

DETERMINAZIONE DELLE CONCENTRAZIONI DI CARNOSINA, ANSERINA, L-ISTIDINA E 3-METIL-L-ISTIDINA IN CAMPIONI DI LATTE OVINO MEDIANTE METODICA HPLC

¹Ducci M., ¹Pacchini S., ¹Niccolini A., ²Fratini F., ²Periccioli M., ¹Martelli F.
¹Dip.to di Anatomia Biochimica e Fisiologia Veterinaria – ²Dip.to Patologia Animale
Facoltà di Medicina Veterinaria – Università di Pisa

Summary

The aim of this research was the detection, in sheep milk, of Carnosine, Anserine and their correlated compounds by HPLC method with isocratic condition and o-Phthalaldehyde post column derivatisation (50 °C). 71 milk samples of "Sarda" breed sheep were used in this research. 16 of these samples were positive to *Staphylococcus coagulase* +. Only Anserine wasn't in all samples. The mean concentration (ng/ml±S.E.) of Carnosine (193,80 ± 147,41) was higher than Anserine (112,55 ± 5,30) and both molecules were lower than L-Histidine (7698,42 ± 613,26) and 3-methyl-L-Histidine (13562,30 ± 988,48). A negative correlation was observed between Carnosine concentration and UFC/ml of *Staphylococcus coagulase* + ($r = 0,660$ $p < 0,001$). These antioxidant and buffering molecules, could inhibit the lipid peroxidation improving milk quality avoiding its degradation. Carnosine, showing protective properties of membrane and stimulating the immunity, could exert an indirect antibacterial activity.

Key words : HPLC - Histidine dipeptides - milk – sheep

Introduzione

I dipeptidi istidinici come la Carnosina (β -alanina-L-Istidina) e molecole correlate mostrano numerose attività biologiche incluso l'attività tamponante, la regolazione dell'attività enzimatica e l'inibizione delle reazioni ossidative (1). È stato mostrato che la Carnosina può inattivare le specie reattive ossigenate ed avere azione chelante sui metalli pesanti (2). Questi dipeptidi sono presenti in elevate quantità nei tessuti eccitabili come il tessuto muscolare striato ed il tessuto nervoso di diverse specie animali e nell'uomo (3,4). Essi rappresentano, nella difesa della cellula dallo stress ossidativo, la componente idrosolubile in contrapposizione a quella liposolubile rappresentata dall' α -Tocoferolo (5). Inoltre la loro presenza porta ad una riduzione dei composti aldeidici generati dalla perossidazione lipidica (6). Le loro concentrazioni nei tessuti animali risultano specie specifiche e la loro determinazione appare importante anche nella valutazione della presenza di proteine di origine animale negli alimenti destinati a soggetti ruminanti (7).

Scopo del presente studio è stato quello di ricercare la presenza dei dipeptidi imidazolici nel latte di pecora con una nuova metodica in HPLC messa a punto in precedenza dagli Autori.

Materiali e Metodi

Per la sperimentazione sono state utilizzate 71 pecore (razza *Sarda*), allevate allo stato semibrado nel Grossetano. Per ogni soggetto veniva raccolto un campione di latte di 10 ml.

Preparazione dei campioni – I campioni di latte erano centrifugati a 11000 rpm per 2' per effettuare la scrematura e mantenuti a + 4°C fino al momento dell'analisi.

A 750 μ l di latte scremato erano aggiunti 750 μ l di acido 5-solfosalicilico (5-SSA) al 5%, agitati su Vortex per 30", centrifugati a 10700 rpm per 20' e 1 ml di sovrantante filtrato su acetato di cellulosa (\varnothing 0.45 μ m). I campioni erano posti a + 4 °C per 15', centrifugati a 12000 rpm per 3' e 20 μ l di sovrantante erano iniettati in HPLC.

Strumentazione e condizioni del sistema HPLC – Pompe Jasco: PU-158 and PU 880; Rivelatore a fluorescenza (Jasco) FP 920, λ_{ex} = 340 ; λ_{ecc} = 445; Colonna: Xpertek SP-SCX 5 μ a scambio cationico (Cobert Associates, Inc.); Fase mobile: 5 % acetonitrile – 95 % soluzione 6 mM HCl + 0,8 moli/litro di NaCl (v/v); Flusso: 1ml/min; Derivatizzazione: post-colonna con o-Ftaldialdeide (OPA) (0,5 ml/min) alla temperatura costante di 50°C.

Reagenti - Carnosina, Anserina, L-Istidina, 3-metil-L-Istidina, Acido 5-solfosalicilico, Acido borico, Brij 35 (soluzione) e 2-Mercaptoetanolo provenivano da (Sigma-Aldrich, Milano). Cloruro di Sodio, Metanolo, Acetonitrile e Acido cloridrico da (J.T. Baker); Idrossido di potassio da (Carlo Erba, Milano), o-Ftaldialdeide da (Fluka).

