



VENETO
BONA TERRA NON PERDE



REGIONE DEL VENETO

VENETO
AGRICOLTURA



DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Risorse naturali e Ambiente



DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Risorse naturali e Ambiente

PROGETTO REGIONALE SU
**“CARATTERIZZAZIONE DELLA QUALITÀ DELL'ORTOFRUTTA
VENETA E DELL'AMBIENTE DI PRODUZIONE”**

METODICHE ANALITICHE UTILIZZATE

a cura del Gruppo Orticoltura

Responsabile scientifico: prof. Paolo Sambo



VENETO
BONUM TERRA NON FRUIT



VENETO
AGRICOLTURA



DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Ricerca naturali e Ambiente

Caratterizzazione qualitativa dei prodotti orticoli

Per ogni matrice vegetale inclusa nel progetto regionale sono stati analizzati i principali composti che partecipano alla caratterizzazione qualitativa delle suddette orticole. Ovviamente le metodiche impiegate e i composti analizzati sono variati in relazione alle singole specie tenendo conto delle specifiche peculiarità di ciascuna. Di seguito vengono riportate le metodiche impiegate con riferimento alle analisi strutturali, chimiche, spettrofotometriche e cromatografiche.

I campioni prelevati dalle diverse aziende sono stati portati presso i laboratori del Gruppo Orticoltura dell'Università di Padova dove si è proceduto a stabilizzare il materiale. Una volta effettuati alcuni rilievi morfo-ponderali quali determinazione del peso unitario del prodotto, dimensioni e colore si è predisposto il materiale per la liofilizzazione al fine di bloccare tutte le attività metaboliche e conservare al meglio il campione.

L'analisi strutturale (*texture*) è stata eseguita utilizzando il Texture Analyzer modello Stable Microsystem "TA-XT-PLUS". Il campione è stato posto trasversalmente sul piano del *Texture Analyser* valutando attraverso i diversi accessori di penetrazione e compressione la forza necessaria per forare l'epicarpo di un frutto o per spezzare un turione determinandone così la consistenza. Per la penetrazione del frutto è stato utilizzato l'ago P/2N con diametro di 2 mm, la velocità del test è stata impostata a 2 mm/s, mentre la profondità di penetrazione, *target mode* impostata è di 5 mm/s. Nei confronti della frattura del turione è stata impiegata la sonda HDP/3PB, la velocità del test è stata impostata a 4 mm/s, 25 mm di distanza, 10 g di trigger force e 300 g per break sensitivity.

SS (%): 200 g di campione sono stati posti in stufa ventilata PID System Instrument modello M80-VF. Le pesate sono avvenute dopo 48 ore di stufa a 105°C. La concentrazione di sostanza secca ha consentito di ricavare il contenuto d'acqua del campione.



VENETO
AGRICOLTURA

REGIONE DEL VENETO

VENETO
AGRICOLTURA



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA
DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Ricerca naturali e Ambiente

pH e EC: le analisi sono state eseguite sul succo del campione scongelato tramite un pHmetro conduttivimetro portatile, modello HI 255 Hanna Instruments.

°Brix: una goccia di frullato è servita per la determinazione dei °Brix, che è stata effettuata tramite rifrattometro portatile digitale HI 96801 Hanna Instruments, uno strumento che utilizza la misura dell'indice di rifrazione per determinare il contenuto zuccherino (°Brix). Dopo aver effettuato una calibrazione con acqua distillata, si sono ottenuti i risultati convertiti in °Brix.

Colore: è stato valutato con il colorimetro ottico Minolta CR-300, secondo il metodo Hunter Lab, a partire dai valori di **L** che indica la luminosità del campione e varia dal nero (zero) al bianco (100), **a** che indica il colore del campione nell'intervallo tra il verde e il rosso e **b** nell'intervallo tra il blu e il giallo.

Capacità antiossidante totale (CAT) e fenoli totali (FT): La determinazione della capacità antiossidante totale (CAT) e dei fenoli totali ha previsto per entrambi la pesata di 0.5 di campione liofilizzato al quale sono stati aggiunti 20 mL di metanolo ad alto grado di purezza; il campione è stato omogeneizzato per 30'' con l'ausilio dell'Ultra Turrax a velocità di 17000 rpm e quindi filtrato con carta da filtro (589 Schleicher).

