

ANALISI DI TERPENI IN PRODOTTI LATTIERO-CASEARI MEDIANTE TECNICA HS-SPME-GC/MS

Manuela GIORDANO^{1*}, Simona BELVISO¹, Giuseppe ZEPPA¹

INTRODUZIONE

I terpeni sono composti alifatici lipofili coinvolti, quali metaboliti secondari, nell'impollinazione delle piante e nella loro resistenza a predatori o malattie. Abbondanti soprattutto nelle dicotiledoni, sono stati individuati da diversi autori nel latte, nel formaggio e nella carne derivanti da bovini ed ovi-caprini alimentati con tali piante e questo ne ha suggerito l'utilizzo come marcatori di *terroir*. L'isolamento di questi componenti prevede in genere l'utilizzo di tecniche dispendiose e lunghe, quali l'estrazione liquido-liquido [1] oppure lo spazio di testa dinamico [2]. La microestrazione in fase solida per spazio di testa statico (HS-SPME) è una tecnica di estrazione veloce, sensibile, che non fa ricorso a solventi e che, accoppiata alla gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS), si è rivelata una tra le più versatili, rapide e convenienti. Lo scopo di questo lavoro è stato quindi quello di sviluppare ed ottimizzare un metodo che permettesse di estrarre i componenti terpenici da matrici lattiero-casearie mediante l'utilizzo di una fibra tripolare.

MATERIALI E METODI

a) *Preparazione del latte* – Nel caso del latte sono stati confrontati tre metodi di preparazione del campione:

I) estrazione diretta del latte crudo (2,5 g) addizionato di NaCl sino ad una concentrazione del 30% (p/v);

II) separazione preliminare della crema mediante centrifugazione ed estrazione da 2,5 g dalla stessa dopo l'aggiunta di 2,5 g di una soluzione di NaH_2PO_4 al 25% (p/v) [3];

III) estrazione del distillato acquoso del coagulo acido [4, 5]. Il latte è stato quindi coagulato mediante aggiunta di acido lattico sino a pH 4 e 12 g del coagulo così ottenuto sono stati addizionati di 400 μL di una soluzione a 10 ppm di 1,3,5-triisopropilbenzene (TIPB) quale standard interno e quindi distillato sotto alto vuoto per 60 minuti. Il distillato acquoso ottenuto (3 mL), è stato infine utilizzato per l'estrazione.

Per la prova è stato utilizzato un unico campione di latte intero crudo bovino

* *Corrispondenza ed estratti*: manuela.giordano@unito.it

¹ Microbiologia Agraria e Tecnologie Alimentari - Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali. Università degli Studi di Torino. Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO).

raccolto durante l'estate 2007 in alpeggio.

b) *Preparazione del formaggio* – Anche nel caso del formaggio sono stati confrontati tre metodi di preparazione del campione per l'estrazione:

I) estrazione diretta di 2,5 g di formaggio finemente macinato;

II) estrazione di 2,5 g di formaggio finemente macinato addizionati di una soluzione (2,5 g) di NaH_2PO_4 al 25% (p/v);

III) estrazione del distillato acquoso. In questo caso 15 g di formaggio finemente macinato sono stati addizionati di 3 mL di acqua ultrapura e 170 μL di una soluzione a 10 ppm di standard interno (TIPB) e quindi distillato sotto alto vuoto per 90 minuti. Il distillato acquoso ottenuto (3 mL) è stato infine estratto.

Per la prova è stato utilizzato un campione di formaggio vaccino da latte crudo, prodotto senza l'aggiunta di innesti, nell'estate 2007 in alpeggio.

c) *Estrazione mediante spazio di testa statico (HS-SPME)* – Il latte, la crema ed il formaggio sono stati posti in un vial da 10 mL e dopo un periodo di equilibratura di 10 minuti a 53°C sono stati estratti per 60 minuti in agitazione con una fibra trifasica (StableFlex 2cm-50/30 μm di DVB/CAR/PDMS) (Supelco).

