

SVILUPPO DI UN METODO PER L'ANALISI  
DI ACIDI FENOLICI NEL LATTEBernardo SCURSATONE<sup>1\*</sup>, Vincenzo GERBI<sup>1</sup>, Giuseppe ZEPPA<sup>1</sup>

## INTRODUZIONE

Le piante sintetizzano molti composti organici, generalmente ritenuti metaboliti secondari, tra i quali spiccano i composti fenolici, molecole aromatiche largamente diffuse nel regno vegetale, la cui presenza e tipologia è correlata al colore, alle caratteristiche sensoriali e nutrizionali, nonché al potere antiossidante della pianta stessa. I composti fenolici sono inoltre coinvolti nella crescita e riproduzione delle piante, nonché nelle loro capacità difensive nei confronti di predatori e patogeni.

Tra i vari composti fenolici spiccano gli acidi fenolici, costituiti da un anello aromatico legato ad una corta catena acidica e uno o più gruppi ossidrilici e metossilici [1], che in relazione al loro elevato valore nutrizionale ed al loro spiccato potere antiossidante sono stati ampiamente studiati e la loro presenza evidenziata in numerosi alimenti.

Tali composti possono essere inoltre utilizzati quali traccianti di qualità e di origine in particolare nei prodotti lattiero caseari [2-4], benché gli studi condotti sull'argomento siano però molto scarsi e non esista al momento alcun lavoro che ne attesti la presenza nel latte o in altri prodotti lattiero caseari.

Lo scopo di questo lavoro è stato quindi quello di colmare questa lacuna mettendo a punto un metodo per l'estrazione e la determinazione mediante HPLC/DAD di questi composti nel latte.

## MATERIALI E METODI

a) *Estrazione degli acidi fenolici* – A 20 mL di latte sono stati addizionati 9 mL di acetone ed 1 mL di tampone acetato al fine di precipitare la frazione proteica ed estrarre gli acidi fenolici. L'estratto acetone è stato quindi evaporato con un flusso di azoto a 52°C ed alla soluzione acquosa restante è stata aggiunta  $\beta$ -Glucuronidase al fine di idrolizzare gli acidi fenolici legati all'acido glucuronico [2, 3]. Al termine dell'idrolisi (~ 12 ore a 37 °C) l'estratto è stato purificato e concentrato mediante passaggio su cartuccia DPA-6S.

La cartuccia è stata preventivamente lavata con metanolo ed attivata con H<sub>2</sub>O. Dopo il passaggio del campione è stato effettuato un lavaggio con 5 mL di

---

\* *Corrispondenza ed estratti:* bernardo.scursatone@unito.it

<sup>1</sup> Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali, Settore di Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Torino. Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO).

H<sub>2</sub>O mentre i composti fenolici sono stati eluiti con 12 mL di acetone. La soluzione è stata successivamente portata a secco a 45°C sotto flusso di N<sub>2</sub> [5] e l'estratto così ottenuto infine ripreso con 300 µL della fase mobile (acqua:metanolo:acido formico - 90:9,9:0,1) ed analizzato.

b) *Sistema cromatografico* - L'analisi è stata condotta con un sistema HPLC dotato di autocampionatore e rivelatore a Diode Array. Gli analiti sono stati separati su colonna C<sub>18</sub>-RP Lichrosphere da 250 mm di lunghezza e 4,6 di diametro. La metodica utilizza acido trifluoroacetico come modificatore di acidità della fase acquosa e acetonitrile nella fase organica. I solventi utilizzati sono quindi una soluzione allo 0,1 % di acido trifluoroacetico in acqua ultrapura (solvente A) ed una soluzione all'80% di acetonitrile in solvente A. Il gradiente utilizzato è il seguente: 0 min 100% A, 5 min 98% A, 10 min 96% A, 15 min 90% A, 30 min 80% A, 35 min 70% A, 40 min 0% A, 45 min 100% A.

Il flusso della fase mobile è stato di 1,5 mL/min ed il volume iniettato di 20 µL. I dati sono stati acquisiti in modalità scan da 210 a 360 nm e con lunghezze d'onda (λ) discrete a 280 e 325 nm. Per ogni acido fenolico è stato registrato lo spettro alla concentrazione di 1 ppm al fine di poter effettuare l'analisi qualitativa, mentre l'analisi quantitativa è stata condotta sulle aree dei picchi degli analiti calcolate al massimo di assorbimento di ogni analita.

La messa a punto del metodo cromatografico è stata effettuata su soluzioni standard di 21 acidi fenolici ed è stata ottenuta una separazione valle-valle per tutti gli analiti tranne che per l'acido siringico e l'acido 3-idrossi-4-metossibenzoico.

I coefficienti di regressione lineare (R<sup>2</sup>) delle rette di taratura calcolate su 5 punti (0,05-0,1-0,5-1-2,5 ppm) sono risultate ottimali per tutti gli analiti (Tab. 1).

