Metodologia NMR nell'analisi degli alimenti

Luisa Mannina

Sapienza Università di Roma, Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Facoltà di Farmacia e Medicina

luisa.mannina@uniroma1.it

Anatoly P. Sobolev, Noemi Proietti,

Donatella Capitani

CNR, Istituto di Metodologie Chimiche,Laboratorio Risonanza Magnetica "Annalaura Segre"

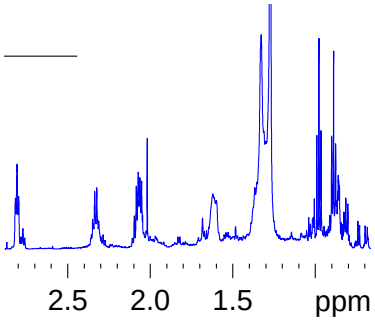
Bari,11 Novembre , 2013

Perché l'analisi NMR nello studio di alimenti?

- Fornisce una descrizione quantitativa di metaboliti specifici (analisi target)
- Fornisce una descrizione globale quantitativa dei metaboliti presenti negli alimenti (metabolomica).
- Permette di monitorare cambiamenti dovuti a fattori esterni (annata, tecniche di produzione, cambiamenti nelle materie (metabonomica).

Schema generale dell'analisi NMR nello studio di alimenti

Alimento → Estrazione o Analisi diretta → ^{1}H NMR spettro → Fingerprint



Assegnazione dei metaboliti → Analisi Quantitativa → Analisi Statistica → Resultati

Estrazione o analisi diretta

Il campione non richiede eccessive manipolazioni

Estrazione in acqua
Estrazione in solvente organico (metodo Bligh Dyer cloroformio/metanolo 1:2 v/v, acqua)

Approcci analitici NMR per l'analisi degli alimenti

Analisi Target: è un'analisi ristretta a specifici metaboliti. In questo caso a volte si effettua un'estrazione prima dell'analisi NMR per concentrare il campione del metabolita di interesse ed evitare possibili interferenze.

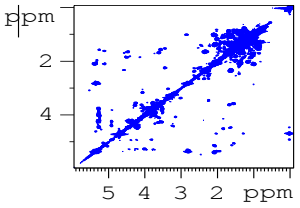
fingerprinting: lo spettro NMR pùò essere considerato come l'impronta digitale del prodotto. Si misurano i segnali ma non si effettua un'identificazione.

Metabolic profiling: è focalizzata su alcuni gruppi di metaboliti associati a specifici pathway.

Metabolomics: richiede un' analisi completa in cui tutti i metaboliti sono quantificati e identificati.

Metabonomics: misura le variazioni di un sistema soggetto a specifiche modificazioni

Assegnazione degli spettri



Estratti acquosi e organici

1D

^{1}H, ^{1}H with diffusion edited filter, ^{13}C

2D

COSY, TOCSY, ^{1}H-^{13}C HSQC e HMBC.

Diffusion Ordered SpectroscopY

^{31}P NMR:

$^{31}P\{^{1}H\}$, $^{1}H\{^{31}P\}$, ^{1}H-^{31}P HMBC.

Metaboliti negli estratti

Estratti acquosi	Estratti in solvente organico
Ammino acidi, Peptidi	Tri-, di-, mono-gliceridi,
Acidi organici	Fosfolipidi,
Zuccheri	Sfingosine
Alcoli	Steroli
Fenoli	Acidi grassi
Nucleosidi	Terpeni
	Aldeidi

Analisi statistica

Nel caso degli alimenti l'approccio statistico dipende fortemente dal problema specifico.

