

Laboratorio 19.4 SEPARAZIONE DI UNA SERIE OMOLOGA DI ACIDI CARBOSSILICI A CATENA CORTA

Cromatografia su carta

SCOPO

Riconoscere qualitativamente un acido carbossilico lineare a catena corta mediante una semplice eluizione su carta.

PRINCIPI

I sali di ammonio di una serie omologa di acidi C_2 - C_6 vengono sottoposti a cromatografia su carta. Si calcolano gli R_F e si costruisce un diagramma R_F /nr. atomi C. Ciò consente di identificare un acido incognito della serie omologa.

APPARECCHIATURA

- Camera di sviluppo di vetro per cromatografia ascendente su carta
- Microsiringa da 5 μ L
- Nebulizzatore

MATERIALI E REAGENTI

- **Carta Whatman n. 1 o n. 4 (20 × 20 cm)**
- **Eluente**
Butanolo/ammoniaca 1,5 N, 150 + 100 (V/V)
- **Soluzioni standard**
In una serie di provette di vetro aggiungere 1 mL di NH_3 concentrata e 1 mL di acqua deionizzata a 1 mL dei seguenti acidi: acetico (C_2), propionico (C_3), butirrico (C_4), valerianico (C_5), capronico (C_6).
- **Reagente rivelatore**
Sciogliere 40 mg di blu di bromofenolo in 100 mL di etanolo e aggiungere 200 mg di acido citrico.

PROCEDIMENTO

- Tracciare sul foglio di carta la linea di semina, a circa 1,5 cm dal bordo, con una matita morbida.
- Depositare 1 μ L di ogni soluzione in modo da formare macchie più compatte possibile, a distanza di 2 cm l'una dall'altra.
- Porre il foglio di carta nella camera satura di solvente, in modo che il bordo su cui è stata effettuata la semina peschi nell'eluente. Fissare il foglio sul sostegno con un paio di mollette.
- Quando il solvente ha percorso 17-18 cm, estrarre il foglio e lasciarlo asciugare all'aria.
- Nebulizzare il reagente rivelatore e lasciare asciugare all'aria. Le macchie appariranno blu su fondo giallo.
- Calcolare l' R_F di ogni macchia e costruire il diagramma R_F /n. di atomi C. Si dovrebbe ottenere una retta.

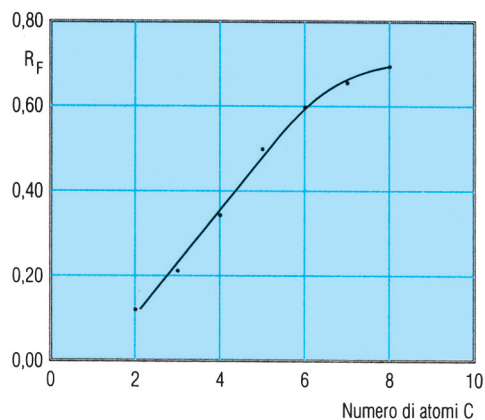
Separazione su carta di una serie omologa di acidi carbossilici C₂-C₈.**ESEMPIO 1**

Carta Whatman n. 1 (20 × 20 cm).

Eluente: butanolo/ammoniaca 1,5 N, 150 + 100 (v/v); semina 1 μL.

Tabella dei dati

Atomi di carbonio	R _F
2	0,12
3	0,22
4	0,35
5	0,50
6	0,60
7	0,66
8	0,70



Laboratorio 19.5 DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ZUCCHERI NEI VINI

Cromatografia su strato sottile di gel di silice

Gli zuccheri naturalmente presenti nel vino sono soprattutto glucosio e fruttosio. L'aggiunta di saccarosio aumenta il grado alcolico del vino ed è prassi comune in molti Paesi. In Italia questa operazione è considerata una frode ed è consentita solo per i vermouth, i marsala speciali, alcuni vini aromatizzati e gli spumanti.

