



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco

Via Pietro Giuria 9 - 10125 – Torino Italy

Phone: 0039 011 6707651

Fax: 0039 011 6707687

Web site: [www.http://www.dstf.unito.it/](http://www.dstf.unito.it/)

**Esercitazione pratica
qualificazione degli infusi e bevande a base di tè
verde e fermentato per il contenuto in flavan-3-oli
mediante LC-UV/DAD**

1. Scopo del metodo

Lo scopo del presente metodo analitico è la determinazione quantitativa di marker flavan-3-olici monomerici ((+)-catechina idrata (C), (-)-epicatechina (EC) ed epigallocatechingallato (EGCG)) in infusi e bevande a base di tè (*Camellia sinensis*). L'acido gallico è utilizzato come controllo interno delle performance analitiche.

2. Principio

Il metodo in oggetto si basa su una separazione analitica ottenuta mediante cromatografia liquida accoppiata ad un rivelatore UV-visibile a fotodiodi (LC-UV/DAD).

3. Materiali e metodi

- ✓ Siringhe per filtrazione campioni.
- ✓ Filtri per soluzioni acquose con diametro dei pori di 0.45 µm o minore e ridotto volume morto.
- ✓ Vial da 2 mL per HPLC e tappi con setto PTFE/silicone.
- ✓ Vial da HPLC da 2 mL con riduttore e tappo con setto PTFE/silicone.
- ✓ Matracci da 5 mL di classe A.
- ✓ Pipette automatiche da 10-100 µL e da 20-200 µL tarate.
- ✓ Bilancia analitica con sensibilità di 0.01 mg o superiore, tarata.
- ✓ Vetreria da laboratorio.
- ✓ HPLC con pompa binaria (o indifferentemente quaternaria) e autocampionatore, eventualmente anche con degasatore (in alternativa degasare con elio).
- ✓ Rivelatore UV/visibile a fotodiodi.
- ✓ Colonna cromatografica Supelco Ascentis® Express RP-Amide (lunghezza 10 cm, particelle sferiche con tecnologia *fused core* con diametro 2.7 µm, diametro interno colonna 4,6 mm); si possono utilizzare anche altre colonne analoghe che permettano di ottenere una separazione analitica comparabile.
- ✓ Precolonne (guard columns) Supelco Ascentis® Express RP-Amide (lunghezza 0.5 cm, particelle sferiche con tecnologia *fused core* con diametro 2.7 µm, diametro interno cartuccia 4,6 mm) e relativo *holder* capillare.
- ✓ Software elaborazione dati cromatografici.

4. Reattivi e standard di riferimento

5.1 Standard di polifenoli (Sigma-Aldrich), elencati nell'ordine di eluizione:

- ✓ (AG) Gallic acid G7384
- ✓ (C) Catechin hydrate C1788
- ✓ (EC) Epicatechin E1753
- ✓ (EGCG) Epigallocatechingallate E4143

5.2 Standard e solventi utili alla preparazione del campione ed all'analisi:

- ✓ Acetonitrile (ACN) grado HPLC.
- ✓ Acqua deionizzata o per HPLC.
- ✓ Miscela acqua – acetonitrile 50 - 50 (V/V).
- ✓ Miscela acqua – acetonitrile 95 - 5 (V/V).
- ✓ Acido formico per analisi.
- ✓ Acido ascorbico.

5. Campo di applicazione

Il metodo di analisi permette di quantificare i marker polifenolici scelti (l'acido gallico verrà utilizzato unicamente come indicatore delle performance analitiche) in infusi di tè in foglie e prodotti commerciali finiti (con denominazione tè). La materia prima di partenza può essere tè verde (non fermentato) o tè nero (fermentato).

L'intervallo di lavoro è compreso tra 200 mg/L e 0.05 mg/L.

