

## Laboratorio

■ di I. Gandolfi<sup>1</sup>, G. Contarini<sup>2</sup>, M. Monici<sup>1</sup>, R. Bortolomeazzi<sup>3</sup>, G. Lerker<sup>4</sup>, N. Frega<sup>5</sup>, L. Conte<sup>3</sup>, P. Cagnasso<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Centrale, Parmalat Spa - <sup>2</sup> CRA-Istituto Lattiero Caseario di Lodi - <sup>3</sup> Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Udine  
<sup>4</sup> Dipartimento di Scienze degli alimenti, Università di Bologna - <sup>5</sup> Dipartimento di Scienze degli alimenti, Università Politecnica delle Marche

# Metodo per la determinazione di acidi grassi omega3 nel latte arricchito

## Dal Laboratorio Centrale Parmalat alla ISO/IDF

*Il metodo per la determinazione degli acidi grassi omega 3 nel latte addizionato di olio di pesce è stato messo a punto nel Laboratorio Centrale Parmalat, validato da un gruppo di lavoro formato da cinque autorevoli Laboratori italiani e proposto al comitato ISO-IDF. Accolto (Draft ISO/DIS 23065), è stato sottoposto ad un circuito internazionale per la validazione ISO-IDF. La Commissione ha valutato estremamente positivi i risultati del ring test e ritenuto determinante l'esperienza dei laboratori italiani, sia privati che pubblici, nello sviluppo, messa a punto e validazione del metodo analitico.*

### Premessa

Da alcuni anni sono entrati sul mercato alimenti che vantano proprietà salutistiche, grazie all'aggiunta di sostanze funzionali potenzialmente utili per contribuire a mantenere la salute. Lo studio delle interazioni dell'elemento funzionale con la matrice, del comportamento al trattamento termico e nel tempo richiede metodi analitici in grado di eseguire fini separazioni e accurate determinazioni quantitative. Da 10 anni Parmalat ha immesso sul mercato un latte a lunga conservazione addizionato di olio di pesce, ricco in acidi grassi omega 3 a lunga catena. L'Azienda ha quindi sviluppato, nel proprio Laboratorio Centrale, un metodo analitico appositamente studiato per la determinazione di acidi grassi poliinsaturi in questa matrice, non essendo disponibile un metodo ufficiale né a livello nazionale né a livello europeo. Il grasso naturale del latte, più di ogni altro, presenta un profilo acidico estremamente complesso per l'elevato numero di acidi grassi presenti e per la gamma di configurazioni steriche altrettanto ampia: solo di recente è stata pubblicata una norma ISO/IDF (International standard ISO 15885/IDF 184:2002<sup>6</sup>) per la valutazione quali-quantitativa degli acidi grassi del latte, in termini percentuali rispetto al totale degli acidi grassi presenti. L'aggiunta di olio di pesce al latte aumenta la complessità del profilo acidico<sup>7</sup> - numero e tipo di acidi grassi- e richiede lo sviluppo di un metodo "dedicato" in grado di eseguire l'estrazione completa e non selettiva di tutti i costituenti senza provocare fenomeni di degradazione a carico dei PUFA. Un ulteriore problema legato a tale determinazione è la valutazione quantitativa. Normalmente in-

fatti la composizione degli acidi grassi viene eseguita, sia nel grasso che negli oli, come % del contenuto totale di acidi grassi. In questo caso, dovendo verificare la concentrazione dei nutrienti aggiunti è essenziale quantificarli in valore assoluto sul grasso (mg/100g di grasso) o sul prodotto (mg/100ml di latte) utilizzando uno standard interno.

### Messa a punto di un metodo per la determinazione di Pufa Omega 3 a lunga catena nel grasso di latte arricchito

Lo studio condotto per la messa a punto del metodo di determinazione di PUFA  $\omega_3$  nel grasso di latte addizionato di olio di pesce, oggetto di una tesi di laurea, ha consentito di:

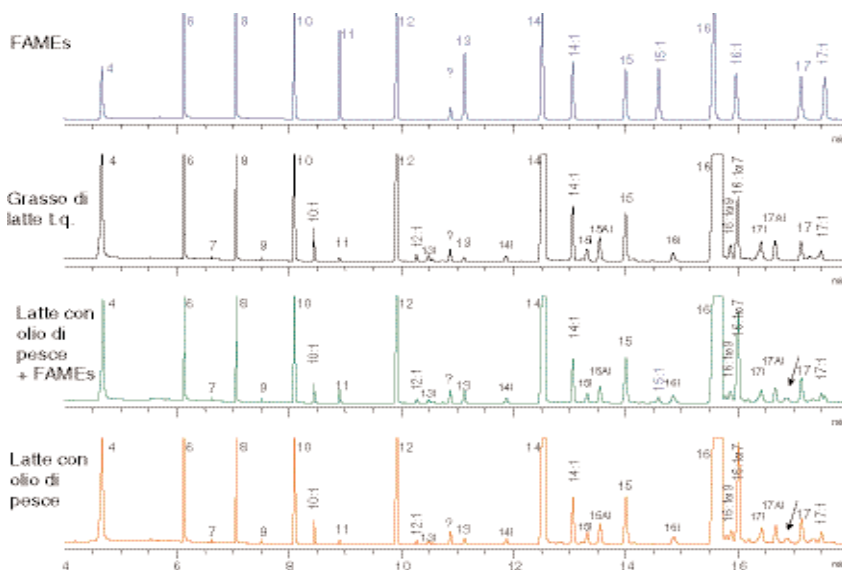
1. verificare che non esistono differenze significative estraendo il grasso del latte con il metodo di Rose-Gottlieb o con un metodo sperimentale che impiega ossalato di potassio quale agente denaturante, mentre si ottiene una maggiore dispersione dei dati impiegando il metodo dell'idrolisi acida<sup>8</sup>

2. individuare lo standard interno (C23:0)<sup>9</sup> per quantificare nel latte acidi grassi con un numero di atomi di carbonio compreso tra 18 e 22. Sono state inoltre valutate diverse forme di C23:0, C23:0TAG (trigliceride), C23:0MAG (monogliceride), C23:0FAME (metilestere) e ne è stata studiata la modalità di utilizzo più idonea. L'aggiunta di C23:0TAG e C23:0MAG al latte determina recuperi insufficienti per la scarsa solubilità, mentre l'aggiunta al grasso estratto determina recuperi soddisfacenti per le forme considerate.

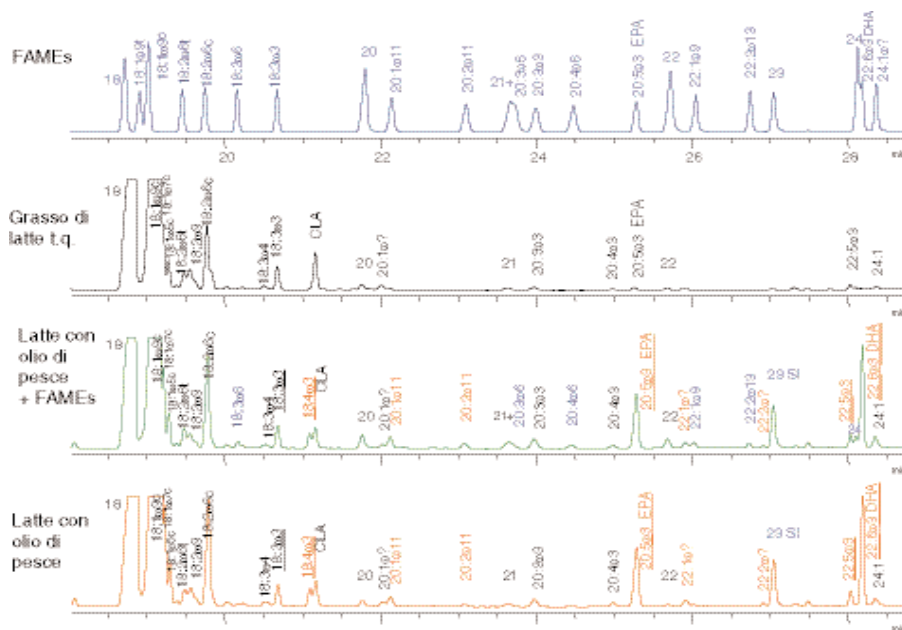
3. mettere a punto il sistema gascromatografico<sup>10</sup> con le relative condizioni: colonna capillare con fase stazionaria di polietilene glicole (Omegawax 320 Supelco 30m, 0.32 mm ID, 0.25 m film thickness), iniezione in split/splitless, programmata di temperatura da 50 °C a 220 °C, rivelazione in FID.