La CAT è stata determinata con il metodo FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma). Il reagente FRAP (soluzione 1 mM di 2,4,6-tripiridil-2 triazina [TPTZ], 2 mM di cloruro ferrico e 250 mM di acetato di sodio a pH 3.6) è stato preparato giornalmente a partire da soluzioni madre di 300 mM di buffer acetato, 12 mM di TPTZ (in acido cloridrico 48 mM) e 24 mM di cloruro ferrico in rapporto 10:1:1. A 100 µL di estratto sono stati aggiunti 1900 µL di reagente FRAP e si è omogeneizzato con l'ausilio di un vortex; dopo 4' a 20° C è stata letta l'assorbanza a 593 nm. La lettura è stata confrontata con una curva di calibrazione costituita da soluzioni di solfato di ammonio ferroso con concentrazione da 0 a 1200 µg mL⁻¹ di ione ferroso. La CAT è stata espressa come mg di Fe²⁺ equivalenti (Fe²⁺E) per kg di campione fresco o secco.

Per la determinazione dei fenoli totali, invece, si sono prelevati 200 µL dell'estratto, sono stati aggiunti 1000 µL di reattivo Folin-Ciocalteu, 800 µL di carbonato di sodio anidro al 7.5% e, al fine di diluire la soluzione, sono stati aggiunti 2000 µL di acqua



VENETO
Agricoltura



VENETO
AGRICOLTURA



DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Ricerca naturali e Ambiente

demineralizzata. Si è proceduto con 15'' di agitazione e successivo riposo per 30' a temperatura ambiente prima di leggere allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 765 nm. L'assorbanza è stata confrontata con quella letta da soluzioni a concentrazione nota di acido gallico (da 0 a 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$) le quali hanno subito lo stesso procedimento dei campioni. Il contenuto totale di fenoli è stato espresso come mg di acido gallico equivalenti (GAE) per kg di campione fresco o secco.

La determinazione della **vitamina C** è stata condotta su 0.5 g di campione in 20 mL di soluzione estraente (costituita da 15 g di ac. meta fosforico in soluzione acetica), omogeneizzati con Ultra-Turrax per 30'', successivamente ad 1 mL di campione è stato aggiunto in sequenza: 1mL di Buffer-acetato, 3 mL di soluzione colorante (2,6 diclorofenolindofenolo) e 10 mL di xylene. Dopo agitazione per 6-10'', i campioni sono stati centrifugati per 5 min ad una velocità di 5000 rpm. L'analisi è stata condotta avvalendosi del "METODO B" ISO 6557, metodica utilizzata per prodotti ortofruttili e derivati. I campioni sono stati letti allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 500 nm. Per la retta di taratura sono state preparate soluzioni a concentrazione nota di ac. ascorbico (da 0-5-10-15-20 mg/100mL) le quali hanno subito lo stesso procedimento dei campioni. I risultati ottenuti sono stati espressi in mg/kg peso fresco o secco.

Caratterizzazione qualitativa di matrici vegetali mediante analisi chimiche strumentali

Questi sono stati identificati e quantificati mediante analisi cromatografiche applicando sia metodiche ufficiali che metodi messe a punto specificatamente per le differenti matrici vegetali.

Su tutte sono stati determinati alcuni elementi minerali mediante cromatografia ionica, gli zuccheri riducenti e gli acidi fenolici liberi mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Questi ultimi appartengono all'ampia classe dei polifenoli e vengono prodotti dalla pianta come meccanismo di difesa in risposta all'attacco di patogeni o a stress ambientali, inoltre sono considerati dei composti nutrizionali