6. Procedimento

7.1 Preparazione degli standard di taratura strumentale - analiti singoli:

7.1.1 Soluzione madre (Soluzione A):

pesare, in un matraccio di classe A da 5 mL, circa 2.0 - 2.2 mg (annotando esattamente il peso al centesimo di mg) di ogni standard. Correggere la pesata tenendo conto della purezza e dell'eventuale idratazione (fornite sul certificato del produttore) e portare a volume con una miscela acqua – acetonitrile 50:50 a cui sia stato aggiunto come modificatore acido ascorbico ad una concentrazione 10 mg/L.

Conservare la *Soluzione A* in freezer (-18°C) e preparare le diluizioni di calibrazione prima dell'analisi direttamente in vial con riduttore conico. La durata della *Soluzione A*, conservata in freezer, è di 3 mesi.

7.1.2 Soluzione di taratura #1:

a 100 µL di miscela solvente 95:5 addizionata di modificatore (acido ascorbico 10 mg/L) aggiungere 100 µL della *Soluzione A* direttamente nel vial con riduttore (concentrazione finale circa **200 mg/L**).

7.1.3 Soluzione di taratura #2:

a 125 µL di miscela solvente 95:5 addizionata di modificatore (acido ascorbico 10 mg/L) aggiungere 75 µL della *Soluzione A* direttamente nel vial con riduttore (concentrazione finale circa **150 mg/L**).

7.1.4 Soluzione di taratura #3:

a 150 µL di miscela solvente 95:5 addizionata di modificatore (acido ascorbico 10 mg/L) aggiungere 50 µL della *Soluzione A* direttamente nel vial con riduttore (concentrazione finale circa **100 mg/L**).

7.1.5 Soluzione di taratura #4:

a 175 µL di miscela solvente 95:5 addizionata di modificatore (acido ascorbico 10 mg/L) aggiungere 25 µL della *Soluzione A* direttamente nel vial con riduttore (concentrazione finale circa **50 mg/L**).

7.1.6 Soluzione di taratura #5:

a 175 µL di miscela solvente 95:5 addizionata di modificatore (acido ascorbico 10 mg/L) aggiungere 25 µL della soluzione di taratura #1 (circa 200 mg/L) direttamente nel vial con riduttore (concentrazione finale circa **25 mg/L**).

7.1.7 Soluzione di taratura #6:

a 180 µL di miscela solvente 95:5 addizionata di modificatore (acido ascorbico 10 mg/L) aggiungere 20 µL della soluzione di taratura #3 (circa 100 mg/L) direttamente nel vial con riduttore (concentrazione finale circa **10 mg/L**).

7.1.8 Soluzione di taratura #7:

a 180 µL di miscela solvente 95:5 addizionata di modificatore (acido ascorbico 10 mg/L) aggiungere 20 µL della soluzione di taratura #4 (circa 50 mg/L) direttamente nel vial con riduttore (concentrazione finale circa **5 mg/L**).

7.1.9 Soluzione di taratura #8:

a 190 µL di miscela solvente 95:5 addizionata di modificatore (acido ascorbico 10 mg/L) aggiungere 10 µL della soluzione di taratura #4 (circa 50 mg/L) direttamente nel vial con riduttore (concentrazione finale circa **2.5 mg/L**).

7.1.10 Soluzione di taratura #9:

a 160 µL di miscela solvente 95:5 addizionata di modificatore (acido ascorbico 10 mg/L) aggiungere 40 µL della soluzione di taratura #7 (circa 5 mg/L) direttamente nel vial con riduttore (concentrazione finale circa **1 mg/L**).

7.2 Preparazione dei campioni reali - infusi e bevande commerciali a base di tè:

Filtrare su filtro con pori di diametro 0.45 µm ogni campione (infuso, bevanda commerciale) direttamente nel vial da 2 mL, avere cura di filtrare un volume almeno 4 volte superiore al volume morto del dispositivo filtrante dichiarato dal produttore.