Il metodo risultante ha consentito di determinare in % relativa tutti gli acidi grassi. In mg/100g grasso sono stati determinati:

- C18:3  $\omega_3$ : acido 9,12,15 octadecatrienoico ( $\alpha$  linolenic acid: alfa-LNA)
- C18:4  $\omega_3$ : acido 6,9,12,15 octadecatetraenoico (Stearidonic acid)
- C20:5  $\omega_3$ : acido 5,8,11,14,17 eicosapentaenoico (EPA)
- C22:5  $\omega_3$ : acido 7,10,13,16,19 docosapentaenoico (DPA)
- C22:6  $\omega_3$ : acido 4,7,10,13,16,19 docosaesaenoico (DHA)



### Didascalia didascalia Didascalia didascalia



- C18:2  $\omega_6$ : acido linoleico
- CLA (picco comprensivo dei maggiori isomeri dell'acido linoleico coniugato).

### Validazione: circuito pilota

Per eseguire circuiti interlaboratoriali è stato costituito un gruppo di lavoro, formato da 4 Laboratori esperti nella determinazione degli acidi grassi – CRA-Istituto Lattiero Caseario di Lodi, Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università di Bologna, Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università di Udine e Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università Politecnica delle Marche - e dall'Azienda produttrice.

È stato organizzato un 1° circuito pilota, in cui ogni laboratorio ha impiegato il proprio metodo, dal momento che la messa a punto di un metodo comune era nella sua fase iniziale. Ad ogni laboratorio sono stati inviati

due campioni di grasso di latte vaccino con 0,2-0,3% di olio di pesce, già addizionato di standard interno C23:0TAG (1% sul grasso) al fine di considerare le seguenti variabili:

- transmetilazione: NGD, C41 197611 e ISO 15884/ IDF 18212
- stabilità dei metilesteri
- tipo di fase stazionaria e lunghezza della colonna cromatografica

Le determinazioni quantitative sono state eseguite presupponendo che tutti i PUFA abbiano fattore di risposta unitario rispetto allo standard interno. I valori di omega 3 presentano una variazione % compresa tra 0,8 e 2,5 e indicano che:

- si ottengono risultati ripetibili e paragonabili utilizzando agenti metilanti differenti e/o colonne diverse, quali Omegawax, SP2330, SP2380.
- lo stoccaggio in frigorifero dei metilesteri



**Tab 1 Confronto tra i parametri di precisione ottenuti nel circuito pilota e nel circuito internazionale**

Circuito pilota*					
	ac. a-Linolenico C 18:3w3	Ac. Stearidonico C 18:4w3	EPA C 20:5w3	DPA C 22:5w3	DHA C 22:6w3
N° di laboratori	5	5	5	5	5
Valore medio, mg/100g grasso	421	346	1556	258	1818
Deviazione standard di ripetibilità, S <sub>r</sub>	9,0	10,3	25,1	6,3	22,9
Coefficiente di variazione di ripetibilità, %	2,1	3,0	1,6	2,4	1,3
Deviazione standard di riproducibilità, S <sub>R</sub>	26,5	22,7	27,3	20,6	50,4
Coefficiente di variazione di riproducibilità, %	6,3	6,6	1,8	8,0	2,8

\*standard interno: C23:0FAME

Circuito internazionale					
	ac. a-Linolenico C 18:3w3 liv. 1	Ac. Stearidonico C 18:4w3 liv. 3	EPA C 20:5w3 liv. 3	DPA C 22:5w3 liv. 3	DHA C 22:6w3 liv. 3
N° di laboratori	10	8	10	12	10
Valore medio, mg/100g grasso	484	264	1503	274	1621
Deviazione standard di ripetibilità, S <sub>r</sub>	7,4	8,4	35,6	5,4	23,2
Coefficiente di variazione di ripetibilità, %	1,5	3,2	2,4	2,0	1,4
Deviazione standard di riproducibilità, S <sub>R</sub>	42,6	22,5	75,4	19,6	79,5
Coefficiente di variazione di riproducibilità, %	8,8	8,5	5,0	7,1	4,9

ri per una notte non porta a variazioni statisticamente significative (P=5%)

➤ i risultati ottenuti con la colonna da 30m sono più ripetibili rispetto a quelli ottenuti con una colonna da 60 m per tutti gli acidi grassi considerati (CV% minore);

Questi risultati hanno indotto il gruppo di lavoro ad organizzare un 2° circuito pilota impiegando un metodo comune, sintesi dei risultati preliminari e di considerazioni pratiche. Laddove possibile sono state utilizzate metodiche già validate e standardizzate per il latte.

