Lo spettro di emissione e di assorbimento è a *bande*
- Analisi (qualitativa) e quantitativa

Prestazioni:

- Alta sensibilità, purché la molecola di interesse abbia assorbimenti adatti; strumentazione poco costosa
- Adatta per molte sostanze organiche
- Tecnica ampiamente usata anche come rivelatore per HPLC



Spettro di assorbimento di una molecola organica

Panoramica sui metodi analitici. 3

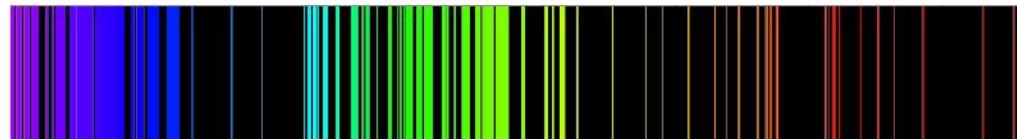
Spettrofotometria di assorbimento atomico (AAS)

Come funziona:

- Una soluzione, contenente ioni metallici, viene nebulizzata in una fiamma
- Si producono atomi metallici, che assorbono selettivamente la luce emessa da una lampada specifica per transizioni elettroniche tra i livelli più esterni
- Lo spettro di emissione e di assorbimento è a *righe*
- Analisi qualitativa e quantitativa

Prestazioni:

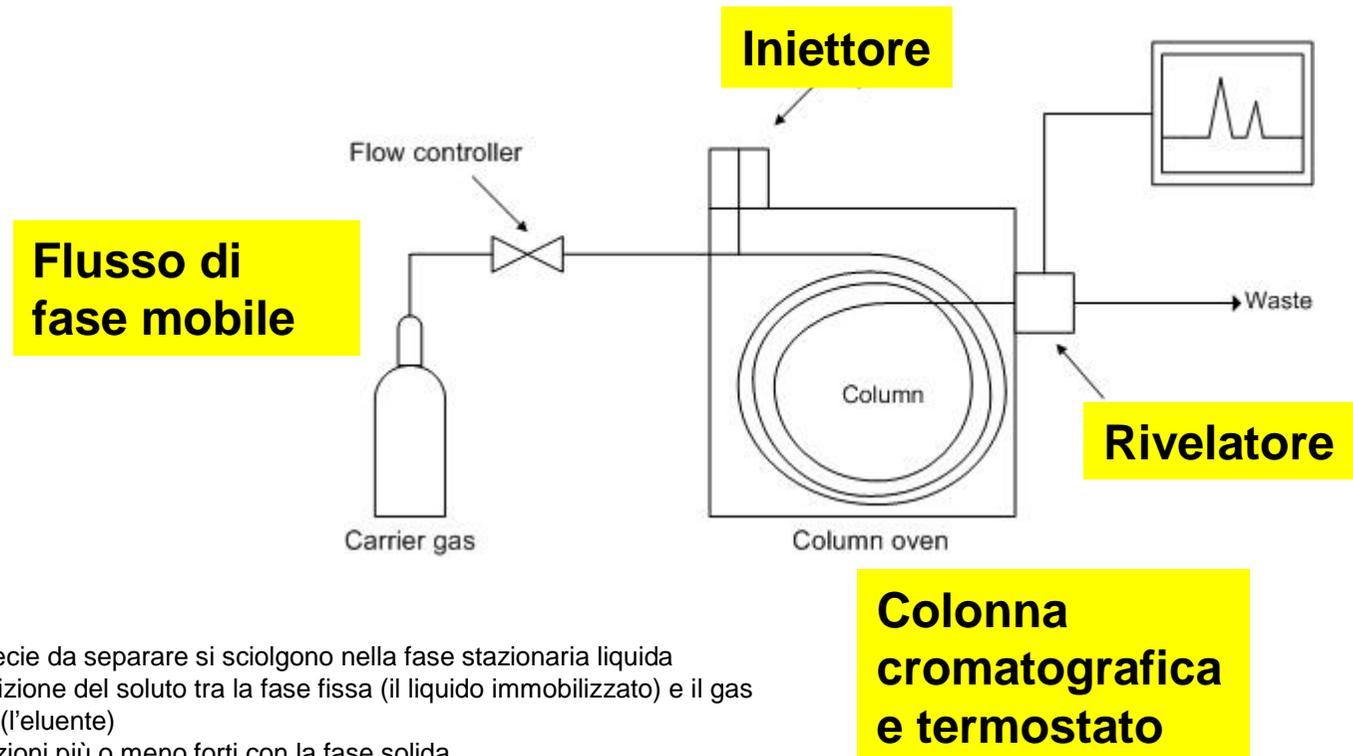
- Una delle tecniche più sensibili per l'analisi degli elementi metallici
- Possibile per circa 70 elementi



