

# Determinazione rapida dei grassi vegetali nel burro

G. NOTA, D. NAVIGLIO,  
R. ROMANO, D. LUONGO,

DIPARTIMENTO DI SCIENZA DEGLI ALIMENTI  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI "FEDERICO II" - NAPOLI

M. DI MATTEO

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA CHIMICA ED ALIMENTARE  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI - SALERNO

C. IMPROTA

DIPARTIMENTO DI CHIMICA - UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
"FEDERICO II" - NAPOLI

## RAPID EVALUATION OF VEGETABLE FATS IN BUTTER

A simple and quick method for evaluating, by means of HRGC or HPLC, the presence of margarine in butter is proposed.

This method indicates the presence of margarine as long as the quantity present is higher than 5%; less than this value would not make the fraud worthwhile.

Viene proposto un metodo, semplice e rapido, che consente, a mezzo HRGC o HPLC, il rilevamento di aggiunte fraudolente di margarine vegetali al burro.

Tale metodo è in grado di rilevare la presenza di margarina in percentuali non inferiori al 5%, valore che garantisce la remuneratività della frode.

## INTRODUZIONE

Il rilevamento ed il dosaggio dei grassi vegetali aggiunti fraudolentemente al burro sono comunemente effettuati tramite l'analisi della frazione acidica e/o di quella sterolica. Poiché, però, il primo metodo può fornire indicazioni ingannevoli in quanto taluni rapporti tra gli acidi grassi considerati significativi possono essere notevolmente influenzati dall'alimentazione somministrata al bestiame, l'attenzione dei ricercatori è rivolta soprattutto al rilevamento quali-quantitativo dei fitosteroli (1, 2, 3). Infatti, la presenza di  $\beta$ -sitosterolo in quantità superiore a quella normalmente presente nel burro, max 0,5% della frazione sterolica, può essere considerato come un sicuro indicatore dell'aggiunta di grassi di natura vegetale.

La metodica normalmente adoperata (1) presenta l'inconveniente di essere eccessivamente lunga e macchinosa in quanto prevede la saponificazione a ricadere della sostanza grassa, l'estrazione dell'insaponificabile, il suo frazionamento a mezzo TLC e, infine, l'analisi gascromatografica della frazione sterolica; essa, quindi, mal si presta ad essere utilizzata quando i campioni da analizzare siano numerosi.

Nel presente lavoro viene proposta una metodica molto più rapida e, quindi, adatta per le analisi di routine in quanto prevede una semplice transesterificazione del campione ed il dosaggio del  $\beta$ -sitosterolo a mezzo HRGC o HPLC.

## METODO GASCROMATOGRAFICO

### Principio del metodo

La metodica prevede il rilevamento dell'aggiunta di grassi vegetali mediante l'esame del rapporto tra due picchi riconosciuti come significativi.

### Procedura di analisi

In una provetta da centrifuga, a circa 100 mg di grasso, si aggiungono, nell'ordine, 1 ml di  $\text{CHCl}_3$  e 400  $\mu\text{l}$  di KOH metanolica 2 N, agitando accuratamente dopo ogni aggiunta. Si neutralizza con 800  $\mu\text{l}$  di HCl 1 N, si agita nuovamente e si centrifuga a 4.000 r.p.m. per 3 min. L'analisi gascromatografica viene condotta su 2  $\mu\text{l}$  della fase cloroformica (fase inferiore).

### Strumentazione adoperata

- Gascromatografo DANI, mod. 8610 HT, dotato di PTV e di FID;
- Integratore HP 3394;
- Colonna capillare (Quadrex Co) in silice fusa: fase legata: metilfenilsilicone 5%; l=25 m; i.d.=0,25 mm; f.t.=0,1  $\mu$ .

### Condizioni operative

- Flusso del gas vettore (He): 2 ml/min;
- Programma del PTV: 60°C per 10''; 60→400°C con dT/dt=500°C/min.; 400°C per 7'; raffreddamento fino a 60°C;
- T della colonna: 250°C per 2'; 250→310°C con dT/dt=5°C/min;
- Metodo: solvent split; valvola chiusa a 10'' e aperta a 2'
- Tempo di analisi: 10 min circa.

## METODO HPLC

### Principio del metodo

La metodica prevede il rilevamento dell'aggiunta di grassi vegetali dall'incremento di altezza del picco del  $\beta$ -sitosterolo.

### Procedura di analisi

In una provetta a fondo sfinato si introducono, nell'ordine, una quantità di grasso compresa tra 90 e 110 mg, 1 ml di esano e 200  $\mu\text{l}$  di KOH metanolica 2N e si agita vigorosamente per 1'. Dopo separazione delle fasi si portano a secco, in corrente di azoto, 0,5 ml della fase che, quindi, vengono ripresi con la miscela eluente indicata nelle condizioni operative.