Il metodo risultante prevedeva:

1. estrazione del grasso: metodo ISO 14156/IDF 172<sup>13</sup>
2. Utilizzo di C23:0TAG come standard interno (presupponendo che tutti i PUFA abbiano fattore di risposta unitario rispetto a C23:0TAG)
3. metilazione: metodo ISO 15884/IDF182<sup>3</sup>
4. condizioni cromatografiche idonee per separare soprattutto il C18:4 ω3 dal C18:2 co-

niugato (CLA) e il DPA dal DHA

Oltre alla colonna in polietilen glicole è stata valutata anche una colonna con fase stazionaria ciano silicene (SP2330, 60m, 0,32mm, diametro interno 0,25μm), in grado di separare gli acidi poliinsaturi e gli isomeri *cis-trans*.

Ad ogni partecipante è stato distribuito latte addizionato di olio di pesce (per valutare la ripetibilità del metodo di estrazione), grasso estratto (per valutare la ripetibilità del metodo di metilazione) e C23:0TAG.

L'analisi dei risultati rivela una maggior variabilità rispetto al primo circuito, attribuibile allo standard interno, C23:0TAG (diverse caratteristiche chimico-fisiche tra gli standard disponibili in commercio, difficoltà di solubilizzazione e di omogenizzazione).

È stato organizzato un 3° circuito pilota utilizzando il C23:0FAME come standard interno (impiegato anche nel metodo AOAC 991.39 per l'analisi degli acidi grassi nell'olio di pesce e presupponendo che tutti i PUFA abbiano fattore di risposta unitario rispetto a C23:0FAME). I dati di variabilità all'interno

delle repliche sono risultati nettamente più contenuti, facendo ipotizzare che allo stato attuale il metodo possa considerarsi affidabile solo utilizzando l'acido tricosanoico metilestere come standard interno<sup>14</sup> (Fig. 1A, 1B).

### Validazione: circuito internazionale ISO-IDF

Il grande interesse della comunità scientifica per gli acidi grassi omega3 e la crescente presenza sul mercato di alimenti addizionati o naturalmente arricchiti con tali nutrienti, ha indotto a proporre il metodo al comitato ISO-IDF. La proposta è stata accolta ed il metodo (Draft ISO/DIS 23065) sottoposto ad un circuito internazionale. Sono stati preparati e distribuiti sei campioni di grasso anidro con 3 differenti aggiunte di olio di pesce (8%, 10%, 12%: due campioni per ogni concentrazione) e sei campioni di grasso anidro con 3 differenti aggiunte di olio di lino (8%, 12%, 16%: due campioni per ogni concentrazione) a 17 laboratori (Finlandia: 1, Francia: 3, Germania: 1, Italia: 3, Nuova Zelanda: 1, Spagna: 4,

**Tab. 2 - Confronto tra i dati di precisione indicati nel metodo ISO 15585 e quelli ottenuti nel circuito internazionale**

	ISO 15585:2002		Circuito internazionale Omega 3	
	1000-5000	>5000	200-2500	>2500
Range di applicabilità mg/100g di grasso	1000-5000	>5000	200-2500	>2500
r : % del valore medio	12,0	5,0	5,3	3,9
R: % del valore medio	20,0	15,0	18,8	15,4





Svizzera: 1, Olanda 2, Gran Bretagna: 1). Ai partecipanti è stato richiesto di quantificare l'acido linoleico e l'acido  $\alpha$ -linolenico in tutti i campioni e C18:4 $\omega$ 3 (ac. stearidonico), C20:5 $\omega$ 3 (EPA), C22:5 $\omega$ 3 (DPA), C22:6 $\omega$ 3 (DHA) in quelli con aggiunta di olio di pesce. È stato richiesto di determinare il fattore di risposta di ogni acido grasso rispetto allo standard interno C23:0FAME.