La complessità dello spettro NMR, che può mostrare "centinaia di segnali, può essere "risolta" applicando metodi chemometrici che riducono le dimensioni dei dati NMR e che permettono di:

-Descrivere i dati (tecniche unsupervised per vedere somiglianze o differenze, TCA, PCA…)

-Generare modelli per classificare campioni o predire la classificazioen di campioni sconosciuti (tecniche supervised LDA, SIMCA, PLS-DA, Neural networks)

Applicazioni

Applications 22
6.1. Alcoholic beverages and fermented products 22
6.1.1. Beer 22
6.1.2. Wine 23
6.1.3. Distillings and soy sauce 25
6.1.4. Vinegar 25
6.2. Coffee and tea 26
6.3. Fruits and vegetables 26
6.3.1. Fruit juices 27
6.3.2. Mandarin Oranges 27
6.3.3. Kiwifruit 27
6.3.4. Mango 28
6.3.5. Black raspberry 28
6.3.6. Melon 28
6.3.7. Watermelon 28
6.3.8. Tomato 28
6.3.9. Lettuce 28
6.3.10. *Brassica rapa* 29
6.3.11. Potato 29
6.3.12. Carrot 29
6.3.13. Maize 29
6.3.14. Wheat 29
6.4. Olive oils 30
6.5. Milk and dairy products 31
6.5.1. Milk 31
6.5.2. Cheese 31
6.5.3. Butter and margarine 32
6.6. Honey 32
6.7. Fish and meat 33
6.8. Others 34