Spettro di emissione del ferro

Gas Cromatografia (GC): lo strumento

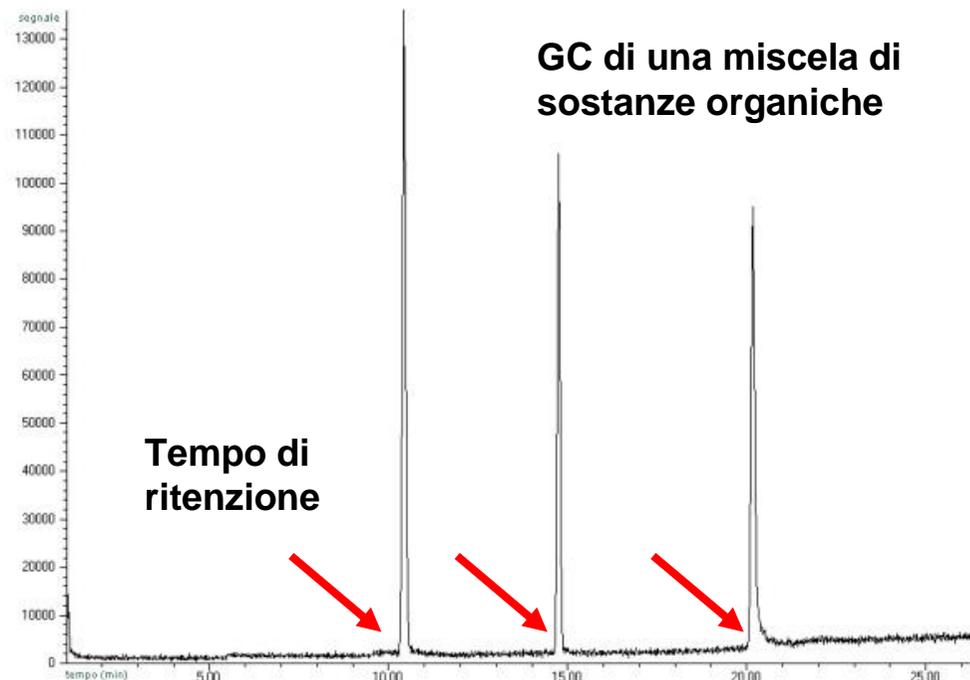
- I componenti di una miscela vengono separati sfruttando le interazioni con un liquido viscoso adsorbito su un materiale solido (*fase fissa o stazionaria*)
- La fase stazionaria è posta in una *colonna cromatografica* (alcuni m)
- Si esegue iniettando il campione in testa alla colonna e facendo fluire un gas di trasporto (*fase mobile*; un gas inerte come azoto, argon o idrogeno) lungo la colonna



Le specie da separare si sciolgono nella fase stazionaria liquida
Ripartizione del soluto tra la fase fissa (il liquido immobilizzato) e il gas inerte (l'eluente)
Interazioni più o meno forti con la fase solida
Scambio dei soluti tra la fase gassosa e la fase solida

Gascromatografia (GC): Eluizione

- Il gas di trasporto trascina i componenti che si trovano nella fase mobile gassosa (*eluizione*)
- Ciascun componente migra all'interno della colonna con propria velocità
- Se il flusso di gas è costante, i componenti vengono trattenuti per un tempo caratteristico (*tempo di ritenzione*) e quindi escono dalla colonna a tempi diversi
- La colonna deve essere termostatabile: aumentando la temperatura il tempo di ritenzione diminuisce



L'area dei picchi cromatografici è proporzionale alla quantità del componente eluito
→ **Analisi qualitativa (tempo di ritenzione) e quantitativa (area del picco)**

La riuscita dell'analisi (cioè la separazione dei componenti) dipende dalla scelta di condizioni appropriate (temperatura, tipo di colonna)

Gas Cromatografia (GC): problemi

Preparazione dei campioni

- Le sostanze da separare devono essere portate ad una temperatura sufficiente a renderle gassose o allo stato di vapore
- Il campione (1-5 μl) viene posto in colonna tramite un iniettore termostato ad alta temperatura
- Solitamente nell'iniettore il campione viene diviso in due porzioni, così da inviare alla colonna 1% del campione iniettato

Rivelatore

Il più comune per sostanze organiche è a ionizzazione di fiamma (FID)

Il soluto eluito in uscita dalla colonna viene miscelato ad un gas combustibile (idrogeno) ed aria, e acceso

