

di Danilo Corradini
 Istituto di Metodologie
 Chimiche del CNR
 Area della Ricerca di Roma 1
 danilo.corradini@imc.cnr.it



METODOLOGIE CROMATOGRAFICHE INNOVATIVE

Impiego nello studio e nell'analisi di biomolecole in matrici agroalimentari

La Giornata di Studio "Metodologie Cromatografiche Innovative per lo Studio e l'Analisi di Biomolecole in Matrici Agroalimentari", svoltasi lo scorso luglio, presso l'Area della Ricerca di Roma 1 del CNR in Montelibretti (Roma) ha fornito un'ampia e qualificata panoramica delle più recenti ed avanzate tecniche cromatografiche utilizzate per lo studio, la caratterizzazione e il dosaggio di biomolecole in matrici agroalimentari. L'incontro è stato organizzato nell'ambito di una collaborazione in atto tra l'Istituto di Metodologie Chimiche del CNR (IMC) e la Shimadzu Italia Srl, finalizzata allo sviluppo di metodologie analitiche cromatografiche innovative. L'evento è stato patrocinato dal Gruppo Interdivisionale di

Scienza delle Separazioni della Società Chimica Italiana e dalla European Separation Science Society ed ha raccolto l'adesione di oltre 80 partecipanti, provenienti da Università, Enti di ricerca e imprese private, prevalentemente dell'Italia centro-meridionale.

Il programma scientifico è consistito in otto comunicazioni presentate da studiosi provenienti dalle Università di Messina, Roma "La Sapienza" e Viterbo "La Tuscia"; dagli Istituti del CNR di Metodologie Chimiche (Montelibretti) e di Genetica Vegetale (Bari); dalla Shimadzu Italia Srl e dalla Avantech Srl (Angrì). Sono state inoltre eseguite due esercitazioni pratiche presso i laboratori dell'Istituto di Metodologie Chimiche nel corso delle quali i partecipanti alla Giornata

di Studio hanno potuto cimentarsi nella separazione di ormoni vegetali mediante HPLC-DAD-MS e stilbeni mediante HPLC-DAD, assistiti dai Dr. Nicoletti e Tonci e dal Sig. Della Posta dell'IMC.

I lavori sono stati aperti dal Direttore dell'Istituto di Metodologie Chimiche del CNR, Giancarlo Angelini, che ha presentato l'Istituto da lui diretto, accennando alla sua costituzione, avvenuta nel 2002 dall'unione dell'Istituto di Chimica Nucleare, dell'Istituto di Cromatografia, del Servizio di Risonanza Magnetica Nucleare e del Centro Studi sui Meccanismi di Reazione del CNR, ed all'attività di ricerca dall'IMC, finalizzata allo sviluppo e innovazione di metodologie chimiche utili ad accrescere le conoscenze scientifiche di base e a

sostenere lo sviluppo di tecnologie avanzate in diversi ambiti applicativi in campo chimico, agroalimentare, ambientale, della conservazione dei beni culturali e della progettazione molecolare.

La prima relazione è stata presentata da Isabella Nicoletti dell'Istituto di Metodologie Chimiche del CNR, che ha illustrato l'attività di ricerca da lei svolta per la messa a punto di metodologie analitiche separative mediante cromatografia liquida ad elevate prestazione (HPLC) con rivelatore a serie di fotodiodi (DAD), sviluppate per l'identificazione e il dosaggio di stilbeni e flavonoidi nei prodotti della filiera viti-vinicola. L'interesse per questi composti chimici presenti in diversi alimenti è motivato dalla