VENETO
Agricoltura



VENETO
AGRICOLTURA



DAFNAE
Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente

fondamentali poiché potenti antiossidanti. Per determinati ortaggi sono stati rilevati specifici composti che determinano la caratterizzazione delle orticole stesse. Nelle specie contenenti pigmenti coloranti come nel pomodoro, nella carota, nel melone e nella zucca sono stati quantificati i carotenoidi licopene e β -carotene (precursore della vitamina A) che conferiscono colorazione gialla, arancione e rossa. Questi composti sono inoltre potenti antiossidanti. La colorazione rosso-violacea tipica del radicchio è invece conferita da antocianine come cianidina-3-glucoside e cianidina-3-malonil glucoside, anche questi composti con elevata capacità antiossidante. Sul radicchio sono stati anche analizzati i principali guaianolidi, responsabili del caratteristico sapore amaro di questo ortaggio. Sui legumi come il fagiolo è stata eseguita invece una caratterizzazione della componente proteica mediante l'analisi degli aminoacidi liberi e derivanti da proteine. Sempre sul fagiolo è risultata interessante l'analisi dei composti antinutrizionali come gli oligosaccaridi verbascosio, stachiosio, raffiniosio e saccarosio, che risultano poco digeribili nell'intestino umano. La caratterizzazione dell'asparago ha richiesto invece l'analisi dell'aminoacido asparagina che possiede confermate proprietà diuretiche. Si è voluto inoltre analizzare il composto responsabili del caratteristico aroma e sapore pungente dell'aglio chiamato alliina, che possiede proprietà antimicotiche e antibatteriche, ipotensive, antitrombotiche e cardiovascolari, antidiabetiche, ipocolesterolemiche e antitumorale.

Di seguito sono riportate le metodiche cromatografiche e la strumentazione utilizzata.

Determinazione di anioni e cationi

L'identificazione e quantificazione di anioni e cationi è avvenuta mediante cromatografia ionica (IC), secondo quanto riportato dalla metodica ufficiale per la determinazione degli anioni (Method 300.0 "Determination of inorganic anions by ion chromatography", J.D. Pfaff, 1993) e dei cationi (Application note 141 "Determination of inorganic cations and ammonium in environmental waters by ion chromatography using the IonPac CS16 column", Dionex).



VENETO
Agricoltura



VENETO
AGRICOLTURA



DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Ricerca naturali e Ambiente

I campioni sono stati estratti in acqua e omogenizzati con il dispersore Utra-Turrax T-18 B (IKA), successivamente filtrati con carta da filtro e dopo opportune diluizioni stabilite in base alle caratteristiche della matrice, l'estratto è stato ulteriormente filtrato con filtri per siringa in acetato di cellulosa da 0.20 μm e infine analizzato in IC. L'analisi è stata effettuata utilizzando un doppio sistema cromatografico Dionex ICS-900 costituito da una pompa che consente di operare in modalità isocratica e da un detector a conducibilità Dionex DS5, con soppressore anionico AMMS 300, 4mm per l'analisi degli anioni e soppressore cationico CMMS 300, 4mm per l'analisi dei cationi. La colonna Ion Pac AS23 con dimensioni 4x250 mm è stata utilizzata per l'analisi degli anioni mentre per i cationi è stata usata la colonna Ion Pac CS12A con dimensioni 4x250 mm, entrambe operanti a 25 °C e precedute da una precolonna. I dati forniti da questo sistema sono stati raccolti ed elaborati usando il software Chromeleon per sistemi LC. Le iniezioni sono state fatte con l'autocampionatore AS-DV. Per l'analisi degli anioni è stata utilizzata la fase mobile costituita da una miscela di sodio carbonato (4.5 mM), sodio bicarbonato (0.8 mM) con velocità di flusso di 1 mL*min⁻¹. L'eluente per l'analisi dei cationi è stato invece l'acido metansolfonico (20 mM) con velocità di flusso di 1 mL*min⁻¹. L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante la formazione di curve di calibrazione ottenute con diluizioni seriali della soluzione madre. Per l'analisi degli anioni è stata utilizzata una miscela costituita da concentrazioni note di fluoruri, cloruri, nitriti, bromuri, nitrati, fosfati e solfati. Per l'analisi dei cationi invece è stata usata una miscela costituita da concentrazioni note di litio, sodio, ammonio, potassio, magnesio e calcio.

Determinazione degli zuccheri riducenti

La determinazione degli zuccheri riducenti glucosio e fruttosio è avvenuta mediante HPLC con opportune variazioni delle metodiche estrattive e cromatografiche in base alle caratteristiche delle orticole.