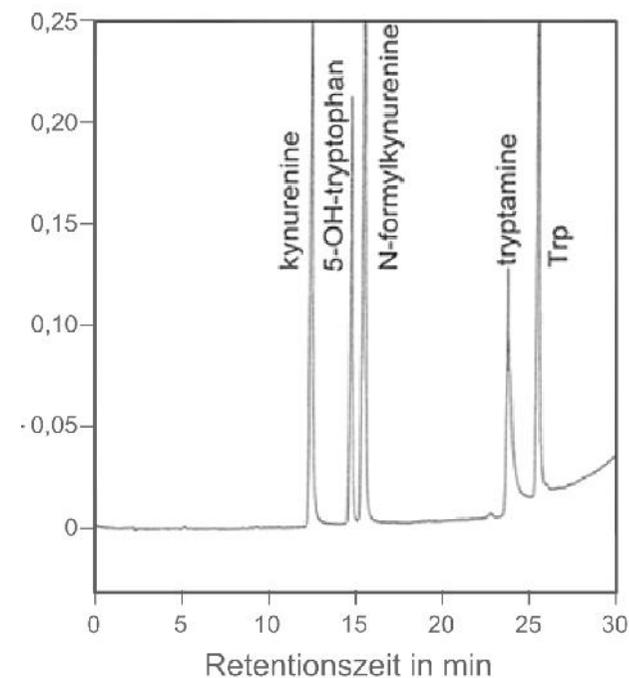
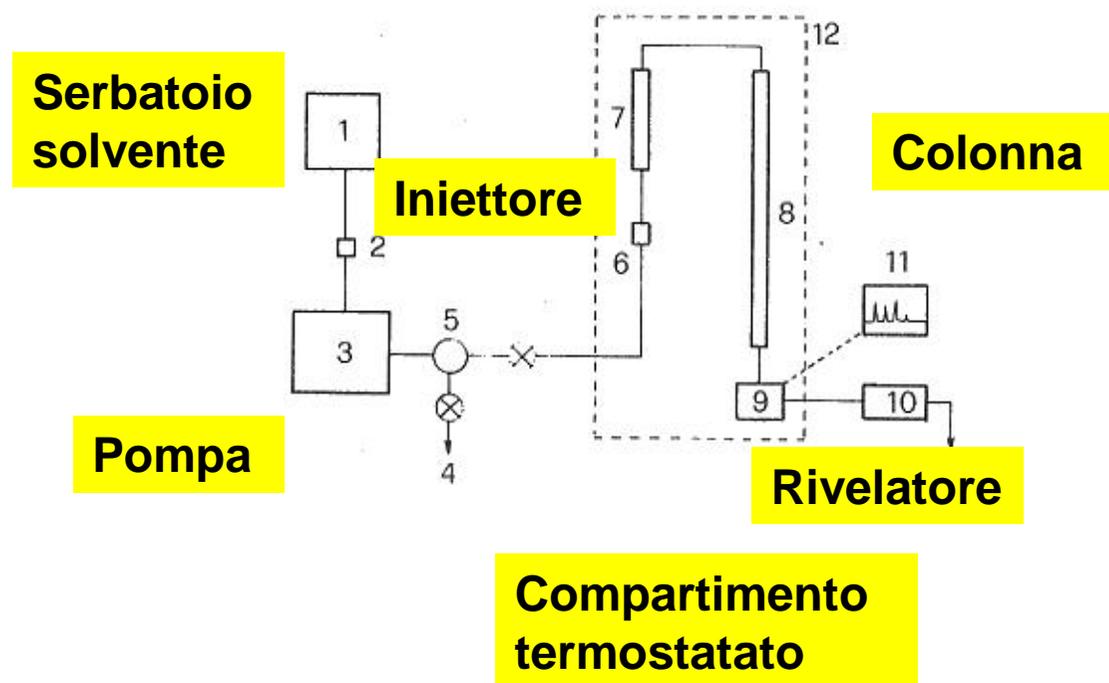
La fiamma è posta tra due elettrodi (ddp 300 V). In assenza di soluto eluito, la fiamma contiene radicali neutri; in presenza di sostanze organiche anche specie ioniche \rightarrow corrente elettrica. Molto versatile.

- Sensibilità elevata: dell'ordine di $10^{-6} - 10^{-9}$ g/l.

Limitazione: l'analita deve essere **volatile** e **stabile** alla temperatura richiesta; altrimenti derivatizzazione (pre-trasformazione in derivati volatili)

Cromatografia liquida (HPLC): lo strumento

- *Fase stazionaria*: un liquido che riveste con uno strato sottile un solido inerte
- *Fase mobile*: un *liquido* immiscibile con la fase stazionaria (*eluente*)
- L'equilibrio di ripartizione è liquido-liquido
- L'eluente attraversa la colonna sotto alte pressioni → flussi notevoli anche attraverso colonne capillari



Cromatografia liquida (HPLC): problemi

Preparazione dei campioni

- Le sostanze da analizzare si trovano a temperatura ambiente; non è necessario che siano volatili → No derivatizzazione
- Il campione (1-5 μ l) viene posto in colonna tramite un iniettore termostato. Solitamente nell'iniettore il campione viene diviso in due porzioni, così da inviare alla colonna 1% del campione iniettato

Colonne

Tradizionalmente la fase mobile è polare e l'eluente poco polare (*fase normale*); se vale l'opposto si dice a *fase inversa*

Rivelatore

Il più comune per sostanze organiche è di tipo spettrofotometrico (assorbimento a 260 nm).

- Sensibilità elevata: dell'ordine di 10^{-6} – 10^{-9} g/l. Molto sensibile, ma...