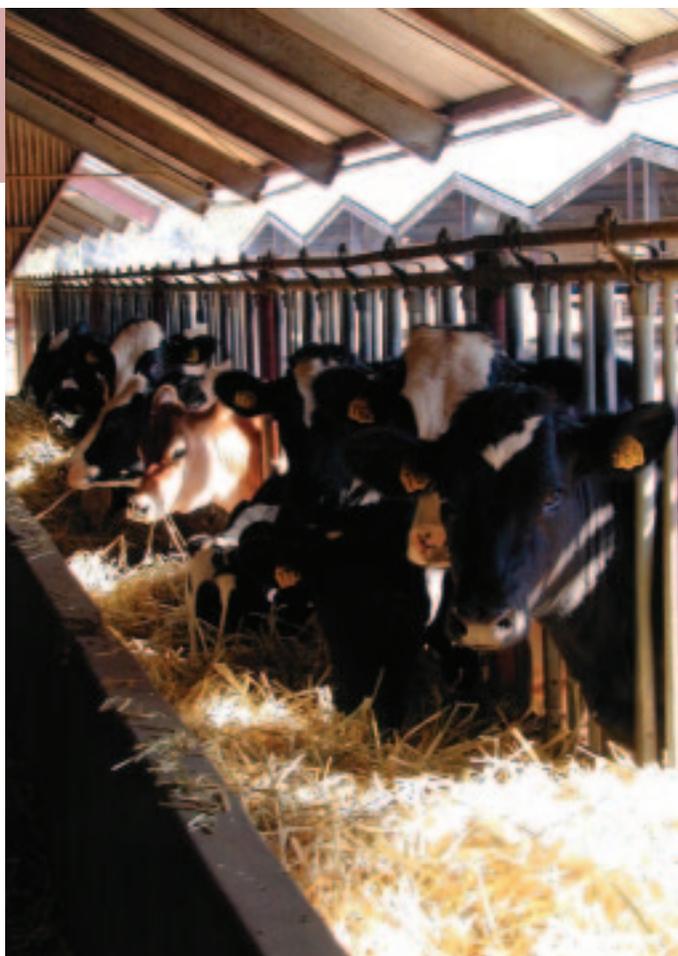
sua attività di un gene di origine vegetale (*Vitis vinifera* cv Lambrusco) che codifica per un enzima chiave nella biosintesi di composti dalla forte attività antiossidante (stilbeni) sintetizzati a partire da precursori naturali già presenti nella pianta ospite.

Manuel Sergi ha descritto l'impiego di un metodo rapido ed efficiente per l'analisi HPLC-MS-MS di sulfamidici nelle carni e negli omogeneizzati per l'alimentazione nella prima infanzia. Il metodo, sviluppato con Roberta Curini e Alessandra Gentili dell'Università di Roma "La Sapienza", è basato sull'estrazione rapida dei sulfamidici in ambiente acquoso e la loro successiva separazione cromatografica mediante HPLC e rivelazione mediante MS tandem.

La relazione ha posto in evidenza i vantaggi che derivano dall'estrazione dei sulfamidici in fase acquosa, riconducibili alla scarsa affinità dell'acqua per la matrice grassa e al basso costo ed impatto ambientale di questo solvente.

Benedetta Margiotta, dell'Istituto di Genetica Vegetale del CNR (Bari), ha illustrato l'applicazione della HPLC a ricerche condotte in collaborazione con Domenico Lafiandra, dell'Università della Tuscia (Viterbo), per lo studio e la caratterizzazione delle proteine del glutine. Queste proteine sono costituite da gliadine monomeriche e glutenine polimeriche. La relazione ha evidenziato che le subunità gluteniniche possono essere classificate da un punto di

loro attività antiossidante, capace di esercitare un effetto protettivo nei confronti dei meccanismi di degenerazione e d'invecchiamento che sono alla base di numerose malattie, incluse quelle cardiovascolari ed alcune forme di tumore. La relazione ha anche illustrato l'applicazione delle metodologie cromatografiche da lei messe a punto in studi condotti in collaborazione con l'Istituto di Scienza delle Produzioni Alimentari del CNR (Lecce), finalizzati alla valorizzazione nutrizionale di piante agronomicamente e nutrizionalmente rilevanti, quale il pomodoro del tipo "cherry", mediante l'inserimento e l'espressione nei tes-



vista funzionale in relazione a numero e posizione dei residui cisteinici, in base ai quali le subunità gluteniniche possono essere classificate in allungatori di catena (quelle subunità che hanno due residui cisteinici disponibili per formare ponti disolfuro intermolecolari); terminatori di catena (quelle subunità che hanno una sola cisteina che perciò, una volta legata ad un'altra subunità, arresta la crescita del polimero gluteninico in quella direzione); ramificatori di catena (quelle subunità che hanno tre o più cisteine libere di legarsi con altre subunità gluteniniche). La relazione ha inoltre posto in evidenza la correlazione positiva tra contenuto pro-

teico, quantità di subunità gluteniniche, dimensioni dei polimeri gluteninici e caratteristiche visco-elastiche del glutine.

