

DOCUMENTO  
TECNICO

Da sinistra:  
A. Di Deo  
L. Di Paola  
V. Carinci

**Antonietta Di Deo  
Lucilla Di Paolo  
Valerio Carinci**

*Centro Enologico Meridionale -  
Ortona (CH)*

## DETERMINAZIONE DELL'ISTAMINA NEI VINI MEDIANTE HPLC CON RIVELATORE ULTRAVIOLETTO

Nel presente lavoro viene determinato il contenuto di istamina mediante HPLC provvisto di rivelatore UV-VIS o DAD. Tale metodo viene proposto come alternativa a quello classico che richiede una strumentazione (rivelatore a fluorescenza) normalmente non disponibile nei laboratori enologici di piccole dimensioni ed una più complessa manipolazione del campione (derivatizzazione).

### Introduzione

Le ammine biogene come l'istamina, che è l'oggetto del nostro lavoro, sono basi organiche a basso peso molecolare presenti nei tessuti vegetali ed animali dove svolgono importanti funzioni nel metabolismo cellulare. La loro origine è dovuta a reazioni di decarbossilazione catalizzata da enzimi decarbossilasici ammino-specifici; di conseguenza, elevate quantità di amminoacidi rappresentano il substrato ideale per la formazio-

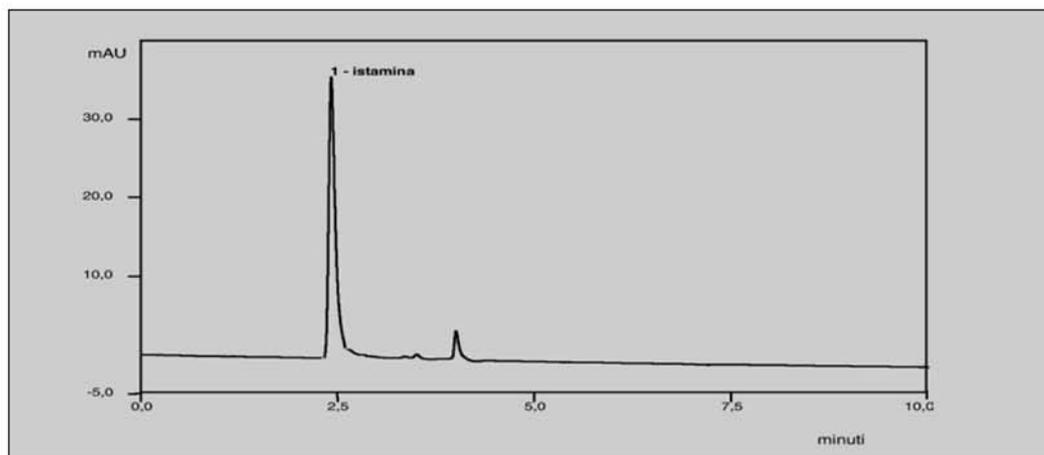
ne di ammine biogene. Quest'ultime rappresentano un importante indicatore della qualità di un alimento per il potenziale rischio sanitario che una elevata assunzione di tali molecole può costituire per il consumatore. La presenza di ammine biogene sembra correlata allo stato sanitario delle uve ed in particolare modo, alle modalità di lavorazione e conservazione.

Risulta quindi importante disporre di un metodo facilmente applicabile nell'analisi di routine dei vini in quanto la

determinazione quantitativa dell'ammina biogena di nostro interesse, è uno dei fattori discriminanti per le esportazioni enologiche.

Naturalmente, prima di poter effettuare la determinazione dell'istamina il campione deve essere purificato allontanando gli interferenti, quali ad esempio, gli acidi organici che assorbono alla stessa lunghezza d'onda dell'analita. Questo tipo di analisi oggi è facilmente sviluppabile grazie alle nuove colonne analitiche per HPLC disponibili in



**Fig. 1 - Profilo cromatografico della soluzione standard di istamina****Tab. 1 - Equazioni della retta e coefficiente di correlazione (r<sup>2</sup>)**

Analita	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)	Equazione della retta	r <sup>2</sup>
Istamina	0.50	2.00	Y = 0.2448 x + 0.0408	0,9800

commercio per le quali, essendo polari, non è più necessario complicare la fase di eluizione aggiungendo vari accoppiatori ionici (con la funzione di ritenere i composti polari) che rendevano poco robusto il metodo ed inoltre minavano il tempo di vita della colonna analitica.