Risultati

Nella figura 1 è riportato il cromatogramma relativo ad un campione di latte di pecora effettuato su colonna a scambio cationico, in condizioni isocratiche di fase mobile e con derivatizzazione post colonna con OPA alla temperatura costante di 50°C. Si possono rilevare quattro picchi completamente separati relativi a: L-Istidina, 3-Metil-L-Istidina, Carnosina, ed Anserina.

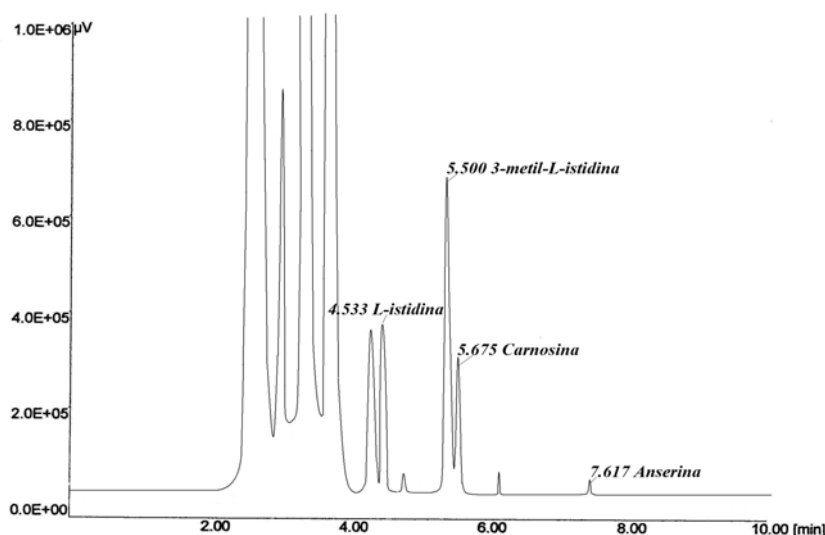


Figura 1: Cromatogramma: dipeptidi istidinici nel latte ovino

Nella tabella 1 sono riportate le concentrazioni medie (ng/ml \pm E.S.) della Carnosina, Anserina, L-Istidina e 3-metil-L-Istidina nel latte di pecora. Come si può osservare la Carnosina è significativamente più elevata dell'Anserina (~20 volte) ed ambedue risultano nettamente inferiori rispetto alle concentrazioni dei loro componenti.

	Carnosina	Anserina	L-Istidina	3-CH₃-L -Istidina
Media (ng/ml)	1931,80	112,55	7689,42	13562,30
E.S.	148,64	5,30	618,36	996,70

Tabella 1: Valori medi \pm E.S. degli analiti nei campioni di latte ovino (n=71)

Nella tabella 2 sono riportate le concentrazioni medie (ng/ml \pm E.S.) dei dipeptidi presenti in campioni di latte sia positivi che negativi alla presenza di UFC di *Staphilococcus coagulasi* +. La Carnosina e l'Anserina risultano meno concentrate nei campioni in cui è stata rilevata la presenza di UFC di *Staphilococcus coagulasi* +; in questi campioni, al contrario, la L-Istidina e la 3-metil-L-Istidina risultano più concentrate.

	Carnosina		Anserina		l-Istidina		3-CH ₃ -l-Istidina	
	Staph -	Staph +	Staph -	Staph +	Staph -	Staph +	Staph -	Staph +
Media (ng/ml)	1963,8	1821,7	117,3	97,67	7321,1	8955,7	12586,2	16917,5
E.S.	181,7	234,1	6,7	5,4	743,9	1032,8	971,3	3009,2

Tabella 2: Valori medi \pm E.S. degli analiti nei campioni di latte ovino in assenza (n=55; Staph -) ed in presenza di UFC di Staphilococcus coagulasi + (n=16; Staph +).

Nella Figura 2 è riportata la retta di regressione lineare della Carnosina vs le UFC Staphilococcus coagulasi +, essa mostra una correlazione negativa significativa ($R=0,660$; $p<0,01$)

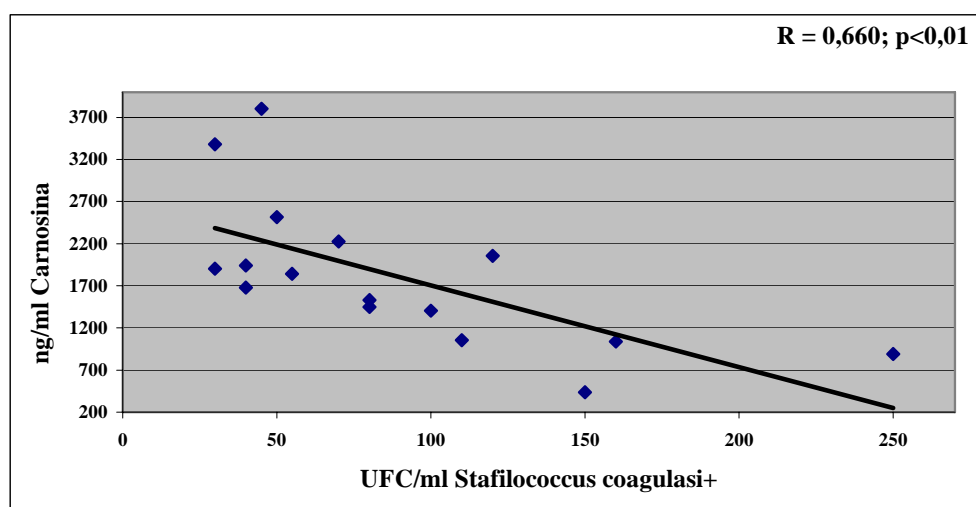


Figura 1: Retta di regressione tra Carnosina vs UFC di Staphilococcus coagulasi + (n=16)