Alcune applicazioni

Oli di oliva

Metabolic profiling

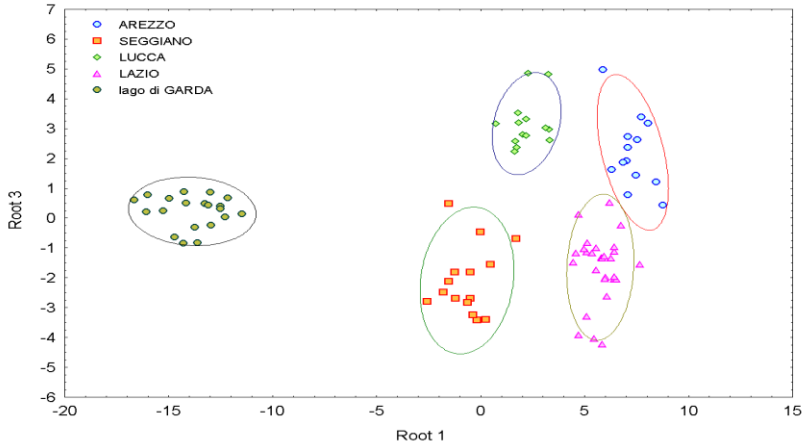
Qualità

Origine geografica

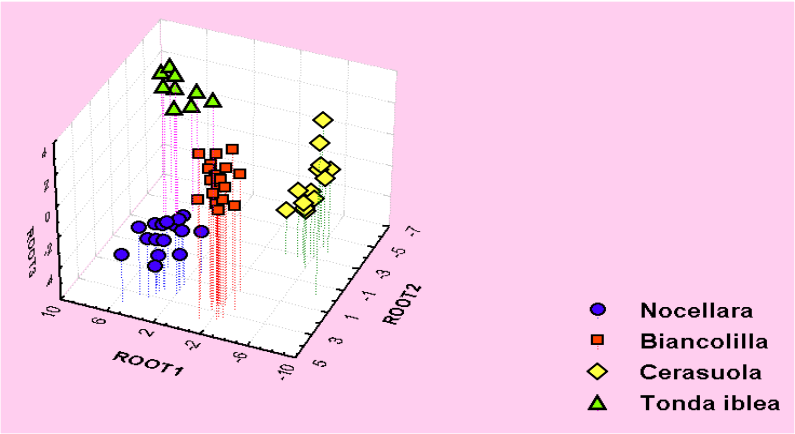
Cultivar

Frodi

Oli di oliva da differenti regioni geografiche

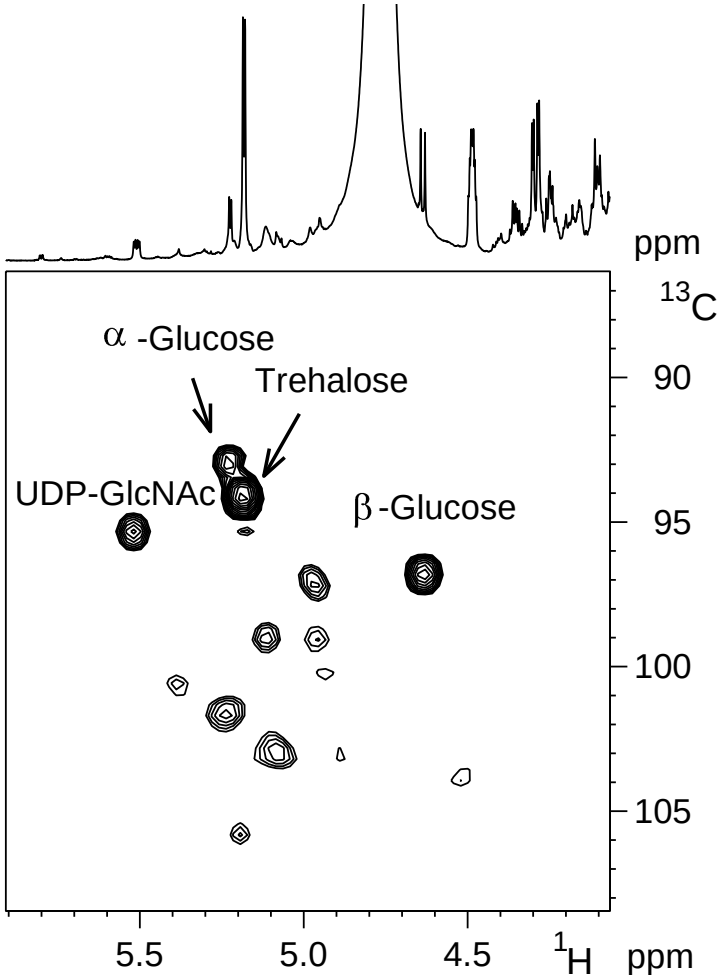


Oli di Oliva monovarietali provenienti dalla stessa area geografica



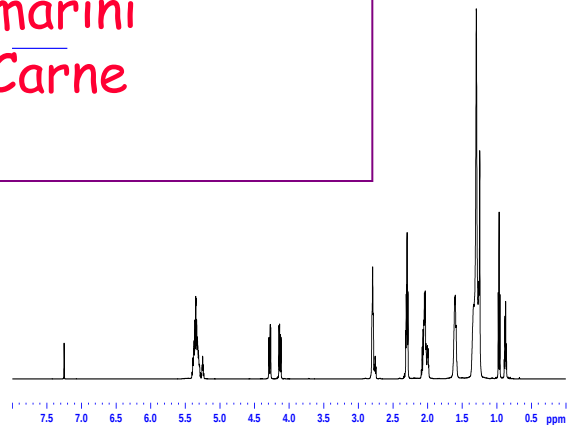
Tartufi

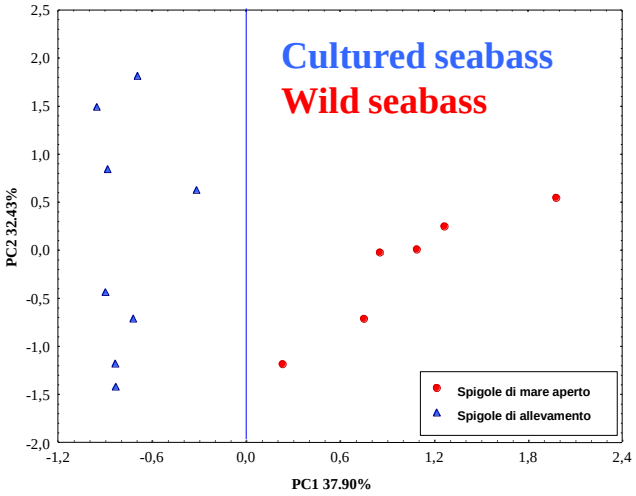
Studio dell'effetto di diversi trattamenti sulla the shelf-life