Il problema tecnico di questa analisi sta nella fase di estrazione SPE; sul mercato, attualmente, sono disponibili molte cartucce sia idrofobiche (C<sub>18</sub>) sia a scambio ionico (cationiche); teoricamente le seconde sono più specifiche per questo tipo di analisi, ma richiedono una maggiore conoscenza dei parametri di ritenzione (condizioni di pH, forza ionica degli eluenti, ecc.); è stato quindi deciso di utilizzare le colonne C<sub>18</sub>, sviluppando un protocollo di estrazione molto semplice, recuperando l'analita nel lavaggio, diversamente dalle applicazioni usuali.

**Materiali.** Lo standard dell'istamina, il metanolo, il fosfato monobasico di potassio, l'acido fosforico, il tampone a pH 7 e le colonne SPE C<sub>18</sub>-E 1000 mg/6 ml sono stati reperiti nel commercio avvalendosi delle produzioni proposte dalle ditte

specialistiche nei vari settori.

## Metodologia di analisi

Le analisi sono state effettuate utilizzando un HPLC P 580 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) provvisto di rivelatore DAD UVD340S, autocampionatore ASI-100 munito di iniettore con loop da 10 µl, colonna C<sub>16</sub> ACCLAIM, Polaradvantage, 5 µm, 120 Å, 4.6 x 250 mm (Dionex).

La corsa cromatografica (isocratica) con durata di 15 minuti è stata condotta a 30° C con un flusso pari a 1 ml/min, utilizzando come fase eluente una soluzione acquosa di tampone fosfato monobasico 10 mM a pH 3.20 con acido fosforico; la rivelazione viene effettuata a 210 nm.

La soluzione standard madre contenente l'analita è stata preparata nella fase eluente e conservata a 4°C. Gli standard di calibrazione sono stati ottenuti diluendo opportunamente la madre sempre con fase eluente.

Per la valutazione del recupero è stato preparato un campione di vino fortificato con aggiunta di istamina pari a 9 mg/l ed uno di controllo

(questi campioni sono stati estratti in triplicato).

Al fine di determinare la linearità, l'accuratezza e la precisione del metodo, sono state costruite cinque curve di calibrazione indipendenti passanti per quattro punti; la linearità è stata valutata calcolando il coefficiente di correlazione r<sup>2</sup>, la precisione (CV%) e l'accuratezza (Acc%) del metodo sono state ottenute utilizzando le seguenti equazioni:

$$CV\% = (SD/A_{STD}) \times 100$$

dove:

CV% = coefficiente di variazione percentuale

SD = deviazione standard

A<sub>STD</sub> = Area media dello standard

$$Acc\% = (C_{r_{STD}} - C_{n_{STD}}) / C_{n_{STD}}$$

dove:

Acc% = Accuratezza percentuale

C<sub>r<sub>STD</sub></sub> = Concentrazione ricalcolata dello standard

C<sub>n<sub>STD</sub></sub> = Concentrazione nominale (o teorica) dello standard

Infine sono stati determinati il limite di rilevabilità (LOD) cioè quella concentrazione il cui picco non supera in altezza tre volte il rumore di fondo ed il limite di determinazione (LOQ) ovvero la più bassa concentrazione analitica determinabile con una precisione ed una accuratezza ≤ 20%.

Preparazione del campione. I vini da analizzare vengono sottoposti ad estrazione in fase solida seguendo tale protocollo:

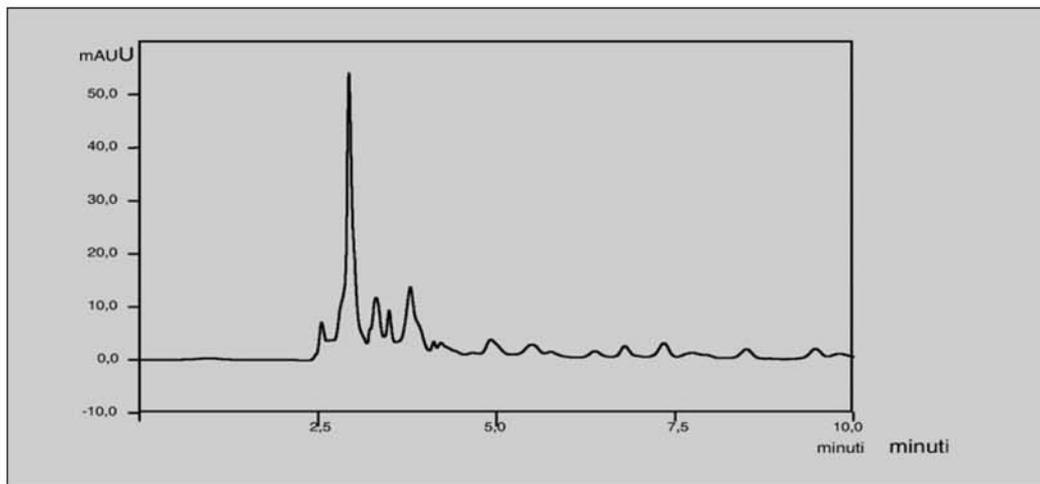
1. condizionamento della colonna SPE con 5 ml di metanolo e successivamente con 5 ml di tampone fosfato a pH 7;

