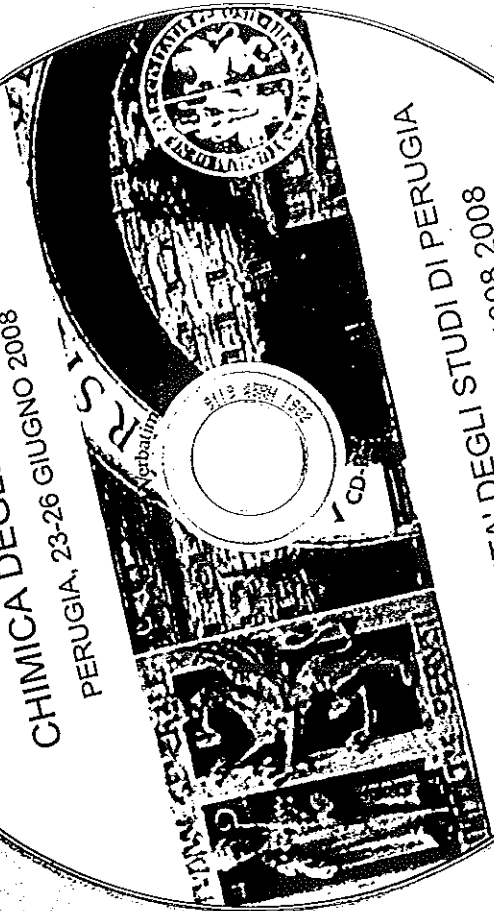


VII CONGRESSO NAZIONALE
di
CHIMICA DEGLI ALIMENTI
PERUGIA, 23-26 GIUGNO 2008



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PERUGIA
VII CENTENARIO 1308 2008
ISBN 978-88-86993-28-9

SVILUPPO DI UN METODO PER L'ANALISI DI ACIDI FENOLICI NEL LATTE

Scursatone B.*, Gerbi V., Zeppa G.

Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse
Agroforestali, Settore di Microbiologia e Tecnologie Alimentari

*bernardo.scursatone@unito.it

Introduzione

Fra le sostanze sintetizzate dalle piante un ruolo di primaria importanza è rivestito dai composti polifenolici in quanto essenziali per la crescita e la riproduzione delle piante, ma altresì per la loro difesa da predatori e patogeni. Questi prodotti hanno inoltre azione antibiotica, fungono da sostanze-segnale e da richiamo per gli insetti impollinatori nonché da agenti protettivi dai raggi UV e da pigmentanti dei frutti (1).

In relazione alle loro numerose attività ed al loro elevato valore nutrizionale i polifenoli sono stati quindi ampiamente studiati e la loro presenza evidenziata in innumerevoli alimenti.

Poiché gli studi che mettono in evidenza la presenza di composti fenolici nel latte sono però molto scarsi e nessuno ha mai preso in considerazione in particolare gli acidi fenolici lo scopo di questo lavoro è stato quello di mettere a punto un metodo per l'estrazione e la determinazione mediante HPLC/MS di questi composti nel latte al fine di un loro utilizzo quali marker di origine del prodotto.

Materiali e metodi

Campioni

La messa a punto del metodo cromatografico è stata effettuata su soluzioni standard di 16 acidi fenolici.

Per la verifica sono stati invece utilizzati 10 campioni di latte di cui 5 provenienti da allevamenti di pianura ed altrettanti da allevamenti di montagna.

Sistema cromatografico

Il sistema cromatografico utilizzato è costituito da un HPLC con rivelatore di massa Finnigan LCQ MS operante in elettrospray ionization (ESI). La separazione è stata ottenuta su una colonna Luna C₁₈ (150 x 2 mm, 5 µm) dotata di precolonna costituita della medesima fase. I solventi utilizzati sono stati due: una fase A costituita da una miscela di acido formico:H₂O (99.9:0.1) ed una fase B costituita da metanolo. La composizione della fase mobile è stata la seguente: 0 min 90% A, 5 min 80% A, 15 min 80% A, 20 min 60% A, 38 min 0% A, 40 min 0% A, 60 min 90% A, 90 min 90% A. Il flusso è stato impostato a 0.2 mL/min e il volume iniettato è stato di 20 µL.

Per il tuning dello spettrometro di massa sono stati infusi in maniera diretta nello spettrometro di massa i sedici acidi fenolici in studio alla concentrazione di 1 ppm in una miscela di acqua:metanolo:acido formico (90:9.9:0.1) ad un flusso di 0,18 ml/min.

Tutti gli analiti sono stati analizzati in ionizzazione negativa (ESI(-)), osservando quindi lo ione molecolare diminuito di una unità eccetto l'acido cinnamico che non avendo sostituenti non viene rilevato in ESI(-) e quindi è stato analizzato in ionizzazione positiva (ESI(+)).

E' stato osservato e registrato lo spettro di massa dei frammenti (ioni 'figlio') generati dalla rottura dello ione principale (ione 'genitore'): tale frammentazione, chiamata spettro ms/ms o ms², è stata osservata per tutti gli analiti ma nell'analisi solo alcuni sono stati identificati in tal modo.