### Strumentazione adoperata

- Cromatografo liquido (Knauer HPLC 64 Pump, Knauer, Berlin, Germany);
- Rivelatore spettrofotometrico Knauer;
- Integratore elettronico (HP 3396, Hewlett Packard, Palo Alto, California, U.S.A.);
- Colonna analitica RP (Hypersil ODS 5  $\mu$ ; 250×4,6 mm).

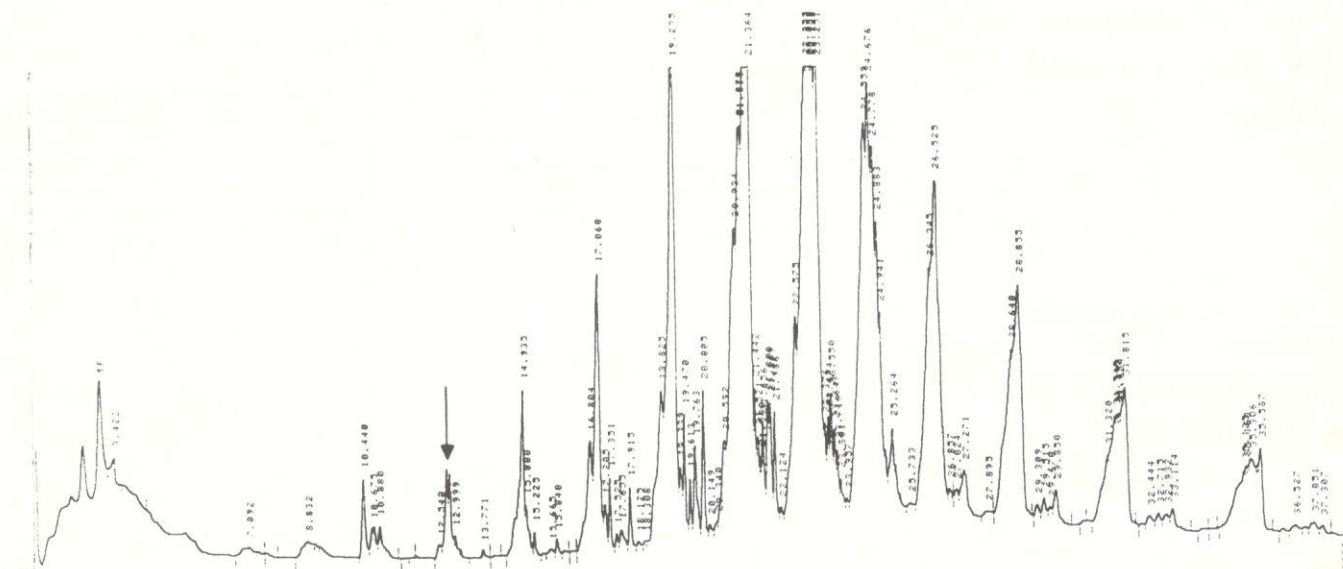


Fig. 1a - Gascromatogramma di un campione di burro addizionato del 5% di margarina  
La freccia indica la zona di uscita del  $\beta$ -sitosterolo

#### Condizioni operative

- Fase mobile: acetonitrile: metanolo: cloruro di metilene: n-esano (70:20:5:5: v/v);
- Flusso: 1 ml/min;
- Loop: 50  $\mu$ l;
- Lunghezza d'onda: 214 nm;
- Tempo di analisi: 20 min circa.

#### Parametri di integrazione

- Attuazione 6;
- Treshold 7.

#### RISULTATI E DISCUSSIONI

In figura 1a viene riportato il gascromatogramma di un campione di burro anidro contenente il 5% di margarina; come si può osservare, il picco del  $\beta$ -sitosterolo non risulta sufficientemente separato per cui l'analisi diretta del campione non è effettuabile e, inoltre, il tempo necessario per la completa eluzione del campione risulta eccessivamente lungo.

Nella figura 1b viene riportato il profilo HRGC dello stesso campione preventivamente transesterificato. Il picco relativo al  $\beta$ -sitosterolo risulta, in questo caso, ben separato e quindi quantificabile; l'analisi gascromatografica, inoltre, richiede un tempo di analisi molto contenuto in quanto gli EMAG, nelle nostre condizioni sperimentali, escono praticamente con il volume morto.

