



LUCA RIVOIRA
DIPARTIMENTO DI CHIMICA
UNIVERSITÀ DI TORINO
LUCA.RIVOIRA@UNITO.IT

AMMINE BIOGENE NEI VINI

In questo lavoro sono stati sviluppati nuovi approcci analitici per la determinazione delle ammine biogene nei vini tramite derivatizzazione con naftalene-2,3-dicarbossialdeide e dabsyl-cloruro, e analisi HPLC-fluorescenza e HPLC-spettroscopia a lenti termiche. È stato inoltre proposto un metodo di screening rapido basato sulla transglutaminazione delle ammine e sulla reazione di Berthelot.

Le ammine biogene (BAs) sono composti azotati prodotti per decarbossilazione microbica degli aminoacidi. La presenza di ammine biogene è stata più volte evidenziata in cibi e bevande, in particolare nelle matrici alimentari fermentate (l'enzima decarbossilasi risulta particolarmente

attivo nei processi fermentativi). Se le concentrazioni di BAs risultano superiori a un determinato livello, la loro presenza provoca un deterioramento delle proprietà organolettiche del cibo/bevanda in cui sono presenti. Se assunte in dosi elevate, le BAs risultano tossiche sia a livello acuto, pro-

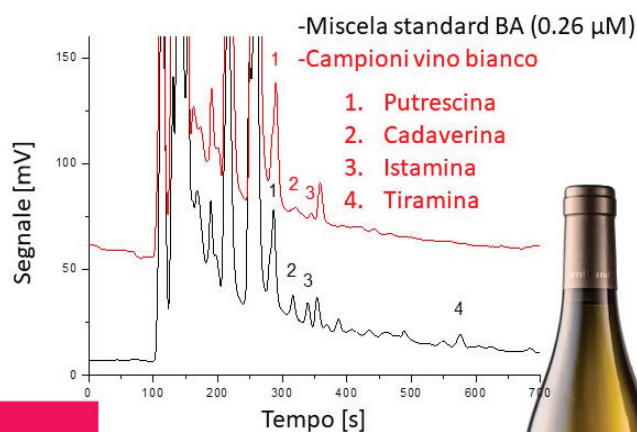


L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.



Analisi di campioni reali HPLC-DBS-TLS

- 2 vini Rebula (Slovenia),
vino bianco



		PUT [mg·L ⁻¹]	CAD[mg·L ⁻¹]	HIS[mg·L ⁻¹]	TYR [mg·L ⁻¹]
Vino A	HPLC-DBS-TLS	0.64±0.02	0.20±0.03	0.08±0.01	< LOD
	HPLC-OPA-FL	0.59±0.13	0.20±0.11	< LOD	< LOD
Vino B	HPLC-DBS-TLS	1.14±0.03	0.25±0.03	0.09±0.01	< LOD
	HPLC-OPA-FL	1.10±0.23	0.15±0.08	< LOD	< LOD

Confronto tra

- Metodo OIV-MA-AS315-18 (HPLC-OPA-FL)
- Metodo HPLC-DBS-TLS



Fig. 2

vocando mal di testa, ipertensione, sia cronico, generando alterazioni cancerogene del DNA. Sulla base di tali premesse, in occasione delle Giornate di Chimica Analitica in memoria del prof. Francesco Dondi, dedicate a tematiche inerenti la Scienza delle Separazioni e la Bioanalitica, ho deciso di portare all'attenzione dei partecipanti il nostro lavoro intitolato "Chromatographic determination of biogenic amines in wines by novel detection approaches".

La ricerca, che si inserisce nell'ambito di una collaborazione internazionale fra il Dipartimento di Chimica dell'Università di Torino, referente Prof. ssa Maria Concetta Bruzzoniti, e il Laboratorio di Scienze Ambientali e della vita dell'Università di Nova Gorica (Slovenia), si basa sulla messa a punto e sul confronto di tecniche analitiche per la determinazione delle BAs nei vini (Fig. 1).

Date le evidenti problematicità delle ammine biogene, nonostante in Europa e in Italia non esista una legge che regoli il livello di concentrazione massima di BAs nei vini, negli anni sono stati

proposti alcuni metodi analitici per la loro determinazione in tale matrice, principalmente basati sulla gascromatografia, sull'elettroforesi capillare e sulla cromatografia liquida. Quest'ultima tecnica è frequentemente accoppiata a una derivatizzazione pre-colonna e a una determinazione con rivelatore UV-Vis. L'ortoftalaldeide (OPA) è l'agente derivatizzante più usato, nonostante sia stata evidenziata una modesta riproducibilità del metodo dovuta alla sua scarsa stabilità.

