



VALORIZZAZIONE DELLA PRODUZIONE AGRUMARIA

Caratterizzazione e determinazione di flavonoidi e carboidrati mediante Hplc

Obiettivo di questa presentazione è la valorizzazione dei residui di lavorazione agrumaria al fine di una loro possibile utilizzazione in campo alimentare. In particolare lo studio è stato rivolto alla determinazione di composti con spiccata azione antiossidante, quali i flavonoidi, al contenuto in fibra alimentare e zuccheri semplici. Lo studio presenta la caratterizzazione mediante Hplc di flavonoidi e carboidrati dei prodotti di risulta dell'essiccamento in forno delle scorze di agrumi ottenute dalla lavorazione di alcune varietà pigmentate del *Citrus Sinensis* (var. Moro, Tarocco e Sanguinello) e di *Citrus limon* nella produzione di succhi di frutta.

Negli ultimi anni è aumentata fortemente, nell'opinione pubblica e scientifica, la consapevolezza che l'assunzione con la dieta di antiossidanti può risultare un valido contributo per il benessere dell'organismo. L'effetto positivo degli antiossidanti sulla salute è sostenuto da studi nutrizionali ed epidemiologici che mostrano come un basso rischio di malattie cardiovascolari e tumorali sia associato ad un'elevata assunzione di frutta e verdura, in grado di apportare i più elevati contenuti di antiossidanti

della dieta (1). Gli agrumi sono alimenti ricchi di flavonoidi e fibra ed i residui della trasformazione agrumaria possono essere utilizzati per il recupero di sostanze ad alto valore aggiunto come fonte di antiossidanti e di fibra alimentare. Nel presente lavoro sono state messe a punto le condizioni sperimentali per il miglior recupero di alcune di queste sostanze ad alto valore aggiunto, in particolare flavonoidi, cianidina 3-glucoside e fibra alimentare solubile, derivanti dallo smaltimento dei residui della produzione di succhi di frutta.

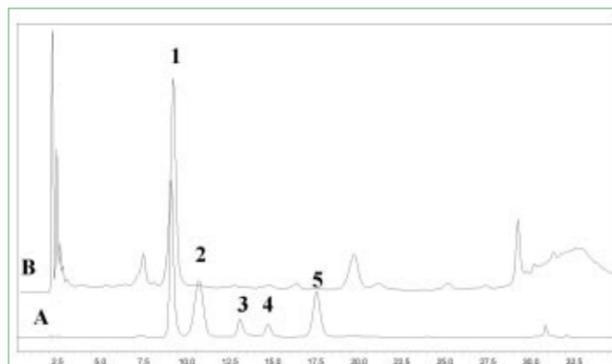


Figura 1 - A) Profilo cromatografico relativo ad una miscela di standard; B) profilo cromatografico relativo ad un campione di scorze di arancia pigmentate; C) profilo cromatografico relativo ad un campione di scorze di limone. Condizioni cromatografiche come riportato nel testo. Identificazione dei picchi: 1) eriocitrina, 2) neoeriocitrina, 3) narirutina, 4) esperidina, 5) naringina, 6) neoesperidina, 7) esperetina

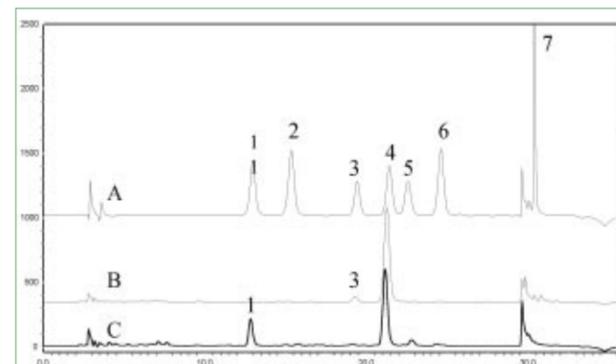


Figura 2 - A) Profilo cromatografico relativo ad una miscela di standard; B) profilo cromatografico relativo ad un campione di scorze di arancia pigmentate; C) profilo cromatografico relativo ad un campione di scorze di limone. Condizioni cromatografiche come riportato nel testo. Identificazione picchi: 1) cianidina-3-glucoside, 2) malvidina-3,5-di-glucoside, 3) delphinidina, 4) peonidina-3-glucoside, 5) malvidina-3-glucoside