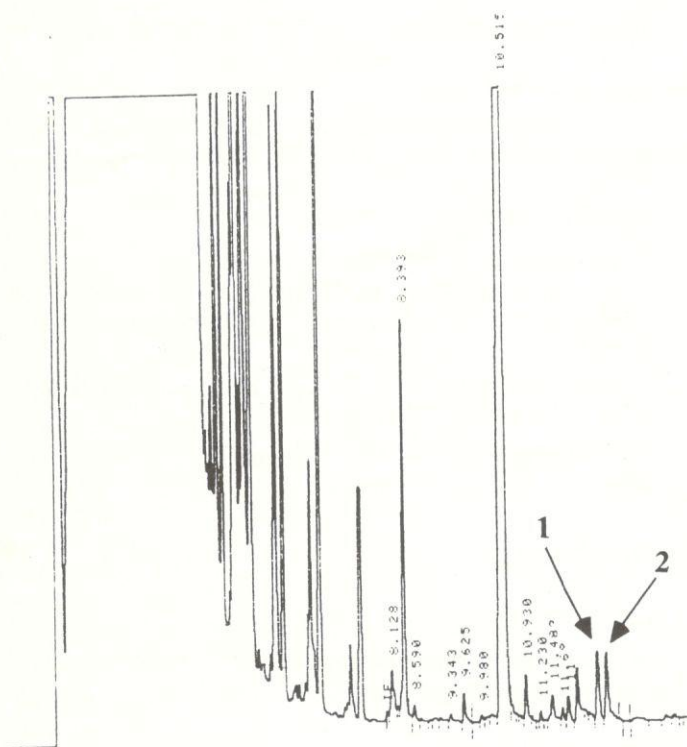


Fig. 1b - Gascromatogramma di un campione di burro addizionato del 5% di margarina e previamente transesterificato.

1) picco del  $\beta$ -sitosterolo; 2) picco di riferimento.

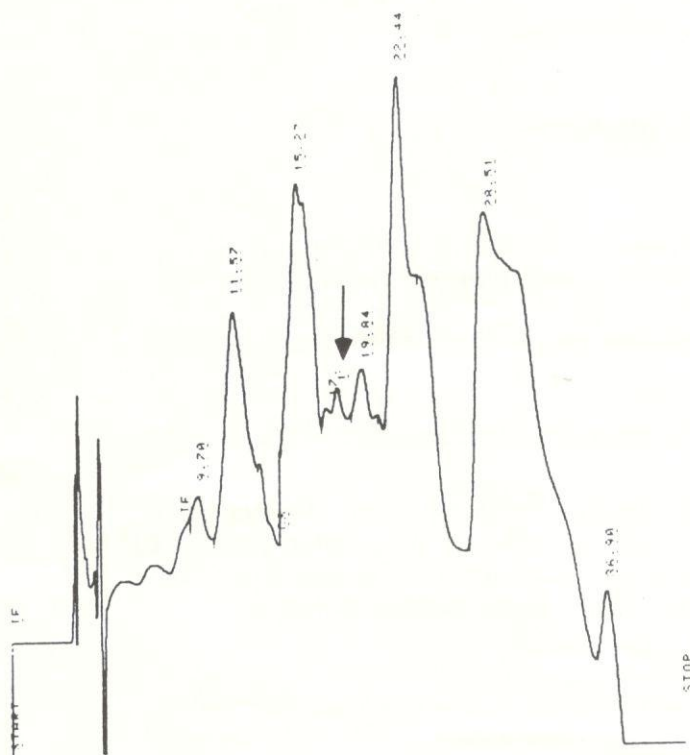
#### Reattivi

- Acetonitrile per HPLC far UV (Lab-Scan Analytical Sciences, Dublin, Ireland);
- Metanolo per HPLC (Lab-Scan Analytical Sciences, Dublin, Ireland);
- Esano per HPLC (Lab-Scan Analytical Sciences, Dublin, Ireland);
- Cloruro di metilene per HPLC (Lab-Scan Analytical Sciences, Dublin, Ireland).

TABELLA I - Valori di R per burri genuini e burri addizionati del 5% di margarina

Campione n°	R1	R2
1	3,950	1,020
2	6,200	1,160
3	4,920	1,260
4	5,660	1,200

R1 = valore del rapporto per burri genuini;  
R2 = valore del rapporto per burri addizionati del 5% di margarina.  
(Il significato di R è indicato nel testo).



**Fig. 2a - Profilo HPLC di un campione di burro addizionato del 5% di margarina.**

La freccia indica la zona di uscita del  $\beta$ -sitosterolo.