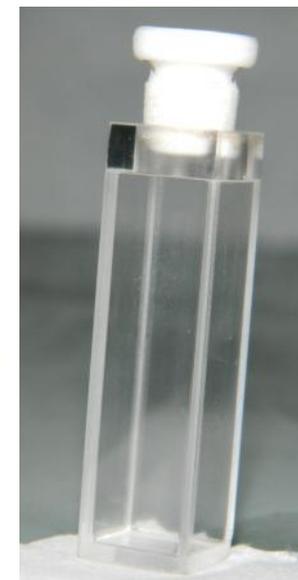
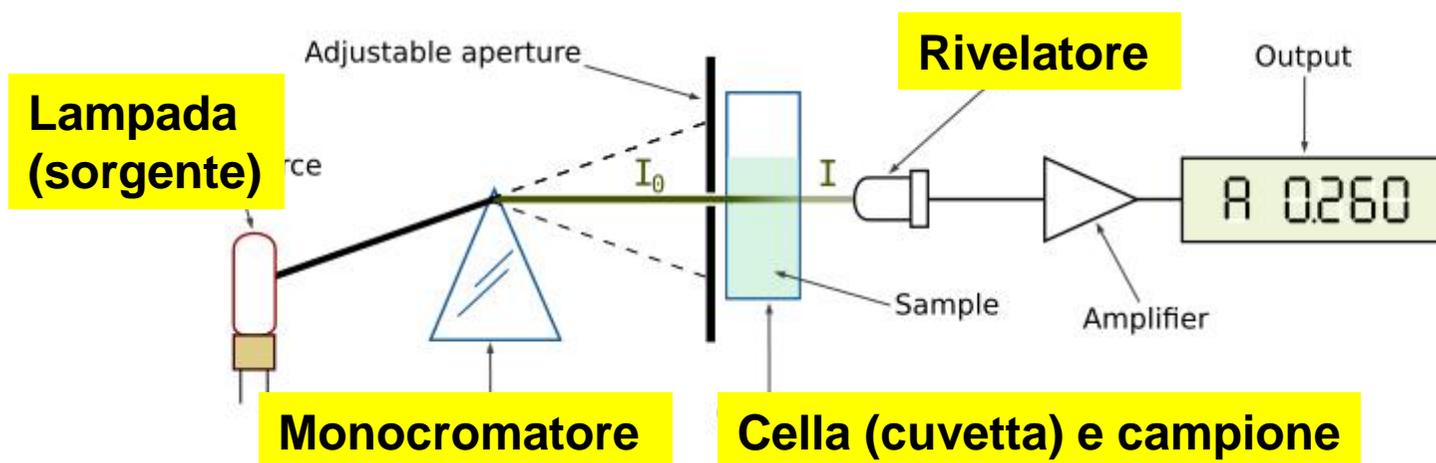
Limitazione: Le sostanze da analizzare debbono contenere gruppi cromofori adatti

Spettrofotometria molecolare: lo strumento

La soluzione viene posta in una cella (*cuvetta*) di quarzo, e viene attraversata da un fascio di luce monocromatica prodotto da una lampada policromatica attraverso il *monocromatore*.

Le molecole posseggono una propria energia di eccitazione (UV/visibile). Se una radiazione di lunghezza d'onda opportuna attraversa la cella, la assorbitanno selettivamente (se posseggono le transizioni adatte): si ha quindi diminuzione (*assorbimento*) dell'intensità della radiazione proporzionale alla concentrazione delle molecole