Nel caso dei distillati acquosi i campioni, posti anch'essi in vial da 10 mL, dopo 5 minuti di equilibratura a 45°C sono stati estratti per 30 min in agitazione con la stessa fibra trifasica precedentemente descritta.

Il desorbimento dei composti volatili è stato effettuato per 4 minuti a 270°C in condizioni splitless. Per ciascuna prova sono state effettuate 3 repliche.

d) *Analisi mediante GC/MS* – Gli estratti sono stati analizzati con un gascromatografo Shimadzu GC-17A accoppiato ad uno spettrometro di massa a quadrupolo Shimadzu QP-5000 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) dotato di una colonna capillare DB-WAX, 30m, 0,25mm id, 0,25 μm spessore del film (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA) ed iniettore split/splitless. Il gas carrier utilizzato è stato elio con un flusso di 1 mL/minuto. E' stata utilizzata la seguente programmata di temperatura: 35 °C per 5 minuti, 2 °C/min fino a 173 °C, 173°C per 1 minuto, 15 °C/min fino a 210 °C, 210 °C per 5 minuti. Gli spettri di massa sono stati registrati tra 33 e 300 uma con un'energia di ionizzazione a impatto elettronico di 70 eV in modalità TIC e SIM, monitorando ed integrando le aree dei picchi degli ioni caratteristici dei mono- e dei sesquiterpeni rilevati. La sorgente e l'interfaccia sono stati mantenuti a 230°C e la velocità di scansione è stata di 500 uma/sec.

L'identificazione dei singoli composti è stata effettuata confrontando gli spettri di massa con quelli presenti nei database NIST ed Adams e con quelli di standard autentici, quando disponibili. Sono stati inoltre calcolati gli indici di ritenzione lineari (LRI) ottenuti previa iniezione di una miscela di una serie omologa di idrocarburi (da C8 a C25) operando nelle stesse condizioni cromatografiche sopra riportate e paragonandoli con quelli presenti in letteratura.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In figura 1 sono riportati per le tre tecniche di estrazione confrontate i valori delle aree assolute dei composti terpenici rilevati nel campione di latte. Con l'utilizzo del solo cloruro di sodio al fine di aumentare la forza ionica del mezzo si sono potuti estrarre e rilevare solo 6 monoterpene. Con il secondo metodo di preparazione del campione, i terpeni estratti aumentano a 9 di cui uno è un sesquiterpene precedentemente non rilevato. Nel caso della distillazione sotto vuoto, utilizzata per evitare una eventuale degradazione dei composti terpenoidici nel coagulo acido, l'analisi ha permesso di estrarre e rilevare 21 componenti di cui 17 monoterpene, un sesquiterpene e 3 molecole appartenenti alla classe dei norisoprenoidi fra cui il β -ionone.