I campioni sono stati estratti in acqua e omogenizzati con il dispersore Utra-Turrax T-18 B (IKA). Nei casi in cui la matrice in esame non ha consentito una rapida filtrazione,



VEROVENETO
VENETO AGRICOLTURA

REGIONE DEL VENETO

VENETO AGRICOLTURA



DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Ricerca naturali e Ambientale

l'estratto è stato centrifugato per separare la parte più grossolana dalla parte liquida. Questa è stata successivamente opportunamente diluita e filtrata con filtri per siringa in acetato di cellulosa da 0.45 μm . Il campione così estratto è stato analizzato in HPLC. L'analisi è stata eseguita con un sistema cromatografico a gradiente Jasco X.LC dotato di detector a indice di rifrazione Jasco RI-2031 Plus. Per l'eluizione dei composti è stata utilizzata la colonna HyperRez XP Carbohydrate Ca^{++} con dimensioni 300x7.7 mm, termostata a 80 °C con compartimento di termostatazione colonna Jasco CO-2060 Plus per ottenere dati riproducibili ad una temperatura controllata. Le iniezioni da 20 μL sono state effettuate con autocampionatore Jasco AS-2055 Plus. I dati forniti da questo sistema sono stati raccolti ed elaborati usando il software ChromNAV per sistemi LC. L'eluente utilizzato per l'analisi cromatografica è costituito da acqua ultrapura ottenuta con il sistema Sartorius Stedim. La velocità di flusso operante è stata di 0.6 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. L'analisi quantitativa è stata effettuata mediante creazione della curva di calibrazione. Questa è stata ottenuta con diluizioni seriali (range di 10-1000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) degli standards di glucosio e fruttosio preparati in acqua ultrapura.

Determinazione degli oligosaccaridi verbascosio, stachiosio, raffiniosio e saccarosio

La determinazione dei composti antinutrizionali verbascosio, stachiosio, raffiniosio e saccarosio nel fagiolo è avvenuta mediante HPLC. I campioni liofilizzati sono stati estratti con una soluzione di etanolo:acqua 50:50 (v/v), lasciati ad agitare su piastra rotante a 25°C per 30 minuti e centrifugati a 2500 rpm a 25 °C per 10 minuti. Il soprannatante è stato portato a secco con evaporatore rotante a 35°C e risospeso con 5 mL di acqua, infine opportunamente diluito e filtrato con filtri per siringa in acetato di cellulosa da 0.45 μm . Il campione così estratto è stato analizzato in HPLC. L'analisi è stata eseguita da un sistema cromatografico a gradiente Jasco X.LC con detector a indice di rifrazione Jasco RI-2031 Plus. Per l'eluizione dei composti è stata utilizzata la colonna HyperRez XP Carbohydrate Ca^{++} con dimensioni 300x7.7 mm, termostata a 80 °C con compartimento di termostatazione colonna Jasco CO-2060 Plus. Le iniezioni da 20 μL sono state effettuate con autocampionatore Jasco AS-2055 Plus. I dati forniti

da questo sistema sono stati raccolti ed elaborati usando il software ChromNAV per sistemi LC. Per l'eluizione dei composti è stata utilizzata acqua ultrapura con velocità di flusso di $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. L'analisi quantitativa è stata effettuata mediante creazione delle curve di calibrazione. Queste sono state ottenute con diluizioni seriali (range di $10\text{-}250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) degli standards di verbascosio, stachiosio, raffiniosio e saccarosio in acqua.

Determinazione degli acidi fenolici liberi

La determinazione degli acidi fenolici è avvenuta mediante HPLC e la metodica estrattiva e cromatografica ha richiesto opportune variazioni in base alle caratteristiche della specie orticola da esaminare.