- Viene rivelata la radiazione trasmessa



Spettrofotometria molecolare: problemi

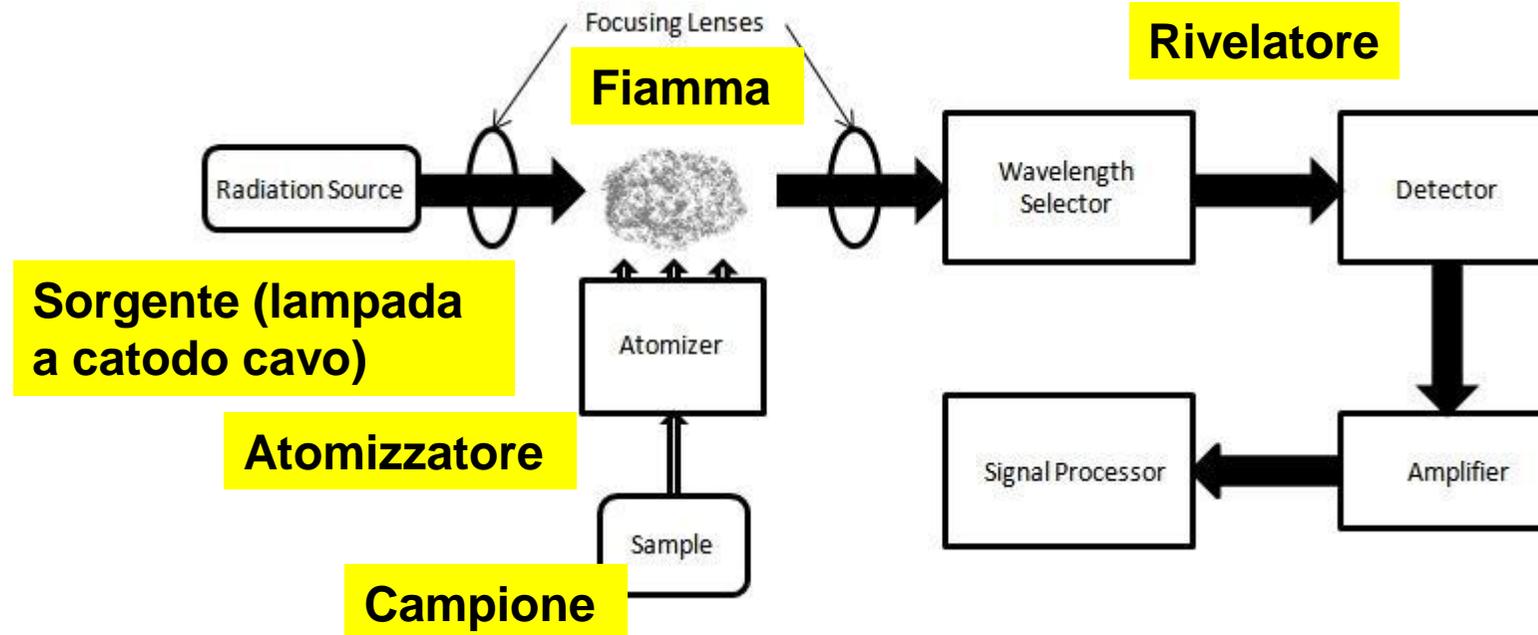
Preparazione dei campioni

- Il campione deve essere presente in soluzione limpida
- Sensibilità elevata: dell'ordine di 10^{-6} – 10^{-9} g/l; dipende molto dalla natura dell'analita
- Metodo adatto per rivelare molte sostanze organiche, spesso usato come rivelatore per cromatografia

Spettrofotometria di assorbimento atomico: lo strumento

La soluzione viene nebulizzata in una fiamma (acetilene, idrogeno o propano; $T > 2000\text{ }^{\circ}\text{C}$) \rightarrow dissociazione in atomi

- Una radiazione di lunghezza d'onda opportuna attraversa la fiamma e viene assorbita selettivamente dagli atomi
- Gli atomi posseggono una propria energia di eccitazione (UV-visibile). Se una radiazione di lunghezza d'onda opportuna attraversa la fiamma, gli atomi la assorbiranno selettivamente: si ha quindi diminuzione (*assorbimento*) dell'intensità della radiazione proporzionale al numero di atomi
- Viene rivelata la radiazione trasmessa



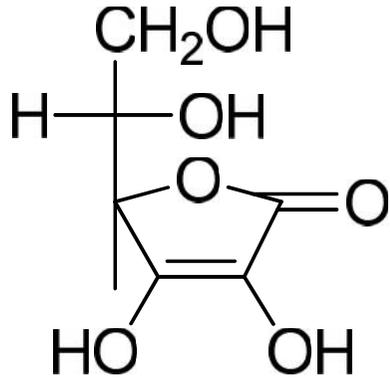
Spettrofotometria di assorbimento atomico: problemi

Preparazione dei campioni

- Il metodo lavora su atomi piuttosto che molecole. Viene determinata non una specie molecolare ma un tipo di atomo (ad es. ferro, calcio, zinco)
- Il campione deve essere completamente *mineralizzato*, cioè trasformato in una specie inorganica ionica (ione ferro, calcio, zinco etc.)
- Necessaria una "*lampada a catodo cavo*" specifica per ciascun elemento, che emette la radiazione opportuna: una scarica elettrica ionizza l'elemento in esame, emettendo così la radiazione necessaria
- Sensibilità elevata: dell'ordine di 10^{-6} – 10^{-9} g/l. Metodo molto adatto per rivelare tracce di metalli

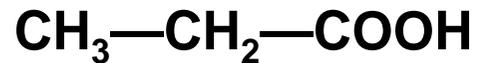


Additivi alimentari: conservanti

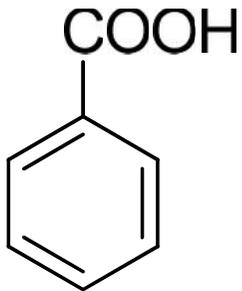


**Acido ascorbico
(vitamina C) E300**

**Antiossidante
molto comune**

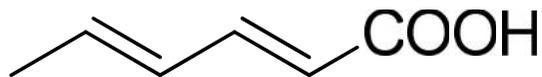


**Acido propionico
E280**



**Acido benzoico
E210**

**Molto comuni. Attivi contro
muffe e lieviti. Presenti nei
prodotti da forno, formaggi
(l'acido propionico è un
costituente naturale)**