7.3 Preparazione dei Quality Controls - infusi e bevande commerciali a base di tè addizionati di quantità note di miscela standard degli analiti per la verifica dell'accuratezza:

Filtrare su filtro con pori di diametro 0.45 µm i campioni per i quali si intende procedere ad una verifica dell'accuratezza della stima quantitativa avendo cura di utilizzare un volume almeno 4 volte superiore al volume morto dichiarato dal produttore. Prelevare un volume opportuno di filtrato e trasferirlo in vial da 2 mL quindi addizionare un volume prefissato di miscela standard (*Soluzione A*), assicurarsi che il campione risulti omogeneo quindi procedere con la separazione analitica.

7.4 Costruzione delle curve di taratura analiti singoli:

Iniettare le soluzioni di calibrazione ed i campioni. Per ogni molecola determinare l'equazione della retta di regressione tra concentrazione nominale ed area cromatografica utilizzando i seguenti standard di taratura:

Analita	Tè fermentato	Tè verde	Tè deteinato/pesca
AG	1.0-2.5-5-10-25-50	25-50-100-150-200	1.0-2.5-5-10-25-50
C	1.0-2.5-5-10-25-50	1.0-2.5-5-10-25-50	1.0-2.5-5-10-25-50
EC	1.0-2.5-5-10-25-50	1.0-2.5-5-10-25-50	1.0-2.5-5-10-25-50
EGCG	1.0-2.5-5-10-25-50	25-50-100-150-200	1.0-2.5-5-10-25-50
GCG	1.0-2.5-5-10-25-50	1.0-2.5-5-10-25-50	1.0-2.5-5-10-25-50
Caffeina			

Il coefficiente di determinazione per le rette di regressione (R^2) stimato mediante foglio di calcolo Excel® o con lo strumento integrato al software di elaborazione dei dati cromatografici, deve essere maggiore o uguale di 0.980.

7.5 Intervalli di concentrazione usuali (bevande a base di tè industriale a base di vero infuso):

Analita	Tè fermentato	Tè verde	Tè deteinato/pesca
AG	-	-	-
C	6-3	12-6	7-1
EC	30-15	40-30	30-5
EGCG	42-25	210-140	40-5

7.6 Condizioni strumentali:

7.6.1 Fasi eluenti: fase A: Acetonitrile (ACN) + 1% Acido Formico (v/v):

fase B: Acqua (H₂O) + 1% Acido Formico (v/v)

7.6.2 Programmata di eluizione e altri parametri cromatografici

Tempo (min)	% fase A	% fase B	flusso (mL/min)
0.0	8	92	1.60
4.3	22	78	1.60
6.3	25	75	1.60
13.0	90	10	1.60
15.0	100	0	1.60
18.5	100	0	1.60

Tempo di riequilibrio dopo ogni analisi: 5.0 min

Volume di iniezione: 8 µL

Parametri di acquisizione UV/DAD			
Run time	18 min	Rise time	2.0 min
Scans			
Min wavelength	210 nm	Scan rate	5 Hz
Max wavelength	500 nm	Bandwidth	2 nm
Step	210 nm		
Channels			
Channel A	280 nm	Bandwidth	3 nm
Channel B	380 nm	Bandwidth	3 nm
Data rate	20 Hz		
Deuterium lamp	ON		
Tungsten lamp	ON		

Parametri di integrazione tracce cromatografiche			
280 nm	Start (min)	Stop (min)	Value
Width	0.0	16.0	0.1
Threshold	0.0	16.0	100
Minimum Area	0.0	16.0	5000
Shoulder Sensitivity	0.0	16.0	0.01
Horizontal baseline	0.0	16.0	OFF
360 nm	Start (min)	Stop (min)	Value
Width	0.0	16.0	0.2
Threshold	0.0	16.0	1000
Minimum Area	0.0	16.0	5000
Shoulder Sensitivity	0.0	16.0	1
Horizontal baseline	0.0	16.0	OFF

8. Verifica delle prestazioni del metodo analitico (accuratezza) e parametri di accettabilità

8.1 Controllo Qualità

8.1.1 Ogni volta che si eseguono analisi di campioni di bevanda ed infuso è necessario effettuare un controllo del bianco utilizzando la miscela acqua – acetonitrile 95:5 (v/v) filtrata su filtro per HPLC: non dovranno essere presenti picchi cromatografici in corrispondenza dei tempi di ritenzione di interesse.

compreso nei limiti definiti non è necessario procedere con una nuova taratura strumentale.