Isabella Nicoletti, Istituto di Metodologie Chimiche - CNR Area della Ricerca di Roma - Monterotondo Stazione (Roma); Claudio Corradini, Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica - Università di Parma. claudio.corradini@unipr.it

Nell'ambito di una linea di ricerca, che da alcuni anni portiamo avanti nel nostro istituto in collaborazione con l'Università di Parma, sono stati sviluppati metodi cromatografici innovativi Hplc per la caratterizzazione di flavonoidi e di carboidrati presenti in alimenti. Sulla base di esperienze precedentemente acquisite (2, 3) nel presente lavoro sono presentate due metodiche Hplc di particolare efficacia nell'analisi e caratterizzazione di agrumi, in particolare in riferimento all'impiego di colonne cromatografiche a fase inversa "narrow bore" e sistemi cromatografici a scambio anionico forte in congiunzione con un rivelatore amperometrico pulsato (Hpaec-Pad), specifici per la separazione di carboidrati. In particolare, è stata eseguita la caratterizzazione per il contenuto in flavonoidi, e carboidrati dei prodotti di risulta dell'essiccamento in forno del cascame ottenuto dalla lavorazione degli agrumi di alcune varietà pigmentate del *Citrus Sinensis* (var. Moro, Tarocco e Sanguinello, più comunemente note come "arance rosse di Sicilia") e di *Citrus limon* nella produzione di succhi di frutta. Relativamente ai flavonoidi agrumari, l'interesse è stato incentrato nella determinazione di alcuni flavonoidi, quali eriocitrina, neoeriocitrina, narirutina, esperidina, naringina, neoesperidina ed esperetina. I risultati ottenuti costituiscono un contributo alla valorizzazione delle matrici studiate al fine di utilizzarle come potenziale fonte di antiossidanti di origine naturale per il settore agro-industriale e farmaceutico.

Parte sperimentale

Le analisi di flavonoidi ed antociani sono state eseguite utilizzando un cromatografo Hplc Shimadzu Serie VP correlato di un sistema di controllo mod. SCL-10A_{vp}, due pompe mod. LC-10Ad_{vp}, un forno termostatico mod. CTO-As10_{vp}, sistema di degassaggio in linea DGU-14⁺, iniettore Rheodyne mod. 772511, associato ad un rivelatore a fotodiodi UV-Vis mod. SPD-M10 A_{vp}

Flavonoidi di concentraz. (µg/mL)	Intervallo	Coefficiente di correlaz.
Eriocitrina	6,4-960	0,9994
Narirutina	4,0-600	0,9995
Neoeriocitrina	10,7-1.605	0,9998
Esperidina	62,5-938	0,9999
Naringina	8,6-1.290	0,9992
Neoesperidina	38,5-1.540	0,9990
Esperetina	39,2-1.568	0,9996

gestito da LC- Workstation System mod. Class VP 5.3. La caratterizzazione dei flavonoidi è stata ottenuta utilizzando una colonna narrow-bore Luna (5 µm, 250x2,0 mm D.I.); mediante un'eluizione a gradiente a step fase mobile, A: 0,5% acido formico in acqua/acetonitrile/2-propanolo (84:10:6, v/v). B: 2-propanolo/acetonitrile (70:30 v/v); flusso, 0,2 ml/min; λ =283 nm; temperatura, ambiente. La determinazione degli antociani è stata eseguita utilizzando una colonna Polaris C18A (5 µm, 150x2,0 mm D.I.), fase

mobile, solvente A (acqua-acido formico (9:1 v/v)), solvente B (acetonitrile-acqua-acido formico (5:4:1 v/v)); programma di eluizione a gradiente dal 10% al 18% di Bin A in 7 minuti, isocratica al 18% di B per 4 minuti, dal 18% al 23% di B in A in 6 minuti, dal 23% al 35% di B in A in 10 minuti; flusso, 0,2 mL/min.; temperatura 30 °C±0,1 °C; rivelatore UV, 518 nm. L'estrazione dei flavonoidi è stata eseguita con metanolo/dimetil-solfossido secondo la procedura riportata in letteratura (4). L'estrazione degli antociani è stata ottenuta mediante alcool metilico acidificata al 2% con acido cloridrico.