Sono stato ricercati gli acidi idrossibenzoico, clorogenico, caffeico, *p*-cumarico, ferulico e cinnamico. Inoltre sono stati ricercati anche gli antiossidanti rutina e naringenina nel pomodoro e nel radicchio l'acido cicorico e gli antociani cianidina-3-glucoside e cianidina-3-malonil glucoside. L'estrazione è avvenuta con solvente organico acidificato (acido formico 0.2% in metanolo) per consentire una maggiore stabilità dei composti antiossidanti. Successivamente i campioni sono stati omogenizzati con il dispersore Utra-Turrax T-18 B (IKA) e filtrati con carta da filtro. Dopo opportune diluizioni stabilite in base alle caratteristiche della matrice, l'estratto è stato ulteriormente filtrato con filtri per siringa in acetato di cellulosa da $0.45 \mu\text{m}$ e infine analizzato in HPLC. Le analisi sono state effettuate usando il sistema cromatografico in gradiente Jasco X.LC, costituito da una pompa binaria Jasco PU-2080 basata sul principio di mescolamento ad alta pressione. Per l'identificazione degli acidi fenolici è stato utilizzato il rivelatore a serie di diodi Jasco MD-2015. La separazione è avvenuta sulla colonna Tracer Extrasil ODS-2 con dimensioni $250 \times 45\text{mm}$, $5\mu\text{m}$ termostata a 35°C con compartimento di termostatazione colonna Jasco CO-2060 Plus. Come fase mobile è stato utilizzato un gradiente di acido formico diluito in acqua (A) e metanolo (B) stabilito in base alle differenti matrici vegetali e con una velocità di flusso tra 0.8 e $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. I dati forniti da questo sistema sono stati raccolti ed elaborati dal software



VENETO
AGRICOLTURA

REGIONE DEL VENETO

VENETO
AGRICOLTURA



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA
DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Ricerca naturali e Ambiente

ChromNAV Chromatography Data System. Le iniezioni da 20 μL sono state fatte con l'autocampionatore Jasco AS-2055. L'identificazione dei composti è avvenuta a specifiche lunghezze d'onda: 280 nm per l'acido idrossibenzoico, acido cinnamico e naringenina, 325 nm per gli acidi clorogenico, caffeico, *p*-cumarico, ferulico e cicorico, 360 nm per la rutina e 520 nm per gli antociani cianidina-3-glucoside e cianidina-3-malonil glucoside.

Infine l'analisi quantitativa è stata eseguita mediante creazione di curve di calibrazione con range 1-100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Queste sono state ottenute con diluizioni seriali degli standards sciolti in metanolo.

Determinazione dei carotenoidi licopene e β -carotene

La determinazione dei pigmenti licopene e β -carotene in matrici come pomodoro, melone, carota e zucca è avvenuta mediante HPLC. I campioni sono stati estratti con tetraidrofurano, omogenizzati con il dispersore Ultra-Turrax T-18 B (IKA) e filtrati con carta da filtro. Dopo opportune diluizioni stabilite in base alle caratteristiche della matrice, gli estratti sono stati ulteriormente filtrati con filtri per siringa in cellulosa rigenerata da 0.45 μm e infine iniettati in HPLC. Le analisi sono state effettuate usando il sistema cromatografico in gradiente Jasco X.LC, costituito da una pompa binaria Jasco PU-2080 basata sul principio di mescolamento ad alta pressione e da un rivelatore a serie di diodi Jasco MD-2015. La separazione cromatografica è avvenuta sulla colonna Tracer Extrasil ODS-2 con dimensioni 250 x 45mm, 5 μm termostata a 25 °C con compartimento di termostatazione colonna Jasco CO-2060 Plus. L'eluizione è avvenuta con un'isocrazia di metanolo:tetraidrofurano:acqua (67:27:6) con velocità di flusso di 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Le iniezioni da 20 μL sono state fatte con l'autocampionatore Jasco AS-2055. L'identificazione dei composti è avvenuta a lunghezza d'onda di 470 nm. I dati cromatografici sono stati elaborati usando il software ChromNAV Chromatography Data System.