La determinazione quantitativa degli zuccheri nei vini può essere effettuata con il metodo di Fehling o con il metodo di Luff Shoorl, oppure per via polarimetrica, rifrattometrica o anche enzimatica. La cromatografia su strato sottile consente comunque una rapida determinazione qualitativa.

PRINCIPI

Il vino viene neutralizzato e «defecato» per eliminare le sostanze coloranti. La soluzione limpida ottenuta viene eluita su lastrina di gel di silice con una miscela di acetato di etile, isopropanolo e acqua e poi rivelata con anisaldeide. La presenza dei diversi zuccheri viene evidenziata per confronto con degli standard.

APPARECCHIATURA

- Camera di sviluppo
- Microsiringa da 5 μL
- Nebulizzatore

MATERIALI E REAGENTI

- Lastrina di gel di silice G (20 × 20 cm o 5 × 20 cm), spessore dello strato 0,20 mm
- La fase stazionaria va attivata ponendo la lastrina in stufa a 110 °C per 30 minuti.

- Eluente
acetato di etile /isopropanolo/acqua, 65 + 30 + 5 (V/V)

- Soluzioni standard

Preparare soluzioni di fruttosio, glucosio e saccarosio allo 0,5% in acqua.

- NaOH 0,5 N
- Soluzione satura di acetato basico di piombo in acqua
- Soluzione satura di Na₂SO₄ in acqua
- Reagente **rivelatore**

Sciogliere 0,5 mL di anisaldeide in 50 mL di CH₃COOH glaciale e poi aggiungere 1 mL di H₂SO₄ concentrato. La soluzione va preparata di fresco.

PROCEDIMENTO

- Aggiungere a 5 mL di vino, neutralizzato con NaOH 0,5 N, 1 mL di soluzione satura di acetato basico di piombo e 1 mL di soluzione satura di Na₂SO₄. Centrifugare.
- Lungo una linea tracciata con una matita morbida a circa 1,5 cm dal bordo della lastrina, seminare 5 mL di ogni soluzione standard e di soluzione campione (se il vino è molto secco, e quindi con poco zucchero, depositare 25 mL).
- Eluire e, quando il solvente ha percorso 15-18 cm, estrarre la lastrina e lasciarla asciugare all'aria.
- Nebulizzare il reagente rivelatore e porre la lastrina in stufa a 100 °C per 30 minuti. Le macchie appaiono di colore blu su fondo rosa.

OSSERVAZIONI

- Con il metodo descritto, il fruttosio e il glucosio presentano valori di R_F molto simili. Per ottenere una migliore separazione, usare una lastrina di gel di silice G preparata usando, invece dell'acqua, H₃BO₃ 0,1 N (30 g di gel di silice + 60 mL di H₃BO₃ per 5 lastre da 20 × 20 cm) e poi eluire con una miscela di 2-butanone/CH₃COOH glaciale/metanolo, 60 + 20 + 20 (V/V).
- Questo metodo può essere usato per la determinazione qualitativa di tutti gli zuccheri presenti in qualsiasi soluzione zuccherina.
- Nel preparare gli standard, se qualche zucchero non si scioglie in acqua, si può usare isopropanolo come solvente.

Laboratorio 19.6 CONTROLLO DI ALCUNE POSSIBILI SOFISTICAZIONI DELLO ZAFFERANO

Cromatografia su strato sottile e su carta

Lo zafferano è ampiamente usato, fin dall'antichità, in cucina e in certa misura anche nella farmacopea di molti Paesi. Il costo molto elevato ne spiega i numerosi tentativi di contraffazione, ovviamente più facili quando il prodotto viene commercializzato sotto forma di polvere quasi impalpabile.

I pigmenti presenti nello zafferano, i principali fra i quali sono molto ben separabili in TLC, sono costituenti specifici e possono essere usati per identificare l'autenticità del prodotto.

D'altra parte, la cromatografia su strato sottile o su carta si presta particolarmente a evidenziare le sofisticazioni dovute, come spesso accade, all'aggiunta (o all'impiego

esclusivo!) di polveri ottenute da piante diverse, come *Calendula officinalis* e soprattutto il cartamo (*Carthamus tinctorius*), oppure di coloranti artificiali, come il giallo tartrazina (E 102). Anche l'aggiunta di zucchero (saccarosio) può essere facilmente evidenziata.

