

SEMI D'UVA ESTRATTI: metodi analitici per il controllo di qualità e l'identificazione di adulterazioni

L'uva, il frutto della vite, è utilizzata quale fonte di alimenti e bevande da migliaia di anni. I semi del frutto, quali sottoprodotti del succo d'uva e dell'industria vinicola, sono usati freschi o più comunemente essiccati per preparare estratti liquidi (acquosi, idroalcolici, in acetato di etile o acetone) che, per successiva filtrazione ed essiccazione (per esempio con metodo "Spray drying") si concentrano in composti fenolici, costituenti naturali dell'uva.

Gli estratti di semi d'uva sono tra le preparazioni vegetali più ampiamente utilizzate negli integratori alimentari per le sempre più crescenti evidenze scientifiche a sup-

porto dei loro effetti benefici sulla salute.^{1,2} Oltre a motivazioni economiche, l'adulterazione intenzionale dei prodotti a base di estratti di semi d'uva è spinta dall'instillare nel consumatore una percezione errata della qualità del prodotto, che di fatto viene arricchito con proantocianidine (PAC) provenienti da altre fonti vegetali disponibili sul mercato a prezzi più convenienti (Tabella 1). Tra gli adulteranti più usati, un estratto ottenuto dalla buccia delle arachidi, un sottoprodotto dell'industria di questo legume, che è disponibile sul mercato a costi inferiori e in volumi di gran lunga superiori rispetto agli

Nome comune: uva

Altri nomi comuni:

Inglese: European grape, wine grape³

Cinese: *Pu tao* (葡萄)

Francese: Raisin

Tedesco: Traube, Weintraube

Italiano: Uva

Spagnolo: Uva

Nome botanico: *Vitis vinifera* L.³

Famiglia: Vitaceae

Sinonimi: *Cissus vinifera* (L.) Kuntze; *Vitis sylvestris* C.C.Gmel.; *Vitis vinifera* subsp. *sativa* Hegi; *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* (C.C.Gmel.) Hegi.^{4,5}



Tabella 1 – Principali specie botaniche usate per adulterare gli estratti di semi d'uva

Specie pianta	Nome Comune	Parte della pianta
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Arachide	Buccia
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	Tè	Foglie
<i>Malus domestica</i> Borkh.	Mela	Frutto
<i>Pinus massoniana</i> Lamb.	Pino rosso cinese	Corteccia
<i>Pinus pinaster</i> Aiton	Pino marittimo	Corteccia
<i>Prunus dulcis</i> (Mill.) D.A.Webb	Mandorla	Guscio
<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	Sorgo	Cuticola

estratti di semi d'uva. Negli Stati Uniti, un tipico mulino per arachidi può produrre fino a 17 t di bucce di arachidi a settimana; nel 2009, il prezzo minimo sul mercato era di 0,02 \$/kg⁶ e i costi sono ancora bassi. In Cina, ad esempio, nel 2015, il valore medio della buccia di arachidi sul mercato era di 10-13 \$/kg, contro i 20-22 \$/kg di un estratto di corteccia di pino e i 30-35 \$/kg di un estratto di semi d'uva (estratti coperti da brevetto possono salire fino a 110 \$/kg).

Alcune associazioni americane hanno pubblicato un documento di orientamento sulle varie tecnologie e metodi analitici, oggi disponibili, per distinguere gli estratti di semi d'uva da potenziali adulteranti, facendo per ciascun metodo una disamina di vantaggi e svantaggi e della loro capacità di autenticare gli estratti di semi d'uva e di rilevare la presenza, quali adulteranti, di estratti ricchi di PAC derivanti da altre fonti vegetali.

Identificazione e distinzione attraverso analisi macro- e microscopica

L'identificazione macroscopica dei semi d'uva^{7,8} è un utile strumento per distinguere i semi d'uva essiccati da altri semi. La valutazione macroscopica degli estratti di semi d'uva, dal tipico colore marrone, serve a determinare l'assenza di materiale estraneo contenente antociani. Tuttavia, l'identificazione macroscopica non è sufficientemente adeguata ad autenticare un estratto di semi d'uva o per rilevare potenziali adulterazioni.

Sebbene in letteratura siano disponibili alcuni dati sulle caratteristiche microscopiche dei semi d'uva^{8,9}, anche le tecniche microscopiche non sono ritenute uno strumento efficace per riuscire a distinguere gli estratti di semi d'uva da specie adulteranti, in quanto attraverso il processo di estrazione viene rimossa qualsiasi struttura cellulare caratteristica utile a determinare l'identità del materiale.



Identificazione e distinzione genetica

Non esistono tracce in letteratura di indagini genetiche sviluppate allo scopo di autenticare estratti di semi d'uva o di rilevare adulterazioni con estratti di altre piante. Sebbene alcuni metodi basati sull'analisi del DNA abbiano avuto un discreto successo nell'identificazione di alcuni estratti secchi,¹⁰⁻¹³ gli stessi presentano tuttavia delle limitazioni nel determinare l'identità e nel caratterizzare il profilo fitochimico di ingredienti sottoposti a complesse lavorazioni come gli estratti di semi d'uva.^{12,14,15}



Identificazione e distinzione chimica

A differenza dei molteplici metodi, oggi disponibili, per l'analisi del succo d'uva e dei vini rossi e bianchi, il numero di tecniche analitiche sviluppate per l'autenticazione degli estratti di semi d'uva e per il rilevamento di eventuali adulterazioni è ancora limitato. La distinzione tra gli estratti di semi d'uva ed i loro adulteranti mediante analisi chimica richiede una conoscenza approfondita dei loro



costituenti, in particolare della struttura delle proantocianidine (PAC) presenti sia nei semi d'uva che nelle specie adulteranti. La composizione degli estratti è influenzata da diversi fattori tra i quali l'origine geografica della pianta, la cultivar ed il processo di produzione dell'estratto.

In **Tabella 2** sono riassunte le principali caratteristiche dei PAC da semi d'uva e da altre fonti vegetali a più basso costo, tra quelle maggiormente utilizzate come specie adulteranti.

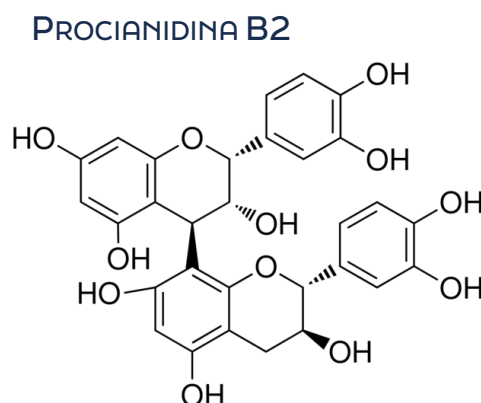
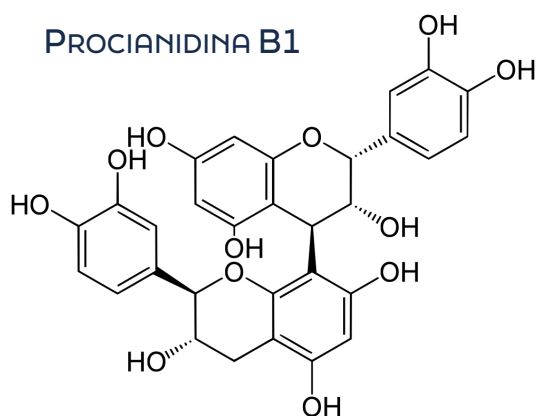
Tabella 2 – Proantocianidine caratteristiche di materie prime vegetali a basso costo, contenenti tannini condensati^a

Ingrediente	Monomeri	Galloilazione	Tipo di PAC	Grado di polimerizzazione ^b
Semi d'uva	Catechina, epicatechina	Sì	Tipo B	2-12 ^{c, 19, 20, 57}
Buccia di mandorla	Afzelechina, catechina, epiafzelechina, epicatechina, epigallocatechina, gallocatechina	NO	Tipo A e B	8-9 ⁵⁸
Buccia della mela	Catechina, epicatechina	NO	Tipo B	3-10 ^{37, 40, 41, 59}
Foglie di tè verde	Catechina, epicatechina, epiafzelechina, epigallocatechina, gallocatechina	Sì	Tipo B	1-11 ⁶⁰
Corteccia di pino marittimo	Catechina, epicatechina, epigallocatechina, gallocatechina	Sì	Tipo B	3-7 ⁴⁶
Corteccia di <i>P. massoniana</i>	Catechina, epicatechina, epigallocatechina, gallocatechina	Sì	Tipo A e B	Nessun dato
Buccia di arachide	Catechina, epicatechina	NO	Tipo A e B	1-9 ⁶¹
Semi del sorgo	Catechina, epicatechina	NO	Tipo B	8 ⁵⁵ Rosso: 10-20 ⁵⁶ Bianco: 5-12 ⁵⁶

^a I tannini condensati (o protoantocianidine) sono costituiti da ripetizioni oligomeriche o polimeriche di unità di flavonoidi connessi tramite legami carbonio-carbonio. Possono contenere da 2 a 50 unità di flavonoidi o un numero maggiore (es. polimeri). Da un punto di vista chimico sono ripetizioni della catechina e della epicatechina e loro esteri dell'acido gallico.

^b Determinato attraverso tiolisi.

^c Il numero dipende dal metodo di lavorazione; per i semi d'uva, il grado di polimerizzazione tra 1 e 37 è stato riportato per frazioni isolate.⁶²⁻⁶⁴



Caratterizzazione fitochimica degli estratti di semi d'uva e di potenziali adulteranti

Vitis vinifera L.

Gli estratti di semi d'uva sono utilizzati negli integratori alimentari quasi esclusivamente in forma di estratti secchi. L'estratto contiene composti fenolici in concentrazioni 50-90%. I principali composti fenolici sono monomeri e polimeri del flavan-3-olo e loro esteri dell'acido gallico. I semi d'uva contengono prevalentemente PAC di tipo B. Si tratta di polimeri di flavan-3-olo le cui unità sono collegate da un singolo legame. Da un estratto di semi d'uva sono state isolate le procianidine(*) B1, B2, B3 e B4 a concentrazioni nell'estratto, rispettivamente del 3,2%, 7,1%, 1,5% e 1,2%.¹⁶ Risultati simili sono stati riportati in uno studio più recente con concentrazioni di procianidine B1, B2, B3 e B4 rispettivamente, del 7,7%, 8,3%, 2,8% e 1,6%.¹⁷ In estratti di semi d'uva è stata inoltre rilevata la presenza di dimeri, trimeri, tetrameri e polimeri di tipo B fino a dimensioni di un dodecamero trigallato.¹⁸ Dall'analisi di quattro estratti di semi d'uva in commercio è emersa una grande variabilità nella distribuzione del peso molecolare delle procianidine. Il grado di polimerizzazione (DP) medio variava tra 3 e 11.^{19,20} Il DP può comunque deviare da questi valori subendo anche l'influenza del processo di produzione. Sul mercato sono stati identificati due diversi tipi di estratti di semi d'uva il cui contenuto in polifenoli varia a seconda se trattati o meno con

(*) I termini "proantocianidina" e "procianidina" sono spesso usati in modo intercambiabile in letteratura. Tuttavia, proantocianidina è un termine generico per una famiglia di composti polifenolici strutturalmente correlati costituiti da procianidine, prodelfinidine, propelargonidine, ecc. Le differenti classi di proantocianidine si distinguono per lo specifico profilo di idrossilazione del flavan-3-olo, ad esempio 3,3', 4', 5,7-pentaidrossiflavan-3-olo per le procianidine, o 3, 4', 5, 7-tetraidrossiflavan-3-olo per le propelargonidine. Il nome "proantocianidina" deriva dal fatto che questi composti producono antocianidine se trattati con un acido minerale. In particolare, da una procianidina si ottiene l'antocianidina "cianidina", da una prodelfinidina la "delfinidina", mentre una propelargonidina è convertita in "pelargonidina", ecc.



l'enzima tannasi. Questo enzima, separando l'acido gallico dalle molecole quali i flavan-3-oli, è in grado ad esempio di dividere l'epicatechina-3-*O*-gallato in epicatechina ed acido gallico. Mentre gli estratti non trattati con tannasi hanno generalmente concentrazioni di acido gallico inferiori allo 0,5%, negli estratti trattati con l'enzima si trovano livelli di acido gallico più elevati (1,75%-4,8%) e tracce di procianidine galloilate.²¹⁻²⁵

***Arachis hypogaea* L.**

Gli estratti della buccia di arachide contengono procianidine di entrambi i tipi, A e B.^{26,27} Le procianidine dimeriche A1 e A2 sono risultate le più abbondanti (6,9% e 2,1%, rispettivamente), mentre la B7 era presente allo 0,2%.¹⁶ Studi successivi hanno confermato la presenza delle procianidine A1 e A2 ed isolato quattro trimeri e due tetrameri (procianidine A-F dell'arachide). Oltre alla procianidina A1, la procianidina E è risultata la più abbondante in un estratto della buccia del legume in 70% acqua-acetone.²⁸ Altri composti fenolici contenuti nella buccia di arachide sono rappresentati da flavonoli (quercetina, canferolo, isoramnetina e loro glicosidi), isoflavoni (genisteina, esperetina), antociani (cianidina, cianidin-3-*O*-glucoside, cianidin-3-*O*-soporoside, peonidina-3-*O*-galattoside e petunidina-3-*O*-galattoside) e resveratrolo (3,5,4'-triidrossi-trans-stilbene).²⁹

***Camellia sinensis* (L.) Kuntze**

Gli estratti di tè verde sono ben caratterizzati e dominati dai monomeri del flavan-3-olo e dai loro gallati. Il principale flavan-3-olo delle foglie del tè verde è l'epigallocatechina gallato (EGCG) a concentrazioni dello 0,7-14,4%; seguono epigallocatechina (0-4,7%), epicatechina gallato (0,2-4,2%), epicatechina (0-1,5%), catechina (0-1,2%) e gallocatechina (0,3-0,8%).³⁰⁻³³ Sul mercato si trovano anche estratti di tè verde altamente purificati contenenti EGCG fino al 95%; tuttavia, gli estratti generalmente utilizzati negli integratori



alimentari hanno titoli in EGCG del 40%-70%. Nelle foglie di tè verde sono presenti anche caffeina (1-3%), teobromina (0,01-0,9%) e piccole quantità (< 0,1%) di teofillina.^{30,31,34}

La foglia contiene, inoltre, flavonoidi, prevalentemente glicosidi della quercetina, canferolo e miricetina, quali 3-*O*-glucosidi, 3-*O*-galattosidi, 3-*O*-rutinosidi, 3-*O*-galattosilrutinosidi e 3-*O*-glucosilrutinosidi.^{32,35,36} La distinzione tra un estratto di tè verde ed un estratto di semi d'uva è abbastanza semplice date le molte differenze nel profilo fitochimico.

***Malus domestica* Borkh.**

I composti fenolici presenti nella buccia della mela sono rappresentati da glicosidi del flavonolo (es. iperoside, quercitrina, avicularina), monomeri del flavan-3-olo (epicatechina, catechina) e suoi polimeri, acidi idrossicinnamici (acido clorogenico, acido caffeico) e dal diidrocalcone "florizina".^{37,38} La buccia delle mele rosse contiene anche antociani, principalmente cianidin-3-*O*-galattoside ed altri glicosidi della cianidina.³⁹ È nella mela intera che si trova la concentrazione più elevata di fenoli (> 70%);

seguono gli acidi idrossicinnamici (4-18%), i flavonoli (1-11%), i diidrocalconi (2-6%) e le antocianine (1-3%).³⁹⁻⁴¹ I composti fenolici presenti nella buccia della mela sono in quantità da 3 a 28 volte superiori rispetto a quelli della polpa. Quest'ultima contiene principalmente PAC e acidi fenolici, mentre i glicosidi flavonolici sono del tutto assenti.

Dai risultati di uno studio di ricerca tedesco, epicatechina e procianidina B2 sono risultati i principali flavan-3-oli della mela.³⁸ I PAC di questo frutto consistono principalmente di procianidine di tipo B lineari aventi come unità predominante l'epicatechina.^{42,43} Sebbene l'adulterazione di un estratto di semi d'uva con PAC di mela non sia economicamente vantaggioso, la buccia di questo frutto rappresenta una delle principali fonti di procianidina B2, composto presente in quantità abbondante anche nell'estratto di semi d'uva.



***Pinus* spp.**



Gli estratti di corteccia di *P. massoniana* sono presenti sul mercato ad un costo 5-10 volte inferiore rispetto agli estratti di *Pinus pinaster* Aiton. Ciò rende il *P. massoniana* una specie adulterante particolarmente interessante sotto il profilo economico. I PAC in forma galloilata sono presenti in quantità esigua in entrambe le specie di pino.¹⁸

Le unità monomeriche consistono principalmente in catechina ed epicatechina, sebbene vi siano anche piccoli quantitativi di epigallocatechina e gallocatechina.^{44,45} Tipicamente,

gli estratti della corteccia di pino contengono PAC di tipo B. Il DP medio dei PAC (esclusivamente di tipo B) determinati in un estratto di *P. pinaster* in acqua calda varia tra 6 e 7.^{44,46} Risultati simili sono stati riportati anche per il pino silvestre (*P. sylvestris* L.).⁴⁷

Dal confronto delle impronte digitali, ottenute in HPLC-UV, di estratti di semi d'uva e *P. massoniana* non sono emerse differenze sostanziali, ad eccezione di una maggior concentrazione di PAC con un più elevato DP osservata nell'estratto di pino. Lo spettro di quest'ultimo presenta inoltre un picco di un dimero di tipo A.²¹

***Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Web**

La composizione in PAC di un estratto della buccia di mandorla, un prodotto di scarto dell'industria di questo frutto, consiste nelle seguenti molecole monomeriche: afzelechina, catechina, gallocatechina, epiafzelechina, epicatechina ed epigallocatechina.⁴⁸

Oltre a catechina ed epicatechina, l'estratto contiene inoltre le procianidine B1, B2, B3, B5, B7 e C1 e dimeri e trimeri di tipo A non ben identificati, anche se l'analisi in spettrometria di massa MALDI-TOF ha rilevato la presenza di molecole con DP fino a 10. Dimeri e trimeri di tipo A costituiscono il 19-22% del contenuto totale di PAC in forma dimerica e trimerica dell'estratto della buccia di mandorla. In esso sono presenti anche dimeri e trimeri della



propelargonidina e della prodelfinidina, anche se a basse concentrazioni (meno del 5% della quantità totale di monomeri, dimeri e trimeri). I principali flavonoidi della buccia comprendono: canferol-3-*O*-rutinoside, isoramnetina-3-*O*-rutinoside, isoramnetina-3-*O*-glucoside e naringenina-7-*O*-glucoside.^{49,50} La presenza di prodelfinidine e propelargonidine e l'assenza di PAC galloilati permettono di distinguere in modo chiaro un estratto della buccia di mandorle da un estratto di semi d'uva.

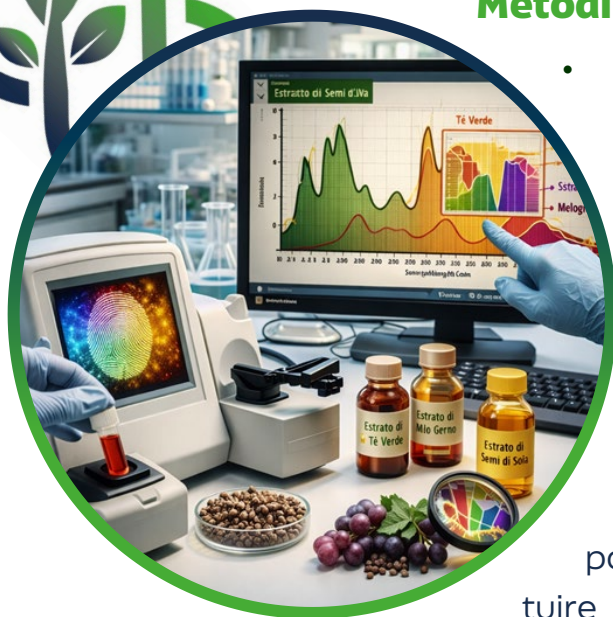
***Sorghum bicolor* (L.) Moench**

Contiene molti composti fenolici delle classi degli acidi idrossibenzoici, acidi idrossicinnamici, flavonoidi, antocianine, flavan-3-oli e flavan-4-oli.⁵¹⁻⁵³ La composizione dei composti fenolici nel sorgo è fortemente influenzata dal genotipo. Gli acidi ferulico e *p*-cumarico sono tra i più abbondanti acidi fenolici presenti in questo cereale. I sorghi bianco e rosso contengono elevate quantità di acido protocatecuico. I flavonoidi "apigenina" e "luteolina" si trovano prevalentemente nei genotipi tannino-pigmentati. Altri flavonoidi distintivi del sorgo sono: eriodictiolo, eriodictiolo 5-*O*-glucoside, taxifolina, taxifolina 7-*O*-glucoside e canferolo 3-*O*-rutinoside-7-*O*-glucuronide. Le antocianine del sorgo sono particolari in quanto non contengono un gruppo -OH in posizione 3. Le antocianine più comuni sono l'apigeninidina e la luteolinidina. I sorghi con pericarpo nero (crusca) hanno quantità più elevate di antocianine rispetto a quelli con pericarpo rosso e marrone. I flavan-4-oli sembra siano presenti solo nella crusca del sorgo rosso.^{51,52} I tannini condensati si trovano solo nei genotipi II e III del sorgo, in cui predominano i geni B1 e B2. I PAC di questo cereale sono principalmente di tipo B con epicatechina e catechina che fungono, rispettivamente, da unità di ripetizione e terminale delle molecole.^{52,54} Alcuni studi hanno individuato variazioni nella composizione dei PAC del sorgo rosso rubino (genotipo di tipo III) come, ad esempio, l'inserimento di unità di gallocatechina/epigallocatechina, PAC contenenti monomeri di proluteolinidina e proapigenidina e la presenza di eriodictiolo o eriodictiolo-5-*O*-glucoside come unità terminali.⁵⁵ I genotipi di sorgo bianco contengono monomeri di catechina ed epicatechina, ma nessun polimero.^{52,56}





Metodi di analisi



- **Standard chimici e materiali botanici di riferimento**

Qualsiasi metodo analitico richiede standard e o materiali di riferimento affidabili. Questo requisito è particolarmente importante quando si conducono indagini per rilevare adulterazioni. L'analista dovrebbe innanzitutto chiedersi quali potenziali adulteranti potrebbero essere stati usati, quali classi di composti e loro fonti botaniche potrebbero essere state utilizzate per sostituire gli estratti di semi d'uva. Specie botaniche

contenenti acido gallico e/o PAC, ad esempio, sono considerate adulteranti ideali degli estratti di semi d'uva date le molte similitudini tra i relativi profili fitochimici.

Per una più efficace individuazione delle adulterazioni sarebbe opportuno disporre di un'impronta digitale spettroscopica/spettrometrica di un estratto di semi d'uva autentico e dei potenziali estratti generalmente usati come adulteranti per confrontarne gli spettri e individuare le differenze.

La farmacopea statunitense (USP) include uno spettro di un estratto di semi d'uva, mentre nell'American Herbal Pharmacopoeia (AHP) sono disponibili dati su una miscela di semi e buccia d'uva. Più difficile reperire informazioni sulle specie adulteranti.

Altro fattore importante ai fini di una corretta distinzione è disporre di standard chimici di riferimento affidabili per eseguire i test cromatografici. Molecole quali afzelechina, catechina, epiafzelechina, epicatechina, epigallocatechina, gallocatechina e alcuni PAC (es. procianidine A1, A2, B1, B2 e C1) sono facilmente reperibili in commercio; difficili da trovare sono invece i PAC in forma di trimeri o polimeri caratteristici dei semi d'uva.

- **Metodi colorimetrici**

I metodi colorimetrici per il rilevamento dei PAC comprendono: la reazione di Bate Smith, il metodo di Folin-Ciocalteu, il saggio del butanolo/acido cloridrico, il test della vanillina e della 4- (dimetilamino) cinnamalaldeide (DMAC). Applicazioni, vantaggi e svantaggi di ciascun test sono descritti in studi americani.^{58,65} Metodi colorimetrici sono stati inoltre messi a punto per misurare il colore e le antocianine nei frutti.⁶⁶

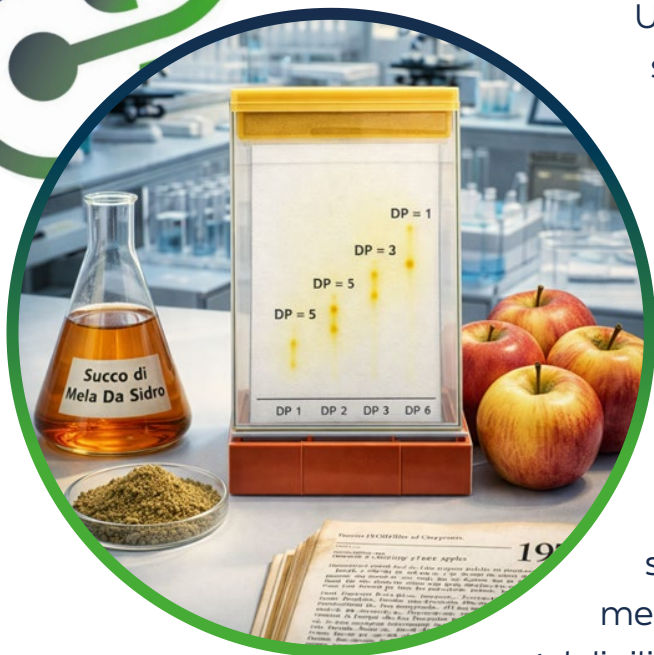
I test colorimetrici, in genere di semplice esecuzione e convenienti, utilizzano sostanze che reagendo con i fenoli formano prodotti colorati prontamente quantificabili mediante assorbimento. Sono metodi di grande utilità per misurare il contenuto totale di fenoli (acidi fenolici, flavonoidi, PAC, ecc.) in ingredienti di origine vegetale. I dosaggi colorimetrici non sono, tuttavia, specifici in quanto, pur misurando il contenuto fenolico totale, non sono in grado di distinguere tra loro le diverse classi di molecole. Poiché i composti

fenolici si trovano in tutto il regno vegetale, queste metodiche non consentono né di distinguere la fonte botanica né di identificare eventuali adulterazioni. Indipendentemente da ciò, questi test sono comunemente impiegati per studiare gli estratti di semi d'uva e spesso rappresentano l'unico metodo chimico utilizzato ai fini del rilascio del certificato di analisi per ingredienti ricchi in PAC. Le analisi colorimetriche hanno avuto un uso limitato nel rilevamento di adulterazioni con estratti della buccia di arachide.^{21,67} Considerandone infatti l'approccio generico, l'utilità di questi test nel rilevare la presenza di adulteranti negli estratti di semi d'uva non è sufficientemente dimostrata.

I test colorimetrici in combinazione con successivi passaggi di precipitazione proteica, consentono di determinare il contenuto fenolico totale e di quei composti fenolici in grado di interagire con le proteine. Un presunto estratto di semi d'uva che non mostra alcuna interazione proteica potrebbe essere considerato o una frazione a basso peso molecolare dello stesso oppure trattarsi di un materiale non autentico.

Il metodo colorimetrico di Niketic-Aleksic per la determinazione del contenuto totale in antociani è risultato efficace nel rilevare tali sostanze in concentrazioni superiori allo 0,1% (p/p) in un estratto secco di semi d'uva.⁶⁸ Tale metodica rappresenta un utile e facile strumento di screening per rilevare la presenza di antociani prima dell'analisi HPLC. In estratti di semi d'uva potrebbero essere presenti residui della buccia che trascinano con sé antocianine a concentrazioni inferiori allo 0,1%. La presenza di antocianine a concentrazioni superiori, sono indice di adulterazione.





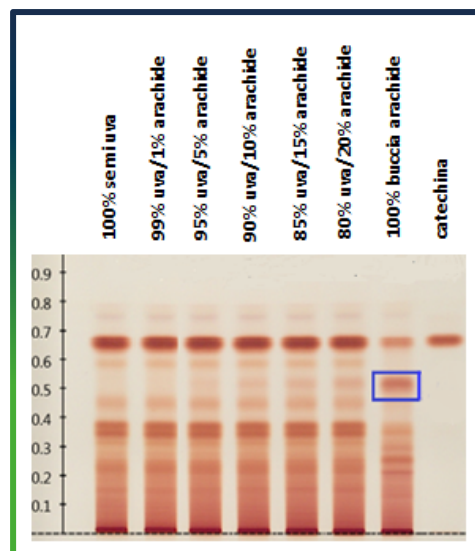
• TLC / HPTLC

Una delle prime TLC (cromatografia su strato sottile) per separare le procianidine in base al loro DP è stata messa a punto nel 1978 usando la mela da sidro.⁷⁰ Nel 2015, un gruppo di ricercatori statunitensi ha sviluppato un nuovo metodo TLC quale test qualitativo rapido ed economico in grado di rilevare la presenza in estratti di semi d'uva di preparazioni a base di buccia di arachide e corteccia di pino. Come fase mobile si utilizza una miscela di acetone-acido acetico-toluene, mentre la fase stazionaria è rappresentata da

gel di silice. Per la buccia di arachide sono stati usati

come standard di riferimento PAC dimerici di tipo A. Questo tipo di approccio consente di identificare facilmente la presenza di tali molecole in estratti di semi d'uva, ma non permette una chiara distinzione tra estratti di corteccia di pino e di semi d'uva data la stretta analogia chimica.

La cromatografia su strato sottile ad alta prestazione (HPTLC) si è mostrata efficace nel rilevare la presenza di estratti di buccia di arachide in prodotti a base di estratti di semi d'uva disponibili in commercio.⁶⁷ La separazione cromatografica è stata effettuata utilizzando come fase stazionaria e mobile, rispettivamente, gel di silice ed una miscela di toluene-acetone-acido formico. Il profilo cromatografico di miscele di estratti di uva ed arachide in differenti percentuali sono state confrontate con estratti autentici di semi d'uva e buccia di arachide e con catechina, usati come standard di riferimento (**Figura a lato**). Le bande sono state osservate alla luce visibile dopo trattamento con il reagente di derivatizzazione "Fast Blue Salt B". La banda evidenziata, principale differenza riscontrata tra i profili cromatografici dei due estratti, consente di distinguere chiaramente la presenza di buccia di arachide in un estratto di semi d'uva a partire da concentrazioni del 5% (p/p). Questi risultati dimostrano quindi che l'HPTLC può costituire uno strumento analitico utile per verificare la presenza di PAC tipici di estratti di buccia di arachidi.



• HPLC

Diversi sono i metodi cromatografici liquidi ad alte prestazioni (HPLC) messi a punto per analizzare PAC e antocianine derivanti da varie fonti botaniche, tecniche che utilizzano varie fasi stazionarie (es. C18, silice, diolo, ciano, ammidi, differenti polimeri, ecc.) e differenti metodi di rilevazione (es. ultravioletto - UV, fotodiodi - PDA, fluorescenza - FLD, spettrometria di massa - MS, colorimetrico, ecc.). La preparazione del campione per l'analisi sia dei PAC che delle antocianine è largamente influenzata dalla matrice.

Per quanto riguarda i PAC, alcune matrici potrebbero richiedere una sgrassatura preventiva per rimuovere lipidi e cere prima di procedere all'estrazione, che può essere eseguita con miscele idroalcoliche, acetone o varianti dello stesso acidificate. Molti estratti botanici in commercio richiedono in genere solo il trattamento con un solvente compatibile con HPLC e successiva filtrazione prima dell'iniezione. In alcuni casi potrebbe essere necessario eseguire un'estrazione in fase solida per rimuovere eventuali sostanze interferenti o materiale estraneo. Esistono essenzialmente due approcci a questo tipo di analisi: distruttivo e non distruttivo.

Il primo approccio comporta la scissione in ambiente acido del campione in presenza di nucleofili (es. benzilmercaptano, floroglucinolo, ecc.). L'analisi HPLC dei prodotti di reazione fornisce informazioni qualitative sulla subunità di struttura (es. profilo di sostituzione del flavan-3-olo) consentendo di determinare la presenza di PAC atipici (es. propelargonidine) in un estratto di semi d'uva sospetto. La tiolisi è un approccio ampiamente usato nella caratterizzazione dei PAC⁷⁰ e per calcolare il DP medio.

I metodi non distruttivi prevedono invece che l'estratto non venga sottoposto a preventiva reazione chimica. Lo svantaggio dei metodi HPLC non distruttivi è la spesso scarsa risoluzione dei PAC costituiti da quattro o più unità, in particolare nei metodi che utilizzano la cromatografia in fase inversa. Tali tecniche sono quindi inefficaci nel distinguere specie botaniche differenti. Un modo per migliorare la separazione cromatografica potrebbe essere quello di trattare preventivamente il campione con polivinilpolipirrolidone, polimero in grado di legare i polifenoli, o con filtri con peso molecolare di 3.000 o 5.000 Da al fine di rimuovere i PAC di dimensione maggiore,^{25,71} con il rischio tuttavia di





eliminare anche molecole potenzialmente rilevanti. Entrambi gli approcci necessitano di standard analitici di riferimento e di preparazioni botaniche autentiche, necessarie per il confronto con il campione sospetto.

Uno dei primi esempi dell'uso di HPLC è la separazione in fase normale di procianidine di semi d'uva sfruttando il diverso DP ed usando un gradiente di metanolo acidificato in diclorometano.⁷² Per ottenere la separazione dei PAC sulla base delle dimensioni si può anche usare la cromatografia a permeazione di gel (GPC), una tecnica ana-

litica la cui risoluzione è tuttavia scarsa e che necessita di derivatizzazione.

Il metodo è stato perfezionato (eliminazione della derivatizzazione ed un leggero miglioramento della risoluzione) utilizzando due colonne di materiale poroso "polistirene-divinilbenzene" collegate in serie per separare estratti di semi d'uva frazionati.⁷³

• **HPLC-Vis**

Ricercatori americani e coreani hanno messo a punto metodi HPLC-Vis con rivelatore a fotodiodi e HPLC-MS (spettrometria di massa) per la separazione e l'identificazione di antociani, generalmente rilevabili a lunghezze d'onda tra 520-546 nm.⁷⁴⁻⁷⁶ Questi pigmenti non si trovano naturalmente nei semi d'uva, ma la presenza in tracce può derivare dal processo di pigiatura e separazione delle bucce d'uva rossa dai semi.

Gli estratti di semi d'uva hanno un tipico colore marroncino. Una colorazione viola rossastro è indice della presenza di elevate quantità di antociani.

• **HPLC-UV/FLD**

Descritta in alcuni studi,^{22,77,78} l'HPLC con rivelatore FLD (fluorescenza) consente una più efficace separazione dei monomeri, dimeri e trimeri di catechina rispetto alla HPLC con rivelatore UV.²² Mancano tuttavia dati sulla capacità dell'HPLC-FLD di distinguere estratti di semi d'uva da potenziali adulteranti.

• **HPLC-MS, UHPLC-MS, HPLC-UV/MS, UHPLC-UV/MS e HPLC-MS/MS**

La combinazione di separazioni cromatografiche in fase normale o ad interazione idrofilica (HILIC), basate sui differenti DP dei PAC, con spettrometria di massa, offre un potente strumento qualitativo in grado di caratterizzare e valutare la distribuzione di monomeri, oligomeri e polimeri. Più difficile identificare trimeri e loro forme galloilate che eluiscono in tempi più ravvicinati. Sebbene l'impiego della cromatografia HILIC per separare PAC abbia dato dei

risultati promettenti, sono necessari più dati per valutare la capacità di questa tecnica di confermare l'autenticità di un estratto di semi d'uva.

Alcuni ricercatori hanno applicato i risultati di loro precedenti lavori alla separazione di tannini di semi d'uva utilizzando come fase stazionaria diolo: l'analisi ESI-MS ha confermato la presenza di dimeri di procianidina attraverso l'uso di otta-meri costituiti da 0 a 3 unità di galloila-zione.⁷⁹ Successivamente, questo stesso metodo è stato adattato per separare e caratterizzare dimeri di procianidina sfruttando pentameri. La caratterizzazione e la semi-quantificazione sono state ottenute attraverso l'aiuto di un tetramero usato come standard di riferimento.⁸⁰ L'efficacia di queste tecniche nel rilevare adulterazioni non è stata tuttavia testata.

Ricercatori olandesi hanno utilizzato l'HPLC in fase normale ed inversa, accoppiata a spettrometria di massa, per caratterizzare vari PAC di tipo A e B ottenuti da semi d'uva e buccia di arachide.¹⁶ L'analisi HPLC con rivelatore UV accoppiata a spettrometria di massa (HPLC-UV/MS) ha invece consentito di ottenere l'impronta fitochimica di estratti di semi d'uva, di buccia di arachide e di corteccia di pino.²¹ Con tale tecnica si riesce a distinguere efficacemente un estratto di semi d'uva da un estratto di buccia di arachide. Più difficile è riuscire a differenziare l'estratto dei semi d'uva da un estratto di corteccia di pino (*P. massoniana*) a causa dell'analogia chimica.

L'HPLC con fase stazionaria "diolo" è stata utilizzata per caratterizzare 20 materie prime in commercio etichettate come "estratti di semi di uva".⁸¹

I picchi atipici osservati nei profili HPLC sono stati ulteriormente analizzati con HPLC-MS/MS (HPLC abbinata a spettrometria di massa tandem). Questo ulteriore passaggio ha portato al rilevamento in un campione di procianidine di tipo A e di propelargonidine di tipo B in quattro prodotti. Si tratta, pertanto, di un approccio efficace nel rilevare le adulterazioni con estratti contenenti procianidine di tipo A e/o propelargonidine.

Con la tecnica dell'HPLC accoppiata a (APCI)-MS (spettrometria di massa con ionizzazione chimica a pressione atmosferica) alcuni ricercatori sono riusciti a identificare in un estratto di semi d'uva le seguenti molecole: acido gallico, procianidine B2 e B4, (+)-catechina, (-)-epicatechina e (+)-epicatechina gallato.⁸²





Nonostante la mancanza di qualsiasi informazione strutturale per $DP > 2$, la presenza delle procianidine dimeriche B2 e B4 potrebbe servire come informazione accessoria nell'autenticazione di estratti di semi d'uva.

Nel 2018, utilizzando la tecnica HPLC-HRMS/MS (spettrometria di massa in alta risoluzione) si è riusciti, per la prima volta, ad identificare l'epicatechina vanillato in semi d'uva e vino rosso a livelli di ppb ($\mu\text{g/kg}$).⁸³

Considerata la particolarità, questo composto po-

trebbe costituire l'unico marcatore utile per autenticare un estratto di semi d'uva. Tuttavia, non è noto se tale epicatechina è realmente presente in tutte le uve.

Con il metodo della cromatografia liquida a ultra alta prestazione (durata circa 65 min) abbinata a spettrometria di massa in alta risoluzione (UHPLC-HRMS), un gruppo di ricerca americano è stato in grado di estrarre, identificare e quantificare monomeri ed oligomeri della catechina fino agli ottameri.⁸⁴ Tale approccio consente di distinguere i PAC dei semi d'uva da quelli di mela, cioccolato e di altri frutti. Sulla base dei dati disponibili in letteratura, i metodi HPLC-MS sono in grado di identificare la presenza di adulteranti in estratti di semi d'uva. Idealmente, questi metodi dovrebbero essere combinati con una robusta analisi chemiometrica.

Nelle analisi si dovrebbero includere più campioni per tenere conto della variabilità degli estratti dovuta sia a variazioni naturali che alle differenze nei processi di produzione.

Una caratterizzazione fitochimica abbastanza completa di un estratto di semi d'uva è stata ottenuta con un'analisi in ultra HPLC con rivelatore a raggi ultravioletti UV e ad aerosol caricato, accoppiata con spettrometria di massa in alta risoluzione (UHPLC-UVCAD-HRMS).²⁵ Una buona separazione dei costituenti si è raggiunta con colonna C18 in 75 min. Utilizzando il rivelatore ad aerosol caricato (CAD: Charged Aerosol Detector) si riesce facilmente a distinguere, dall'impronta digitale, l'estratto dei semi d'uva da quello della buccia di arachide e della corteccia di pino marittimo.

I 39 principali picchi del cromatogramma sono stati parzialmente o completamente attribuiti a 83 differenti composti. L'assegnazione strutturale è stata effettuata confrontando i dati della spettrometria di massa con quelli di composti noti o con dati di letteratura, modelli di frammentazione in MS di

composti noti sono stati utilizzati per ripartire le molecole nelle relative classi di appartenenza. Sebbene gli autori di questo studio abbiano notato un'importante differenza tra estratti di semi d'uva trattati o meno con enzimi, il metodo UHPLC-UVCAD-HRMS è in grado di distinguere entrambi i tipi di estratto da potenziali adulteranti.



• MALDI-TOF

La spettrometria di massa MALDI-TOF (MALDI: desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice; TOF: analizzatore a tempo di volo) è comunemente utilizzata per determinare le caratteristiche strutturali generali (ad esempio, il tipo di monomero, PAC di tipo A o B, numero di unità monomeriche e il grado di galloilazione) e la distribuzione dei PAC con vari DP all'interno di estratti contenenti tannini condensati.⁸⁵⁻⁸⁷ La preparazione del campione è rapida e semplice e consiste nel dissolvere l'estratto in metanolo o in acqua-acetone, miscelare e diluire 1:1 nel sistema matrice (generalmente una soluzione in metanolo dell'acido 2,5-diidrobenzoico). Possono essere utilizzate entrambe le modalità, lineare o reflectron; dal confronto tra le due emerge come la modalità lineare sia in grado di identificare in modo più efficace i PAC con elevato DP.¹⁸ Con l'uso del MALDI-TOF si è riusciti a distinguere un estratto di semi d'uva da un estratto di corteccia di quercia (*Quercus robur* L., Fagaceae) e di tè verde,⁸⁵ e anche da un estratto di corteccia di pino.¹⁸ Il principale svantaggio di questa tecnica analitica è il costo elevato della strumentazione (\$180,000 - 350,000) che ne rende impossibile l'acquisto da parte di molti laboratori.

• NMR

La spettroscopia NMR (risonanza magnetica nucleare) ^1H e/o ^{13}C può essere utilizzata per confrontare campioni sospetti con campioni autentici. Se abbinato ad un software di riconoscimento del profilo fitochimico, l'NMR diventa uno strumento potente e robusto per riuscire a caratterizzare ed autenticare estratti botanici. Per quanto riguarda le procianidine dell'uva, l'NMR si è mostrato efficace nel distinguere vini da varietà di uva differenti, di varie annate e regioni.⁸⁸ Di conseguenza, una combinazione di chemiometria e spettroscopia NMR potrebbe essere utile per rilevare la presenza di adulteranti in un estratto di semi d'uva. Sarebbe tuttavia prima opportuno dimostrare, convalidandone il metodo, la capacità dell'NMR di discriminare un estratto di semi d'uva da estratti contenenti PAC.

Tabella 3 – Confronto tra i differenti approcci usati per autenticare estratti di semi d'uva

Ingrediente	Monomeri	Galloilazione	Tipo di PAC
Macroscopico	Parti di piante non lavorate	Rapido, economico	• Nessuna automazione/statistica • Il risultato dipende dalle competenze dell'analista
Microscopico	Parti di piante non lavorate; semi polvere	Rapido, economico	• Nessuna automazione/statistica con microscopi di alta qualità • Il risultato dipende dalle competenze dell'analista • Difficoltà a distinguere le specie strettamente correlate
Genetico	Parti di piante non lavorate; semi polvere	• È in grado di distinguere specie strettamente correlate • Approcci più avanzati possono rilevare il DNA frammentato in materiali lavorati • L'adulterante può essere facilmente identificato	• Preparazione ed analisi del campione complessi • Attrezzatura costosa • Non applicabile a estratti in polvere sottoposti a complesse lavorazioni • I limiti di rilevabilità per le polveri necessitano di essere valutati
HPTLC	Estratti	• Rapido • Attrezzature economiche • Rilevata adulterazione da buccia di arachide a partire dal 5% • Non è richiesta alcuna statistica	• Nessuna statistica • Rilevamento di adulterazioni < 5% difficile • Necessità di standard di riferimento
HPLC-UV-Vis/FLD	Estratti	• Attrezzatura standard presente in molti laboratori • Ideale per composti con cromofori forti (es. acidi fenolici) • Rilevazione di adulterazione con buccia di arachidi e fonti di propelargonidine • Antociani	• Attrezzatura costosa • Quantitativa (meno specifica di HPLC-UV/MS) • Impossibile distinguere i picchi sovrapposti • Rilevamento di adulterazioni spesso non semplice • Necessità di standard di riferimento
HPLC-UV/MS	Estratti	• Analisi quali- e quantitativa • Elevata sensibilità	• Attrezzatura costosa • Rilevamento di adulterazioni spesso non semplice
HPLC-MS/MS	Estratti	• Analisi quali- e quantitativa • Elevata sensibilità e specificità	• Attrezzatura costosa • Rilevamento di adulterazioni spesso non semplice
MALDI-TOF	Estratti	• Fornisce informazioni strutturali sui PAC • È in grado di rilevare PAC ad elevato peso molecolare • L'adulterazione può essere rilevata attraverso l'impronta digitale dei PAC	• Attrezzatura costosa

Conclusioni

Dal punto di vista analitico, l'autenticazione di un estratto di semi d'uva rappresenta una grossa sfida. L'autenticazione o il rilevamento di adulterazioni in un estratto potrebbe richiedere l'applicazione di più metodi di analisi. L'adulterazione con PAC rappresenta un livello di sofisticazione distinguibile solo attraverso tecniche cromatografiche che sfruttano diversi metodi di rilevamento (UV-Vis, FLD, MS, MS/MS, ecc.) o tramite metodi spettroscopici/spettrometrici come NMR o MALDI-TOF.

Tuttavia, è l'adulterazione con estratti botanici ricchi in procianidine di tipo B a costituire la sfida più grande, in quanto non facilmente identificabili né con metodi cromatografici né con tecniche spettroscopiche/spettrometriche. I risultati migliori si ottengono quando le impronte digitali, ottenute ad esempio mediante HPLC-UV, HPLC-MS o MALDI-TOF, sono messe a confronto con estratti di semi d'uva autentici e con potenziali estratti adulteranti e successivamente analizzati utilizzando software statistici di ultima generazione.



Riferimenti bibliografici

1. Feringa H.H.H., Laskey D.A., Dickson J.E., Coleman C.I. The effect of grape seed extract on cardiovascular risk markers: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Diet Assoc.* 2011; 111: 1173-1181.
2. Ma Z., Zhang H. Phytochemical constituents, health benefits, and industrial applications of grape seeds: A mini-review. *Antioxidants.* 2017; 6(3): 71.
3. McGuffin M., Kartesz J.T., Leung A.Y., Tucker A.O. *Herbs of Commerce*. 2nd ed. Silver Springs, MD: American Herbal Products Association; 2000.
4. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <https://www.tropicos.org/Name/34000217>.
5. The Plant List. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2457006>
6. Reed K.A. Identification of phenolic compounds from peanut skin using HPLC-MSn. Blacksburg, VA, Virginia Polytechnic Institute and State University; 2009.
7. Cadot Y., Minana-Castello M.T., Chevalier M. Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during fruit development. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(24): 9206-9215.
8. Nowshehri J.A., Bhat Z.A., Shah M.Y. Pharmacognostic standardisation and phytochemical evaluation on the seeds of two *Vitis vinifera* L. varieties grown in Kashmir valley, India. *Pharmacogn J.* 2016; 8: 465-470.
9. *Vitis vinifera* (seed). American Herbal Products Association; 2014. <http://www.botanicalauthentication.org/index.php>.
10. Wang X., Liu Y., Wang L., Han J., Chen S. A nucleotide signature for the identification of *Angelica sinensis* radix (danggui) and its products. *Sci Rep.* 2016; 6: 34940.
11. Little D.P. Authentication of Ginkgo biloba herbal dietary supplements using DNA barcoding. *Genome.* 2014; 57: 513-516.
12. Ivanova N.V., Kuzmina M.L., Braukmann T.W.A., Borisenko A.V., Zakharov E.V. Authentication of herbal supplements using next generation sequencing. *PLoS ONE.* 2016; 11(5): e0156426.
13. Lu Z., Rubinsky M., Babajanian S., Zhang Y., Chang P., Swanson G. Visualization of DNA in highly processed botanical materials. *Food Chem.* 2018; 245: 1042-1051.
14. Reynaud D.T., Mishler B.D., Neal-Kababick J., Brown P.N. The capabilities and limitations of DNA barcoding of botanical dietary supplements. 2015. http://www.ahpa.org/Portals/0/pdfs/The-Capabilities-and-Limitations-of-DNA-Testing-FINAL_AHPA.pdf
15. Parveen I., Gafner S., Tehen N., Murch S.J., Khan I.A. DANN Barcoding for the identification of botanicals in herbal medicine and dietary supplements: strengths and limitations. *Planta Med.* 2016; 82: 1225-1235.
16. Appeldoorn M.M., Sanders M., Vincken J.-P., Cheynier V., Le Guernevé C., Hollman P.C.H., Gruppen H. Efficient isolation of major procyanidin A-type dimers from peanut skins and B-type dimers from grape seeds. *Food Chem.* 2009; 117: 713-720.
17. Weseler A.R., Bast A. Masquelier's grape seed extract: from basic flavonoid research to a well-characterized food supplement with health benefits. *Nutr J* 2017; 16(1): 5.
18. Weber H.A., Hodges A.E., Guthrie J.R., O'Brien B.M., Robaugh D., Clark A.P., Harris R.K., Algaier J.W., Smith C.S. Comparison of proanthocyanidins in commercial antioxidants: grape seed and pine bark extracts. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 148-156.
19. La V.D., Bergeron C., Gafner S., Grenier D. Grape seed extract suppresses lipopolysaccharide-induced matrix metalloproteinase (MMP) secretion by macrophages and inhibits human MMP-1 and -9 activities. *J Periodontol.* 2009; 80: 1875-1882.
20. Monagas M., Hernandez-Ledesma B., Garrido I., J Martin-Alvarez P., Gomez-Cordoves C., Bartolome B. Quality assessment of commercial dietary antioxidant products from *Vitis vinifera* L. grape seeds. *Nutr Cancer.* 2005; 53: 244-254.
21. Villani T.S., Reichert W., Ferruzzi M.G., Pasinetti G.M., Simon J.E., Wu Q. Chemical investigation of commercial grape seed derived products to assess quality and detect adulteration. *Food Chem.* 2015; 170: 271-280.



22. Nakamura Y., Tsuji S., Tonogai Y. Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. *J Health Sci.* 2003; 49: 45-54.
23. Chamorro S., Viveros A., Alvarez I., Vega E., Brenes A. Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment. *Food Chem.* 2012; 133: 308-314.
24. Ras R.T., Zock P.I., Zebregs Y.E.M.P., Johnston N.R., Webb D.J., Draijer R. Effect of polyphenol-rich grape seed extract on ambulatory blood pressure in subjects with pre- and stage I hypertension. *Br J Nutr.* 2013; 110: 2234-2241.
25. Sica V.P., Mahony C., Baker T.R. Multi-detector characterization of grape seed extract to enable in silico safety assessment. *Front Chem.* 2018; 6 (334). doi:10.3389/fchem.2018.00334.
26. O'Keefe S.F., Wang H. Effects of peanut skin extract on quality and storage stability of beef products. *Meat Sci.* 2006; 73: 278-286.
27. Constanza K.E., White B.L., Davis J.P., Sanders T.H., Dean L.L. Value added processing of peanut skins: antioxidant capacity, total phenolics, and procyanidin content of spray-dried extracts. *J Agric Food Chem.* 2012; 60: 10776-10783.
28. Dudek M.K., Gliński V.B., Davey M.H., Sliva D., Kaźmierski S., Gliński J.A. Trimeric and tetrameric A-type procyanidins from peanut skins. *J Nat Prod.* 2017; 80: 415-426.
29. Bansode R.R., Randolph P., Ahmedna M., Hurley S., Hanner T., Baxter S.A., Johnston T.A., Su M., Holmes B.M., Yu J., Williams L.L. Bioavailability of polyphenols from peanut skin extract associated with plasma lipid lowering function. *Food Chem.* 2014; 148: 24-29.
30. Lee L.-S., Kim S.-H., Kim Y.-B., Kim Y.-C. Quantitative analysis of major constituents in green tea with different plucking periods and their antioxidant activity. *Molecules.* 2014; 19: 9173.
31. Friedman M., Levin C.E., Choi S.H., Kozukue E., Kozukue N. HPLC analysis of catechins, theaflavins, and alkaloids in commercial teas and green tea dietary supplements: comparison of water and 80% ethanol/water extracts. *J Food Sci.* 2006; 71: C328-C337.
32. Zhao Y., Chen P., Lin L., Harnly J.M., Yu L., Li Z. Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS. *Food Chem.* 2011; 126: 1269-1277.
33. Roman M.C., Hildreth J., Bannister S. Determination of catechins and caffeine in *Camellia sinensis* raw materials, extracts, and dietary supplements by HPLC-UV: Single-laboratory validation. *J AOAC Int.* 2013; 96: 933-941.
34. Blaschek W., Frohne D., Loew D. *Theae viridis folium*. In: Blaschek W, ed. *Wichtl – Teedrogen und Phytopharmaka*. Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2016: 644-646.
35. Lin L.-Z., Chen P., Harnly J.M. New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas. *J Agric Food Chem.* 2008; 56: 8130-8140.
36. Del Rio D., Stewart A.J., Mullen W., Burns J., Lean M.E., Brighenti F., Crozier A. HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *J Agric Food Chem.* 2004; 52: 2807-2815.
37. Pastene E., Troncoso M., Figueroa G., Alarcon J., Speisky H. Association between polymerization degree of apple peel polyphenols and inhibition of *Helicobacter pylori* urease. *J Agric Food Chem.* 2009; 57: 416-424.
38. Kschonsek J., Wolfram T., Stockl A., Bohm V. Polyphenolic compounds analysis of old and new apple cultivars and contribution of polyphenolic profile to the in vitro antioxidant capacity. *Antioxidants.* 2018; 7(1): 20.
39. Vrhovsek U., Rigo A., Tonon D., Mattivi F. Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *J Agric Food Chem.* 2004; 52: 6532-6538.
40. Jakobek L., Garcia-Villalba R., Tomas-Barberan F.A. Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region. *J Food Comp Anal.* 2013; 31: 199-211.
41. Guyot S., Marnet N., Laraba D., Sanoner P., Drilleau J.-F. Reversed phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermesmerrien). *J Agric Food Chem.* 1998; 46: 1698-1705.
42. Shoji T., Mutsuga M., Nakamura T., Kanda T., Akiyama H., Goda Y. Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 3806-3813.
43. Feliciano R.P., Meudt J.J., Shanmuganayagam D., Krueger C.G., Reed J.D. Ratio of "A-type" to "B-type" proanthocyanidin interflavan bonds affects extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* invasion of gut epithelial cells. *J Agric Food Chem.* 2014; 62: 3919-3925.
44. Kim S.M., Kang S.-W., Jeon J.-S., Um B.-H. A comparison of Pycnogenol® and bark extracts from *Pinus thunbergii* and *Pinus densiflora*: extractability, antioxidant activity and proanthocyanidin composition. *J Med Plants Res.* 2012; 6: 2839-2849.
45. Navarrete P., Pizzi A., Pasch H., Rode K., Delmotte L. MALDI-TOF and ¹³C NMR characterization of maritime pine industrial tannin extract. *Ind Crops Prod.* 2010; 32:105-110.

46. Jerez M., Pinelo M., Sineiro J., Nunez M.J. Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chem.* 2006;94: 406-414.
47. Bianchi S., Krosiakova I., Janzon R., Mayer I., Saake B., Pichelin F. Characterization of condensed tannins and carbohydrates in hot water bark extracts of European softwood species. *Phytochemistry.* 2015; 120: 53-61.
48. Bartolome S.B., Monagas J.M., Lafuente I.G., et al., Inventors; Consejo Superior De Investigaciones Cientificas, Madrid (Spain); Exxentia Grupo Fitoterapeutico S.A., Madrid (Spain) assignee. Phenolic extracts of almond peel containing procyanidins, propelargonidins, and prodelphinidins, and method for preparation thereof. 2010.
49. Monagas M., Garrido I., Lebron-Aguilar R., Bartolome B., Gomez-Cordoves C. Almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) skins as a potential source of bioactive polyphenols. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 8498-8507.
50. Bolling B.W. Almond polyphenols: methods of analysis, contribution to food quality, and health promotion. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2017; 16: 346-368.
51. Dykes L., Rooney L.W. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World.* 2007; 52: 105-111.
52. Dykes L., Rooney L.W. Sorghum and millet phenols and antioxidants. *J Cereal Sci.* 2006; 44: 236-251.
53. Yang L., Allred C.D., Awika J.M. Emerging evidence on the role of estrogenic sorghum flavonoids in colon cancer prevention. *Cereal Foods World.* 2014; 59: 244-251.
54. Gu L., Kelm M.A., Hammerstone J.F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Gebhardt S., Prior R.L. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr.* 2004; 134: 613-617.
55. Krueger C.G., Vestling M.M., Reed J.D. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of heteropolyflavan-3-ols and glucosylated heteropolyflavans in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 538-543.
56. Brohan M., Jerkovic V., Wilmotte R., Collin S. Catechins and derived procyanidins in red and white sorghum: their contributions to antioxidant activity. *J Inst Brew.* 2011; 117: 600-607.
57. Labarbe B., Cheynier V., Brossaud F., Souquet J.-M., Moutounet M. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 2719-2723.
58. Prior R.L., Gu L. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry.* 2005;66: 2264-2280.
59. Oszmiański J., Wolniak M., Wojdyto A., Wawer I. Influence of apple puree preparation and storage on polyphenol contents and antioxidant activity. *Food Chem.* 2008;107: 1473-1484.
60. Jiang X., Liu Y., Wu Y., Tan H., Meng F., Wang Y.S., Li M., Zhao L., Liu L., Qian Y., Gao L., Xia T. Analysis of accumulation patterns and preliminary study on the condensation mechanism of proanthocyanidins in the tea plant [*Camellia sinensis*]. *Sci Rep.* 2015; 5: 8742.
61. Sarnoski P.J., Johnson J.V., Reed K.A., Tanko J.M., O'Keefe S.F. Separation and characterisation of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC-MSn. *Food Chem.* 2012; 131: 927-939.
62. Prieur C., Rigaud J., Cheynier V., Moutounet M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry.* 1994; 36: 781-784.
63. Sun B., Leandro C., Ricardo da Silva J.M., Spranger I. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J Agric Food Chem.* 1998; 46: 1390-1396.
64. Spranger I., Sun B., Mateus A.M., de Freitas V., Ricardo da Silva J.M. Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chem.* 2008;108: 519-532.
65. Hagerman A.E. The Tannin Handbook. 2011; <http://www.users.miamioh.edu/hagerman>
66. Wrolstad R.E. Color and pigment analyses in fruit products. Vol Station Bulletin 624. Corvallis, OR: Agricultural Experiment Station, Oregon State University; 1993: 1-17.
67. Sudberg E., Sudberg S., Nguyen J. Validation of a high performance thin-layer chromatographic fingerprint method for the simultaneous identification of grape seed and peanut skin and the adulteration of commercial grape seed extract with peanut skin. AHPA (American Herbal Products Association) Botanical Congress; 2014; Las Vegas, NV.
68. Niketic-Aleksic G., Hrazdina G. Quantitative analysis of the anthocyanin content in grape juices and wines. *Lebensm Wiss Technol.* 1972; 5: 163-165.
69. Lea A.G.H., Arnold G.M. The phenolics of ciders: Bitterness and astringency. *J Sci Food Agric.* 1978; 29: 478-483.
70. Gu L., Kelm M.A., Hammerstone J.F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Prior R.L. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 7513-7521.
71. Peng Z., Hayasaka Y., Iland P.G., Sefton M., Hoj P., Waters E.J. Quantitative analysis of polymeric

- procyanidins (tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reverse phase high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 26-31.
72. Rigaud J., Escribano-Bailon M.T., Prieur C., Souquet J.M., Cheynier V. Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. *J Chromatogr A.* 1993; 654: 255-260.
 73. Kennedy J.A., Taylor A.W. Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. *J Chromatogr A.* 2003; 995: 99-107.
 74. Wang H., Race E.J., Shrikhande A.J. Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 1839-1844.
 75. Oh Y.S., Lee J.H., Yoon S.H., Oh C.H., Choi D.S., Choe E., Jung M.Y. Characterization and quantification of anthocyanins in grape juices obtained from the grapes cultivated in Korea by HPLC/DAD, HPLC/MS, and HPLC/MS/MS. *J Food Sci.* 2008; 73: C378-C389
 76. Lorrain B., Ky I., Pechamat L., Teissedre P.-L. Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules.* 2013; 18: 1076.
 77. Kelm M.A., Johnson J.C., Robbins R.J., Hammersstone J.F., Schmitz H.H. High-performance liquid chromatography separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 1571-1576.
 78. Robbins R.J., Leonczak J., Li J., et al. Determination of flavanol and procyanidin (by degree of polymerization 1-10) content of chocolate, cocoa liquors, powder(s), and cocoa flavanol extracts by normal phase high-performance liquid chromatography: collaborative study. *J AOAC Int.* 2012; 95: 1153-1160.
 79. Kelm M.A., Versari A., Parpinello G.P., Thorngate J.H. Mass spectral characterization of *Uva longanesi* seed and skin extracts. *Am J Enol Vitic.* 2012; 63: 402-406.
 80. Kuhnert S., Lehmann L., Winterhalter P. Rapid characterisation of grape seed extracts by a novel HPLC method on a diol stationary phase. *J Funct Foods.* 2015; 15: 225-232.
 81. Kelm M.A., Kupina S., Shrikhande A. Grape seed extract authentication. 250th American Chemical Society National Meeting & Exposition; 2015; Boston, MA.
 82. Li W., Fong H.H.S., Singletary K.W., Fitzloff J.F. Determination of catechins in commercial grape seed extract. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2002; 25: 397-407.
 83. Ma W., Waffo-Teguo P., Jourdes M., Li H., Teissedre P.-L. First evidence of epicatechin vanillate in grape seed and red wine. *Food Chem.* 2018; 259: 304-310.
 84. Zhang M., Sun J., Chen P. A computational tool for accelerated analysis of oligomeric proanthocyanidins in plants. *J Food Comp Anal.* 2017; 56: 124-133.
 85. Ricci A., Parpinello G.P., Palma A.S., Teslić N., Brilli C., Pizzi A., Versari A. Analytical profiling of food-grade extracts from grape (*Vitis vinifera* sp.) seeds and skins, green tea (*Camellia sinensis*) leaves and Limousin oak (*Quercus robur*) heartwood using MALDI-TOF-MS, ICP-MS and spectrophotometric methods. *J Food Comp Anal.* 2017; 59: 95-104.
 86. Hummer W., Schreier P. Analysis of proanthocyanidins. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52: 1381-1398.
 87. Yang Y., Chien M. Characterization of grape procyanidins using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2000; 48: 3990-3996.
 88. Anastasiadi M., Zira A., Magiatis P., Haroutounian S.A., Skaltsounis A.L., Mikros E. ¹H NMR-based metabonomics for the classification of Greek wines according to variety, region, and vintage. Comparison with HPLC data. *J Agric Food Chem.* 2009; 57: 11067-11074.