Determinazione dei principali guaianolidi



VENETO
Agricoltura



VENETO
AGRICOLTURA



DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Ricerca naturali e Ambiente

La determinazione dei principali guaianolidi nel radicchio è avvenuta mediante HPLC. I composti analizzati sono stati i seguenti: diidrolattucina, lattucina, 8-deossi-lattucina coeluito con diidrolattupicrina ossalato, jaquinellina, diidrolattupicrina coeluito con lattupicrina. Il campione liofilizzato è stato estratto con una soluzione di metanolo:acqua (4:1) al 2% di acido formico, messo in agitazione con vortex per circa un minuto, sonicato a 25°C per 10 minuti e centrifugato a 4000 rpm per 10 minuti. L'estrazione è stata ripetuta una seconda volta e i sopranatanti sono stati recuperati ed uniti. Gli estratti sono stati portati a secco con l'evaporatore rotante a 35 °C e recuperati con 2 mL di metanolo. Ad 1 mL di estratto sono stati aggiunti 7 mL di diclorometano, il tutto centrifugato a 4000 rpm per 10 minuti. Una volta recuperato il sopranatante, è stato purificato con SPE (estrazione in fase solida) secondo quanto riportato da Ferioli, 2012. Per la SPE è stata utilizzata la cartuccia Silica Si-1 (3 mL reservoir, 500 mg sorbent mass, Phenomenex) condizionata con 6 mL di soluzione di diclorometano:i-propanolo 1:1 (v/v) ed equilibrata con 6 mL di diclorometano. Successivamente è stato caricato il campione ed eluito con 6 mL di soluzione di diclorometano:etilacetato 3:2 (v/v). L'eluato è stato portato a secco con l'evaporatore rotante a 34 °C e recuperato con 4 mL di soluzione di acetonitrile:acqua 10:90 (v/v), infine filtrato con filtri per siringa in nylon da 0.45 µm ed utilizzato per l'analisi cromatografica. L'analisi è stata effettuata con un sistema cromatografico a gradiente (Jasco PU-2080 Plus) con detector a serie di diodi (Jasco MD-2015). La separazione dei composti in esame è avvenuta su una colonna Luna C18 con dimensioni 250 x 4.6 mm, 5µm (Phenomenex) termostata a 25 °C (Jasco CO-2060) con una velocità di flusso di 1 mL*min⁻¹. È stata utilizzata una fase mobile costituita da acqua (A) e acetonitrile (B) con gradiente di eluizione di B 10-42 % in 30 minuti, seguito da un'isocratica di B per 10 minuti. La lunghezza d'onda utilizzata per l'identificazione dei guaianolidi è stata 256 nm. Le iniezioni (20 µL) sono state fatte con un'autocampionatore (Jasco AS-2055). I dati forniti da questo sistema sono stati raccolti ed elaborati usando il software ChromNAV Chromatography Data System. L'analisi quantitativa è stata eseguita utilizzando la curva di calibrazione dello standard interno di santonina. Una



VEROVENETO
BONUM TERRAM NON FRUITUR



VENETO
AGRICOLTURA



DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Ricerca naturali e Ambientale

quantità nota di standard è stata sciolta in una soluzione di metanolo:acqua 1:1 (v/v) e la curva di calibrazione è stata ottenuta con diluizioni seriali con range 2-20 $3\text{m}^*\text{L}^{-1}$.

Determinazione degli aminoacidi liberi e derivanti da proteine

L'analisi degli aminoacidi è avvenuta secondo quanto riportato dalla European Pharmacopoeia 5.0 paragrafo 2.2.56. "Amino acid analysis". La determinazione è stata eseguita mediante HPLC con derivatizzazione pre-colonna ed è stato possibile identificare e quantificare gli aminoacidi L-acido aspartico, L- acido glutammico, L-serina, L-istidina, glicina, L-treonina, L-arginina, L-alanina, L- tirosina, L-valina, L-metionina, L-fenilalanina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-prolina. L'estrazione degli aminoacidi liberi è avvenuta su campione liofilizzato mediante aggiunta di acqua demineralizzata. Il campione è stato incubato a 25°C per 24 ore e successivamente filtrato con carta da filtro, diluito con acido cloridrico 0.1 N e nuovamente filtrato con filtri per siringa in cellulosa rigenerata da 0.20 μm . L'analisi degli aminoacidi derivanti da proteine è invece avvenuta per idrolisi delle proteine con acido cloridrico 6 N. Il campione è stato incubato in forno ventilato a 110 °C per 24 ore. Dopo il raffreddamento è stato filtrato con carta da filtro, diluito con acido cloridrico 0.1 N e nuovamente filtrato con filtri per siringa in cellulosa rigenerata da 0.20 μm . Il campione è stato sottoposto a derivatizzazione pre-colonna mediante reazione con i reagenti OPA (che non reagisce con gli aminoacidi secondari) e FMOC (per aminoacidi secondari come la prolina). Infine il campione è stato analizzato in HPLC usando il sistema cromatografico Agilent 1260 Infinity costituito da pompa binaria in gradiente G1312, un sistema di degasaggio sotto vuoto a 4 canali G1322A, un rivelatore a serie di diodi G4212B e un detector a fluorescenza. La separazione cromatografica è avvenuta sulla colonna Zorbax Eclipse AAA con dimensioni 4.6 x 150 mm, 3.5 μm termostata a 40 °C con comparto colonna termostato G1316A. La fase mobile utilizzata è stata sodio fosfato monoidrato 40 mM portato a pH 7.8 con sodio idrossido (A) e una soluzione di acetonitrile:metanolo:acqua 45:45:10 (v/v/v) (B). L'eluizione degli aminoacidi è avvenuta con gradiente di B 0-57 in 18 minuti, 57-100 in 50 secondi con