Le separazioni dei carboidrati sono state eseguite mediante cromatografo liquido serie 4000i; rivelatore elettrochimico pulsato (PED) (Dionex, Usa); colonna Dionex Carbo Pac PA 100 (250 mmx4,0 mm I.D.) dotata di idonea precolonna. Le separazioni sono state eseguite mediante eluizione a gradiente di sodio/idrossido/sodio acetato. I carboidrati sono stati estratti a caldo (80 °C) in acqua.

Tabella 2 - Eriocirina, narirutina, esperidina espressi in g/kg di prodotto

Campioni	Eriocirina	Narirutina	Esperidina
Arancia rossa A	-	9,86 (±0,1)	35,67 (±0,4)
Arancia rossa B	-	10,1 (±0,3)	37,59 (±0,5)
Arancia rossa C	-	8,68 (±0,3)	27,9 (±0,5)
Arancia rossa D	-	11,10 (±0,2)	38,82 (±0,3)
Limone A	3,15 (± 0,06)	-	8,92 (±0,1)
Limone B	2,26 (± 0,02)	-	9,29 (± 0,2)
Limone C	3,32 (±0,05)	-	9,43 (±0,5)
Limone D	1,95 (±0,05)	-	7,39 (±0,6)
Limone E	3,03 (±0,03)	-	7,57 (±0,1)

Risultati

Le determinazioni quantitative di flavonoidi sono state eseguite sulla scorza di differenti varietà di agrumi (*Citrus sinensis* e *citrus limon*). In Figura 1 sono riportati i profili cromatografici ottenuti. Il dosaggio dei flavonoidi è stato eseguito mediante il metodo dello standard esterno. La retta di calibrazione sono state realizzate analizzando in triplicato

Valorization of Byproducts from Citrus Fruit Processing. Characterization and Determination of Flavonoids and Carbohydrates by Hplc

The aim of the present work was to valorise the by-products generated from citrus fruit processing, and to use them as a potential natural source of antioxidant compounds, as well as functional food ingredients rich in soluble fibres. The present investigation was carried out to identify and quantify by Hplc flavonoids and carbohydrates present in dried citrus rind of some varieties of *Citrus Sinensis* (cultivar Moro, Tarocco e Sanguinello) and *Citrus lemon*.

ABSTRACT

soluzioni standard a cinque differenti concentrazioni comprese nell'intervallo riportati in Tabella 1. In Tabella 2 sono riportati i valori delle determinazioni quantitative relative ai campioni di scorze di agrumi essiccati. Il recupero è risultato compreso tra 98 e 102%. La caratterizzazione delle antocianine è stata eseguita mettendo a punto un metodo le cui condizioni operative sono riportate nella parte sperimentale; in Figura 2 sono riportati i profili cromatografici ottenuti. La determinazione quantitativa delle antocianine nelle scorze di arancia pigmentata (Tabella 3) ha confermato la presenza di una miscela di composti, il principale rappresentato dalla cianidina 3-O-glucoside.

Tale risultato non si discosta dalla composizione dei succhi di arancia e si allinea con i valori medi riportati in letteratura. La

Tabella 3
Cianidina-3-glucoside
espressa in mg/kg

Campioni	Cianidina-3-glucoside mg/kg	Antociani totali mg/kg
Arancia rossa A	1,97 ($\pm 0,02$)	4,2 ($\pm 0,02$)
Arancia rossa B	3,61 ($\pm 0,01$)	4,94 ($\pm 0,02$)
Arancia rossa C	2,08 ($\pm 0,01$)	3,06 ($\pm 0,02$)
Arancia rossa D	0,28 ($\pm 0,03$)	1,12 ($\pm 0,03$)

determinazione degli zuccheri semplici è stata eseguita mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione a scambio anionico forte ad alti valori di pH e rivelazione amperometrica pulsata (Hpaec-Pad), seguendo procedure di analisi precedentemente messe a punto (5, 6). In particolare la determinazione di glucosio, fruttosio e saccarosio è stata eseguita mediante il metodo dello standard interno, impiegando arabinosio. I risultati sono mostrati in Tabella

4. Inoltre è stata verificata l'eventuale presenza di frazioni oligosaccaridiche solubili. I risultati conseguiti sono riportati in Tabella 5. I campioni sono stati analizzati seguendo una procedura simile a quella proposta da Grigelmo-Miguel e Martin-Belloso (7) ed al metodo ufficiale AOAC di Prosky *et al.* (8).