PRINCIPI

Dopo aver fatto macerare lo zafferano in metanolo umido si eluisce la soluzione ottenuta su lastrina di gel di silice o di cellulosa oppure su carta. Nel primo caso si effettua un controllo complessivo delle sofisticazioni, mentre con gli altri tipi di strato si evidenzia solo la presenza di coloranti sintetici gialli o rossi.

APPARECCHIATURA

- Camere di sviluppo
- Lampada UV (254 nm)
- Microsiringa da 5 o 10 μL

MATERIALI E REAGENTI

- Lastrina di gel di silice (Kieselgel 60), con indicatore di fluorescenza F_{254} (5 (o 10 o 20) \times 20 cm), spessore dello strato 0,2 mm
Va condizionata in stufa a 105 °C per 30 minuti.
- Lastrina cromatografica di cellulosa microcristallina (5 (o 10 o 20) \times 20 cm)
- Carta Whatman nr. 20 o analoga, con caratteristiche di alta efficienza e bassa velocità, quindi molto fine
- Metanolo
- Soluzione acquosa al 10% dei coloranti E 102, E 104, E 110
- Soluzione acquosa all'1% di saccarosio
- Eluenti
 1. TLC su gel di silice: acetato di etile/isopropanolo/acqua, 58+30+12 (V/V); meglio se preparato di fresco.
 2. TLC su cellulosa e PC: NH_3 concentrata/soluzione di citrato di sodio al 2,4%, 5 + 95 (V/V).
- Reagente rivelatore per gli zuccheri
Sciogliere 0,5 mL di anisaldeide in 50 mL di CH_3COOH concentrato e aggiungere 1 mL di H_2SO_4 concentrato. La soluzione deve essere preparata di fresco.

PROCEDIMENTO

Estrazione dei pigmenti

- Pesare circa 50 mg del campione in esame. Aggiungere 1 goccia d'acqua e attendere 2-3 minuti.
- Aggiungere 1 mL di metanolo e lasciare a riposo per circa mezz'ora.
- Trattare allo stesso modo i campioni in polvere dei possibili sostituti dello zafferano.

Eluizione

- Depositare sulla lastrina cromatografica 5 mL della soluzione limpida ottenuta dai campioni e dalle sostanze di controllo e 2 mL di una soluzione dei coloranti sintetici.
- Ambientare la lastrina nella camera di eluizione per circa 30 minuti.
- Lasciar correre l'eluente per circa 15 cm su lastrina di gel di silice (occorre circa 1 ora) oppure 8-10 cm su carta o strato di cellulosa (occorrono circa 30 minuti).

Rivelazione del saccarosio

Per evidenziare la presenza di zuccheri come il saccarosio in concentrazioni superiori al

5%, spruzzare la lastrina di gel di silice con la soluzione di anisaldeide e poi lasciare per 30 minuti in stufa a 105 °C. Compaiono macchie blu su fondo rosa-violetto. Non usare questo rivelatore su cellulosa o su carta.