VENETO
Agricoltura



VENETO
AGRICOLTURA



DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Ricerca naturali e Ambiente

velocità di flusso di $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Le iniezioni da $10 \mu\text{L}$ sono state fatte con l'autocampionatore G1329B. I dati forniti da questo sistema sono stati raccolti ed elaborati usando il software OpenLAB CDS. L'identificazione dei composti è avvenuta a lunghezza d'onda di 338 nm per aminoacidi che hanno reagito con il reagente OPA e 262 nm per gli aminoacidi che hanno reagito con FMOC. Il detector a fluorescenza è stato invece impostato con i seguenti parametri: $0 \text{ min} - 340/450$; $15 \text{ min} - 266/305$. L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante curve di calibrazione costruita mediante diluizioni seriali del mix di 17 aminoacidi standard in acido cloridrico 0.1 ($1 \text{ nmol}/\mu\text{L}$, $100 \text{ pmol}/\mu\text{L}$, $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$). Gli aminoacidi serina, treonina e tirosina vengono parzialmente distrutti durante l'idrolisi, per questo è necessario sottoporre il campione ad almeno tre tempi di idrolisi ($24-48-72-96$ ore a seconda delle caratteristiche della matrice vegetale in esame) per estrapolare la concentrazione di partenza degli aminoacidi al tempo 0.

Identificazione e quantificazione dell'asparagina

L'analisi dell'aminoacido asparagina nell'asparago è avvenuta seguendo la metodica per l'analisi degli aminoacidi come riportato dalla European Pharmacopoeia 5.0 paragrafo 2.2.56. "Amino acid analysis". L'estrazione dell'aminoacido libero è avvenuta su campione liofilizzato con aggiunta di acqua demineralizzata. Il campione è stato incubato a 25°C per 24 ore e successivamente filtrato con carta da filtro, diluito con acido cloridrico 0.1 N e nuovamente filtrato con filtri per siringa in cellulosa rigenerata da $0.20 \mu\text{m}$. L'analisi dell'aminoacido derivante da proteine è invece avvenuta per idrolisi delle proteine con acido cloridrico 6 N . Il campione è stato incubato in forno ventilato a 110°C per 24 ore e successivamente lasciato raffreddare e filtrato con carta da filtro, diluito con acido cloridrico 0.1 N e nuovamente filtrato con filtri per siringa in cellulosa rigenerata da $0.20 \mu\text{m}$. L'asparagina è deaminata ad acido aspartico in seguito ad idrolisi, quindi è possibile quantificare i due l'aminoacidi separatamente nell'estrazione senza idrolisi, mentre nell'estrazione con idrolisi l'asparagina è stata quantificata come acido aspartico.