A partire da tali assunzioni, in questo studio sono stati valutati due nuovi derivatizzanti per le BAs nei vini, il naftalene-2,3-dicarbossilaldeide (NDA) e il dabsyl-cloruro (DBS) con successiva analisi HPLC accoppiata a detector a fluorescenza (HPLC-NDA-FL) e a spettroscopia a lenti termiche (HPLC-DBS-TLS). È importante sottolineare come l'ifenziazione HPLC-TLS, nonostante risulti meno utilizzata della classica HPLC-MS, sia una tecnica che offre alta sensibilità, a prezzi strumentali inferiori. Condizione necessaria per l'applicazione di tale tecnica di rivelazione è che gli analiti (che

vengono eccitati da un raggio laser a una specifica lunghezza d'onda), abbiano un decadimento non fluorescente. È stato infatti dimostrato come il calore rilasciato dalla diseccitazione non fluorescente delle molecole sia proporzionale alla loro concentrazione e la sua misurazione ne permetta la quantificazione. Il DBS non forma complessi fluorescenti con le BAs e quindi si presta ad una rivelazione mediante TLS.

Per lo studio, sono state selezionate le 4 BAs più rappresentative e più presenti nelle matrici alimentari: putrescina, cadaverina, istamina e tiramina.

Dopo una prima ottimizzazione delle condizioni di separazione cromatografica, per entrambi i reagenti, sono state ottimizzate le condizioni di derivatizzazione: tempi di reazione, concentrazione dell'agente derivatizzante e temperatura. Tramite l'utilizzo di tecniche statistiche si sono così individuate, le condizioni sperimentali che portano ad una migliore resa di derivatizzazione delle BAs. Tali condizioni hanno portato ad un notevole risparmio del tempo di derivatizzazione rispetto al metodo proposto dall'*International Organisation of Vine and Wine* (OIV), che utilizza l'OPA. La rapidità di preparazione del campione all'analisi non è tuttavia l'unico parametro di confronto fra i metodi testati; pertanto anche le linearità e le sensibilità dei nuovi metodi sono stati confrontati con quello dell'OIV. Dai risultati ottenuti si osserva come la derivatizzazione con DBS, seguita da analisi tramite HPLC-TLS, offra limiti di rivelabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) inferiori rispetto sia al metodo con NDA che a quello dell'OIV con OPA (es. $LOD_{\text{istamina}} = 11 \mu\text{g/L}$ (DBS), $27 \mu\text{g/L}$ (NDA), $60 \mu\text{g/L}$ (OPA)). Anche per gli altri analiti, sono stati osservati incrementi da 5 a 10 volte rispetto alla metodica OIV.

Il metodo HPLC-DBS-TLS è stato confrontato con il metodo OIV, analizzando due campioni di vino (tipologia Rebula, Slovenia). Come si può osservare in Fig. 2, le concentrazioni di putrescina e cadaverina risultano concordi per i due metodi; l'istamina, invece, viene correttamente quantificata con il metodo HPLC-DBS-TLS, mentre risulta non rivelabile con il metodo OIV che utilizza l'OPA,

confermando quindi la maggiore sensibilità della procedura da noi proposta.

Infine, nell'ultima parte del lavoro, si è proposto un nuovo metodo, basato sulla rivelazione TLS, per un rapido screening del contenuto totale di BAs nel vino, sfruttando la reazione di transglutaminazione delle ammine con produzione di NH_3 che viene successivamente fatta reagire con ipoclorito e acido salicilico in condizioni basiche (reazione di Berthelot) per dare il prodotto finale indofenolo, rivelato tramite TLS. È bene precisare come tale procedura sia semi-quantitativa, in quanto è possibile quantificare solo la somma delle BAs. Dopo ottimizzazione dei parametri coinvolti nella reazione di Berthelot (tempo, temperatura, concentrazione del catalizzatore) è stato ricavato un valore di limite di rivelabilità per l'ammoniaca. Considerando, infine, l'attività enzimatica dell'enzima transglutaminasi, il tempo di reazione e il volume del reattore, tale valore è stato convertito al limite di rivelabilità teorico della tecnica per le singole BAs. I limiti calcolati, che variano in un intervallo compreso fra 1,0 e 5,0 $\mu\text{g/L}$, a seconda del peso molecolare di ciascuna ammina, risultano molto promettenti per l'analisi di campioni reali.

Gli argomenti proposti sono stati dettagliatamente descritti nell'articolo: L. Rivoira *et al.*, Novel approaches for the determination of biogenic amines in food samples, *STUDIA UBB CHEMIA*, 2017, **LXII**(3), 103; DOI: [10.24193/sub.chem.2017.3.08](https://doi.org/10.24193/sub.chem.2017.3.08)



Biogenic Amines in Wines

In this work, we developed new analytical approaches for the determination of biogenic amines in wines based on the derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde and dabsyl-chloride, followed by HPLC-Fluorescence and HPLC-Thermal lens spectroscopy analysis. A rapid screening method has also been proposed, based on transglutamination of the amines and on the Berthelot reaction.