Discussione

Con questa nuova metodica in HPLC già standardizzata dagli Autori (8,9) è stato possibile rilevare per la prima volta la presenza di Carnosina, Anserina e loro componenti, L-Istidina e 3-Metil-L-Istidina, nel latte di pecora. Tra i due dipeptidi la Carnosina è risultata più concentrata. Tali molecole, che mostrano un'attività antiossidante e tamponante (10,11,12) insieme ad altre molecole come l' α -Tocoferolo, potrebbero esplicitare un'azione protettiva delle membrane dalla perossidazione lipidica (5).

In nostri studi preliminari, non ancora pubblicati, abbiamo osservato che la Carnosina *in vitro*, alle concentrazioni rilevate nel latte, non inibisce la replicazione dello Stafilococco. In questa ricerca, invece, è stata rilevata una correlazione negativa tra concentrazione della Carnosina nel latte e presenza di UFC di Staphilococcus coagulasi +; questo potrebbe suggerire una proprietà antibatterica indiretta della Carnosina su questi microrganismi.

Infine la minore concentrazione dei dipeptidi rispetto a quella più elevata dei loro componenti nei campioni di latte in presenza di UFC di Staphilococcus coagulasi + potrebbe indicare la rottura del legame dipeptidico nel latte di soggetti con processi infiammatori in corso.

La Carnosina presente nel latte, inibendo la perossidazione lipidica, potrebbe migliorare la qualità percepita dal consumatore in quanto diminuendo la formazione delle aldeidi si ridurrebbe il substrato per la formazione di melanoidine (reazione di Maillard) che

contribuiscono a dare lo sgradevole sapore di cotto e il colore grigio al latte trattato termicamente o conservato per lungo tempo.

Conclusioni

Questa metodica ha reso possibile per la prima volta la determinazione dei dipeptidi istidinici nel latte ovino dove sono presenti in basse concentrazioni; ulteriori studi saranno necessari per valutarne la proprietà antiossidante sia da soli che in associazione alle altre molecole antiossidanti non enzimatiche quali: Glutazione, Acido ascorbico, α -Tocoferolo Coenzima Q₁₀ anch'essi presenti nel latte.

Bibliografia

1. Decker E.A., Livisay S.A. and Zhou S - A revaluation of activity of purified Carnosine - *Biochemistry (Mosc)* 2000, Jul; 65(7):766-70. Review.
2. Decker E.A., Ivanov V., Zhu B.Z. and Frei B. - Inhibition of Low-Density Lipoprotein Oxidation by Carnosine and Histidine - *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 511-516
3. Kohen R., Yamamoto Y., Cundy K. and Ames B.N. - Antioxidant Activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain - *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1988, 85: 3157-3179,
4. Penafiel R., Ruzafa C., Monserrat F., Cremades A. – Gender-related differences in carnosine, anserine and lysine content of murine skeletal muscle – *Amino acid*, 2004, 26 (1): 53 –58
5. Quinn Pj, Boldyrev A.A., Formazuyk V.E. - Carnosine: its properties, functions and potenzial therapeutic applications - *Mol. Aspects Med.*, 1992,13 (5): 379-444
6. Hipkiss A.R., Michaelis J., Syrris P. – Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-Carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS Letters* 1995, 371, 81-85.
7. Schonherr J. - Analysis of products of animal origin in feed by determination of carnosine and related dipeptides by High-performance liquid chromatography - *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50 1945-1950.
8. Ducci M., Niccolini A., Pacchini S., Martelli F., Della Longa A., Buoncristiani P., Martelli F. - Confronto tra diverse fasi mobili per la determinazione in HPLC di carnosina, anserina, l-istidina, 3-metil-L-istidina - *Ann. Fac. Med. Vet. Pisa*, 2004. In stampa
9. Ducci M., Pacchini S., Niccolini A., Della Longa A., Gazzano A., Martelli F. - Effetto della Variazione di temperatura sulla reazione di derivatizzazione dei dipeptidi istidinici e loro componenti - *Ann. Fac. Med. Vet. Pisa*, 2004. In stampa
10. Sanocka D and Kurpysz M - Reactive oxygen species and sperm cells - *Reprod Biol Endocrinol.* 2004 Mar 23;2(1):12
11. Boldyrev A., Buligina E., Leinsoo T., Petrushanko I., Tsubone S., Abe H. - Protection of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds - *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2004 Jan;137(1):81-8.
12. Abe H. - Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle - *Biochemistry (Mosc)* 2000 Jul 65 (7):757-65. Review.