VEROVENETO
BONUM TERRAM NON FRUITUR



VENETO
AGRICOLTURA



DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Ricerche naturali e Ambientali

Il campione è stato sottoposto a derivatizzazione pre colonna mediante reazione con i reagenti OPA e FMOC. Infine il campione è stato analizzato in HPLC usando il sistema cromatografico Agilent 1260 Infinity costituito da pompa binaria in gradiente G1312, un sistema di degasaggio sotto vuoto a 4 canali G1322A, un rivelatore a serie di diodi G4212B e un detector a fluorescenza. La separazione cromatografica è avvenuta sulla colonna Zorbax Eclipse AAA con dimensioni 4.6 x 150 mm, 3.5 μm termostata a 40 °C con comparto colonna termostato G1316A. La fase mobile utilizzata per l'eluizione è stata sodio fosfato monoidrato 40 mM portato a pH 7.8 con sodio idrossido (A) e una soluzione di acetonitrile:metanolo:acqua 45:45:10 (v/v/v). L'eluizione dell'aminoacido è avvenuta con gradiente di B 0-57 in 18 minuti, 57-100 in 50 secondi con velocità di flusso di 2 mL*min⁻¹. Le iniezioni da 10 μL sono state fatte con l'autocampionatore G1329B. I dati forniti da questo sistema sono stati raccolti ed elaborati usando il software OpenLAB CDS. L'identificazione del composto in esame è avvenuta a lunghezza d'onda di 338 nm. L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante curve di calibrazione costruita con diluizioni seriali della soluzione madre (1 nmol/ μL , 100 pmol/ μL , 10 pmol/ μL). La soluzione madre è stata preparata sciogliendo una quantità nota dello standard di asparagina in acqua facilitandone lo scioglimento con la sonicazione.

Identificazione e quantificazione dell'alliina

L'analisi dell'alliina sull'aglio è stata eseguita mediante HPLC con derivatizzazione pre colonna. L'estrazione è avvenuta su campione liofilizzato con una soluzione di metanolo:acqua 80:20 (v/v), pH 3. Il campione è stato omogenizzato con il dispersore Utra-Turrax T-18 B (IKA) ed incubato a 25°C per 10 minuti. L'estratto è stato poi filtrato con carta da filtro. Successivamente è stata eseguita la derivatizzazione pre colonna con metodo Pico-Tag che utilizza un'aliquota di filtrato (800 μL) alla quale è stata aggiunta una uguale quantità di soluzione di metanolo:TEA:PITC:acqua 7:1:1:1 (v/v). L'estratto è stato incubato per 20 minuti a 25°C, successivamente portato a secco con evaporatore rotante, risospeso con 2 mL di fase mobile A, opportunamente diluito e



VENETO
BONUM TERRA NON PERIT



VENETO
AGRICOLTURA



DAFNAE
Dipartimento di Agronomia Animali
Alimenti Ricerca naturali e Ambiente

filtrato con filtri per siringa in cellulosa rigenerata da 0.20 μm per l'analisi in HPLC. L'analisi cromatografica è stata eseguita utilizzando il sistema cromatografico Agilent 1260 Infinity costituito da pompa binaria in gradiente G1312, da un sistema di degasaggio sotto vuoto a 4 canali G1322A e da un rivelatore a serie di diodi G4212B. La separazione cromatografica è avvenuta sulla colonna Zorbax Eclipse AAA con dimensioni 4.6 x 150 mm, 3.5 μm termostata a 25 °C con comparto colonna termostato G1316A. La fase mobile utilizzata è stata una soluzione di acetonitrile: sodio acetato triidrato 68 mM, 25:975 (v/v), pH 6.5 (A) e una soluzione di metanolo: acqua: acetonitrile 150:400:450 (v/v/v) (B). L'eluizione è avvenuta con gradiente di B 0-100 in 55 minuti con velocità di flusso di 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Le iniezioni da 10 μL sono state fatte usando l'autocampionatore G1329B. I dati forniti da questo sistema sono stati raccolti ed elaborati usando il software OpenLAB CDS. L'identificazione del composto è avvenuta a lunghezza d'onda di 254 nm. L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante curva di calibrazione costruita con diluizioni seriali della soluzione madre derivatizzata (1.6 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 16 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 32 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). La soluzione madre è stata preparata sciogliendo una quantità nota dello standard di alliina in una soluzione di metanolo:acqua 80:20 (v/v), pH 3. La soluzione madre è stata successivamente derivatizzata con metodo Pico-Tag.