

Linea guida analitica per il riso rosso fermentato

**SIFITLab Laboratorio d'analisi di Siena
Università degli Studi di Siena
Fondazione E. Mach**

Febbraio 2018

Il riso rosso fermentato può definirsi di qualità quando, oltre ai comuni requisiti chimici, fisici e microbiologici che devono essere rispettati per ogni ingrediente utilizzabile negli integratori alimentari (come definiti dalla Direttiva 2002/46 e dal Decreto legislativo 21 maggio 2004 n. 169), rispetta tutti i requisiti di naturalezza di fermentazione (da *Monascus purpureus* Wennt. e subspecie, come da normativa) e produzione, rispetto del limite in citrinina e assenza di qualunque sofisticazione. Si suggerisce un protocollo di analisi integrato capace di mettere in luce tutte le possibili deviazioni di campioni di riso rosso fermentato e classificare in maniera efficace campioni naturali e campioni sofisticati.

Esso prevede:

1. titolo in monacolina K totale del campione e presenza di monacoline secondarie;
 2. provenienza della monacolina K presente, se naturale da riso o non;
 3. materiale genetico fungino;
 4. analisi dei pigmenti (non fondamentale, ma importante per un quadro analitico più completo).
-

Nel dettaglio:

- 1.

Il titolo dichiarato dal fornitore, il rapporto tra forma acida e lattonica della monacolina K e il rapporto tra MK e monacoline secondarie vengono analizzati mediante HPLC con standard interno (lovastatina o mevinolina Sigma-Aldrich). L'analisi cromatografica è condotta utilizzando un HPLC e rivelatore a schiera di diodi (DAD) su campioni solubilizzati in metanolo. La colonna utilizzata è un RP C18. La miscela eluente è formata da acetonitrile acidificato per acido formico e acqua acidificata ancora per acido formico. Vengono iniettati

5 μ l e il flusso è regolato a 0,25 ml min $^{-1}$. La lunghezza d'onda utilizzata λ è 250 nm. La titolazione dichiarata dal fornitore deve essere confermata e deve riferirsi alla monacolina K totale: forma acida più forma lattonica. I campioni autentici mantengono un rapporto piuttosto variabile delle due forme di monacoline K, che dipende dal processo di fermentazione e di asciugatura. La MKL può essere molto più rappresentata, ma nei campioni considerabili autentici MKA:MKtot è $>0,30$. Campioni con MKA:MKtot compreso tra 0,15 e 0,30 sono sospetti. Campioni con MKA:MKtot $<0,15$ sono plausibilmente adulterati per aggiunta di MK (mevinolina o lovastatina). I campioni a base di riso rosso fermentato devono evidenziare la presenza di altre monacoline, oltre la K: monacolina J, L, M e X. Ogni processo di produzione può comportare la presenza di monacoline secondarie più o meno espresse, ma la presenza delle monacoline secondarie deve essere di almeno il 15% delle monacoline totali, quindi MKtot:Msec $>0,15$. Campioni con MKtot:Msec compreso tra 0,15 e 0,05 pongono dubbi di autenticità; un rapporto MKtot:Msec $<0,05$ porta a considerare i campioni plausibilmente adulterati per aggiunta di MK.

2.

La provenienza della monacolina K (se da riso o non) viene determinata con l'analisi dei rapporti isotopici. Per l'analisi isotopica, la monacolina K viene estratta dai campioni di riso rosso tramite la tecnica pubblicata da Li et al. 2004. La molecola viene poi isolata tramite HPLC preparativo, liofilizzata ed analizzata usando un analizzatore elementare interfacciato con uno spettrometro di massa isotopica, per determinarne il rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (espresso come $\delta^{13}\text{C}$). Il campione viene considerato non autentico se il $\delta^{13}\text{C}$ analizzato nella monacolina K è superiore (ovvero inferiore in valore assoluto) a -28,3‰ (Perini et al., 2017), tenendo poi conto dell'incertezza di misura.

3.

Per l'analisi del materiale genetico, l'acido nucleico dei campioni è estratto con kit di estrazione specifici e amplificato utilizzando primer specifici per materiale genetico fungino. La positività viene valutata su gel elettroforetico di agarosio. L'identificazione è eseguita mediante sequenziamento e riconoscimento per confronto con database GeneBank. I campioni autentici devono evidenziare la presenza di ***Monascus purpureus*** Wennt. o subspecie. Alcuni campioni non presentano materiale genetico conservato, fatto che può dipendere da naturali processi post-fermentativi operati dal produttore. La presenza di muffe o altri lieviti fermentanti come ***Aspergillus*** spp., ***Saccharomyces*** spp. o altri è invece da considerare come indizio di

una fermentazione non ottenuta da (solo) *Monascus* spp. La presenza di contaminanti ambientali indica campioni di bassa qualità.

4.

I campioni di riso rosso normalmente contengono pigmenti con massimo di assorbimento a 405 nm (pigmenti gialli) e a 510 nm (pigmenti rossi). I rapporti di assorbanza tra i massimi è generalmente compreso tra 0,75 e 1,40. A 500 µg/ml i campioni di riso rosso dovrebbero fornire un'assorbanza a 405 nm e 510 nm $>0,2$. Assorbanze comprese tra 0,20 e 0,15 suggeriscono campioni con scarsa presenza di pigmenti. Assorbanze a 405 nm e 510 nm $<0,15$ identificano campioni con una quantità di pigmenti molto scarsa, indice di un processo fermentativo incompleto o di scarsa qualità.

Si sottolinea che questa ipotesi di protocollo integrato di analisi è il più completo ad oggi riguardante il riso rosso fermentato e attraverso queste analisi l'Italia può proporsi come riferimento internazionale sull'argomento, di interesse europeo.

Riferimenti bibliografici

- M. Perini, G. Carbone, F. Camin (2017) Stable isotope ratio analysis for authentication of red yeast rice. *Talanta* 174, 228–233.
- Y. Li, Z. Fang, W. Zheng-tao, Z. Hu (2004) Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, 1101–1112.