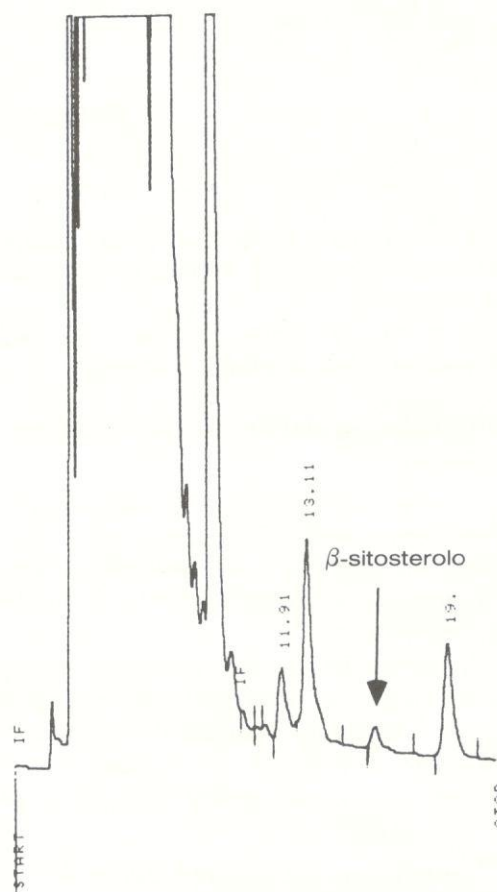
L'analisi dei gascromatogrammi di numerosi burri, sicuramente genuini e di diversa provenienza, ha confermato la presenza di un picco (indicato con 2) ben isolato appena dopo quello del  $\beta$ -sitosterolo (picco 1) ed assente nei profili della margarina. I rapporti (R) tra le aree relativi ai picchi 2 e 1 sono compresi, per burri sicuramente genuini, tra 3,4 e 6,0 mentre per burri addizionati del 5% di margarina, si osserva che tali valori sono prossimi all'unità e, quindi, nettamente fuori dell'intervallo tipico dei burri genuini (Tab. I).

Dall'esame della figura 2a, che riproduce un cromatogramma HPLC relativo ad un campione di burro addizionato del 5% di margarina, si rileva che il picco del  $\beta$ -sitosterolo appare non adeguatamente separato. Analizzando, invece, lo stesso campione previa transesterificazione, si osserva che il picco del  $\beta$ -sitosterolo è perfettamente integrabile (Fig. 2b), inoltre il tempo di analisi richiesto per la completa eluizione del campione appare molto ridotto.

Va, inoltre, considerato che, mentre i burri sicuramente genuini presentano un picco del  $\beta$ -sitosterolo alto circa 1 mm, per le miscele di burro al 5% di margarina tale picco raggiunge un'altezza di circa 10 mm.

Nel presente lavoro non si è utilizzata rigorosamente la procedura di transesterificazione di Christie (4) bensì la procedura modificata, descritta e discussa in un nostro precedente lavoro (5).

La metodica da noi suggerita, considerati i presupposti su cui si basa, mal si presta ad un rigoroso dosaggio della margarina nel burro in quanto il dato analitico che fornisce è cor-



**Fig. 2b - Profilo HPLC di un campione di burro addizionato del 5% di margarina e previamente transesterificato.**

retto per aggiunte non inferiori al 5%. Questa considerazione, però, non costituisce in nessun modo una limitazione al suo impiego in quanto, da informazioni assunte in campo commerciale, è risultato che la specifica frode è certamente non remunerativa per aggiunte di margarina al burro in percentuali inferiori a tale valore.

Il metodo proposto, inoltre, risulta, sia nella versione gascromatografica sia nella versione HPLC, molto più semplice e rapido della procedura convenzionale (1) e, in definitiva, appare particolarmente allettante quando si abbia da analizzare un gran numero di campioni e/o quando sia richiesto un giudizio immediato.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) G. CERRUTI, G. VOLONTERIO, P. RESMINI, Riv. Ital. Sostanze Grasse, 46, 356-362 (1969)
- 2) I. KATZ, M. KEENEY, J. Dairy Sc., 50, 1764-1768 (1967).
- 3) J. EISNER, N.P. WONG, D. FIRESTONE, S. BOND, J. Ass. Off. Agr. Chem., 45, 337-342, (1962).
- 4) W.W. CHRISTIE, Lipid Analysis, 2nd ed. Pergamon Press, Oxford, U.K., 1982, p. 53.
- 5) G. NOTA, D. NAVIGLIO, R. ROMANO, D. LUONGO, S. SPAGNA MUSSO, Riv. Ital. Sostanze Grasse, (in corso di pubblicazione).