Tiina Kumm ha illustrato i risultati di recenti studi, condotti sotto la guida di Luigi Mondello e Paola Dugo dell'Università di Messina, sull'applicazione della cromatografia liquida multidimensionale all'analisi di trigliceridi in matrici agroalimentari. La metodologia sviluppata utilizza un sistema comprehensive Ag+LCxNARP-LC con una colonna "micro bore" a scambio cationico (argentata in laboratorio) in fase normale nella prima dimensione e una colonna monolitica C18 in fase inversa per la seconda dimensione. Pertanto i trigliceridi sono dapprima separati secondo il loro



grado di insaturazione e, successivamente, secondo il loro numero di PN (PN=CN-2DB). L'identificazione dei picchi è effettuata usando come rivelatore lo spettrometro di massa con interfaccia APCI (dopo la seconda dimensione) e considerando i tempi di ritenzione delle due dimensioni. Con questo tipo di analisi, ad ogni composto identificato corrispondono due tempi di ritenzione, ed inoltre, nello spazio bidimensionale è possibile individuare delle zone caratteristiche per famiglie o classi omologhe di composti, la cui collocazione è strettamente correlata alla loro natura chimica, che, nel caso di trigliceridi, sono il numero di PN e il numero di doppi legami. Danilo Sciarrone ha presentato un sistema

gas cromatografico multidimensionale (MDGC), recentemente sviluppato da Luigi Mondello e Paola Dugo, coadiuvati da Alessandro Casilli e Peter Q. Tranchida, tutti dell'Università di Messina, applicato ad analisi convenzionali e fast di una serie di composti chirali presenti in un olio di rosmarino. Il cuore del sistema MDGC è un semplice sistema di trasferimento per la rapida e sequenziale re-iniezione di heart-cuts dalla prima alla seconda dimensione. Il sistema di trasferimento non ha restrizioni di temperatura, possiede volumi morti molto piccoli e permette di effettuare analisi multidimensionali tramite un meccanismo di bilanciamento delle pressioni. Il sistema MDGC è caratterizzato da due

tificazione di alcune classi di composti, quali, ad esempio, monoterpeni e sesquiterpeni, che, a causa delle loro similarità strutturali, comportano l'ottenimento di spettri di massa molto simili e in alcuni casi identici. La libreria innovativa, denominata Flavour & Fragrance Natural & Synthetic Compounds (FFNSC 1.2), si avvale per l'identificazione dei componenti volatili, oltre che del dato spettroscopico, anche di un parametro cromatografico quale l'indice di ritenzione lineare (LRI). La libreria è dotata di un software interattivo che correla il database di spettri di massa con gli indici di ritenzione lineare, rendendo l'identificazione di un composto particolarmente semplice ed affidabile.

forni GC, che permettono quindi l'uso di programmate di temperature indipendenti, e dalla possibilità di utilizzare uno spettrometro di massa o un rivelatore a ionizzazione di fiamma. La relazione ha evidenziato che la metodica fast permette di ottenere gli stessi risultati analitici, in un tempo inferiore di circa cinque volte, mediante l'utilizzo di colonne micro bore in entrambe le dimensioni. Il sistema ha permesso un'ottima riproducibilità quali/quantitativa.

Vincenzo Casilli (Università di Messina e Avantech Srl, Anagni) ha illustrato gli studi intrapresi presso l'Università di Messina con i Prof. Luigi Mondello e Paola Dugo, coadiuvati da Costa, Fina e Scala, per la stesura di una libreria GC-MS innovativa per l'identificazione dei componenti volatili di matrici complesse. La relazione ha evidenziato le limitazioni delle librerie attualmente in commercio, soprattutto nell'iden-