9. Calcoli quantitativi ed espressione dei risultati

Per calcolare la concentrazione dei bio-marker previsti dal metodo è sufficiente interpolare il valore di area cromatografica risultante utilizzando le equazioni delle rette di regressione lineare così come descritto precedentemente.

Lo schema di calcolo è il seguente:

ottenuta la retta di regressione di formula generale:

$$y=mx(+q)$$

sostituire a y l'area del picco cromatografico corrispondente all'analita registrata per il campione in esame (bevanda e/o infuso) e calcolare il valore di concentrazione (x), in mg/L.

Il risultato finale potrà essere espresso in mg/L oppure in mg/Kg (nel caso di infusi a partire da droga secca). La sommatoria dei singoli bio-marker (ciascuno alla concentrazione stimata dal metodo) potrà essere presa come parametro di confronto tra campioni, anche in accordo al principio utilizzato nella metodica ufficiale ISO 14502-2.

È altresì possibile esprimere il risultato in equivalenti di catechina (moltiplicando la concentrazione ottenuta per il peso molecolare della catechina e dividendo per il peso molecolare di ogni standard considerato singolarmente) in accordo a quanto riportato in una precedente pubblicazione scientifica¹.

I valori di limite di quantificazione (LOQ) e di limite di rilevabilità (LOD), calcolati analizzando sperimentalmente soluzioni di calibrazione a diluizione scalare fino ad ottenere, sulla diluizione massima e su 10 repliche analitiche, un valore di CV% (Coefficiente di Variazione %) delle aree cromatografiche inferiore a 20%, sono riportati in tabella:

Limiti di prestazione del metodo (mg/L - 10 repliche analitiche)		
Analita	LOQ	LOD
AG	-	-
C	0.05	0.01
EC	0.05	0.01
EGCG	0.05	0.01

¹ Chiara Cordero, Francesca Canale, Daniele Del Rio, Carlo Bicchi (2009). Identification, quantitation, and method validation for flavan-3-ols in fermented ready-to-drink teas from Italian market using HPLC-UV/DAD and LC-MS/MS. JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE, vol. 32, p. 1-9

10. Incertezza sul risultato

Incertezza		
Analita	Precisione aree cromatografiche	Incertezza relativa composta
AG	-	-
C	4.7	4.7E-02
EC	5.5	5.5E-02
EGCG	6.5	6.6E-02

7. Layout cromatogrammi soluzioni di calibrazione e campioni reali

Figura 1: profilo cromatografico registrato a 280 nm di una miscela di calibrazione (concentrazione 5 mg/L) che include i bio-marker di qualificazione del tè incluso l'acido gallico (AG).