L'identificazione degli analiti è stata ottenuta tramite confronto spettrale e quindi il valore di Similarità (che varia da un minimo di 0 ad un massimo di 1) è stato posto superiore a 0,9 per un'identificazione positiva.

c) *Campioni* - Il metodo è stato testato su 21 campioni di latte di cui nove provenienti da allevamenti di montagna e 10 da allevamenti di fondovalle.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

In una prima fase di valutazione del metodo sono stati analizzati 7 campioni di latte preventivamente addizionati dei 19 acidi fenolici in studio alla concentrazione di 0,5 ppm. E' risultato che la ripetibilità del metodo, calcolata mediante il Coefficiente di Variazione percentuale (CV%), è risultata inferiore al 17% per 10 analiti, mentre la resa di estrazione è risultata variare da un minimo del 7% per l'acido siringico ad un massimo del 75% per il 4-idrossibenzoico.

Il metodo è stato successivamente applicato nell'analisi di alcuni campioni di latte provenienti da allevamenti di montagna e di pianura utilizzando l'acido cinnamico quale standard interno. I risultati ottenuti hanno evidenziato, per la prima volta, la presenza nel latte di quattro acidi fenolici: il ferulico, il vanillico,

il 3,4-di-idrossibenzoico ed il 4-idrossibenzoico (Fig. 1). Mentre gli ultimi due sono risultati ugualmente presenti nei latti di montagna così come in quelli di pianura, l'acido vanillico è risultato presente solo nei latti di pianura ed il ferulico solo in quelli di montagna.

Tabella 1 – Tempo di ritenzione (Rt), coefficiente di regressione (R<sup>2</sup>) e Limite di Rilevabilità (LOD, mg/L) di 21 acidi fenolici.  
*Table 1 – Retention time (Rt), regression coefficient (R<sup>2</sup>) and Limit of Detection (LOD, mg/L) for 21 phenolic acids.*

| Compound name  | Rt   | R <sup>2</sup> | LOD   |
|--|------|----------------|-------|
| 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (Gallic acid)             | 8,3  | 1,000          | <0,05 |
| 3,4-dihydroxybenzoic acid (Protocatechuic acid)        | 12,8 | 0,999          | <0,05 |
| 3,5-dihydroxybenzoic acid ( $\alpha$ -resorcylic acid) | 14,3 | 0,999          | <0,05 |
| 2,3,4-trihydroxybenzoic acid                           | 14,7 | 0,999          | <0,05 |
| 4-hydroxybenzoic acid                                  | 17,7 | 0,999          | 0,01  |
| 2,5-dihydroxybenzoic acid (Gentisic acid)              | 19,0 | 0,999          | <0,05 |
| 3-hydroxybenzoic acid                                  | 20,5 | 0,998          | <0,05 |
| 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid (Vanillic acid)        | 20,9 | 0,997          | 0,01  |
| 2,4-dihydroxybenzoic acid ( $\beta$ -resorcylic acid)  | 21,7 | 1,000          | <0,05 |
| 2,3-dihydroxybenzoic acid                              | 22,2 | 0,995          | <0,05 |
| 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid (Isovanillic acid)     | 22,6 | 0,998          | <0,05 |
| 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid (Siringic acid)    | 22,6 | 0,998          | 0,01  |
| 3,4-dihydroxycinnamic acid (Caffeic acid)              | 23,0 | 1,000          | 0,01  |
| 4-hydroxycinnamic acid (4-coumaric acid)               | 28,1 | 0,999          | 0,01  |
| 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid (Ferulic acid)        | 30,8 | 0,997          | 0,01  |
| 3-hydroxycinnamic acid (3-coumaric acid)               | 31,4 | 0,998          | 0,01  |
| 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (Sinapic acid)    | 31,8 | 0,999          | 0,01  |
| 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid (Isoferulic acid)     | 32,8 | 0,997          | <0,05 |
| 2-hydroxybenzoic acid (Salicylic acid)                 | 34,1 | 0,996          | <0,05 |
| 2-hydroxycinnamic acid (2-coumaric acid)               | 34,6 | 0,999          | <0,05 |
| Cinnamic acid  | 39,0 | 0,998          | 0,01  |

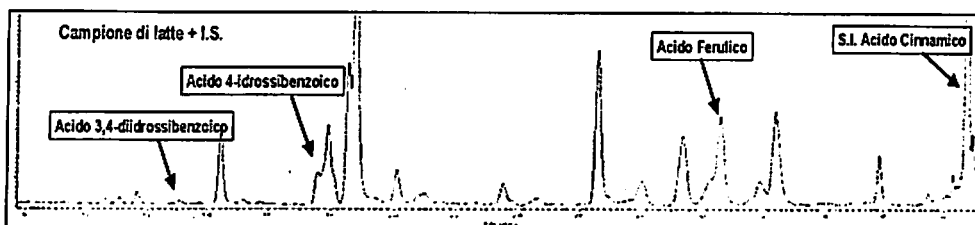


Figura 1 – Cromatogramma relativo ad un campione di latte. Sono visibili i picchi relativi ad alcuni acidi fenolici ed allo standard interno (IS).