Lo scrivente ha presentato una panoramica degli studi in corso presso l'Unità di Ricerca dell'Istituto di Metodologie Chimiche del CNR di cui è responsabile, finalizzati allo sviluppo e innovazione di metodologie analitiche separative e spettroscopiche, utili ad accrescere le conoscenze scientifiche di base e a sostenere lo sviluppo di tecnologie avanzate di produzione, conservazione e distribuzione di alimenti che rispondono a requisiti di massima sicurezza, salubrità e minimo impatto ambientale, oltre che per l'accertamento della qualità, tipicità e origine degli alimenti e dei mangimi, con particolare attenzione agli alimenti di filiere agroalimentari di rilevante importanza per l'area mediterranea. In particolare, la relazione ha illustrato i risultati degli studi in corso per sviluppare metodologie analitiche separative per il riconoscimento e dosaggio di fitormoni,

loro metaboliti e molecole biologicamente attive estratte da organismi vegetali, condotte per mezzo della HPLC-MS con tecniche di ionizzazione a pressione atmosferica, sia per elettro-nebulizzazione (*Electrospray Ionization*, ESI), sia mediante ionizzazione chimica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI). È

l'alloggiamento del naso dell'operatore. La tecnica, che rappresenta l'unico modo per sfruttare al massimo l'elevato potere risolutivo della gascromatografia con l'elevata sensibilità e selettività del naso umano, è stata resa più semplice ed accurata mediante la progettazione di un software di ausilio all'operatore per riportare le sensa-

cedentemente illustrate in aula da Michela Tonci di questo Istituto, che hanno fornito ai partecipanti la possibilità di vedere all'opera due cromatografi liquidi muniti di rivelatore a serie di fotodiodi, uno dei quali accoppiato ad uno spettrometro di massa con sorgente di ioni a pressione atmosferica (ESI e APCI), con i quali sono state ese-



stato anche illustrato l'impiego della HPLC-MS per la separazione, identificazione e dosaggio di flavonoidi estratti dalle parti edibili e di scarto dei carciofi.

Giacinto Errante ha descritto una strumentazione semplice, di facile utilizzo ed accurata per lo studio olfattometrico di matrici complesse di interesse alimentare e cosmetico con la quale è stato condotto uno studio finalizzato a correlare la differente composizione enantiomerica di oli essenziali di "*Aniba rosaeodora*" e di "*Cinnamomum camphora*" con l'attività odorigena di ogni singolo componente. Lo studio, condotto con Luigi Mondello e Barbara d'A. Zellner dell'Università di Messina, ha utilizzato un sistema gascromatografico munito di sistema di splittaggio a quattro vie per la veicolazione degli analiti, di un detector FID e di una linea di trasferimento riscaldata munita di cono per

zioni odorose percepite con un buon grado di ripetibilità ed in modo dettagliato.

La relazione ha evidenziato le differenze profonde esistenti tra l'attività odorigena di prodotti dotati di attività ottica e la non corrispondenza della sensazione odorosa generata da un differente enantiomero, oltre che la difficile correlazione esistente tra attività odorigena e quantità assoluta di ogni componente presente in una matrice complessa. Errante ha inoltre sottolineato che il risultato raggiunto nello studio è stato quello di rendere disponibile, mediante l'utilizzo di strumentazione commerciale, per un uso diffuso, un sistema di semplice uso e ad elevato grado di accuratezza per l'applicazione della tecnica gascromatografica-olfattometrica.

La Giornata di Studio è stata conclusa da due esercitazioni svolte presso i laboratori dell'Istituto di Metodologie Chimiche, pre-

giate l'analisi del *trans*-resveratrolo in un vino rosso e la separazioni di miscele di ormoni vegetali standard.

Ringraziamenti: Come coordinatore del programma scientifico della Giornata di Studio esprimo la massima gratitudine al Direttore dell'Istituto di Metodologie Chimiche, Giancarlo Angelini e al Presidente dell'Area, Sesto Viticoli, per il sostegno e supporto logistico dato all'iniziativa, la Shimadzu Italia Srl per la fattiva ed efficiente collaborazione, in particolare nelle persone di Roberta Maroni e Cosimo Manzo. Mi congratulo inoltre con tutti gli oratori per avere saputo adeguare lo stile delle loro comunicazioni al carattere divulgativo dell'evento, pur presentando dati di recente ed elevato interesse scientifico. Infine, ma non per ultimo, ringrazio i Colleghi dell'Istituto di Metodologie Chimiche ed in, particolare, Nicoletti, Tonci, Bello, Galanti e Della Posta dell'Unità di ricerca Bioseparazioni Cromatografiche ed Elettroforetiche dell'IMC, senza il cui fondamentale apporto l'iniziativa non sarebbe stata realizzata