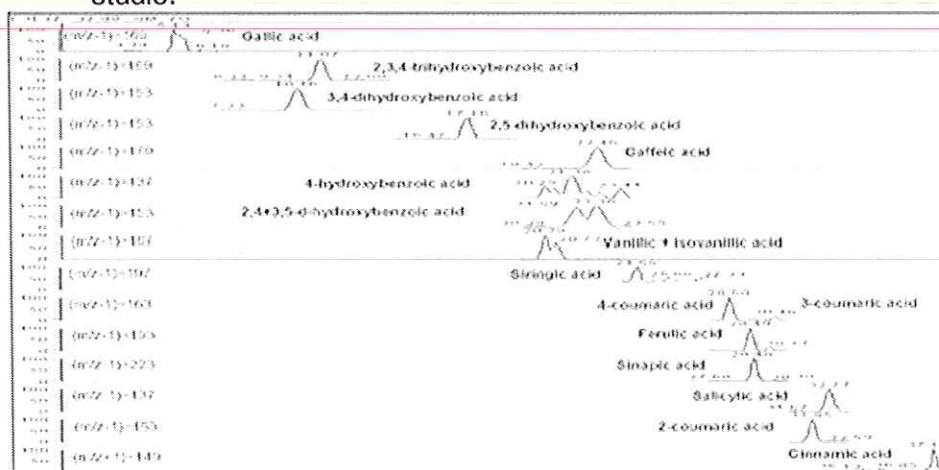
Lo strumento è stato impostato in maniera da acquisire in modalità ms² soltanto lo spettro relativo alla massa degli ioni 'figlio' aumentando così la sensibilità e la ripetibilità del metodo; tale impostazione, denominata S.R.M. (Single Reaction Monitoring) setta il rivelatore in maniera che si distinguano uno Ione Quantificatore (lo ione registrato in S.I.M.) il cui segnale serve per l'analisi quantitativa e uno Ione Qualificatore (lo ione registrato in S.R.M.) che ha lo scopo di dare la conferma della presenza di un certo analita. L'analisi degli acidi fenolici condotta in tale maniera, risulta sensibilissima e molto precisa per la corretta identificazione degli analiti.

Risultati

1) Valutazione del metodo cromatografico

Nella Fig. 1 è riportato il cromatogramma acquisito in S.I.M. per i 16 acidi fenolici esaminati nel corso dello studio. Si evidenzia una ottima separazione dei composti e solo nel caso degli acidi vanillico ed iso-vanillico e degli acidi 2,4- e 3,5-di-idrossibenzoico si ha una parziale coeluizione.

Fig.1 - Cromatogramma in S.I.M. degli acidi fenolici esaminati nello studio.



Al fine di valutare la ripetibilità strumentale ed il Limite di Rilevabilità (L.O.D.) sono state analizzate quattro miscele a 0.05-0.1-0.5 ed 1 ppm degli acidi fenolici in studio. Ciascuna miscela è stata esaminata quattro volte. I coefficienti di variazione (CV%) ed il coefficiente di regressione della retta di taratura evidenziano una buona ripetibilità con CV% in genere bassi ed una altrettanto buona linearità con un valore di R^2 molto superiore a 0,9 per tutti gli analiti considerati (Tab.1).

Tab. 1 - Coefficienti di variazione (CV%) e valori di R^2 calcolati per gli acidi fenolici in studio.

Compound	CV%				R^2
	1 ppm	0,5 ppm	0,1 ppm	0,05 ppm	
3,4,5-trihydroxybenzoic acid (Gallic acid)	19,14	19,21	29,80	—	0,9462
3,4-dihydroxybenzoic acid (Protocatecuic acid)	40,24	9,93	19,37	—	0,9911
2,3,4-trihydroxybenzoic acid	19,71	67,55	40,23	6,75	0,9430
3-hydroxybenzoic acid	42,49	—	—	—	—
2,5-dihydroxybenzoic acid (Gentisic acid)	3,10	9,68	10,78	16,39	0,9963
4-hydroxybenzoic acid	29,12	—	—	—	—
2,4-dihydroxybenzoic acid (Resorcylic acid)	9,77	14,83	26,75	—	0,9798
3,4-dihydroxycinnamic acid (Caffeic acid)	4,38	13,31	14,69	75,28	0,9897
3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid (Siringic acid)	2,73	1,10	—	—	0,9652
4-hydroxycinnamic acid (4-coumaric acid)	5,90	6,21	12,81	15,01	0,9985
3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid (Ferulic acid)	8,04	6,77	11,78	6,51	0,9988
3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (Sinapic acid)	13,98	9,46	17,56	49,97	0,9967
3-hydroxycinnamic acid (3-coumaric acid)	13,89	33,74	86,57	—	0,9973
2-hydroxycinnamic acid (2-coumaric acid)	1,09	6,58	19,73	1,87	0,9983
2-hydroxybenzoic acid	5,05	6,00	5,84	15,61	0,9955