### Risultati

L'analisi statistica è stata condotta secondo la norma ISO 5725-2:1994<sup>15</sup>.

La valutazione dei dati ha portato all'esclusione di 4 laboratori che presentavano valori significativamente differenti dagli altri. Il calcolo dei parametri di precisione del metodo ( $s_r$ , repeatability standard deviation e  $S_R$ , reproducibility standard deviation) è stato pertanto eseguito sui valori forniti da 13 laboratori. I parametri di precisione sono stati confrontati con quelli ottenuti nello studio pilota (tab 1), considerando i campioni con concentrazione di omega 3 confrontabile.

L'osservazione dei valori indica che i dati di  $s_r$  (repeatability standard deviation), tranne che per EPA, risultano confrontabili e i dati di  $S_R$  (reproducibility standard deviation), come aspettato, appaiono più alti per la maggior parte degli acidi grassi omega3.

L'utilizzo dei due tipi di olio e le differenti concentrazioni con cui sono stati addizionati al grasso del latte, implica per l'acido linoleico e linolenico range di concentrazione molto

ampi all'interno dei 12 campioni testati. Le deviazioni standard aumentano al crescere delle concentrazioni. Alla luce di questo sono stati individuati due range di concentrazione (200-2500 mg/100g e > 2500 -9000 mg/100g) e ripetuta la trattazione statistica. I risultati sono stati confrontati con i parametri di precisione indicati in 15885:2002 (tab.2). Tutti i valori ottenuti nel circuito di validazione del metodo per gli omega 3 sono risultati più bassi eccetto il valore di riproducibilità per concentrazioni molto elevate: in tal caso potrebbe essere opportuno aumentare la concentrazione dello standard interno almeno di 5 volte. I valori di precisione ottenuti nel range di concentrazione 200-2500 mg/100 g di grasso sono stati valutati più che soddisfacenti.

### Ufficializzazione: ISO-IDF

I risultati del ring test internazionale sono stati recentemente presentati in sede IDF-ISO e sono attualmente al vaglio della commissione statistica per stabilire se potranno essere utilizzati i medesimi parametri di ripetibilità e riproducibilità per tutto il range di concentrazione o se dovranno essere utilizzati valori diversi nel caso di alte o basse concentrazioni. In ambito internazionale è stata riconosciuta come determinante l'esperienza dei laboratori italiani, sia privati che pubblici, nello sviluppo, messa a punto e validazione di questo metodo analitico. ■

### Bibliografia

<sup>6</sup> International Standard ISO 15885:2002, Milk fat - Determination of the fatty acid composition by gas-liquid chromatography

<sup>7</sup> Santha N.C., Ackman R. G., Fish oil tetracosenoic acid isomers and GLC analysis of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 26 (3), 237-9 (1990)

<sup>8</sup> Theodet C., Gandemer G., Comparaison de cinq methodes pour extraire les lipides du lactoserum et des ses derives. *Lait-Lyon*, 71 (1), 41-54 (1991)

<sup>9</sup> Yan X., Borlow P., Craven C., Discrimination in recovery during capillary GLC analysis of fish oil: the use of a recovery correction factor (RCF). *Food Chemistry*, 40 (1), 93-9. (1991)

<sup>10</sup> Ulberth F., Schrammel F.: Accurate quantification of short, medium- and long chain fatty acid methyl esters by split-injection capillary gas liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 704 (2),455-63 (1995)

<sup>11</sup> Metodo NGD C41- 1976: Preparazione degli esteri metilici di acidi grassi

<sup>12</sup> International Standard ISO 15884:2002, Milk fat - Preparation of fatty acid methyl esters

<sup>13</sup> ISO 14156/ IDF 172, Milk and Milk Products – Extraction methods for lipids and liposoluble compounds.

<sup>14</sup> Cagnasso P., Bortolomeazzi R., G. Contarini, L. Conte, N. Frega, I. Gandolfi, G. Lerker: Determinazione quantitativa degli acidi grassi n-3 addizionati al latte vaccino: risultati preliminari di un test di validazione, *Progress in Nutrition*, 2,200, (2003)

<sup>15</sup>International Standard ISO 5725-2:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.