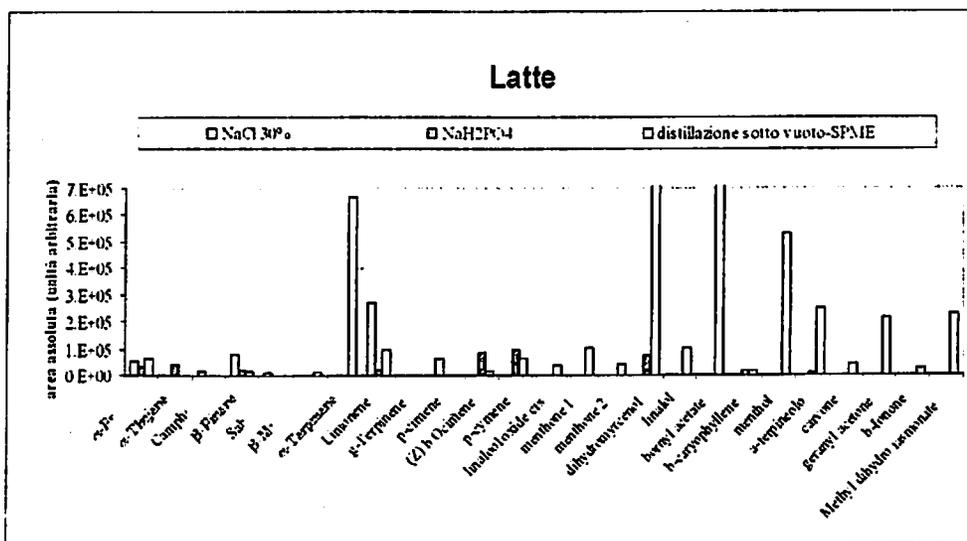


Figura 1 – Valori delle aree assolute dello ione caratteristico dei terpenoidi estratti e rilevati in latte mediante i tre differenti metodi di estrazione confrontati quali l'aggiunta di NaCl, l'aggiunta di NaH₂PO₄ e la distillazione sotto vuoto, seguiti dalla HS-SPME.

Figure 1 – Absolute area values for characteristic ion of terpenoids extracted and detected in milk samples by means of three extraction methods such as the addition of NaCl, the addition of NaH₂PO₄ and vacuum distillation, all followed by HS-SPME.

Nella figura 2 sono riportate invece le aree assolute dei terpeni estratti dai campioni di formaggio confrontando le differenti metodiche di preparazione del campione seguite da estrazione SPME. Le analisi hanno permesso di individuare la presenza di 5 molecole, sia sui campioni tal quali, sia con l'aggiunta della soluzione di NaH₂PO₄. Sono stati individuati in particolare 4 monoterpene ed 1 sesquiterpene. Anche in questo caso la distillazione sotto vuoto si

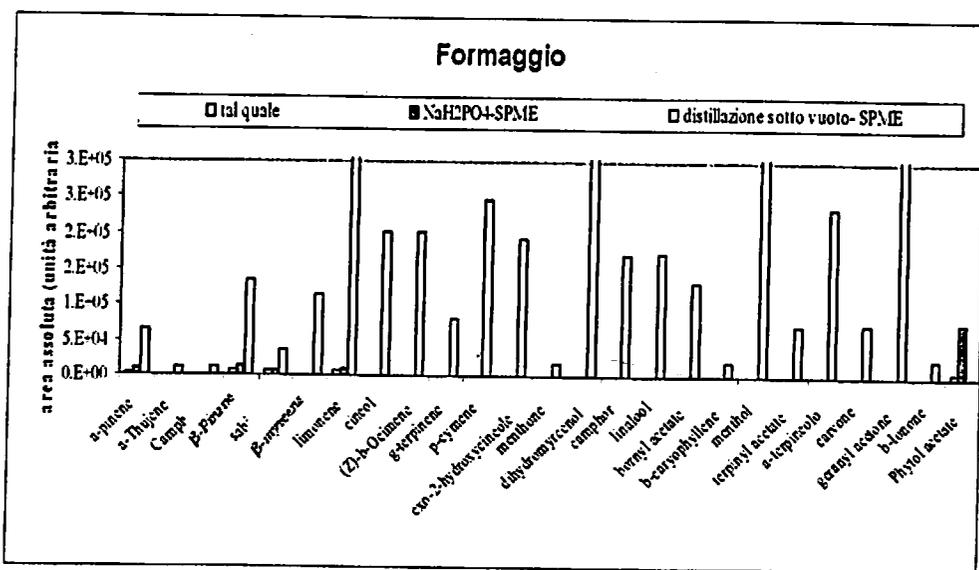


Figura 2 – Valori delle aree assolute dello ione caratteristico dei terpenoidi estratti e rilevati nel formaggio mediante i tre differenti metodi confrontati quali l'estrazione diretta, dopo l'aggiunta di una soluzione di NaH_2PO_4 e la distillazione sotto vuoto, seguiti dalla HS-SPME.

Figure 2 – Absolute area values for characteristic ion of terpenoids extracted and detected in cheese samples by means of three extraction methods such as direct extraction, addition of a NaH_2PO_4 and vacuum distillation, all followed by HS-SPME.

è rivelata la migliore tra le metodiche di preparazione del campione in quanto sono stati individuati 24 composti di cui 22 monoterpeni, 1 sesquiterpene e 1 norisoprenoide.