Pesce e prodotti marini
Carne

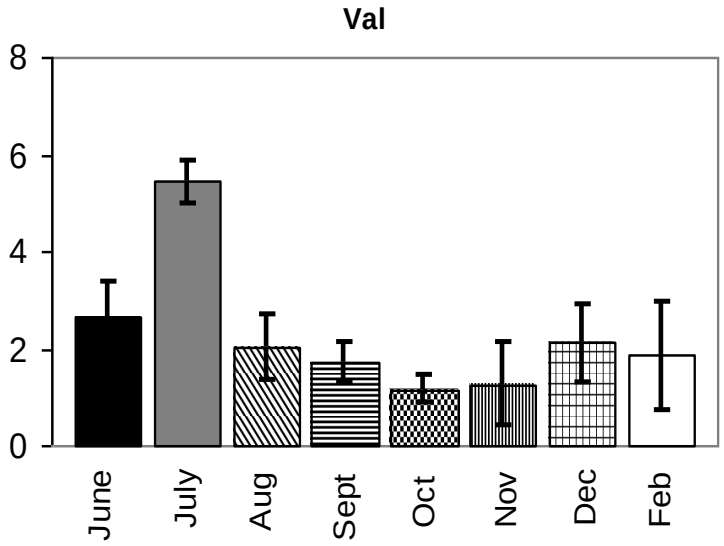
Comparazione tra diverse tipologie di allevamento e di mare aperto





Frutta

Variazione del Profilo dei metaboliti nel tempo.
Determinazione di possibili nutraceutici
Variazione del "profilo" dell'acqua nel tempo.



Pomodori
Lattuga, Mais

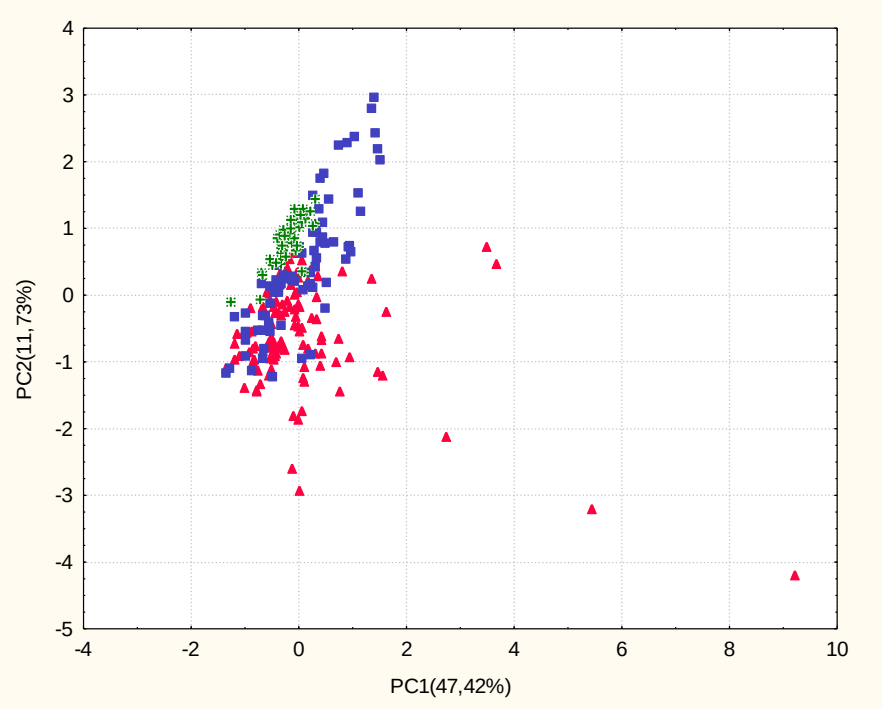
Studi riguardanti l'origine geografica, lo stato di maturazione, la specie e i prodotti geneticamente modificati