GUIDA ALL'INTERPRETAZIONE DEI CROMATOGRAMMI

TLC su gel di silice

- Dopo l'eluizione si evidenziano, a partire dalla base, tre macchie molto nette (**3**, **6**, **7** nell'Esempio), insieme con altre meno intense, che nel complesso caratterizzano la purezza dello zafferano. Le macchie sono giallo-arancio, se osservate a occhio nudo, ma presentano una colorazione marrone, se illuminate da luce UV e diventano blu se trattate con anisaldeide. La sostanza **3**, che ha l' R_F più piccolo (circa 0,16 nell'Esempio), è la crocina.
- Una macchia (**10**) immediatamente al di sopra delle tre citate (che corrisponde alla picrocrocina, $R_F \cong 0,53$) si evidenzia solo con luce UV a 254 nm e mostra una colorazione viola scuro molto netta.
- Altre due macchie (**15** e **13**), visibili in UV a 254 nm, si possono osservare poco sotto il fronte del solvente e sono dovute al safranale e al 4-idrossi- β -ciclocitrale.
- Di solito si osservano una-due macchie deboli (**1**, **2**) sotto quella molto intensa della crocina. Altre macchie alla base del cromatogramma possono essere dovute a deterioramento della crocina o a coloranti estranei: sono quindi utili per rivelare zafferano vecchio (degradato) o adulterato, ma è comunque normale osservare una tenue strisciata gialla.
- La tartrazina (E 102) sale pochissimo rispetto al punto di partenza (**18**) e dà una colorazione gialla, mentre E 104 ed E 110 salgono poco sopra (**19** e **20**) e quasi insieme, dando una colorazione gialla e rossa, rispettivamente.
- Il cartamo, spesso usato al posto dello zafferano oppure per «tagliarlo», dà una caratteristica macchia rosso-cremisi (**17**), che appare gialla con luce UV a 366 nm.
- Altri estratti naturali diversi dallo zafferano danno macchie vicino al fronte del solvente, visibili anche in UV a 366 nm.
- La macchia relativa al saccarosio (**21**) appare blu su fondo rosa-violetto con l'opportuno rivelatore e si trova poco al di sotto di quella della crocina. Appare solo se il saccarosio è presente in misura superiore al 5%.

TLC su cellulosa e PC

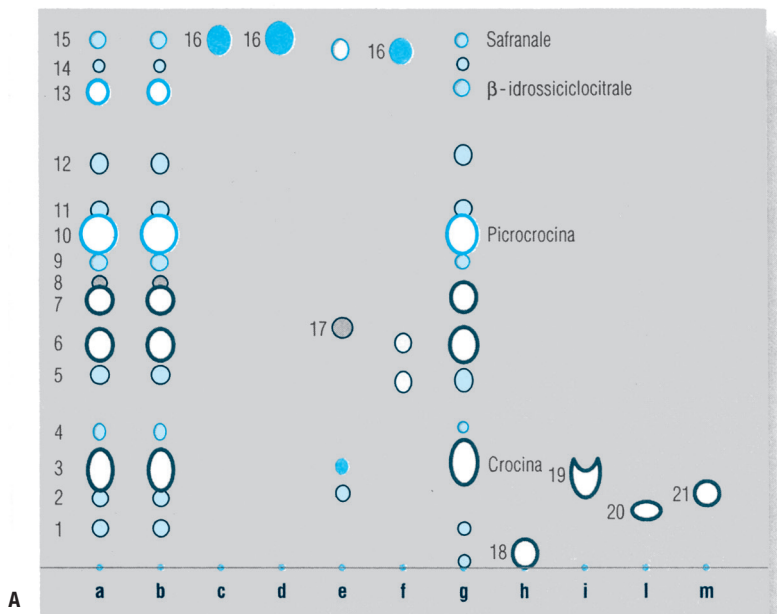
I pigmenti dello zafferano rimangono praticamente alla base, formando una macchia allungata, mentre i coloranti sintetici (con l'eccezione della macchia inferiore di E 104) salgono nettamente.

Caratteristiche delle macchie

E 102	giallo-arancio	$R_F \cong 0,75$
E 110	rosso-arancio	$R_F \cong 0,50$
E 104	giallo	$R_F \cong 0,40$
	giallo	$R_F \cong 0,10^*$

* Questa macchia è coperta dallo zafferano.

- (A) Separazione di zafferano, coloranti sintetici e saccarosio in TLC su gel di silice **ESEMPIO** 60 Merck (20×20 cm) con indicatore di fluorescenza.
- (B) Separazione in PC su carta Whatman nr. 40 di coloranti sintetici e di uno zafferano acquistato in un *hard discount* a prezzo molto basso.
- (C) Determinazione semiquantitativa del colorante E 102, usato in genere per sofisticare i prodotti a basso prezzo. Separazione in TLC canalizzata su cellulosa microcristallina Whatman 4821-620 (5×20 cm). Larghezza delle strisce: 8-10 mm; deposizione $3 \mu\text{L}$. Corsa dell'eluente: 10 cm circa; durata: 15 minuti circa. R_F di E 102: $\approx 0,75$.