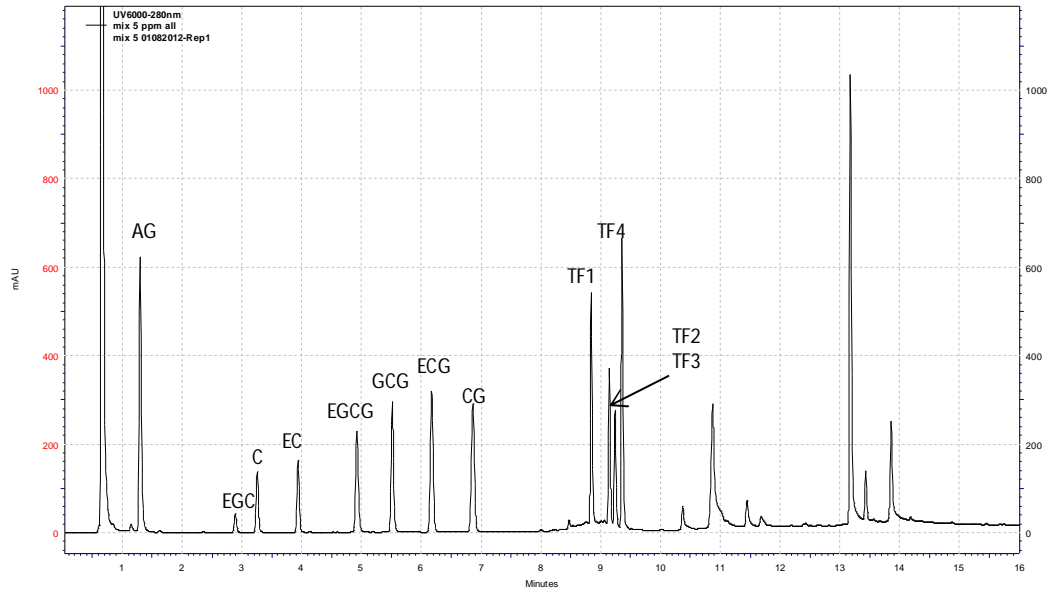


Figura 2: ingrandimento della zona di eluzione delle theaflavine (380 nm).

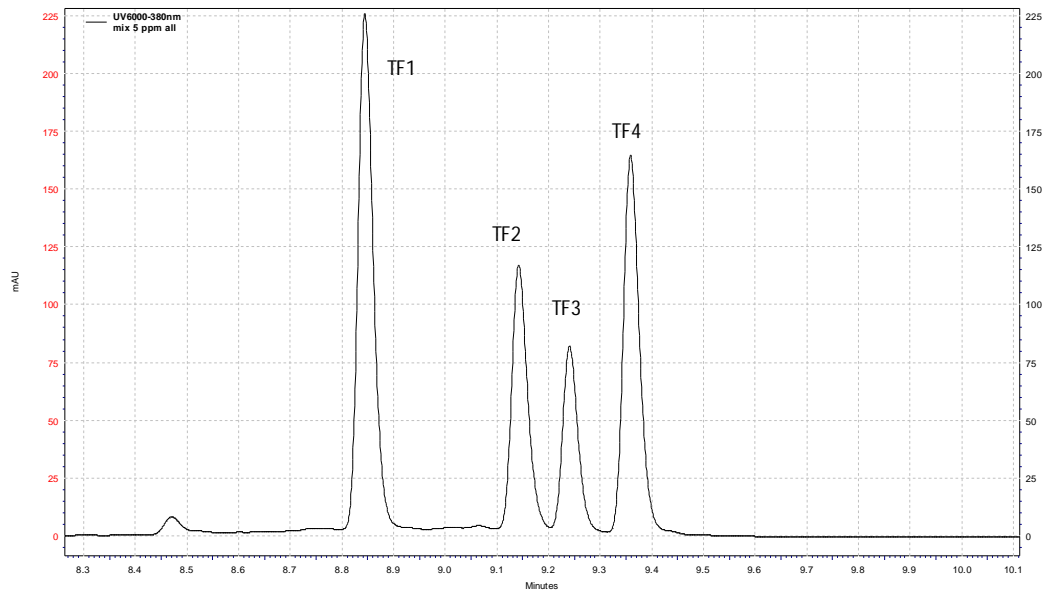


Figura 3: profilo cromatografico di una bevanda industriale a base di tè fermentato (traccia nera registrata a 280 nm) sovrapposto al profilo del medesimo campione addizionato di una quantità nota di analiti (Quality Controls - traccia rossa).