2. caricamento con 1 ml di vino portato a pH 8 (con idrossido di sodio) al fine di neutralizzare la ionizzazione basica ed ottenere una maggiore ritenzione dell'analita;

3. eluizione con 5 ml di una soluzione acquosa al 5% di metanolo.

Si microfiltra su filtri da 0.45 µm e successivamente si inietta nel sistema cromatografico.



**Fig. 2 - Profilo cromatografico di un campione di vino****Tab. 2 - Dati di precisione ed accuratezza (n=5)**

Concentrazione	Precisione CV%	Accuratezza Acc%
2.00	5.33	0.56
5.00	3.18	3.71
10.00	1.46	10.71
20.00	1.12	18.26

## Risultati e discussione

Il metodo di determinazione dell'istamina in HPLC, risulta lineare nel range 2,00–20,00 mg/l. Il valore di  $r^2$  ottenuto è pari a quanto riportato in Tab. 1 assieme all'equazione della retta di calibrazione ed ai valori del LOD e del LOQ. Gli altri parametri di validazione: accuratezza, precisione, sono riassunti nella Tab. 2.

Dai dati ottenuti si osserva che il metodo proposto è preciso ed accurato. Il processo di estrazione in fase solida offre una buona purificazione del campione ed un recupero del 67%; quest'ultimo potrebbe essere notevolmente migliorato utilizzando cartucce SPE a scambio ionico che però, come accennato precedentemente, richiedono una buona conoscenza dei meccanismi di ritenzione.

Di seguito proponiamo un esempio di separazione cromatografica relativa sia ad uno standard, sia ad un campione di vino Figg. 1 e 2.

## Considerazioni conclusive

L'attività decarbossilasica a carico degli amminoacidi liberi è un tema di grande attualità, in quanto si è notato che la microbiologia svolge un ruolo fondamentale nella formazione delle ammine biogene soprattutto per quel che riguarda gli alimenti fermentati. Le caratteristiche di questi prodotti, infatti, sono fortemente correlate all'attività dei ceppi microbici selezionati sia durante la fermentazione primaria (zuccheri – alcool), sia nel corso di quella secondaria (malo – lattica).

Dal momento che nel mosto e nei vini si hanno buone quantità di amminoacidi liberi, queste matrici sono potenziali produttrici di elevate quantità di istamina che, anche quando non raggiunge alte concentrazioni, può costituire un rischio favorendo la possibile formazione di nitrosammine, notoriamente potenti agenti cancerogeni. La complessità delle reazioni coinvolte, rende quindi difficile stabilire un limite di tos-

sicità in quanto la risposta dei singoli individui all'allergene è variabile e non prevedibile.

Il metodo per la determinazione dell'istamina proposto, permette un facile e veloce controllo di questo importante analita il cui dosaggio viene sempre più richiesto sia dal mercato nazionale, sia dai vari importatori.

A conclusione di questo lavoro riportiamo alcune nostre osservazioni relative alla variazione del contenuto dell'istamina nei vini come conseguenza del processo tecnologico adottato: la sua formazione è strettamente correlata a diversi fattori quali la temperatura di fermentazione, lo stato igienico dell'attrezzatura di cantina e l'utilizzo (per quanto riguarda la fermentazione malo-lattica) di batteri selezionati. Inoltre l'impiego di alcuni coadiuvanti come ad esempio la bentonite, può ridurre per adsorbimento quantità rilevanti di istamina; il suo utilizzo è dunque da prendere in considerazione.

## Abstract

We describe a chromatography (HPLC) method for the qualitative and quantitative determination of histamine in wine.

Samples were prepared by solid phase extraction and after filtration through a 0,45  $\mu\text{m}$  pore size filter; histamine was detected at 210 nm by diode-array detector.

## Bibliografia

- Chemtek "Notiziario tecnico" Volume 6 giugno 2004
- Phenomenex "User's guide strata"
- Supelco "Guide to solid phase extraction"
- Supelco Maggio 2004 "The reporter magazine"
- Supelco Giugno 2004 "The reporter magazine"
- F.Galgano, M. Caruso "HPLC determination of agmatine and other amines in wine" International Journal of wine and wine sciences, Anno 2003, n° 4, 237-242.