2) Estrazione degli acidi fenolici

Il metodo messo a punto per l'estrazione degli acidi fenolici dal latte prevede che 20 mL di latte addizionati di acido cinnamico quale standard interno vengano trattati con 9 mL di acetone al fine di estrarre i composti d'interesse e 1 mL di tampone acetato per precipitare la frazione proteica. L'estratto acetone così ottenuto viene quindi evaporato con N_2 ed alla soluzione acquosa restante vengono aggiunte circa 6600 unità di β -Glucuronidase al fine di idrolizzare gli acidi fenolici legati all'acido glucuronico. Al termine di un periodo di 12 ore a 37 °C l'estratto viene purificato e concentrato mediante passaggio su cartuccia DPA6S. La cartuccia viene preventivamente lavata con metanolo ed attivata con H_2O . Dopo il passaggio del campione viene effettuato un lavaggio con 5 mL di H_2O mentre i composti fenolici vengono infine eluiti con 12 mL di acetone che viene successivamente evaporato a secco a 45 °C sotto flusso di N_2 . L'estratto così ottenuto viene infine ripreso con 300 μ L della fase mobile (acqua:metanolo:acido formico - 90:9.9:0.1) ed analizzato.

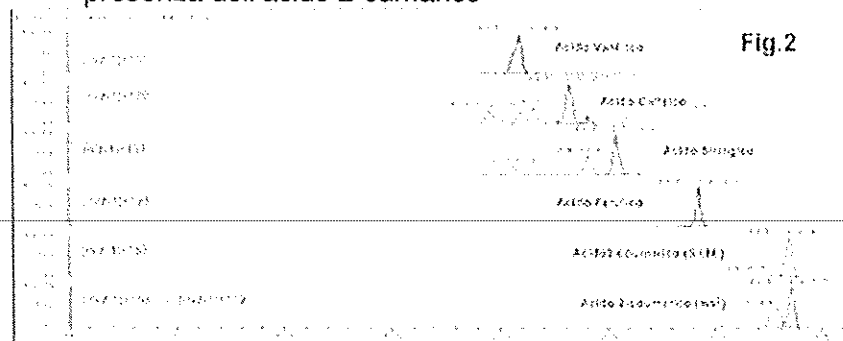
Gli acidi fenolici presenti negli estratti sono stati identificati in base al loro tempo di ritenzione (Tr) e il controllo è stato fatto sul loro Tr relativo ossia in base al rapporto $[(Tr \text{ del campione} / Tr \text{ dello standard}) \times 100]$ che è risultato essere inferiore a 2.5% per tutti gli analiti considerati.

Al fine di valutare la ripetibilità del metodo tre campioni di latte sono stati addizionati di una soluzione standard di acidi fenolici così da ottenere una concentrazione finale di 500 ppb. I valori calcolati del C.V.% sono risultati per quasi tutti gli acidi fenolici esaminati inferiori al limite di 18 previsto dalle vigenti linee guida della Comunità Europea (6).

3) Analisi dei campioni di latte

I risultati della analisi dei dieci campioni di latte di diversa origine hanno evidenziato la presenza di acidi fenolici in tutti i latti esaminati con concentrazioni comprese tra 5 e 100 ppb. In alcuni casi tale presenza è stata confermata dal picco di massa dello ione frammento (ms^2) come nel caso dell'acido 2-cumarico che presenta un picco ms^2 corrispondente alla massa 119 (Fig.2).

Fig.2 - Cromatogramma relativo ad un campione di latte di montagna: si notano i picchi relativi ad alcuni acidi fenolici e il picco dello ione frammento $m=119$ che conferma la presenza dell'acido 2-cumarico



E' da evidenziare che nei latti di montagna si è rilevata la presenza di una maggior concentrazione e di un maggior numero di acidi fenolici rispetto ai latti di pianura.

Se tali risultati venissero confermati da ulteriori approfondimenti si potrebbe ipotizzare l'utilizzo di questi composti quali marcatori di origine del prodotto.

Bibliografia

- 1) Vermerris W, Nicholson R., Phenolic Compounds Biochemistry Springer ed
- 2) Besle J., Lamaison J., Pradel P., Fraisse D., Viala D., Martin B., 2004, Flavonoids, from forages to milk, Renc. Rech. Ruminants, Vol. 11: 67-70.
- 3) Antignac J., Cariou R., Le Bizec B., Cravedi J., Andre F., 2003, Identification of phytoestrogens in bovine milk using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry Rapid Commun. Mass Spectrom., Vol. 17, 1256-64.
- 4) King R., Mano M., Head R., 1998, Assessment of isoflavonoid concentrations in Australian bovine milk samples Journal Dairy Res., Vol. 65, 479-489.
- 5) Dvorakova M., Hulin P., Karabin M., Dostalek P., 2007, Determination of Polyphenols in Beer by an Effective Method Based on Solid-Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection Czech J. Food Sci., Vol. 25, 182-188.
- 6) Official Journal of the European Communities, 17.8.2002, L 221/8.