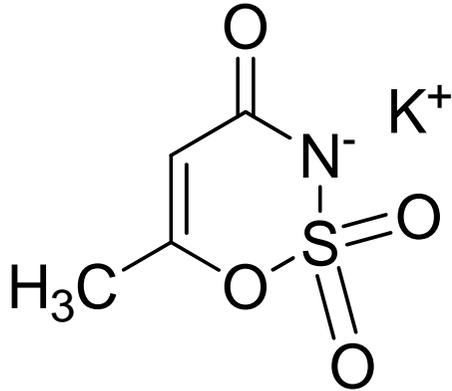


**Acido sorbico
E200**

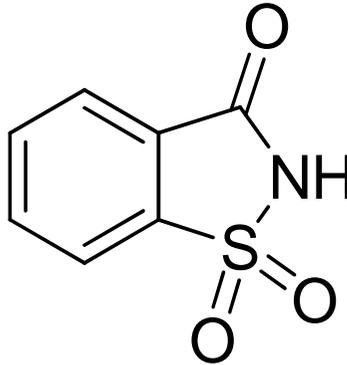
Analisi degli additivi alimentari: conservanti

Additivo	Fonte	Estrazione	Determinazione
Acido ascorbico e acido citrico	Tutti gli alimenti	in fase acquosa con acido fosforico	HPLC a fase inversa. Eluente: acetonitrile Rivelatore UV 210 nm
Acido benzoico	Tutti gli alimenti	in fase acquosa con acido fosforico	HPLC a fase inversa. Eluente: acetonitrile/acetato di sodio/acido acetico, pH 4.5 Rivelatore UV 254 nm
Acido sorbico	Prodotti da forno, polenta, gnocchi di patate, pasta con ripieno	in fase acquosa con metanolo	HPLC a fase inversa. Eluente: acetonitrile/acetato di sodio/acido acetico, pH 4.5 Rivelatore UV a 257 nm
Acido propionico	Prodotti da forno	in fase acquosa con acido formico	GC a 220 °C. Gas di trasporto: elio

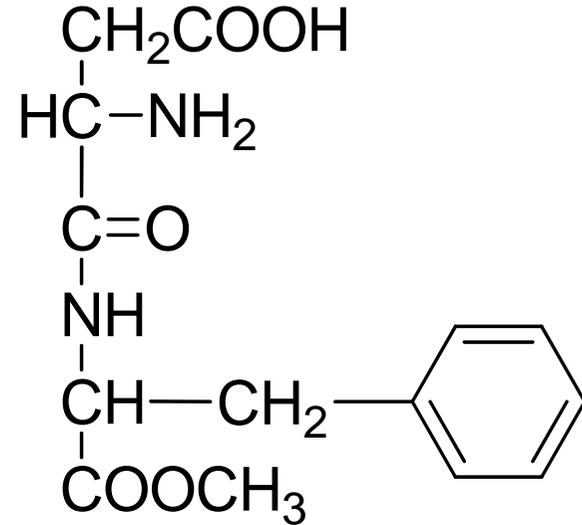
Additivi alimentari: edulcoranti



Acesulfame K
E950



Saccarina
E954



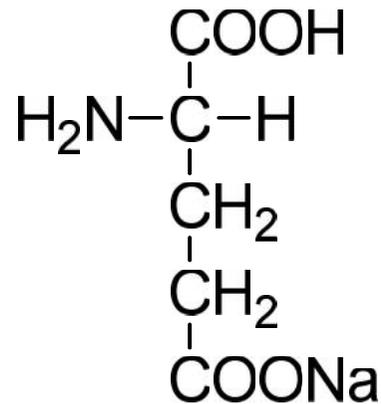
Aspartame
E951

**Edulcoranti molto comuni, con potere dolcificante molto superiore allo zucchero (spesso con retrogusto amaro)
Usati in prodotti dolciari e bibite “dietetiche”. L’aspartame è però poco stabile termicamente**

Analisi degli additivi alimentari: edulcoranti

Additivo	Fonte	Estrazione	Determinazione
Acesulfame K	Bevande, dolcificanti	con eluente	HPLC a fase inversa. Eluente: metanolo/tampone fosfato Rivelatore UV 210 nm
Aspartame	Bevande, dolcificanti	con eluente	HPLC a fase inversa. Eluente: metanolo/tampone fosfato Rivelatore UV 210 nm
Saccarina	Bevande, dolcificanti	nessuna	HPLC a fase inversa. Eluente: acido acetico/metanolo Rivelatore UV a 254 nm