Figure 1 – Chromatogram of a milk sample. Are reported the peaks relative to phenolic acids and to the internal standard (IS).

#### CONCLUSIONI

Il metodo sviluppato oltre ad essere di facile esecuzione ed a presentare una buona resa di estrazione ha consentito di evidenziare per la prima volta la presenza nel latte di acidi fenolici.

Benchè si tratti di risultati preliminari e siano necessari ulteriori approfondimenti sembra evidenziarsi infine una significativa differenza fra i lattici di fondovalle e quelli di alpeggio relativamente al contenuto in acidi fenolici e questo consente di ipotizzarne l'utilizzo quali marker di tracciabilità del prodotto.

**RIASSUNTO** - I composti fenolici sono composti essenziali per la crescita e la riproduzione delle piante così come per la loro difesa da predatori e patogeni. Tra questi composti, che si differenziano in varie classi in funzione della loro struttura molecolare, stanno assumendo rilevante importanza nutrizionale gli acidi fenolici suddivisibili a loro volta in due classi distinte di derivati, quelli dell'acido benzoico e quelli dell'acido cinnamico. Benchè la presenza degli acidi fenolici nei prodotti lattiero caseari sia stata ipotizzata, non esistono metodi per la determinazione di questi composti nel latte. Lo scopo di questo lavoro è stato quindi quello di sviluppare un metodo per la determinazione degli acidi fenolici nel latte e di valutare la possibilità di un loro utilizzo per la rintracciabilità dei prodotti lattiero-caseari. La procedura analitica adottata comprende 4 fasi: 1) estrazione degli analiti di interesse con acetone e tampone acetato (pH=4,6); 2) idrolisi degli acidi fenolici coniugati mediante enzima  $\beta$ -Glucuronidasi a 37°C; 3) purificazione per rimuovere gli interferenti coestratti mediante una estrazione in fase solida utilizzando colonnine DPA-6S; 4) analisi mediante HPLC operante in fase inversa e rivelazione con Diode Array operante in modalità fullscan. La separazione su colonna cromatografica è risultata valle-valle per 21 acidi fenolici tranne che per l'acido siringico e il 3-idrossi-4-metossibenzoico che coeluiscono. Le rese di estrazione sono risultate elevate mentre i coefficienti di variazione molto contenuti. Il metodo è stato infine applicato su alcuni campioni di latte provenienti da allevamenti di montagna e di fondovalle evidenziando

la presenza di quattro acidi fenolici di cui uno (acido vanillico) presente solo nei lattini di fondovalle ed uno (acido ferulico) solo in quelli di alpeggio.

*Parole chiave:* acidi fenolici, latte, HPLC, tracciabilità

**SUMMARY – Development of a method of analysis for phenolic acids in milk.** – Phenolic compounds are secondary metabolites of plants generally involved in defence against ultraviolet radiation or aggression by pathogens. Among the different classes of these compounds, defined according to their molecular structure, very important are the phenolic acids, constituted of a phenolic ring bonded to a short acidic chain and one or more –OH and –OCH<sub>3</sub> groups. These compounds can be distinguished in two classes, the derivatives of benzoic acid and the derivatives of cinnamic acid. The aim of this work was to develop and validate a method of analysis for these compounds in milk in which have never been determined before and use them for traceability purpose. The analytical procedure includes four steps: 1) extraction of phenolic acids with acetone and acetate buffer (pH=4,6); 2) hydrolysis of the conjugated phenolic acids using  $\beta$ -glucuronidase at 37°C; 3) clean up, with a solid-phase extraction to remove co-extracted materials with a DPA-6S cartridge and finally 4) analysis with reversed phase liquid chromatography and an UV diode array detector, operating in full scan modality. Chromatographic separation was valley-valley for 21 phenolic acids except for siringic acid and 3-hydroxy-4-metoxybenzoic acid that coelute. Extraction recoveries were good and variation coefficient were low. Analysis of lowland and highland milk samples were performed with this new method and results showed the presence of 4 phenolic acid: vanillic acid is present only in lowland milks, ferulic acid is present only in highland milks while 3,4- and 4-hydroxybenzoic acids were ubiquitous.

*Keywords:* phenolic acids, milk, HPLC, traceability

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

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Vermerris W, Nicholson R (2006). *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, 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., 17, 1256-1264.
- 4) King R, Mano M, Head R (1998). *Assessment of isoflavonoid concentrations in Australian bovine milk samples*. J. Dairy Res., 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., 25, 182-188.