Tabella 4 - Glucosio, fruttosio e saccarosio
espressi in g/100 g (s.s.) di prodotto

Campioni	Glucosio	Fruttosio	Saccarosio
Arancia rossa A	6,31 ($\pm 0,1$)	3,86 ($\pm 0,1$)	3,23 ($\pm 0,2$)
Arancia rossa B	11,72 ($\pm 0,1$)	10,52 ($\pm 0,2$)	3,96 ($\pm 0,1$)
Arancia rossa C	10,18 ($\pm 0,2$)	8,47 ($\pm 0,1$)	3,21 ($\pm 0,1$)
Arancia rossa D	9,71 ($\pm 0,1$)	8,14 ($\pm 0,1$)	2,89 ($\pm 0,1$)
Limone A	6,33 ($\pm 0,2$)	4,27 ($\pm 0,2$)	3,10 ($\pm 0,2$)
Limone B	6,05 ($\pm 0,2$)	3,92 ($\pm 0,1$)	3,20 ($\pm 0,2$)
Limone C	5,92 ($\pm 0,2$)	4,14 ($\pm 0,1$)	4,15 ($\pm 0,1$)
Limone D	6,14 ($\pm 0,2$)	3,43 ($\pm 0,1$)	2,91 ($\pm 0,1$)
Limone E	5,75 ($\pm 0,1$)	3,78 ($\pm 0,1$)	2,85 ($\pm 0,1$)

Tabella 5

Campione	Fibra insolubile	Fibra solubile	Fibra totale
Arancia rossa A	42,01 ($\pm 1,44$)	23,21 ($\pm 0,92$)	65,23 ($\pm 1,37$)
Arancia rossa B	40,10 ($\pm 1,05$)	22,76 ($\pm 0,89$)	62,85 ($\pm 1,34$)
Arancia rossa C	44,31 ($\pm 1,35$)	19,24 ($\pm 0,78$)	64,12 ($\pm 1,49$)
Arancia rossa D	38,25 ($\pm 0,59$)	21,14 ($\pm 0,74$)	59,40 ($\pm 1,33$)
Limone A	39,24 ($\pm 0,53$)	22,27 ($\pm 0,62$)	61,52 ($\pm 1,55$)
Limone B	40,63 ($\pm 0,82$)	23,06 ($\pm 0,89$)	63,07 ($\pm 1,14$)
Limone C	42,74 ($\pm 0,75$)	18,92 ($\pm 0,72$)	61,85 ($\pm 1,81$)
Limone D	40,02 ($\pm 0,47$)	22,12 ($\pm 0,61$)	62,15 ($\pm 1,64$)
Limone E	39,77 ($\pm 0,43$)	21,97 ($\pm 0,82$)	61,75 ($\pm 1,55$)

Ringraziamenti: Gli autori ringraziano sentitamente la Ortogel SpA di Caltagirone (CT) per aver gentilmente fornito tutti i campioni oggetto del presente studio.

Bibliografia

- (1) S.A. Averne, N.M. o'Brien, *Nutr and Cancer*, 1999, **34**, 160.
- (2) C. Corradini *et al.*, *Am. Lab.*, 2001, **33**, 18.
- (3) C. Corradini *et al.*, *Ann. Chim.*, 2002, **92**, 387.
- (4) S. Kawaii *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 3565.
- (5) C. Corradini *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 1997, **91**, 343.
- (6) C. Corradini, Separazione e caratterizzazione di carboidrati in matrici agroalimentari mediante Hpaec, in *La Cromatografia ionica nell'analisi alimentare*, a cura di S. Cavalli, C. Sarzanini, Nuova Poligrafica Milanese, 2001, 113.
- (7) N. Grigelmo-Miguel, O. Martin-Belloso, *Food Res. Int.*, 1999, **31**, 355.
- (8) L. Prosky *et al.*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1988, **71**, 1017.