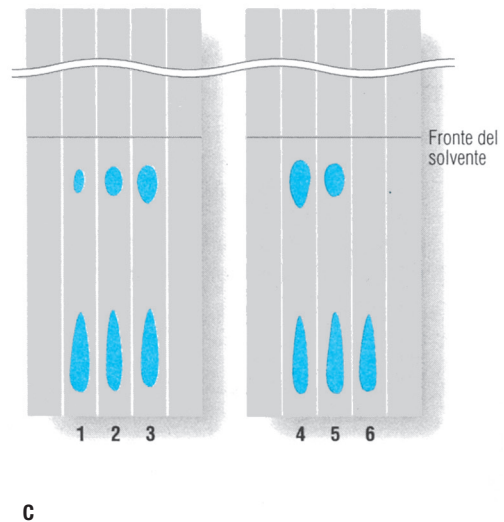
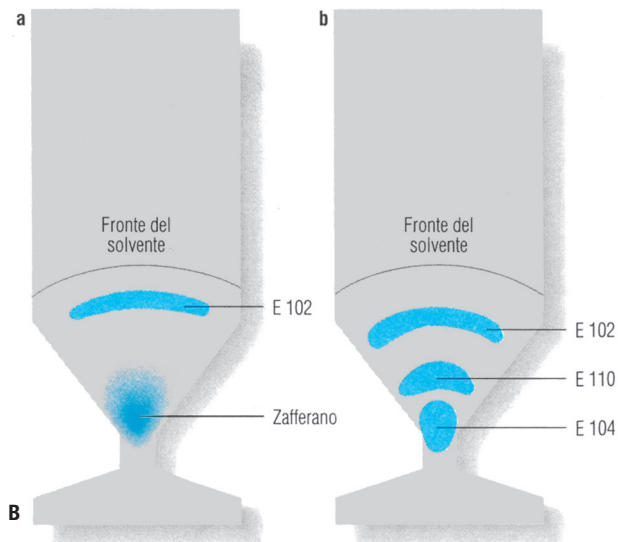


A. (a sinistra) Separazione su gel di silice 60 F_{254} (Merck). (a) Zafferano di provenienza iraniana; (b) zafferano di provenienza spagnola; (c) curry; (d) curcumina; (e) cartamo; (f) zafferano di provenienza egiziana (contraffatto); (g) zafferano di provenienza sconosciuta (possibile la presenza di E 102: macchia poco staccata dalla partenza); (h) E 102; (i) E 104; (l) E 110; (m) saccarosio.

B. (sotto, a sinistra) Separazione in PC su carta Whatman nr. 40 di: (a) zafferano acquistato in un *hard discount*; (b) coloranti sintetici.

C. (sotto, a destra) Determinazione semiquantitativa di E 102: (1) standard contenente l'1% di E 102; (2) standard al 3%; (3) standard al 5%; (4) standard al 10%; (5) campione di uno zafferano di prezzo molto basso, acquistato in un *hard discount*; (6) campione di zafferano commerciale esente da coloranti sintetici.

- Macchie gialle o giallo-arancio alla luce visibile e scure all'UV (254 nm); deboli o intense (senza riempimento in colore)
- Macchie scure all'UV (254 nm); deboli o intense (senza riempimento in colore)
- Macchie gialle al visibile e fluorescenti gialle all'UV (366 nm)
- Macchie rosse



OSSERVAZIONI

- Il cromatogramma ottenuto in PC evidenzia la presenza di E 102 nel campione analizzato.
- Il confronto con gli standard nella determinazione semiquantitativa suggerisce una percentuale di E 102 intorno al 3-5% nello zafferano campione (5).