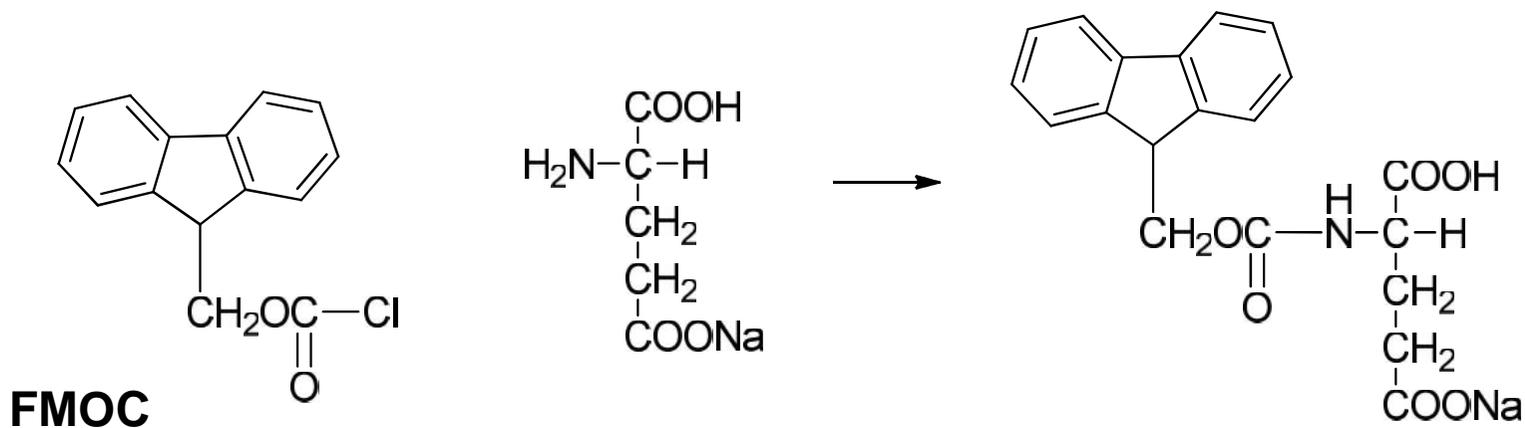
Additivi alimentari: esaltatori di sapidità



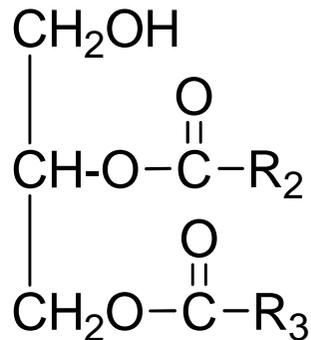
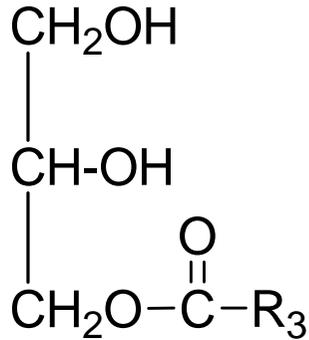
Glutammato monosodico
E621

Il più noto esaltatore di sapidità per
alimenti a base proteica

Problema analitico: sostanza non volatile, non stabile termicamente (no GC); senza assorbimento nell'UV (no HPLC) → derivatizzazione con il fluorenilmetil cloroformiato (FMOC), che conferisce intenso assorbimento



Additivi alimentari: emulsionanti

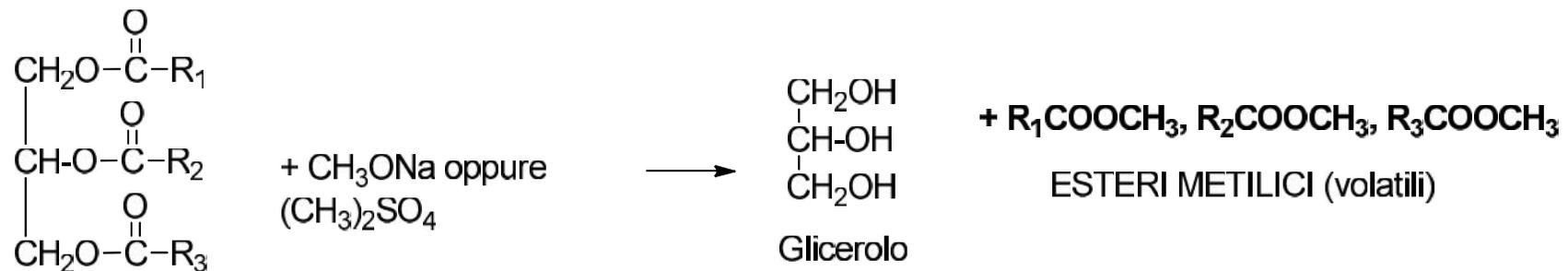


Mono- e di-acilgliceroli (mono- e di-gliceridi degli acidi grassi)

E471

Comuni emulsionanti usati per dare morbidezza ai prodotti da forno

Problema analitico: sostanze non volatili ma stabili termicamente → derivatizzazione con metile solfato → formazione di esteri metilici degli acidi grassi, che sono volatili (GC)



Analisi degli additivi alimentari: esaltatori di sapidità, emulsionanti

Additivo	Fonte	Estrazione	Derivatizzazione	Determinazione
Glutammato monosodico	Tutti gli alimenti	Acido cloridrico*	Fluorenilmetil cloroformiato (FMOC)	HPLC. Eluente: acetonitrile/metanolo/ tampone citrato Rivelatore UV 265 nm
Mono- e di-gliceridi degli acidi grassi	Prodotti da forno	Cloroformio**	Saponificazione ed esterificazione	GC

