

3.2 Analisi qualitative

3.2.1 Spettrometria UV-VIS

Le norme ISO (International Organization for Standardization) sono un insieme di indicazioni relative alle metodiche test sullo zafferano. La prima normativa ISO sulla spezia ha origine nel 1975 e negli anni ha subito tre modifiche (1980, 1993, 2003).

Nelle prima modifica del 1980 il testo della norma è stato adattato al commercio internazionale della spezia inserendo le tre categorie di qualità (I, II e III) con tolleranze nel tenore di residui floreali fra il 7 e il 20 %, valori minimi relativi al potere colorante, alle ceneri totali, al contenuto in azoto e all'estratto solubile in acqua fredda e valori massimi di umidità del 14% per lo zafferano in stimmi e dell'8% per lo zafferano in polvere. Nell'edizione successiva, quella del 1993, le categorie commerciali diventano quattro (I, II, III, IV). Inoltre, sono stati eliminati i criteri per determinare le percentuali minime per l'estratto solubile in acqua fredda e azoto e sono stati introdotti nuovi parametri per i tenori di umidità, sostanze volatili e cellulosa.

La versione del 2003 affronta la questione dell'adulterazione della spezia, come richiesto da diverse imprese del settore. Le categorie di qualità si riducono nuovamente a tre e viene alzato il valore minimo di potere colorante necessario per poter commercializzare il prodotto. Inoltre vengono uniformate per le tre categorie la percentuale di umidità e sostanze volatili (12% per lo zafferano in fili e 10% per quello in polvere) e di ceneri totali sulla S.S. (8%), eliminando le specifiche riguardanti azoto e cellulosa.

Nello specifico, per quanto riguarda la determinazione del potere colorante dello zafferano i test di spettrofotometria evidenziano alcuni aspetti importanti: più piccola è la dimensione delle particelle dopo la macinazione, maggiore è il valore del potere colorante ottenuto. Per questo occorre, prima di effettuare le analisi, polverizzare lo zafferano in stimmi (ma anche quello in polvere se non ha una granulometria sufficientemente bassa) in modo che più del 95% di questo passi attraverso un setaccio da 500 µm di luce di maglia. Un altro aspetto importante è correlato alla velocità di agitazione necessaria per l'estrazione dei pigmenti caratteristici dello zafferano: maggiore è la velocità (che per la norma ISO deve essere di almeno 1000 giri/min), maggiore sarà l'estrazione.

Procedura

Le analisi sono state effettuate in doppio sia su stimmi di fiori provenienti da bulbi Marchigiani sia su stimmi di fiori provenienti da bulbi Olandesi. Per le analisi è stato seguito il seguente protocollo:

- Tutti i campioni sono stati preparati mediante polverizzazione con Vibromulino RESTCH MM 400 (1 min a 30 Hz) al fine di ottenere una buona rappresentatività ed omogeneità degli stessi. 100 mg di polvere sono stati inseriti in vials, chiuse ermeticamente con tappo e setto di silicone/PTFE (Supelco, Bellefonte, PA, USA), e successivamente estratti con fibra SPME.
- Alla fine del periodo di equilibratura (1h), una fibra condizionata (1,5 h a 250 °C) polidimetilsilossano (PDMS) veniva esposta (3 h) nello spazio di testa mediante auto campionatore CombiPAL (CTC analytics, Switzerland). La temperatura di 25 °C è stata scelta per l'estrazione al fine di prevenire eventuali alterazioni della matrice vegetale (ossidazione e perdita di alcuni composti). Al fine di mantenere costante la temperatura durante l'analisi le vials sono state mantenute su di un supporto termostato (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland).
- Le sostanze volatili estratte mediante HS-SPME sono state identificate mediante un Gascromatografo Trace GC Ultra (Thermo-Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) accoppiato ad uno Spettrometro di Massa DSQII a singolo quadrupolo (Thermo-Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) equipaggiato con una colonna Rtx-Wax (30 m; 0.25 mm i.d.; 0.25 µm film thickness, Restek, USA). Il programma di temperatura del forno è stato: temperatura iniziale di 35°C per 8 minuti, fino a 60 °C con variazione di 4 °C/min, da 60 °C a 160 °C con variazione di 6 °C/min ed infine da 160 °C a 200 °C con variazione di 20 °C/min. Le eventuali contaminazioni e picchi derivanti dalla fibra sono stati individuati regolarmente con l'esecuzione di prove in bianco. Dopo ciascuna analisi le fibre venivano poste nell'iniettore del Gascromatografo per 5 min a 250 °C per prevenire contaminazioni. Le iniezioni sono state eseguite in modalità splitless (8 min). Il gas di trasporto utilizzato è elio con flusso costante di 1 ml/min. La transfer line era mantenuta a 230 °C e la temperatura della sorgente era di 250 °C. Lo spettro di massa è stato ottenuto utilizzando un detector selettivo ad impatto elettronico a 70 eV, con elettro moltiplicatore con voltaggio pari a 1456 V, e registrando i dati con frequenza 1 scan s-1 nel range m/z di 30-350.