La maggior parte delle molecole monoterpeniche rilevate risultano presenti sia nei campioni di latte che di formaggio ed alcune di queste corrispondono a componenti già riscontrati in altri prodotti lattiero-caseari ottenuti da alimentazione con foraggi freschi [2, 6]. E' da evidenziare che nel latte compaiono molecole, quali *cis* linalol ossido, isomeri del mentone, metil diidroiasmonato; queste molecole non sono state però riscontrate nei formaggi, che sono invece caratterizzati da composti come cineolo, *eso*-2-hydroxycineolo, canfora e terpinil acetato.

CONCLUSIONI

Il metodo che prevede la distillazione sotto vuoto, seguita da spazio di testa con l'utilizzo di una fibra trifasica, è risultato il più efficiente in quanto ha consentito di estrarre dai prodotti lattiero-caseari un numero maggiore di compo-

nenti terpenici ed, in maggiore quantità rispetto agli altri metodi utilizzati e potrebbe pertanto essere utilizzato per definire il profilo terpenico dei prodotti lattiero-caseari ed un loro eventuale legame con l'area di provenienza.

RIASSUNTO – Obiettivo di questa ricerca è stato quello di sviluppare un metodo veloce e sensibile basato sull'utilizzo della microestrazione in fase solida accoppiata alla gascromatografia/spettrometria di massa che permettesse di estrarre terpeni volatili da matrici lattiero-casearie, quali latte e formaggio. Confrontando tre metodiche di preparazione del campione, la tecnica migliore è risultata quella della distillazione sotto vuoto, seguita da un'estrazione HS-SPME in spazio di testa statico con una fibra bipolare che ha permesso di estrarre e rilevare un numero relativamente elevato di molecole terpeniche da matrici lipidiche complesse come quelle casearie.

Parole chiave: latte, formaggio, terpeni, SPME

SUMMARY – *Terpene analyses in dairy products by means of HS-SPME-GC/MS* – The aim of this research was to develop an easy and sensible method by means of solid-phase micro-extraction technique to extract volatile terpenes from dairy products such as milk and cheese. Comparing 3 different ways of sample preparations, the best technique to detect the major number of terpenoids compounds, both from a qualitative and from a quantitative point of view, was the vacuum distillation followed by static headspace technique with a bipolar fiber.

Keywords: milk, cheese, terpenes, SPME

Ringraziamenti: Poster presentato al I Congresso Lattiero-Caseario AITeL. Bologna, 12 giugno 2008 "Acquisizioni scientifiche e valorizzazione del latte e dei derivati: aspetti genetici, ambientali e tecnologici".

BIBLIOGRAFIA

- 1) Broudiscou L-P, Cornu A, Rouzeau A (2007). *In vitro degradation of 10 mono- and sesquiterpene of plant origin by caprine rumen micro-organisms*. J. Sci. Food Agric., 87, 1653-1658.
- 2) Tornambè G, Cornu A, Pradel P, Kondjoyan N, Carnat AP, M. Petit M, Martin B (2006). *Changes in terpene content in milk from pasture-fed cows*. J. Dairy Sci., 89, 2309-2319.
- 3) Lee J-H, Diono R, Kim G-Y, Min DB (2003). *Optimization of solid phase microextraction analysis for the headspace volatile compounds of Parmesan cheese*. J. Agric. Food Chem., 51, 1136-1140.
- 4) Favaro G, Magno F, Boaretto A, Bailoni L, Mantovani R (2005). *Traceability of Asiago mountain cheese: a rapid, low-cost analytical procedure for its identification based on solid-phase microextraction*. J. Dairy Sci., 88, 3426-3434.

- 5) Zeppa G, Giordano M, Bertolino M, Gerbi V (2005). *Application of artificial neural network on mono- and sesquiterpenes compounds determined by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the Piedmont ricotta cheese traceability.* J. Chromatogr. A, 1071, 247-253.
- 6) Fernández-García E, Imhof M, Schlichtherle-Cerny H, Bosset JO, Nuñez M (2008). *Terpenoids and benzenoids in La serena cheese made at different seasons of the year with a Cynara cardunculus extract as coagulant.* Int. Dairy J., 18, 147-157.