*Dopo precipitazione delle proteine con acido solfosalicilico

**Dopo digestione enzimatica

Additivi alimentari: nitriti e nitrati

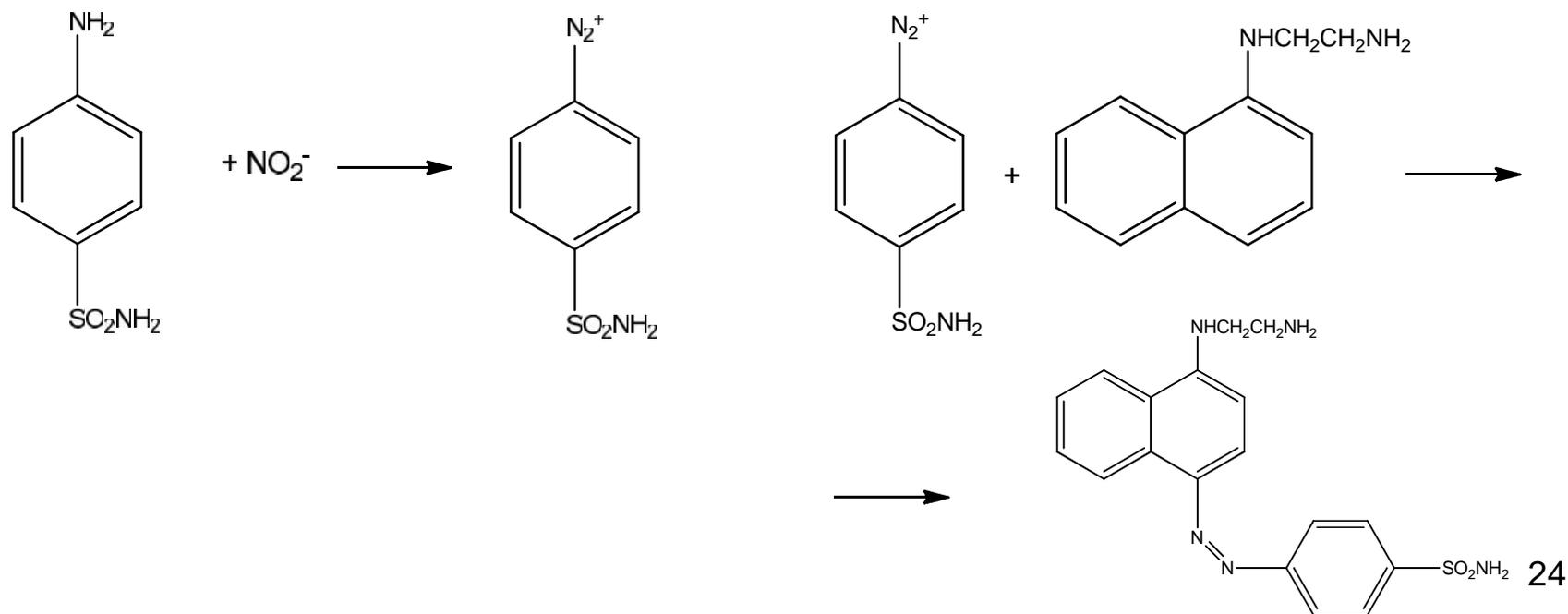
NaNO_2 (E250), KNO_2 (E249); NaNO_3 (E251), KNO_3 (E252)

Conservanti molto attivi per prevenire intossicazioni da *Clostridium botulinum* (botulismo)

Uso prevalente nella carne conservata;

Potenzialmente tossici (precursori di nitrosammine)

Problema analitico: sostanze non volatili, poco stabili termicamente, prive di assorbimento all'UV → reazione con solfanilammide e naftilendiammina → formazione di una sostanza fortemente colorata (spettrofotometria)



Additivi alimentari: sali minerali

I sali minerali sono i componenti che rimangono (*ceneri*) dopo il trattamento a 500 °C dei tessuti animali e vegetali

***Elementi principali* (Ca, P, K, Cl, Na, Mg)**

Elementi in tracce (oligoelementi; Fe, Zn, Cu, Mn, I, Mo, etc.)

Elementi essenziali* (ruolo biologico conosciuto); *elementi non essenziali* (funzione sconosciuta), ed *elementi tossici

La loro importanza non è solo nutrizionale: contribuiscono all'aroma degli alimenti, possono attivare o inibire reazioni enzimatiche, modificano la consistenza

**Il contenuto di sali minerali negli alimenti viene determinato principalmente mediante spettrofotometria di assorbimento atomico
Esempio: calcio, ferro e zinco**

Analisi degli additivi alimentari: Ca, Fe, Zn

Additivo	Fonte	Estrazione	Determinazione
Calcio	Tutti gli alimenti	Mineralizzazione a secco, per via umida o in forno a microonde	AAS in fiamma aria/acetilene 422.7 nm
Ferro			AAS in fiamma aria/acetilene 248.3 nm
Zinco			AAS in fiamma aria/acetilene 213.9 nm