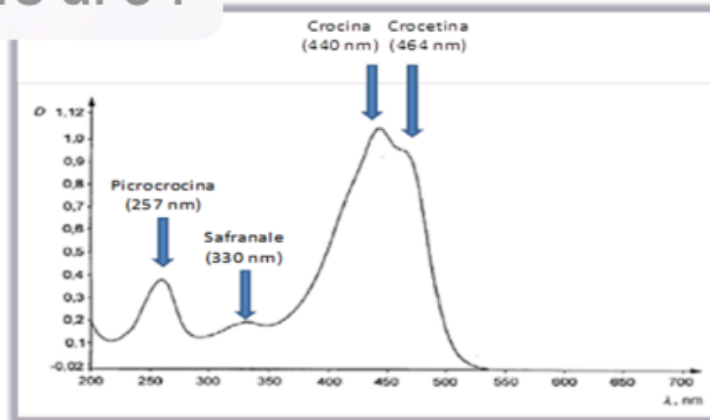


Figura 10: Esempio di spettro di assorbimento delle tre principali molecole (ISO 3632, 2003)

- Si è poi proceduto all'elaborazione dei dati. Le percentuali di potere colorante, amaricante e aromatico sono stati calcolate con la seguente formula:

- **Potere colorante:** $E_{1\text{cm}}^{1\%} = A_{440} \times 20.000 / \% \text{ secco}$
- **Potere amaricante:** $E_{1\text{cm}}^{1\%} = A_{257} \times 20.000 / \% \text{ secco}$
- **Potere aromatico:** $E_{1\text{cm}}^{1\%} = A_{330} \times 20.000 / \% \text{ secco}$

dove:

A = lettura diretta dell'assorbanza a 440 nm, 330 nm e 257 nm;

E 1% 1cm = assorbanza di una soluzione all'1%, con cammino ottico di 1 cm;

20.000 = volume delle diluizioni totali con acqua distillata.

3.2.2 Gascromatografia e spettrometria di massa (GC/MS)

La Gascromatografia associata alla Spettrometria di Massa (GC/MS) è una tecnica molto utilizzata in chimica analitica. Essa consente di valutare il profilo delle componenti volatili presenti in un determinato prodotto, nel caso specifico nella spezia dello zafferano. Il Gascromatografo provvede alla separazione dei composti volatili mentre lo Spettrometro di Massa ad esso collegato funge da rivelatore, identificando le stesse componenti estratte. L'estrazione dei composti volatili è stata eseguita mediante la tecnica di Microestrazione su Fase Solida dello Spazio di Testa (HS-SPME). Questa metodologia si basa sull'estrazione dei composti volatili dallo spazio di testa del campione posto in vials utilizzando una fibra composta di polidimetilsilossano (PDMS).

$$P_s(\%) = (M_f/M_i) \times 100$$

dove:

P_s = peso secco

M_f = massa finale

M_i = massa iniziale

- Con una bilancia di precisione sono stati pesati $125 \pm 0,1$ mg di zafferano, trasferiti poi in un matraccio ambrato da 250 ml a cui sono stati aggiunti 200 ml di acqua distillata.
- La soluzione è stata agitata per 1 h al buio (tramite un agitatore meccanico con velocità di 1000 giri/min) e a temperature ambiente e poi portata al volume di 250 ml.
- Un'aliquota della soluzione è stata quindi filtrata con un filtro idrofilo di politetrafluoroetilene (PTGE, provvisto di pori di diametro di $0,45 \mu\text{m}$) in un cilindro graduato, scartando i primi 40 ml e conservando soltanto i successivi 20 ml.
- Sono stati prelevati 10 ml da quest'ultima aliquota e sono stati trasferiti in un matraccio ambrato da 100 ml portando poi a volume con acqua distillata e agitando al fine di omogenizzare la soluzione.
- 1 ml della soluzione acquosa è stata poi posta in una cuvetta di quarzo al fine di registrarne l'assorbimento a tre lunghezze d'onda, 440 nm, 330 nm e 257 nm utilizzando uno spettrofotometro (Shimadzu UV-240) e acqua distillata come liquido di riferimento. L'assorbimento a 440 nm corrisponde alla crocina, alla lunghezza d'onda di 257 nm si osserva la picrocrocina ed infine il safranale ha come punto di massimo assorbimento 330 nm. Eventuali variazioni dello spettro di assorbimento standard riportato in Figura 7 possono indicare che lo zafferano in esame potrebbe essere stato soggetto ad adulterazioni con possibile presenza di coloranti artificiali.

Caratteristiche	Categorie		
	I	II	III
Residui floreali (% max.)	0,5	3	5
Corpi estranei: <i>foglie, steli, altro materiale vegetale</i> (% max.)	0,1	0,5	1
Umidità e componenti volatili (% max.)			
<i>Zafferano in filamenti</i>	12	12	12
<i>Zafferano in polvere</i>	10	10	10
Ceneri sulla SS (% max.)	8	8	8
Potere aromatico espresso in lettura diretta dell'assorbanza del safranale a 330 nm sul secco			
<i>Min.</i>	20	20	20
<i>Max.</i>	50	50	50
Potere colorante espresso in lettura diretta dell'assorbanza di crocina a 440 nm sul secco	≥ 190	≥ 150	≥ 100
Potere amaricante espresso in lettura diretta dell'assorbanza di picrocrocina a 257 nm sul secco	≥ 70	≥ 55	≥ 40
Coloranti acidi artificiali idrosolubili	assenti	assenti	assenti

Tabella 4: *Classificazione delle condizioni chimico-fisiche dello zafferano (ISO 3632,2003)*

Procedura

Per le analisi, effettuate in doppio sia su campioni da bulbi Marchigiani sia da bulbi Olandesi, è stato fatto riferimento alla metodiche e ai valori della normativa ISO 3632/2003:

- Dopo aver polverizzato gli stimmi con un vibro mulino (RETSCH MM 400), 500±1 mg di zafferano sono stati posti in una stufa termostata a 105°C per 3-4 h. Quando la massa è rimasta costante, ossia quando l'essiccazione ha permesso la perdita dell'intero contenuto di umidità, il prodotto è stato estratto dalla stufa. Si è quindi proceduto con il calcolo della percentuale di peso secco: