PANORAMICA SULLE TECNICHE NMR APPLICATE AL SETTORE ALIMENTARE

Claudia Napoli
Bruker Italia – Viale Lancetti 43 - MILANO

PERCHE’ ANALIZZARE MATRICI ALIMENTARI?

Negli ultimi anni sono aumentate sempre di più le richieste di metodi analitici che possano provare l’origine, la composizione, la sicurezza, l'autenticità e l'affidabilità dei materiali, partendo dalle materie prime fino al prodotto finale.

La difficoltà principale è data dalla complessità del campione che è una miscela di molti componenti in rapporti molto diversi tra loro.

Per tale motivo, tutte le possibili metodologie analitiche devono essere valutate, e la caratterizzazione completa richiede spesso dati complementari derivanti da tecniche diverse.

PERCHE' ANALIZZARE MATRICI ALIMENTARI MEDIANTE NMR?

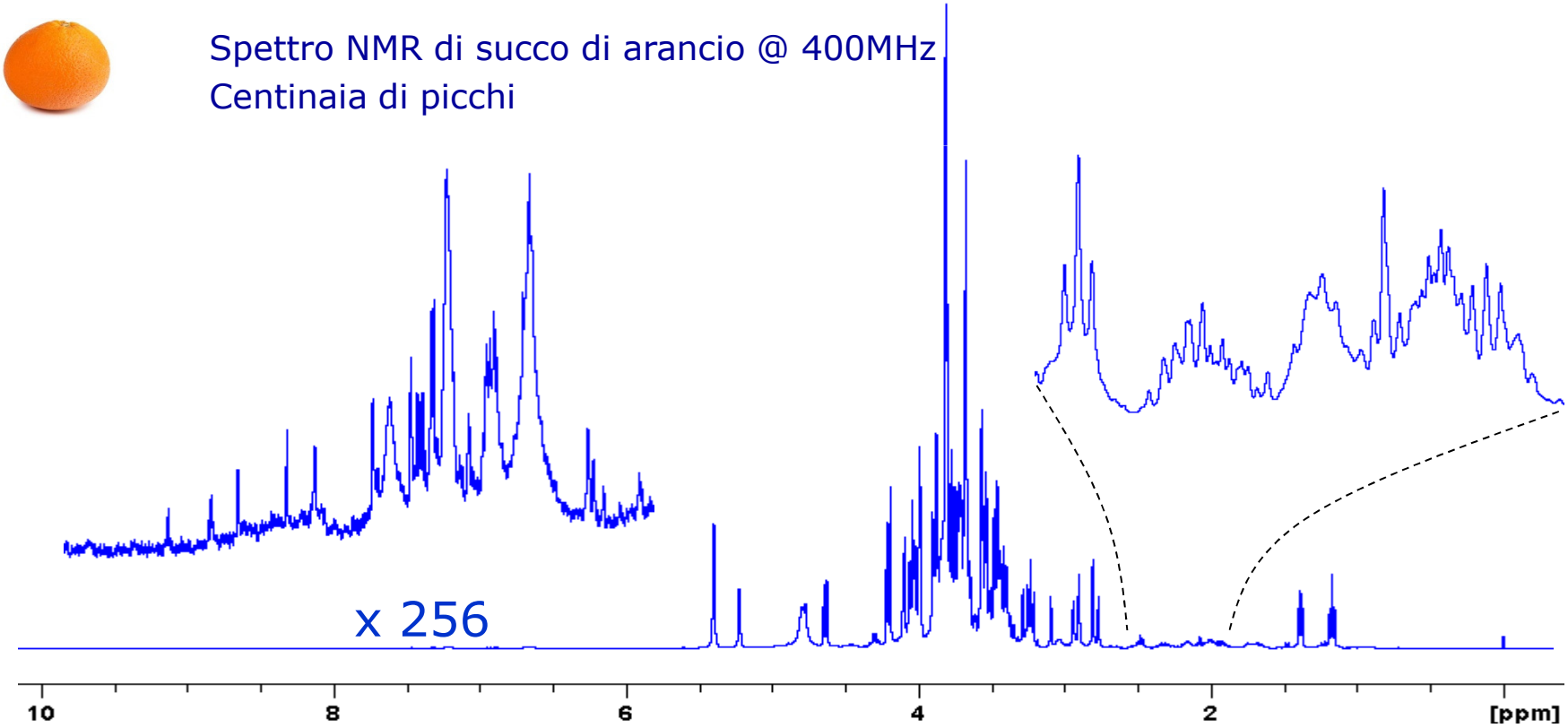
Tra tutte le tecniche analitiche i principali vantaggi della spettroscopia NMR sono :

- E' una tecnica quantitativa
- NON è una tecnica distruttiva
- NON richiede particolare manipolazione del campione
- E' una tecnica veloce e riproducibile
- Fornisce molte informazioni strutturali
- NON richiede alcuna calibrazione

ANALISI NMR DEGLI ALIMENTI

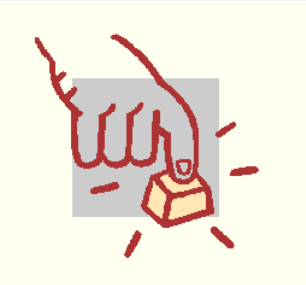
Il problema principale da affrontare in queste applicazioni è legato alla complessità dei campioni che tipicamente si presentano come miscele di molte componenti in rapporto molto differenti tra di loro. Per esempio:

Spettro NMR di succo di arancio @ 400MHz
Centinaia di picchi



ANALISI NMR DEI SUCCHI DI FRUTTA

SGF (Sure Global Fair) è un istituto di garanzia della qualità per l'industria europea del succo di frutta



The first NMR push button system
from
order input to final report
providing rapid response

Bruker-SGF Fruit Juice Screener

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

SUCCO DI FRUTTA:

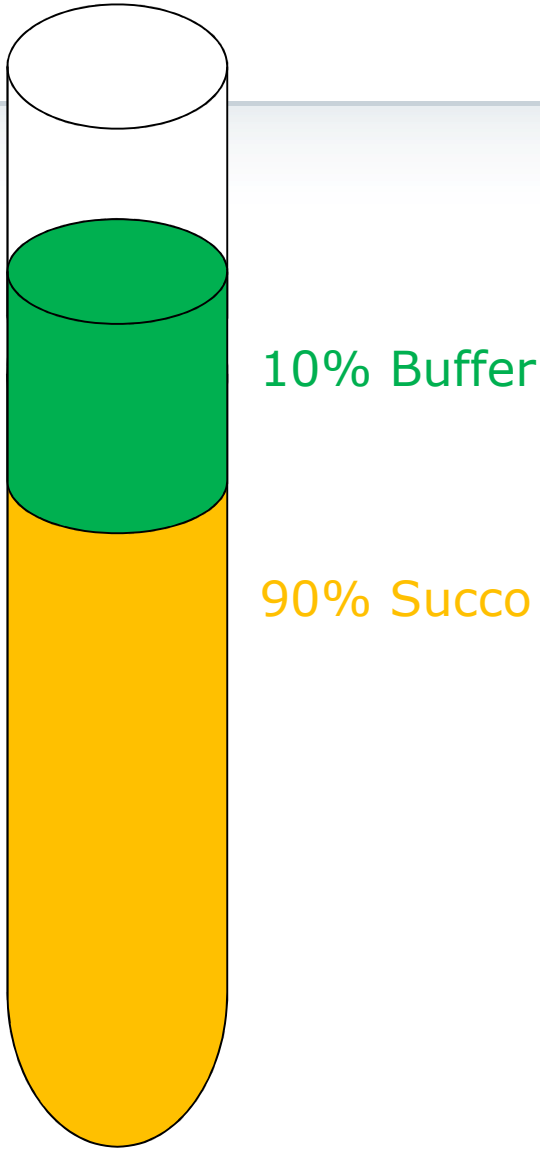
- Campioni limpidi (es. succo di mela):

Aggiunta di 10% di buffer (KH_2PO_4, D_2O, NaN_3, TSP)

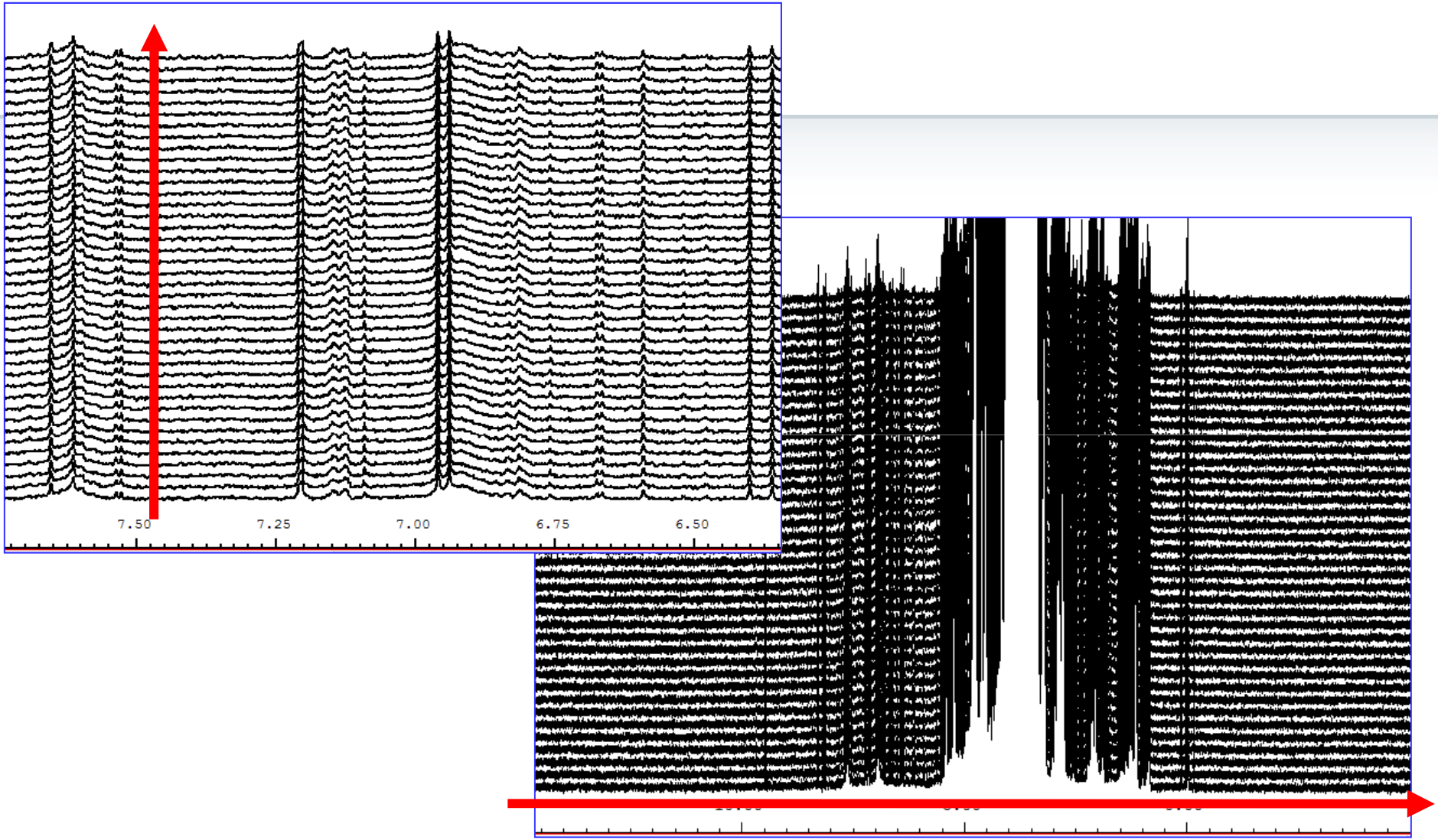
- Campioni torbidi (es. succo d'arancia)

Centrifuga 10 minuti

Aggiunta di 10% di buffer



RIPRODUCIBILITA‘ DELLA PROCEDURA



40 repliche di succo di mela

SCREENING MEDIANTE PROTON-NMR

ESPERIMENTI NMR SUCCO DI FRUTTA

- Due esperimenti NMR acquisiti per ciascun campione

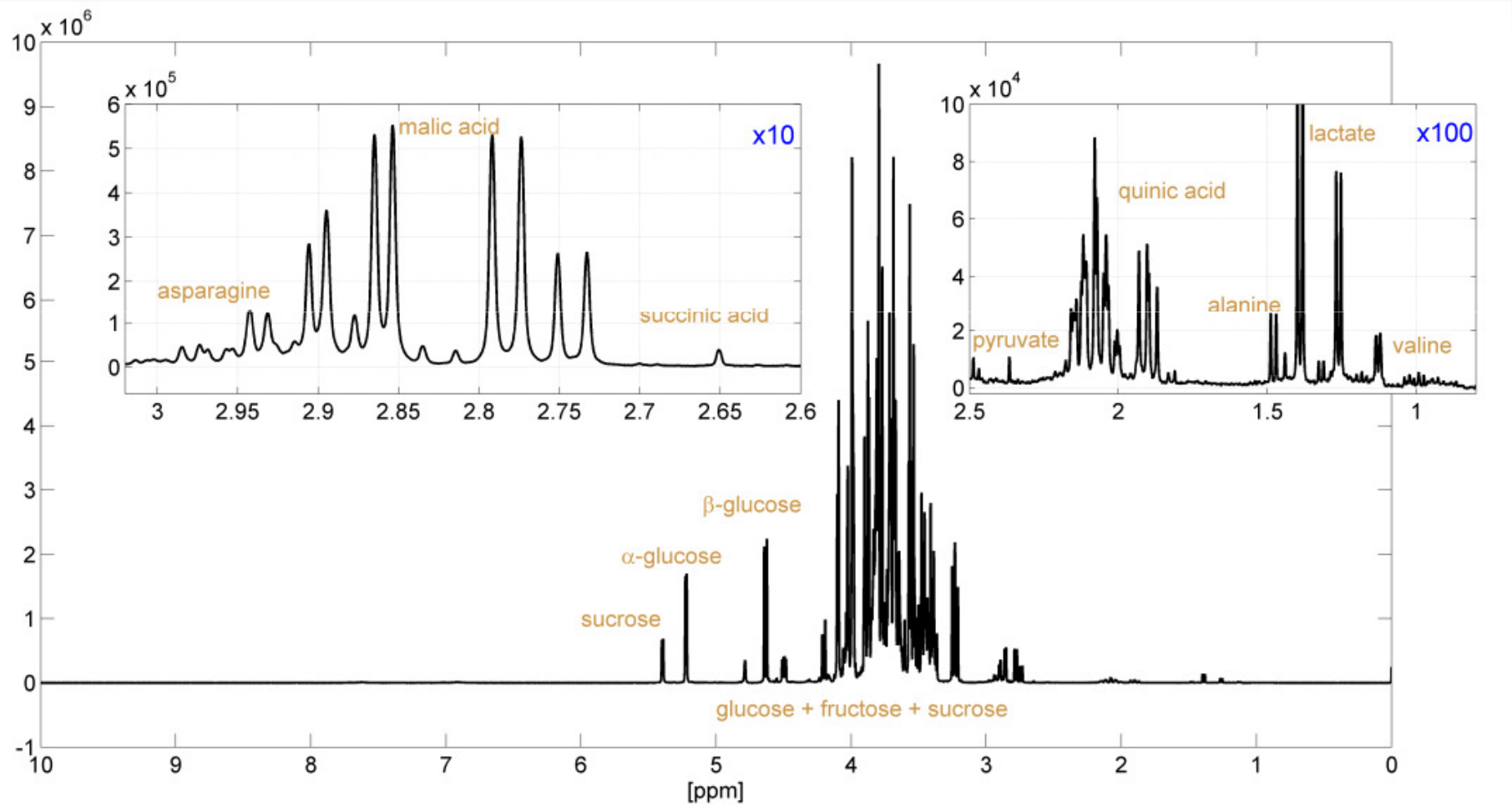
✓ Spettro protonico con soppressione del segnale dell'acqua mediante impulso di presaturazione

✓ Spettro JRES che separa gli effetti di chemical shift e J-coupling in due dimensioni indipendenti.

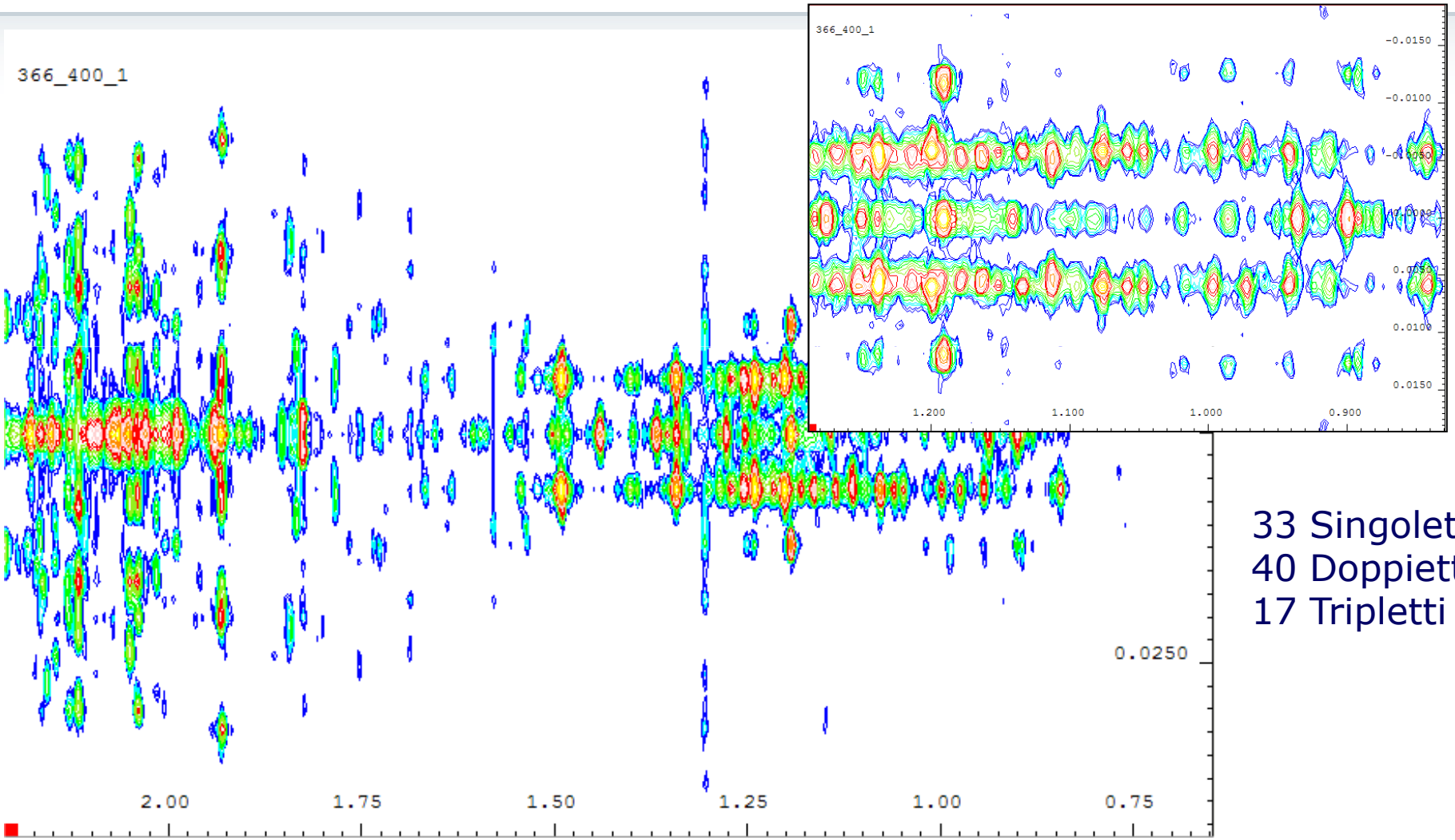
- Processing automatico per entrambi gli esperimenti.

SPETTRO PROTONICO 1D

Succo di mela

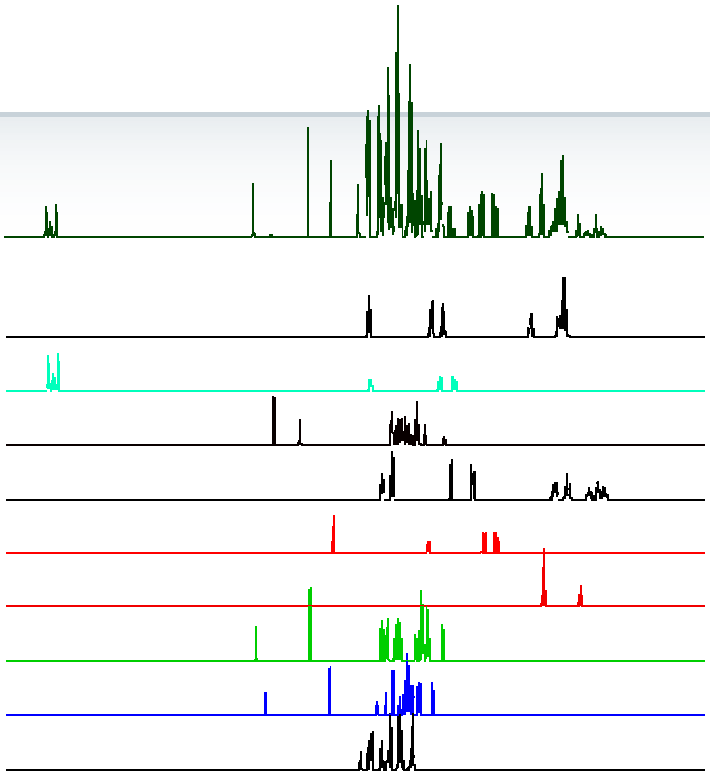


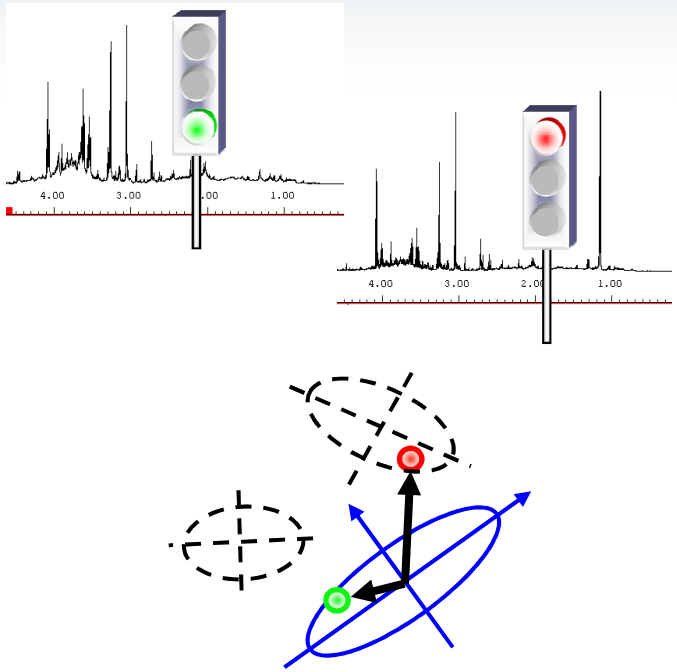
ESPERIMENTO 2D-J-RESOLVED (JRES)



33 Singoletti
40 Doppietti
17 Tripletti

ANALISI DI MISCELE





TARGETED

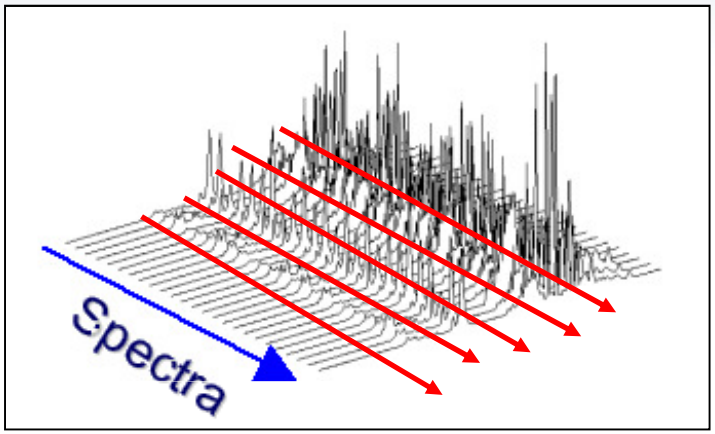
Metabolic profiling
Identificazione / Quantificazione

UNTARGETED - STATISTICS

Metabolic fingerprinting
Classificazione / Discriminazione

APPROCCIO "UNTARGETED"

ANALISI STATISTICA MULTIVARIATA



$$\begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & X_{13} & \cdots \\ X_{21} & X_{22} & X_{23} & \cdots \\ \cdots & \cdots & \cdots & \\ \cdots & \cdots & \cdots & \end{bmatrix}$$

- The valutazione statistica è fatta usando una combinazione di diverse tecniche multivariate:

✓ Principal Components Analysis (PCA)

✓ Canonical Analysis (CA)

✓ Multivariate Analysis of Variance + Cross-Validation (CV)

ALCUNI ESEMPI : FRUTTI DIFFERENTI

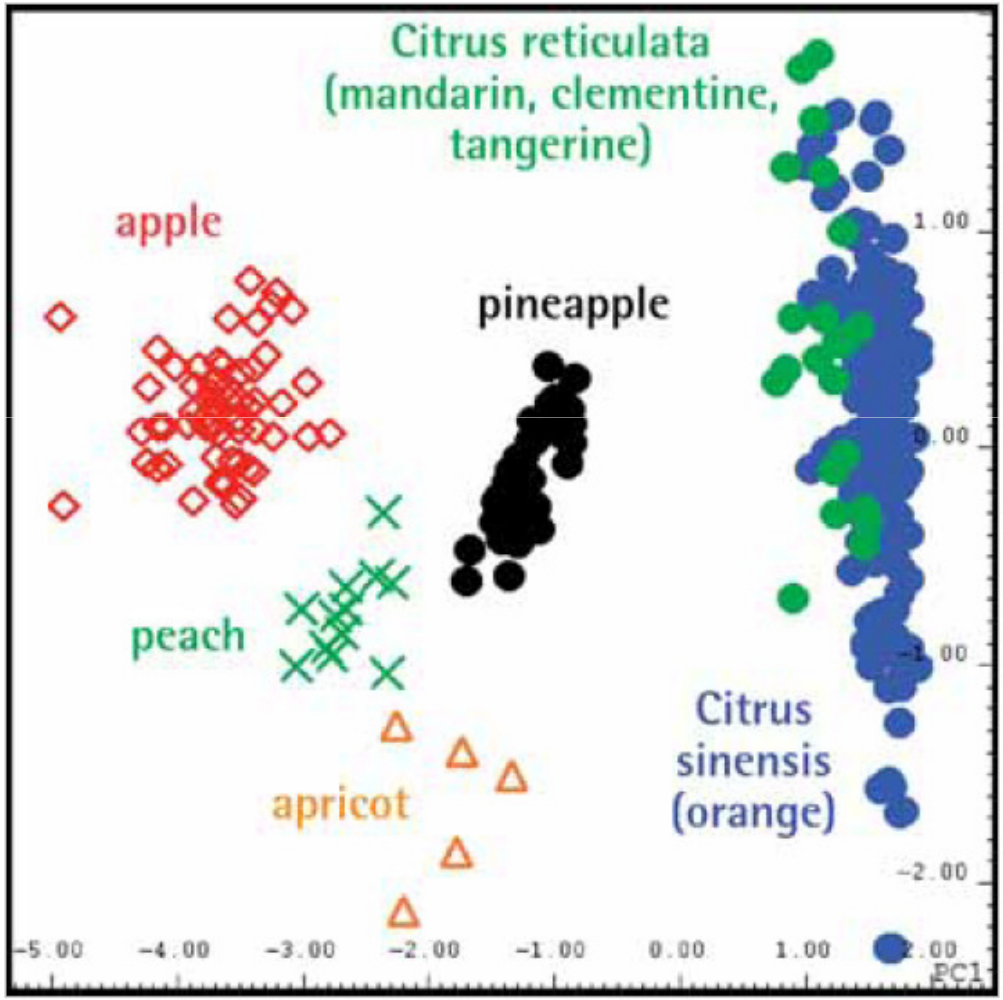
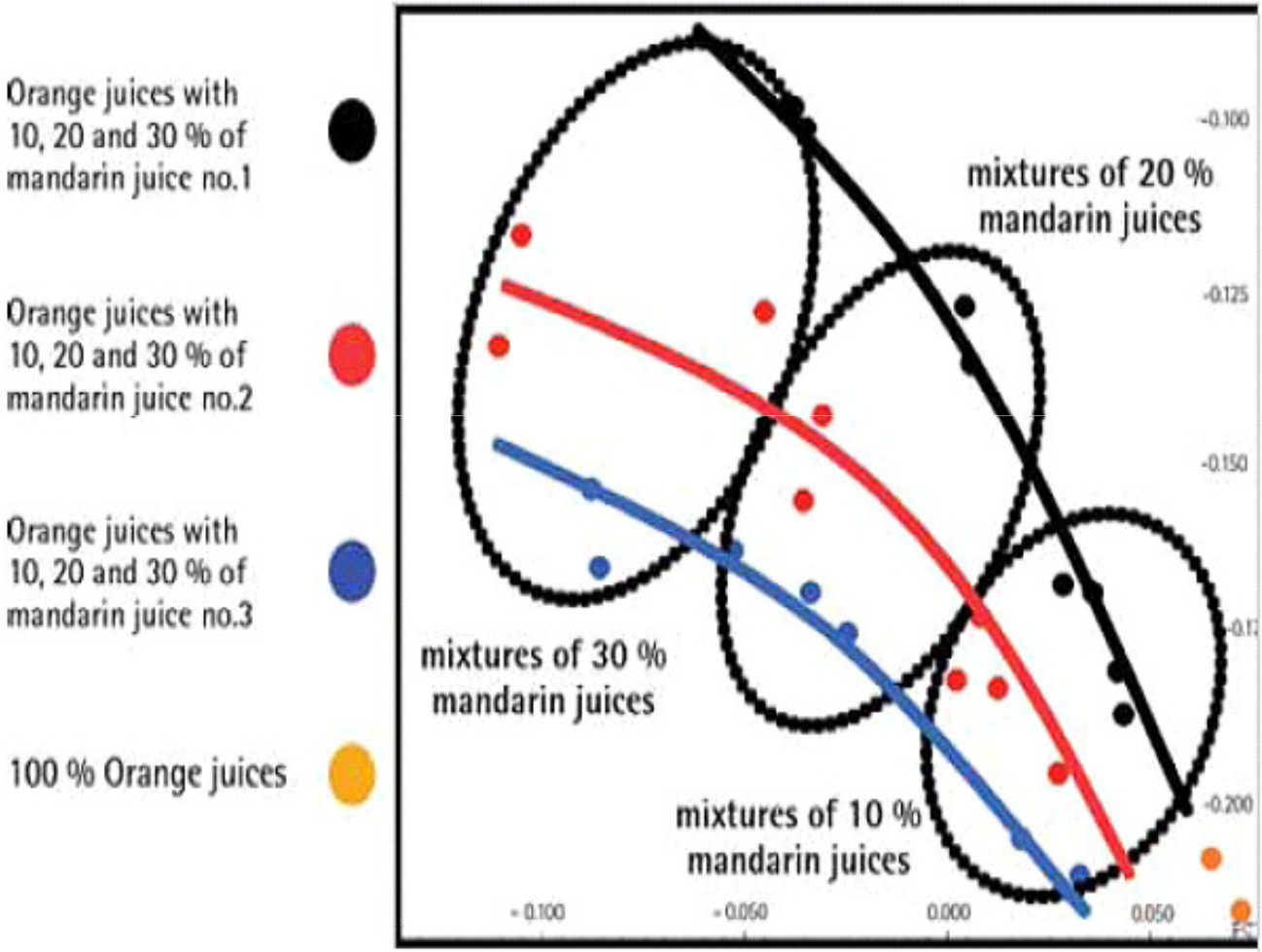


Fig. 2: Multifruit differentiation by PCA represented in a two dimensional plot

ALCUNI ESEMPI: ARANCIA – MANDARINO
Diversi succhi- diverse percentuali



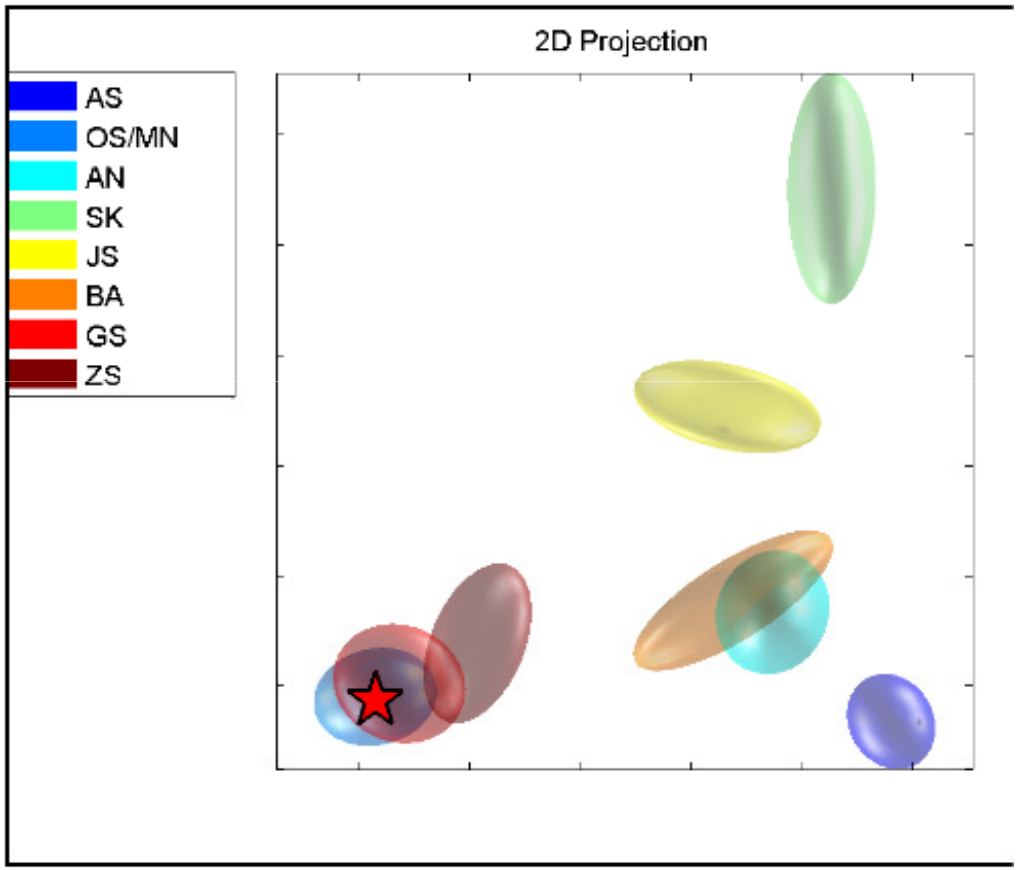
1H-NMR @400 MHz
La PCA rivela differenti percentuali di aggiunte

CLASSIFICAZIONE FRUTTO

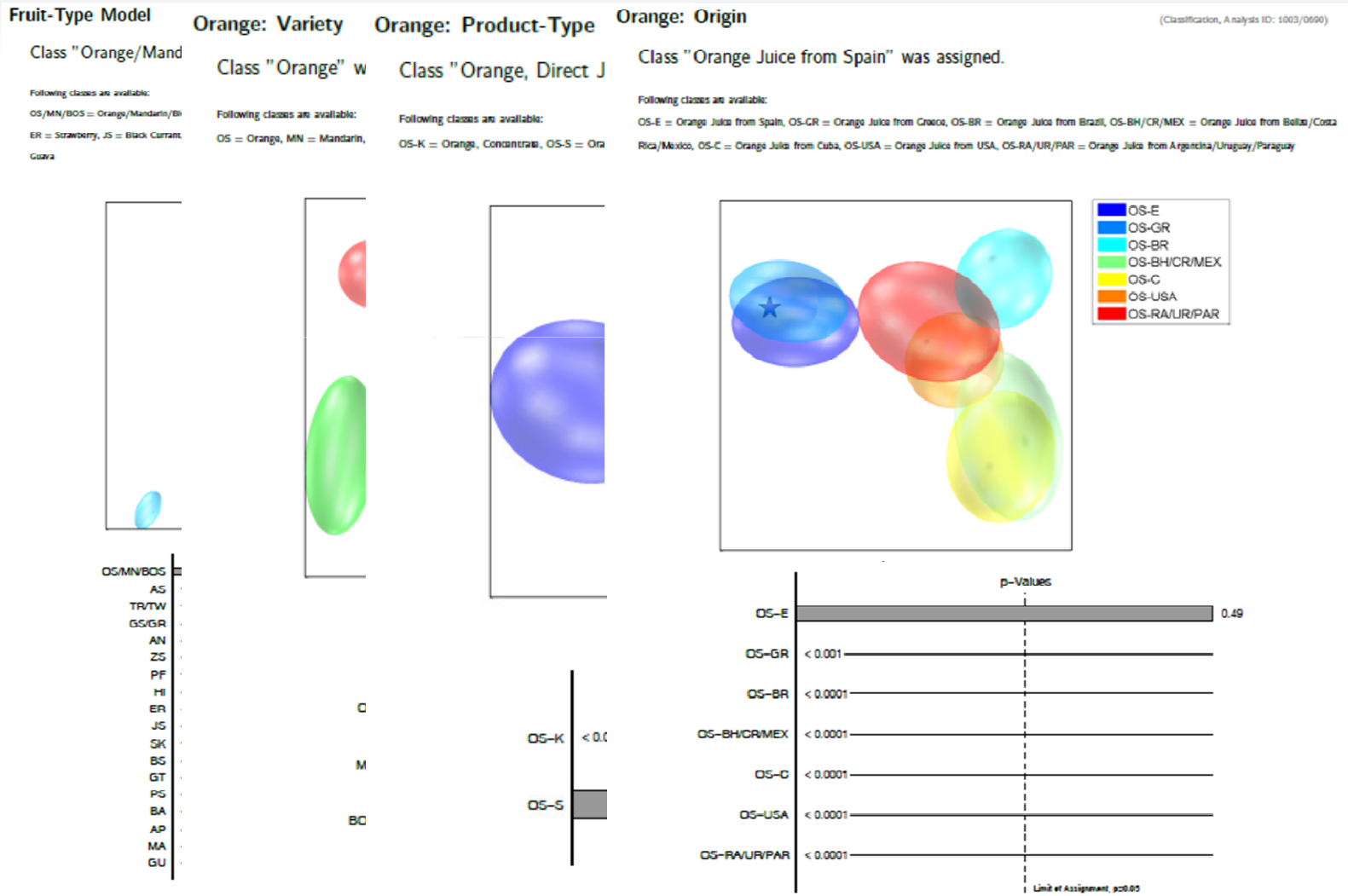
Il modello include:

AS: apple
OS: orange
MN: tangerine
SK: sour cherry
JS: black currant
BA: banana
GS: grapefruit
ZS: lemon

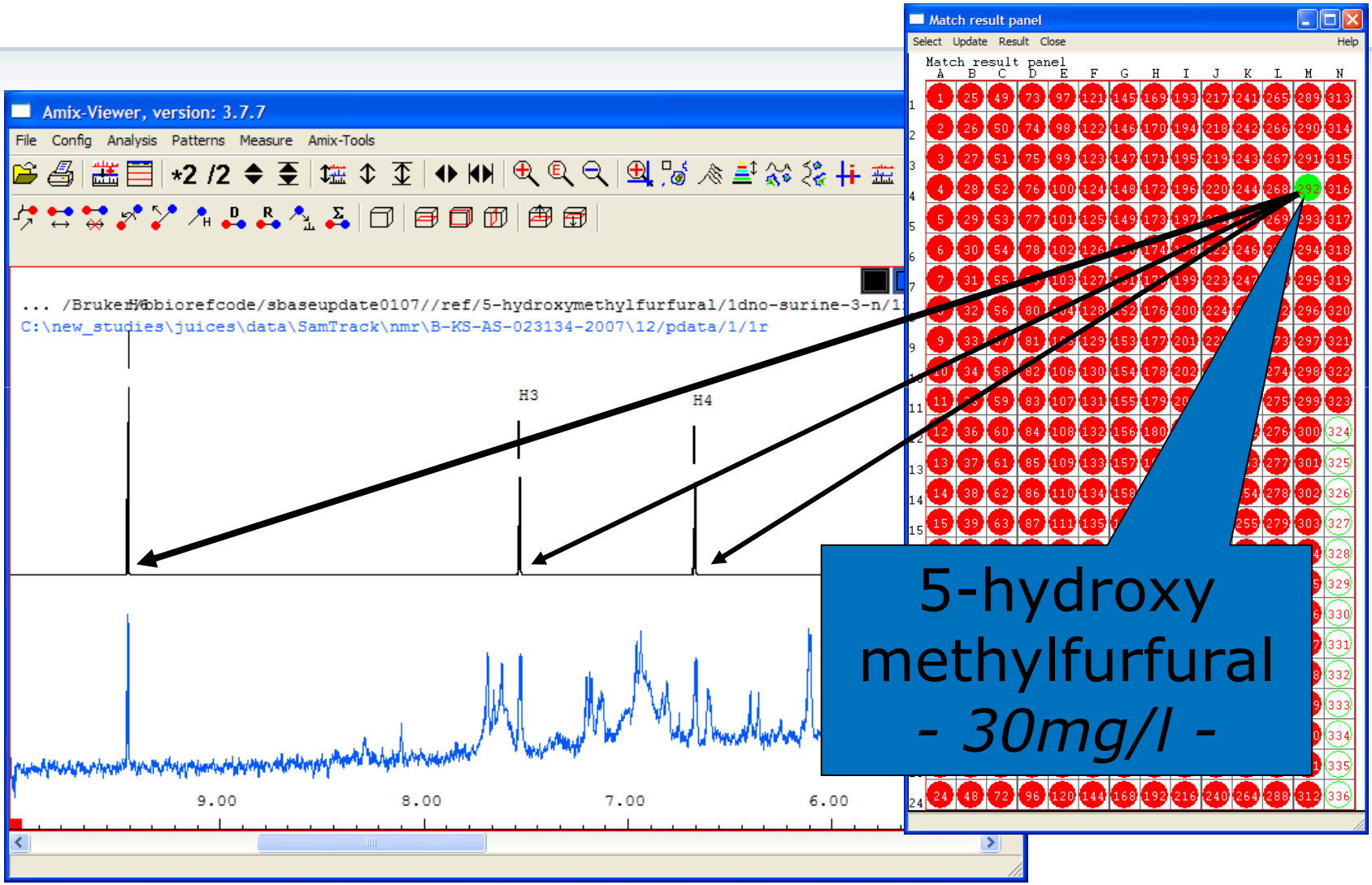
Confronto rispetto al modello (non al singolo campione): il modello è stato costruito con centinaia di campioni autentici.



REPORT : MODELLO DI CLASSIFICAZIONE



ANALISI "TARGETED"
IDENTIFICAZIONE MEDIANTE DATABASE

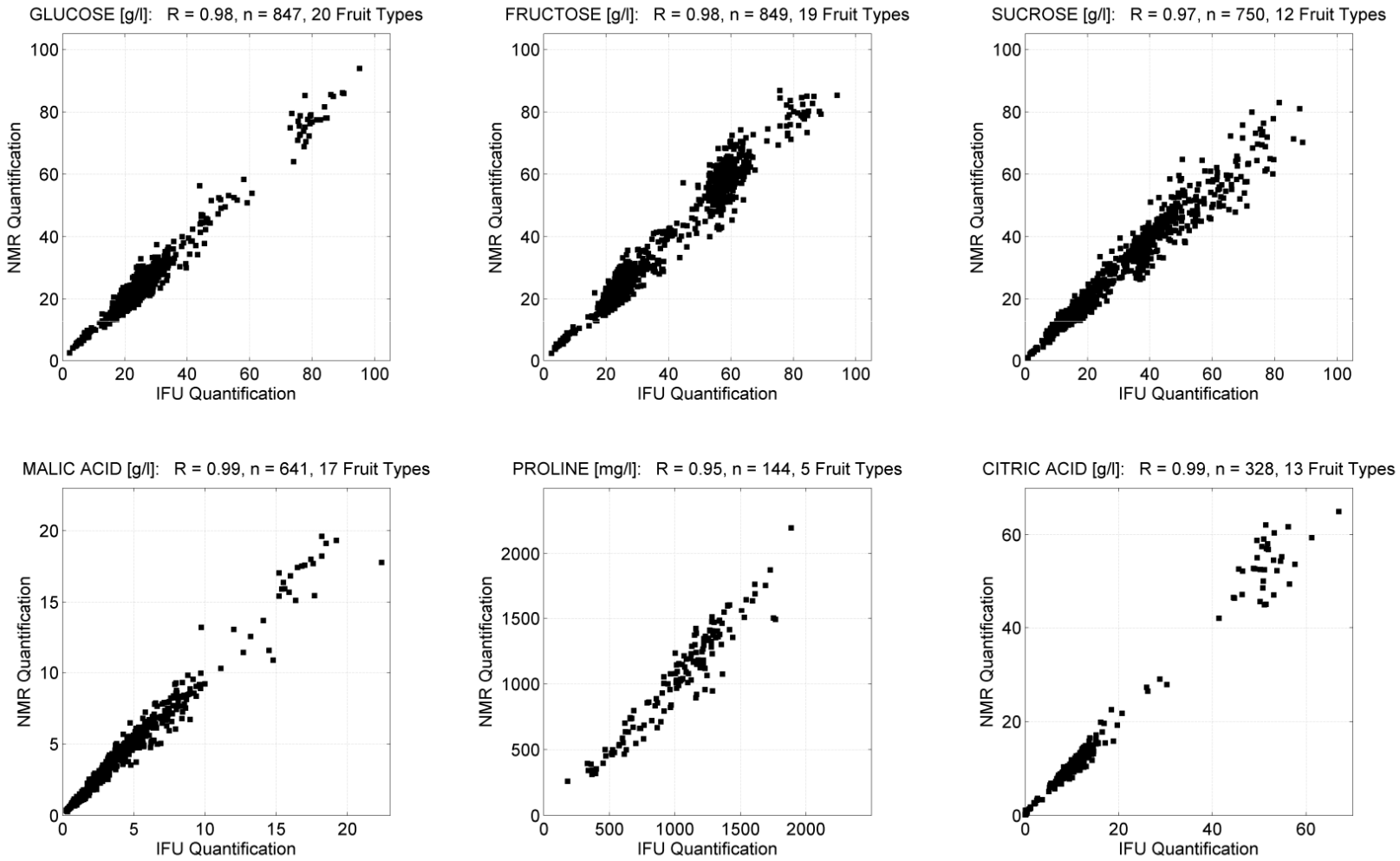


QUANTIFICAZIONE

Quantification Results: (Analysis-ID: Q)

Compound	Result	Unit	A.I.J.N. (Orange) Flag	min	max	SGF-Profiling n =1364
5-hydroxymethylfurfural	N/Q	mg/l	●	-	10	not detectable
D-galacturonic acid	N/Q	mg/l	○	-	-	0 279
acetaldehyde	<2	mg/l	○	-	-	not detectable
alanine	98	mg/l	●	60	205	43 182
benzaldehyde	N/Q	mg/l	○	-	-	not detectable
benzoic acid	N/Q	mg/l	○	-	-	not detectable
citric acid	9.6	g/l	●	6.3	17.0	5.5 16.4
ethanol	<10	mg/l	●	-	3000	0 1173
formic acid	<5	mg/l	○	-	-	0 26
fructose	24.3	g/l	●	20.0	35.0	16.9 33.5
glucose	20.4	g/l	●	20.0	35.0	14.7 31.8
lactic acid	<50	mg/l	●	-	200	0 182
malic acid	2.5	g/l	●	0.8	3.0	0.45 2.8
methanol	N/Q	mg/l	○	-	-	0 108
phlorin	29	mg/l	○	-	-	0 91
proline	631	mg/l	●	450	2090	187 2244
sorbic acid	N/Q	mg/l	○	-	-	not detectable
succinic acid	38	mg/l	○	-	-	15 54
sucrose	41.8	g/l	●	10.0	50.0	26.9 60.6

CONFRONTO CON I METODI DI RIFERIMENTO



Figures show 95% of all available samples, time period = 3 years, up to 20 different fruit types

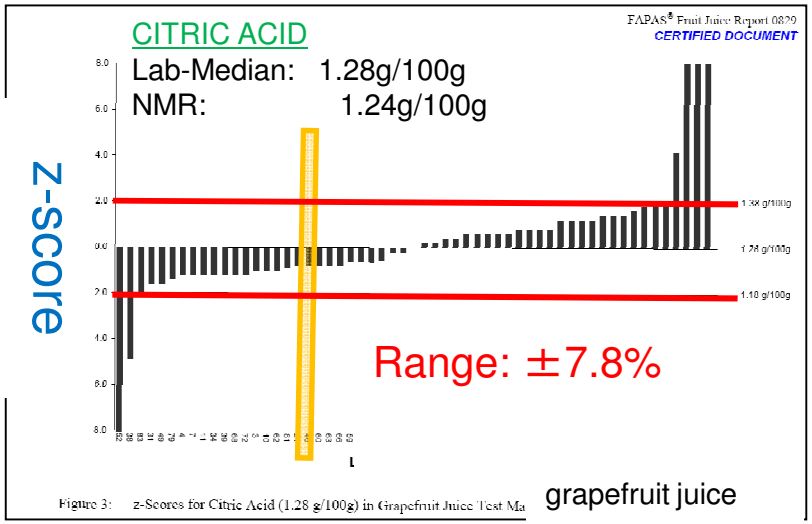
FAPAS®:
Food Analysis Performance Assessment Scheme

- Proficiency Tests in Food Analysis
- Il campioni-test vengono inviati ai laboratori partecipanti
- Ciascun laboratorio quantifica, per esempio, zuccheri, acidi, pH, pesticidi, …
- FAPAS valuta i risultati (confronto interlaboratorio)

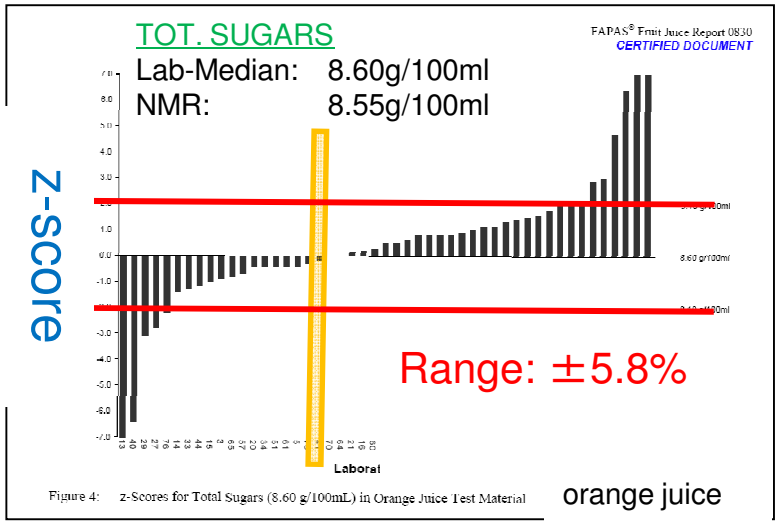
Result of BRUKER JuiceScreener

Z-Score = *Median* + Z * *StdDev*

*Values with an absolute z-score greater than **2** are **rejected (no successful participation)***



grapefruit juice



orange juice

RISULTATI DELLA QUANTICAZIONE

- Profilo zuccherino (Saccarosio, Glucosio, Fruttosio) => Aggiunta di zuccheri
- Profilo acidico => Aggiunta di acidi (es: acido citrico nel succo di mela)
- Rapporto acidi Malico/ Chinico => Maturazione della mela
- Rapporto acidi citrico/iso-citrico nel succo di limone=> Aggiunta di acido citrico
- Concentrazione di acido galatturonico => trattamento enzimatico in succo di mela
- Concentrazione di florina in frutti del genere Citrus => Uso della buccia
- Concentrazione dei parametri di deterioramento => acido lattico, acido fumarico, HMF, acido formico, acido gluconico
- Rivelazione della presenza di altri frutti => Es, pera nel succo di mela, arancio nel succo di mela, pompelmo nel succo di arancia

SGF-PROFILING™ :

- Definizione obiettivi
- Costruzione del modello di"normalità" in condizioni standardizzate
- Validazione del modello
- Acquisizione degli spettri dei campioni nelle stesse condizioni usate per il modello
- Confronto del campione incognito con il modello

L’approccio SGF-profiling™
(Spin Generated Fingerprint Profiling) può essere applicato anche a matrici alimentari diverse?

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- OLIO DI OLIVA: 140.0 mg di olio di oliva vengono dissolti in 700 ul di cloroformio deuterato ($CDCl_3$).
- VINO: 900 ul di vino vengono miscelati con 100 ul di "wine-buffer". Dopo il pH della miscela viene aggiustato in accordo con il pH del "reference-wine" pH usando NaOH 1M o HCl 1M.

Di questa miscela, 600 µl vengono trasferiti nel tubo NMR e misurati.

ESPERIMENTI SU OLIO DI OLIVA E VINO

- Tre esperimenti acquisiti per ciascun campione di olio di oliva

✓ Spettro protonico semplice (standard single pulse experiment)

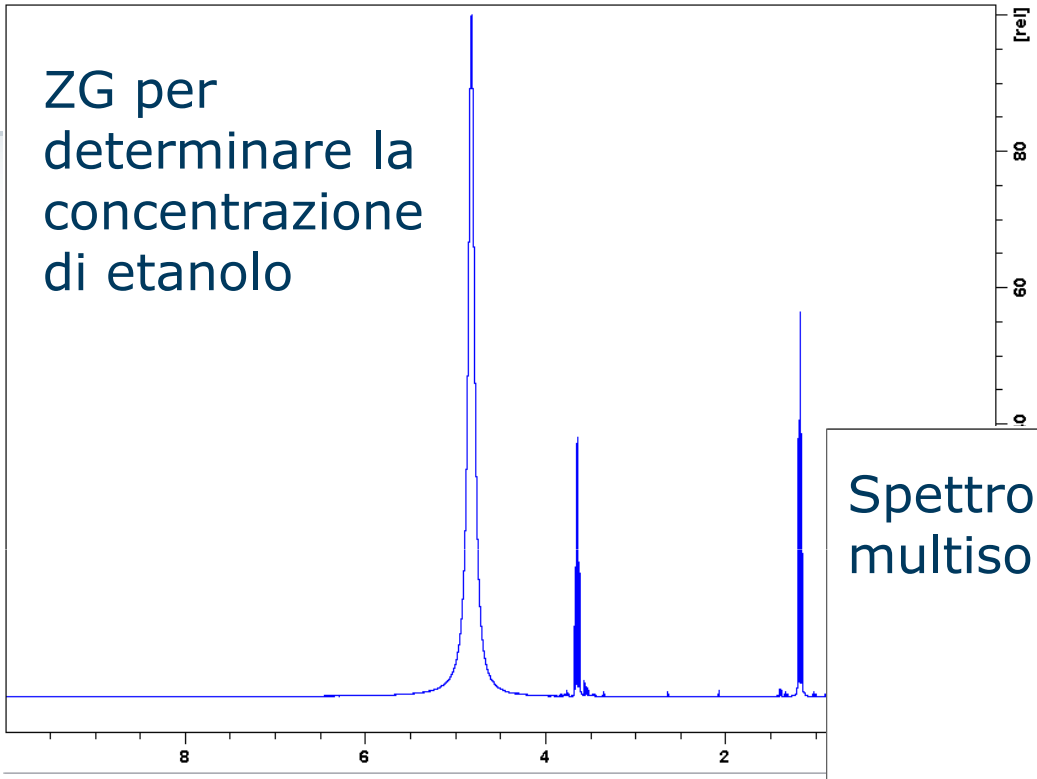
✓ Spettro protonico con soppressione dei segnali dei lipidi mediante un impulso modulato

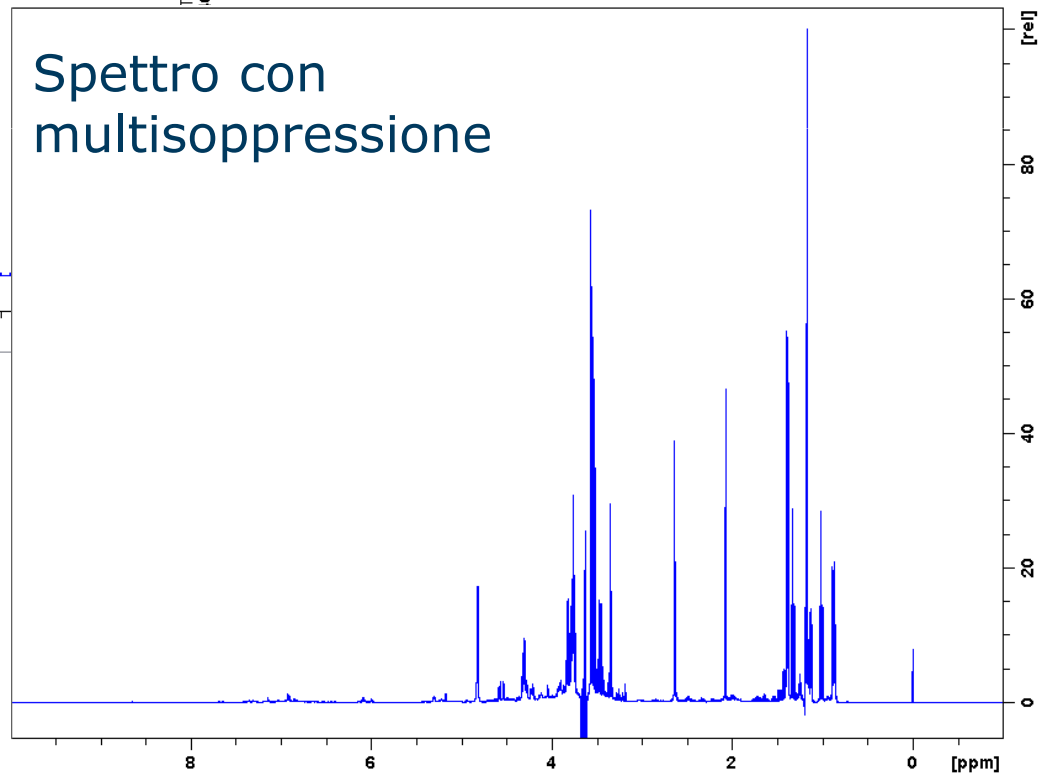
✓ Spettro JRES che separa gli effetti di chemical shift e J-coupling in due dimensioni indipendenti

- Gli stessi esperimenti vengono acquisiti sui campioni di vino ma, in questo caso, vengono soppressi i segnali di acqua ed etanolo

- Processing automatico

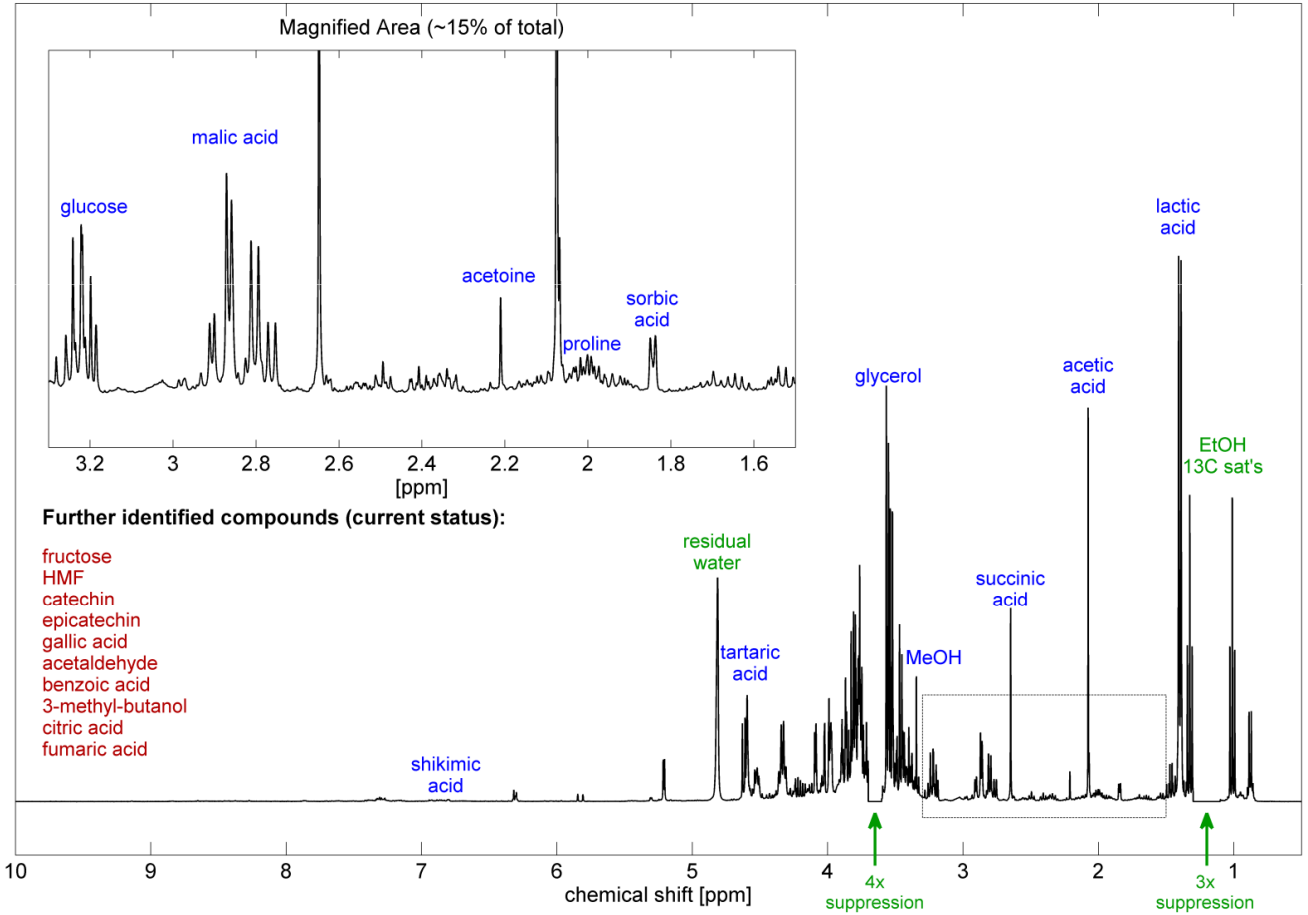
VINO

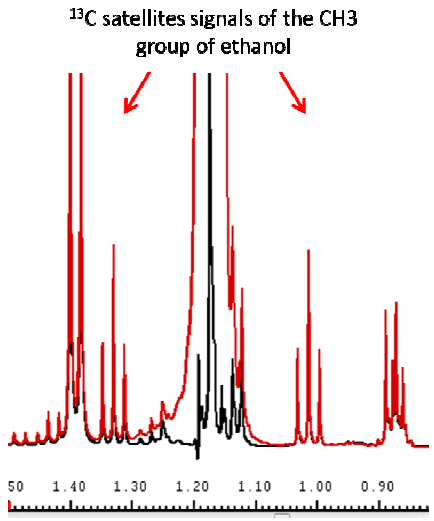

ZG per determinare la concentrazione di etanolo
[rel]
80
60
8
6
4
2


Spettro con multisoppressione
[rel]
80
60
40
20
0
8
6
4
2
0
[ppm]

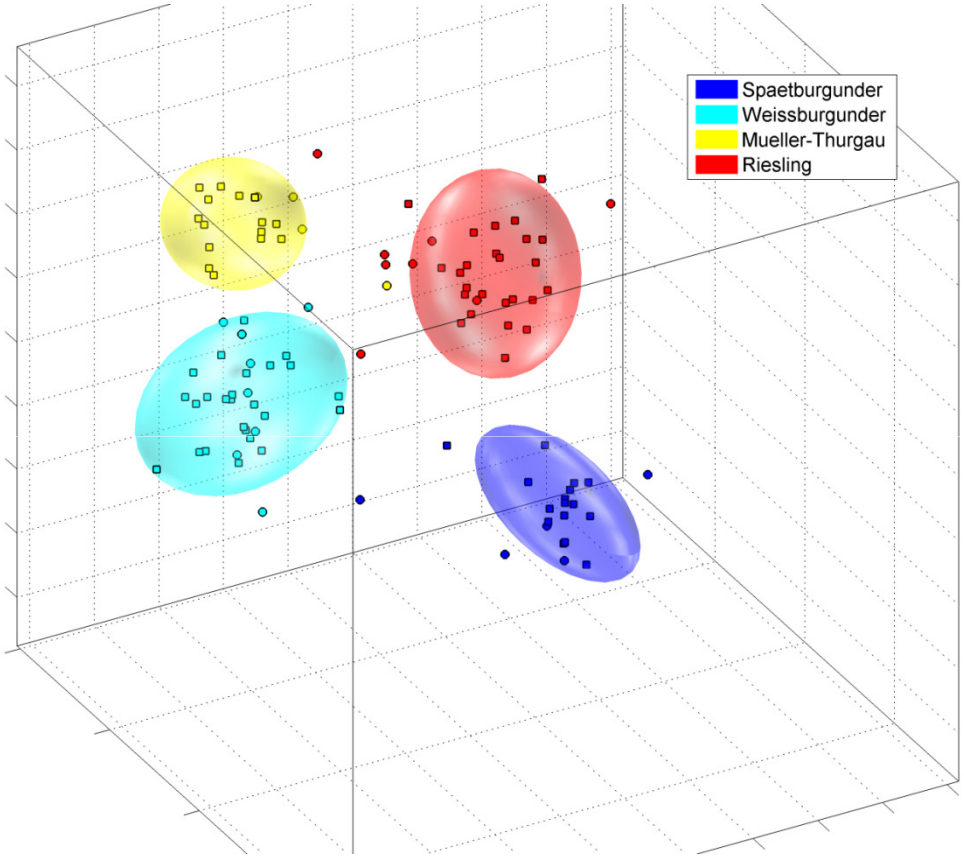
SOPPRESSIONE ETANOLO E ACQUA

Soppressione multipla di 8 frequenze

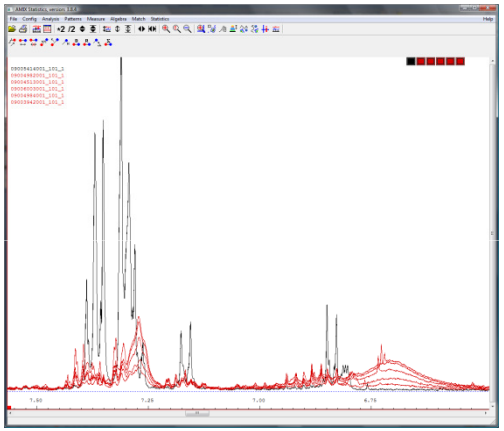


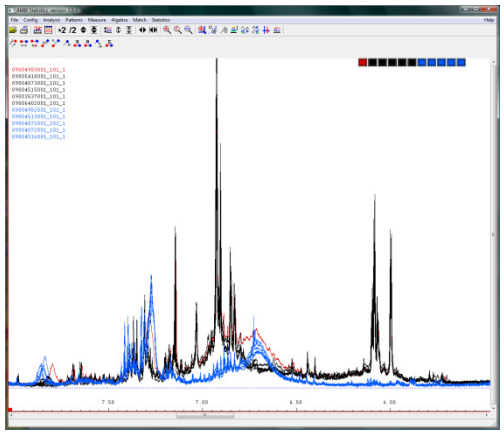


DIFFERENZIAZIONE DELLA VARIETA’



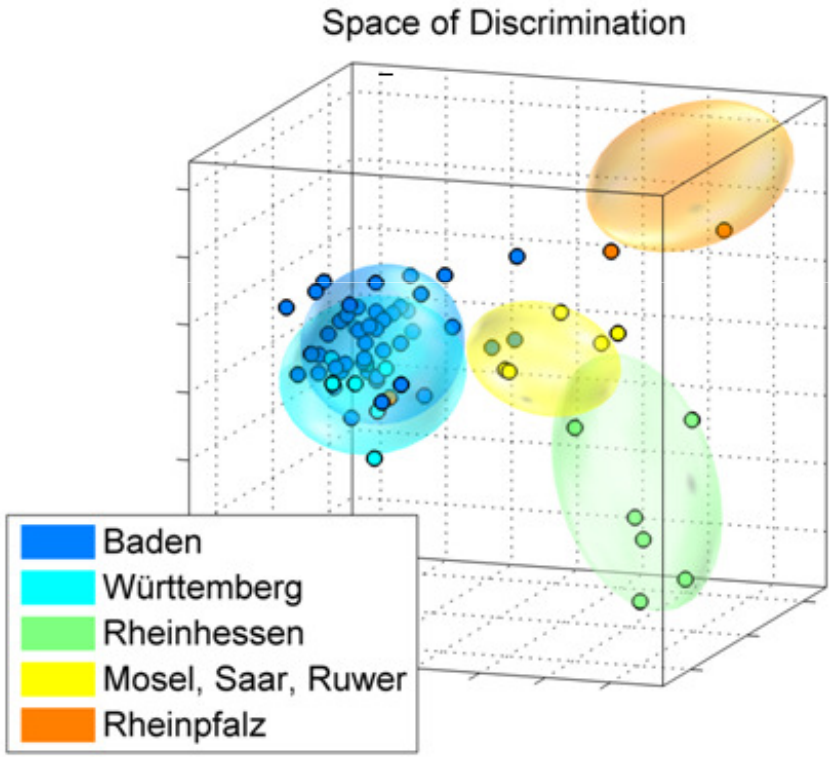
100 vini della regione Baden





R.Godelmann CVUA Karlsruhe

DIFFERENZIAZIONE DELLA REGIONE GEOGRAFICA



Confusion Matrix (avg. = 89.3%)

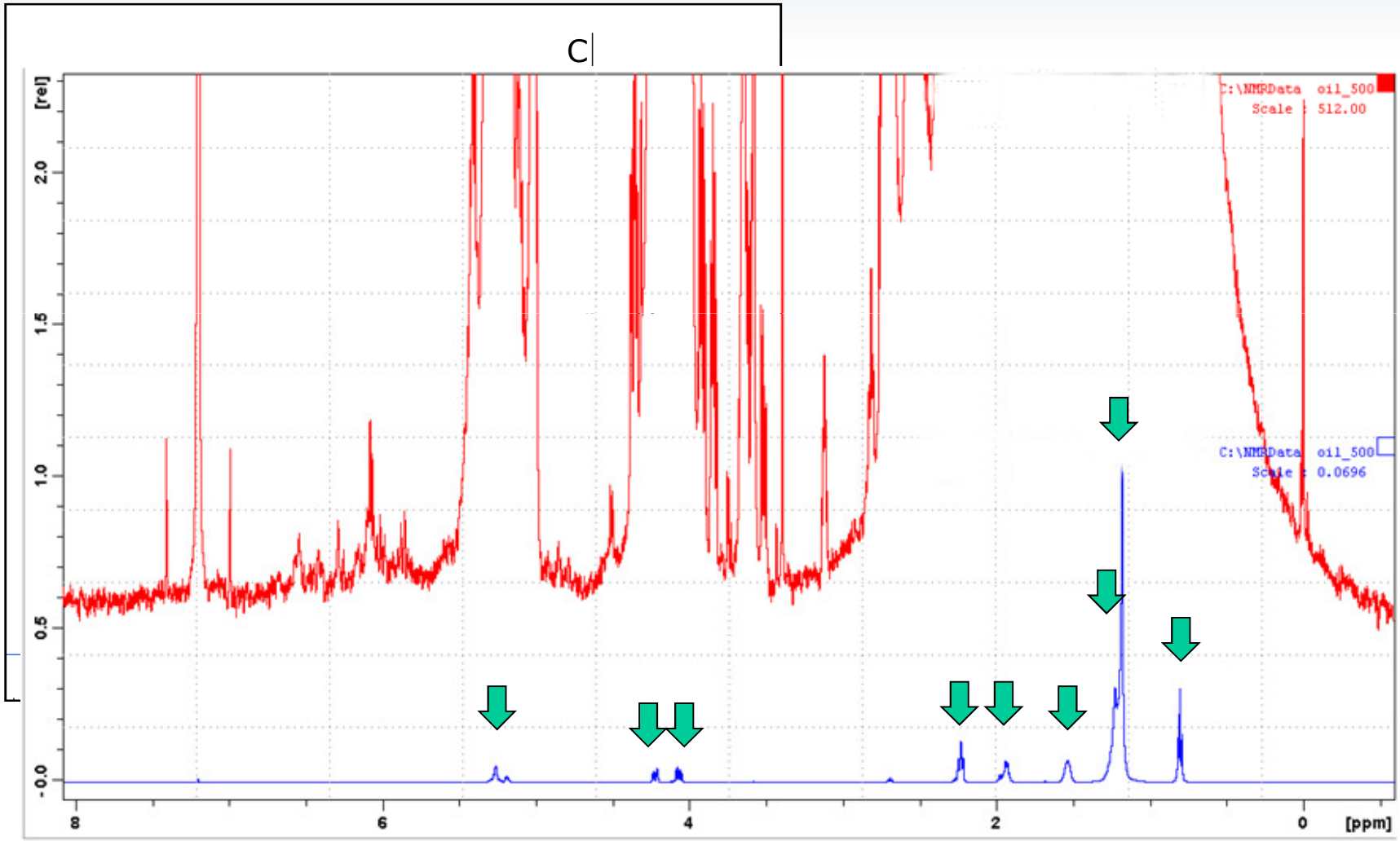
Baden	92	38			6
Württemberg	7	59			1
Rheinhessen	1	1	95		
Mosel, Saar, Ruwer		2	4	100	
Rheinpfalz					92

Original Groups

RIPRODUCIBILITA' DELLA QUANTIFICAZIONE

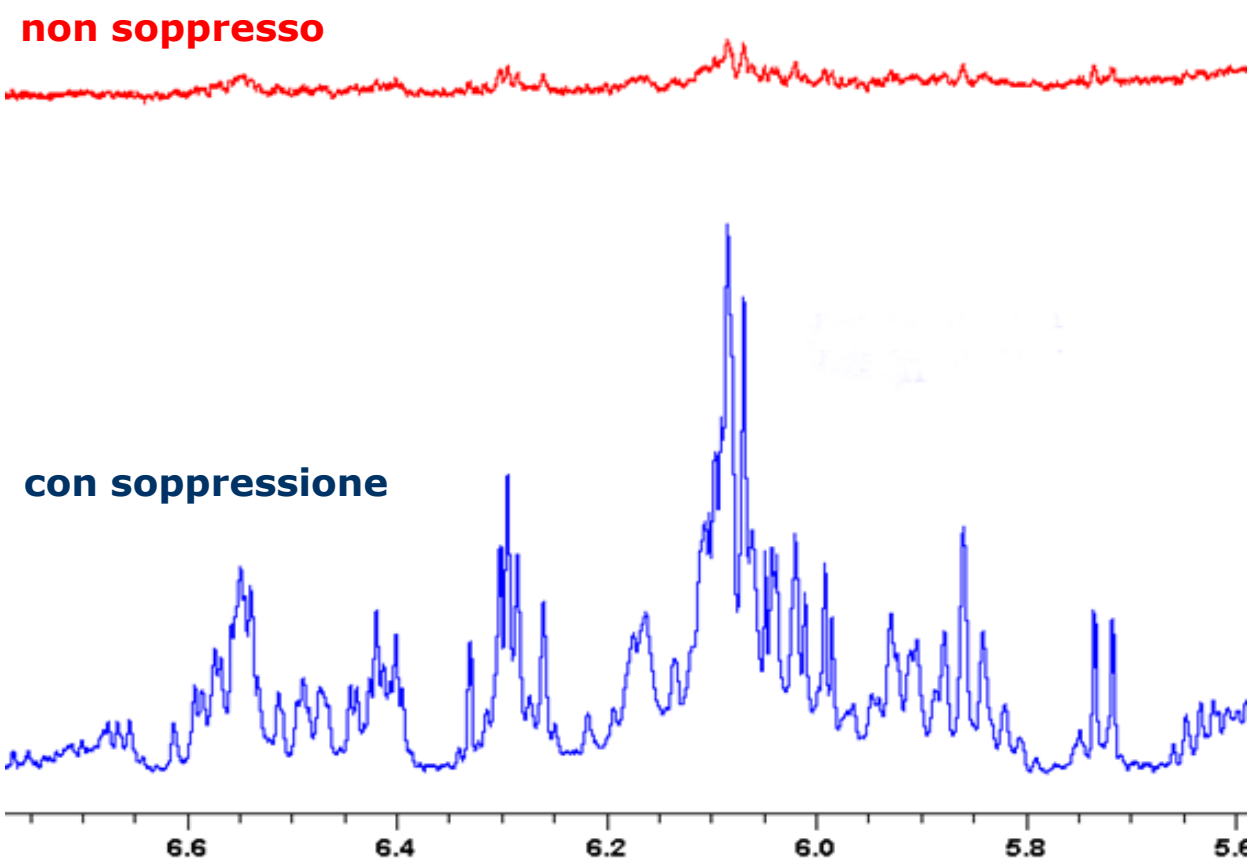
Compound	Mittelwert (mg/l)	StdAbw (mg/l)	StdAbw (%)
acetaldehyde	<5	n/a	n/a
trigonelline	16	1	6.4%
shikimic acid	65	3	4.3%
2,3-butandiol	321	23	7.0%
lactic acid	177	5	2.7%
malic acid	3818	74	1.9%
tartaric acid	2235	155	7.0%
glucose	2591	92	3.5%
fructose	2407	110	4.6%
succinic acid	331	14	4.1%
glycerol	5129	280	5.5%
methanol	110	3	2.5%
acetoine	6	1	10.5%
fumaric acid	<5	n/a	n/a
acetic acid	209	7	3.3%
citric acid	266	18	6.9%
total adenine	8	1	13.0%
alanine	42	4	8.8%
ethanol	97127	533	0.5%

OLIO DI OLIVA

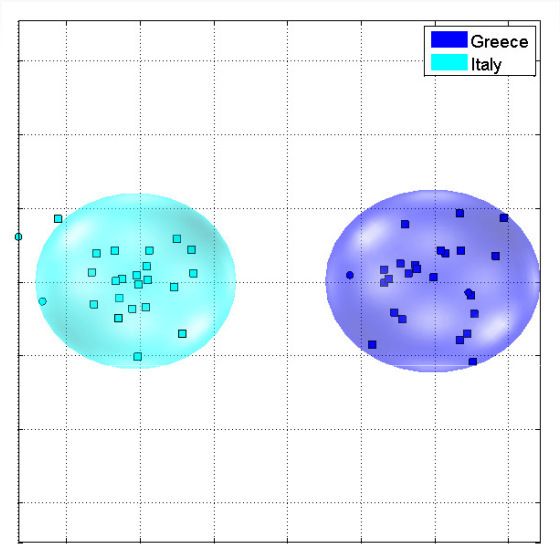


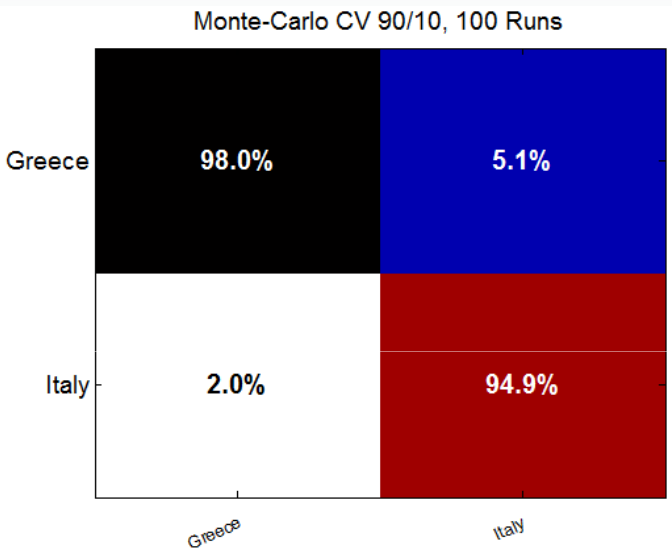
SOPPRESSIONE SEGNALI LIPIDICI

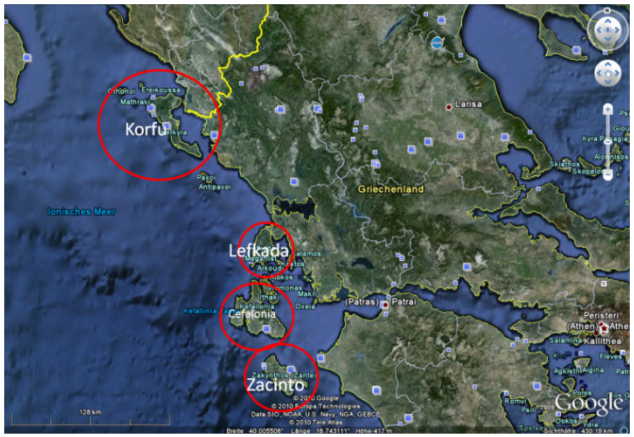
Confronto nella regione aromatica e olefinica



DIFFERENZIAZIONE DELL'ORIGINE



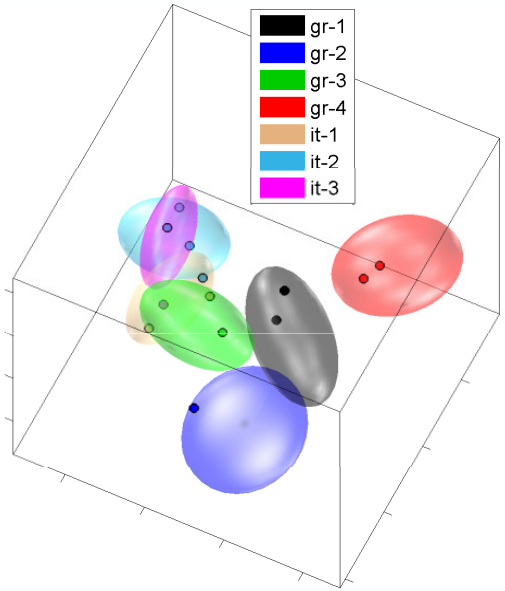




Collaborazione con il Prof. Sacco & Co., University of Bari, Italy

F. Longobardi et al. / Food Chemistry 130 (2012) 177–183

DISCRIMINAZIONE DELLA REGIONE D'ORIGINE



	gr-1	gr-2	gr-3	gr-4	it-1	it-2	it-3
gr-1	100	12	13	6	2		1
gr-2		74			2		5
gr-3			71				4
gr-4				93		3	
it-1		7	3		70	12	13
it-2		1	2	1	18	78	26
it-3		6	11		7	7	53

Experiments used:
ZG: 0.5 – 3 ppm, 450 buckets
NOESYGPPR1DSP: 5.6 - 9.5 ppm, 450 buckets
CDCl3 excluded (7.1-7.5)
No Scaling = Absolute concentration
Per bucket: Unit variance scaling
PCA Fixed Dimension: 50
Cross Validation: 7 sets
Monte Carlo: 1000 runs

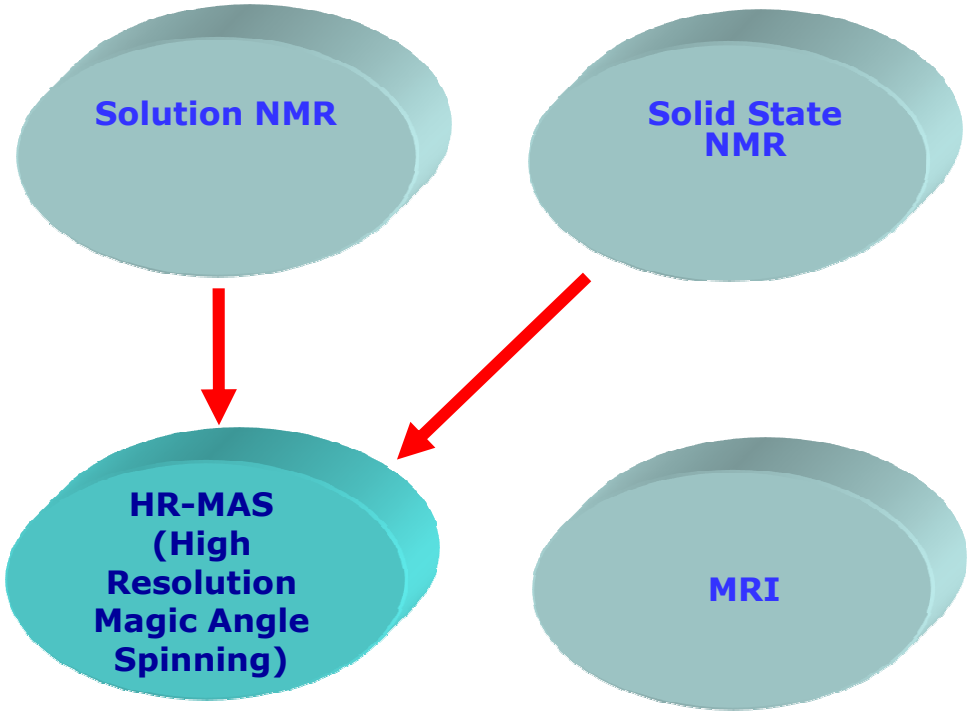
Daunia	= it-1	15 samples
Terra di Bari	= it-2	31 samples
Terra d'Otranto	= it-3	11 samples
Kefaloniá	= gr-1	14 samples
Corfu	= gr-2	10 samples
Lefkáda	= gr-3	8 samples
Zákinthos	= gr-4	14 samples

Mean correct prediction rate: **78.2%**
(±2.6% standard deviation)

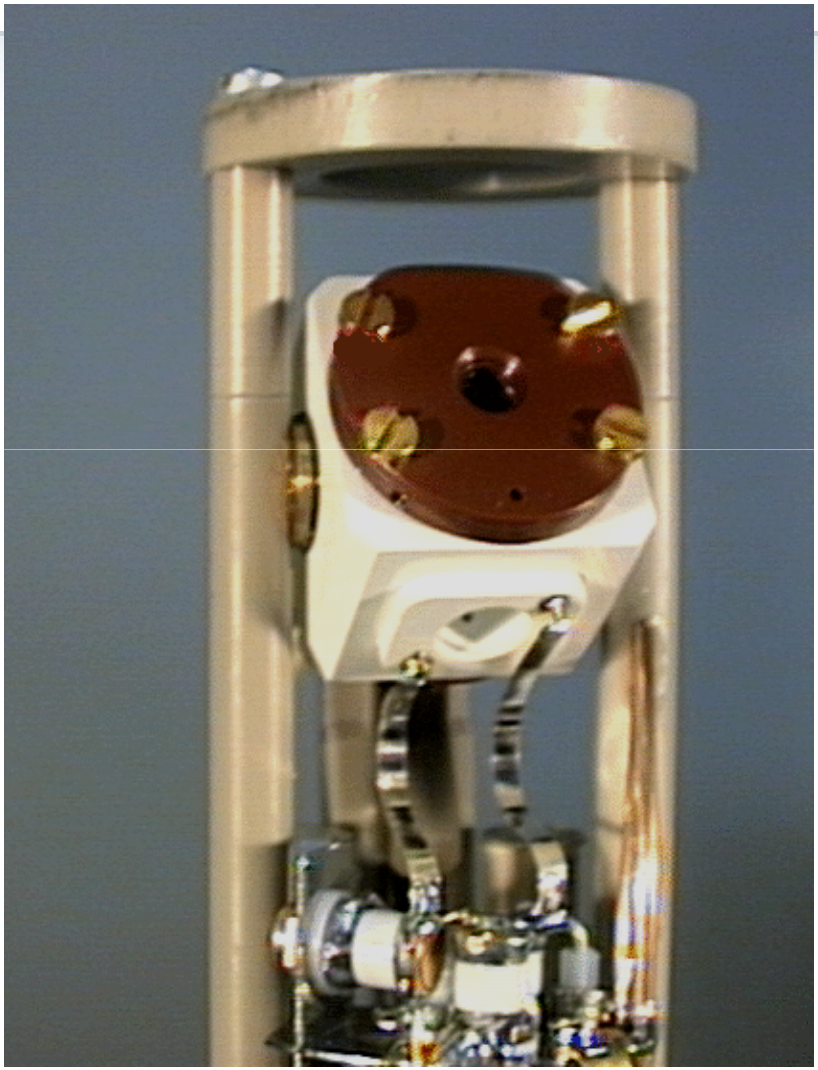
Collaborazione con il Prof. Sacco & Co., University of Bari, Italy
F. Longobardi et al. / Food Chemistry 130 (2012) 177–183

COS' ALTRO SI PUO' FARE CON NMR ?

L'NMR ad alta risoluzione può essere usata anche per campioni eterogenei.
Quando il campione è in uno stato fisico intermedio tra solido e liquido, può essere utilizzata una particolare configurazione strumentale.

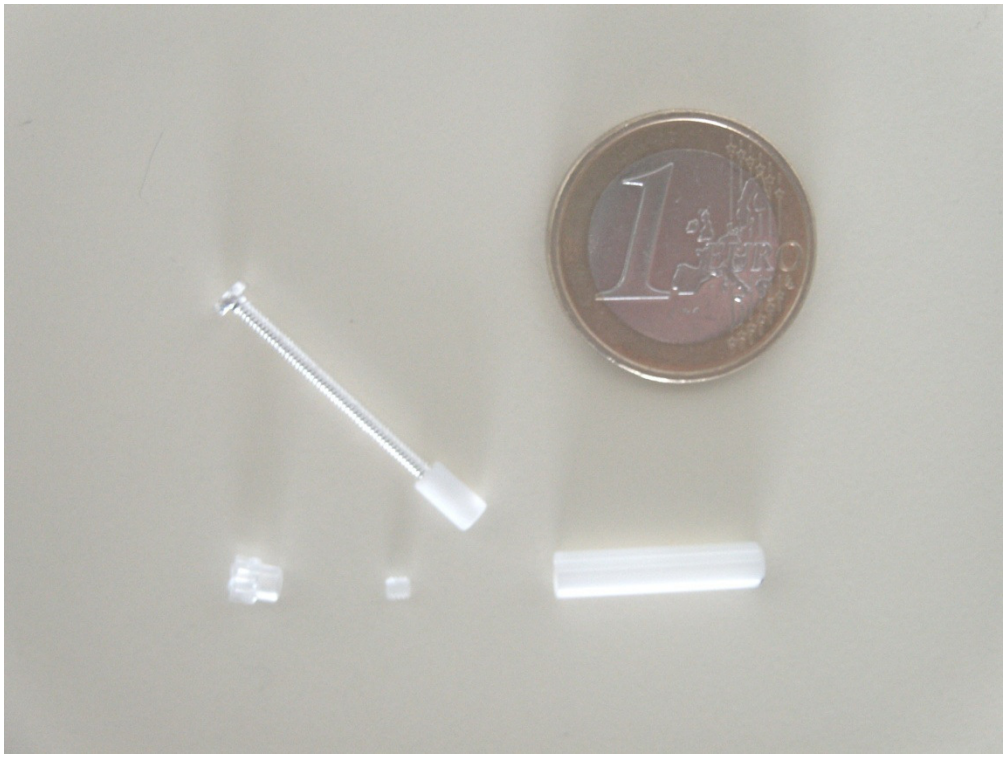


HRMAS



PROBE

ROTOR



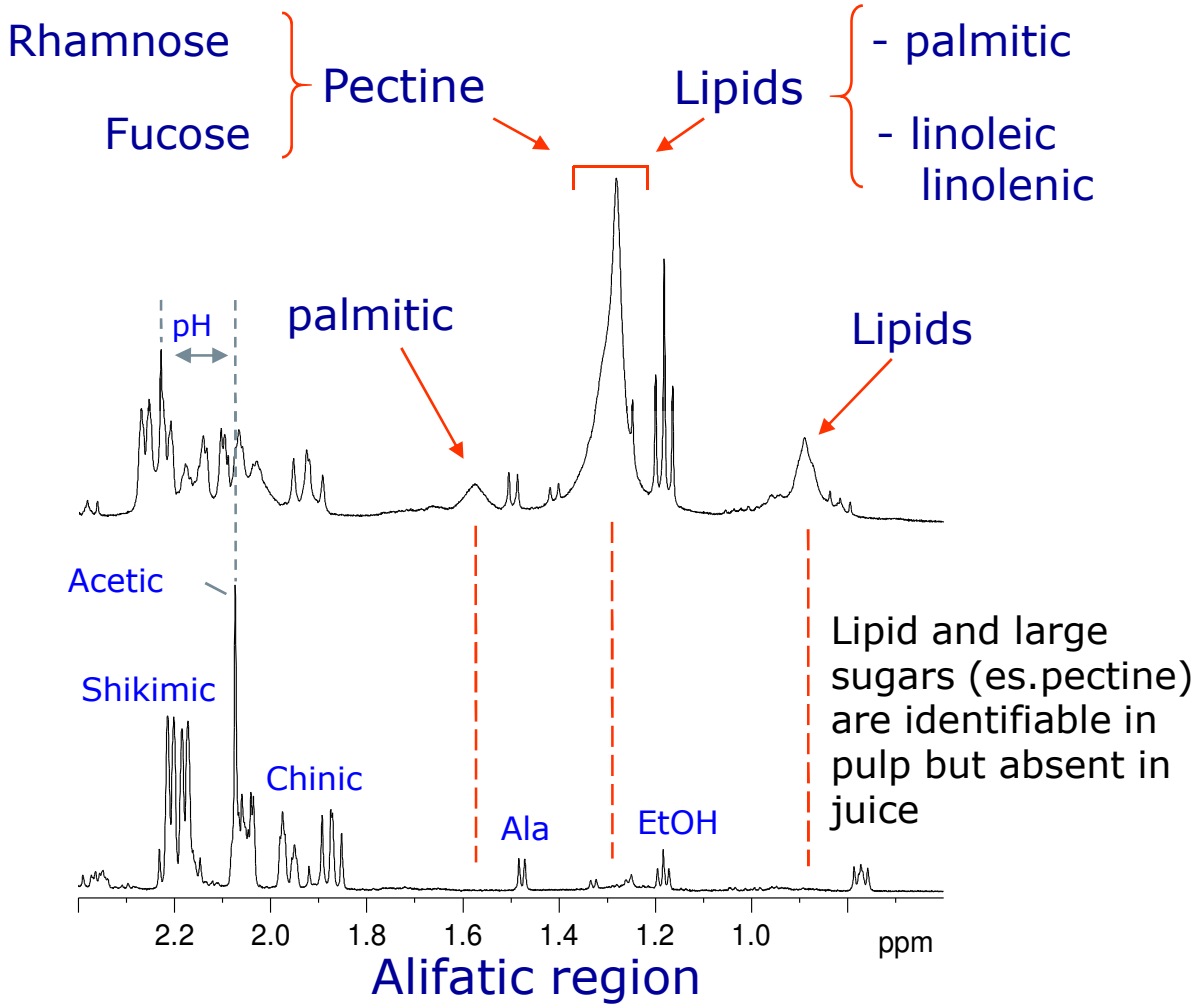
APPLICAZIONI HR-MAS SULLA POLPA DI MANGO

Polpa

^{1}H NMR using HR-Magic Angle Spinning (400 MHz)

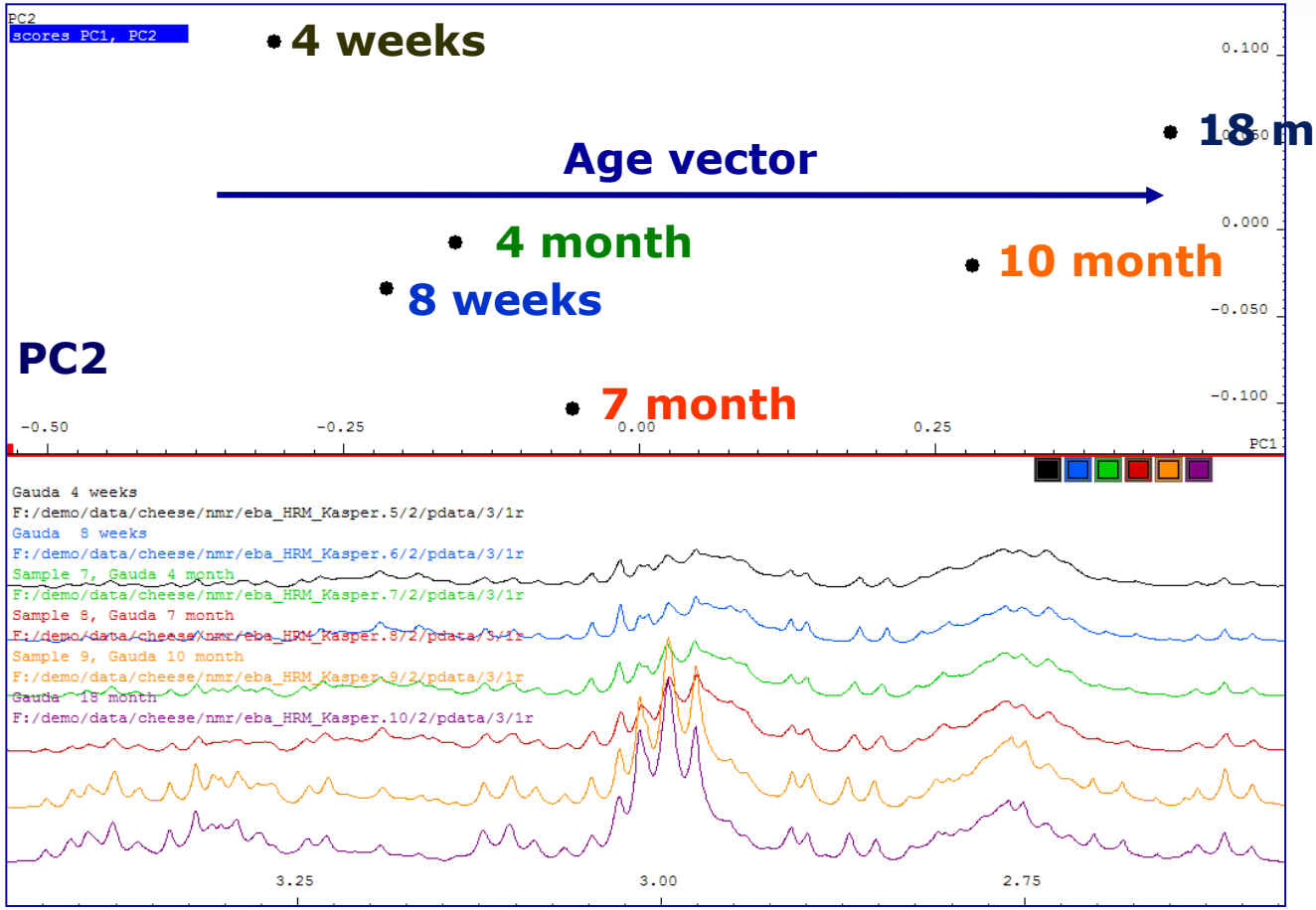
Succo

^{1}H NMR @ 600 MHz



Lipid and large sugars (es.pectine) are identifiable in pulp but absent in juice

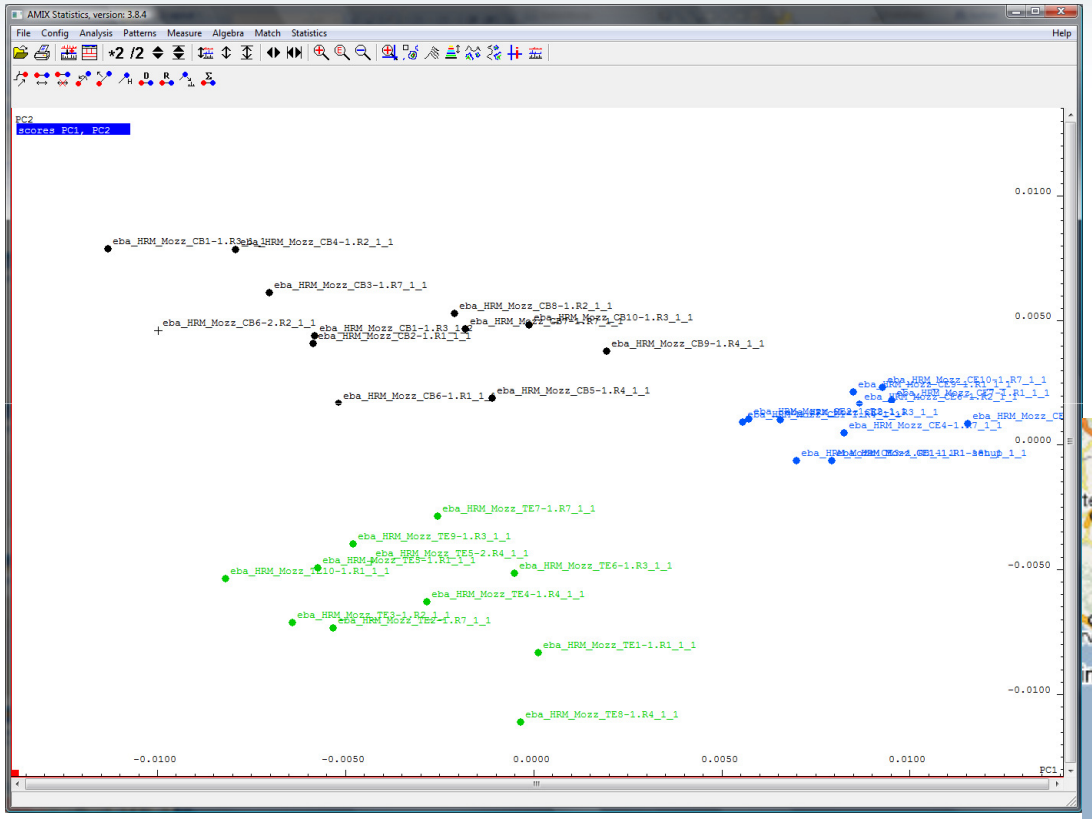
STUDIO SULLA STAGIONATURA DEL FORMAGGIO MEDIANTE HR-MAS



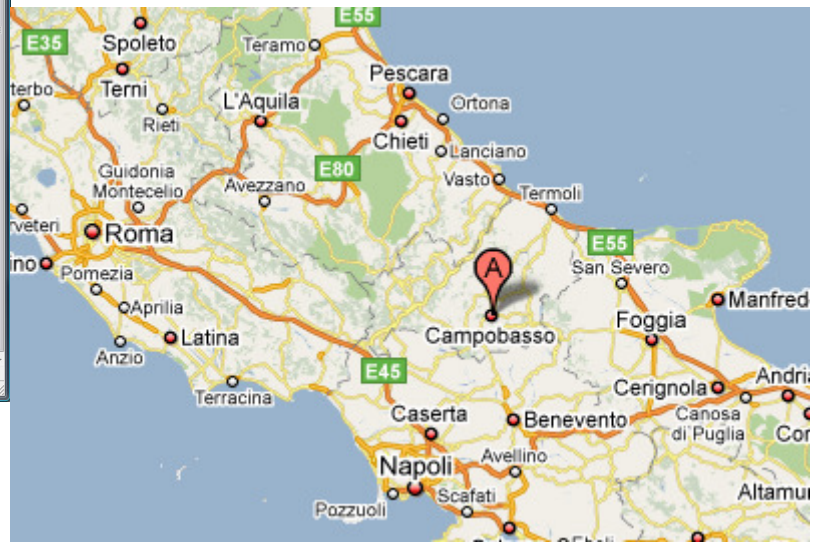
Età crescente

by Courtesy of Kasper Hettinga, Wageningen Universiteit

MOZZARELLA CON HR-MAS



- Campobasso
- Caserta
- Teramo



Collaborazione con il Dr.Scortichini, IZS Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Abruzzo e Molise, Teramo, Italia

CONCLUSIONI

L‘analisi NMR può dare luogo ad un insieme di risultati „targeted” e “untargeted” da un solo breve esperimento, offrendo così un grande numero di parametri analitici a basso costo per campione.

L’approccio utilizzato per lo screening dei succhi di frutta può essere utilizzato come metodo “modello” facilmente trasferibile ad altre matrici. Lo stesso workflow può essere facilmente applicato come metodo di controllo qualità ma anche utilizzato per applicazioni cliniche/mediche.

La soppressione multipla è di grande aiuto per la rivelazione di segnali di componenti minoritarie in presenza di segnali molto intensi.

La tecnica HR-MAS permette di studiare campioni difficilmente analizzabili con una configurazione per liquidi.