Miele

Identificazione di markers specifici
Conferma dell'origine geografica

Birre Trappiste

Monitoraggio dei processi di produzione;
Comparazione di birre diverse

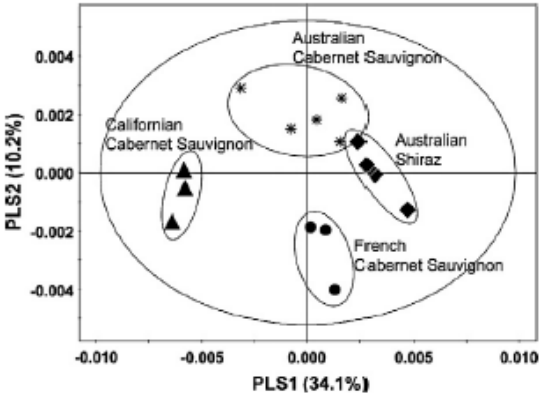


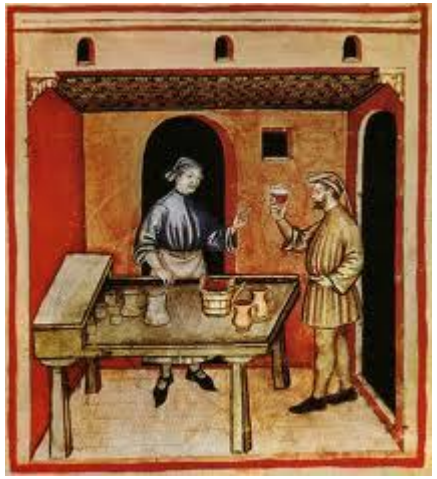
▲ No trappist ■ Trappist ✱ Rochefort 8

Rochefort o non-Rochefort…

vino e aceto

Monitoraggio dei processi di produzione; varietà, origine geografica





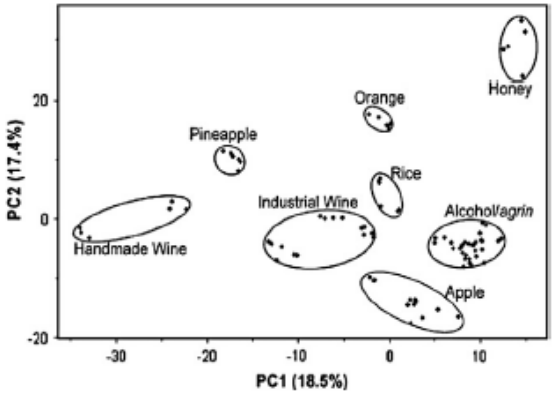


Fig. 18. PCA score plot of vinegars obtained from different raw materials. (Reproduced with permission from [150].)

Caffè e tè

Differenze tra le diverse tipologie di caffè e di tè

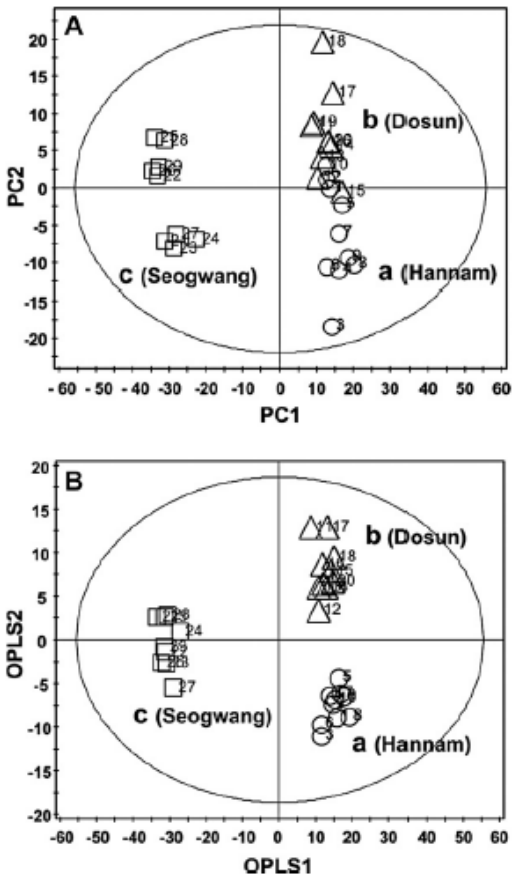


Fig. 19. PCA (A) and OPLS-DA (B) score plots derived from ^{1}H NMR spectra of green tea extracts from different growing areas of Jeju Island, South Korea. (Reproduced with permission from [153].)

Latte e formaggi

Differenze di stagionatura e di tipologia di formaggio

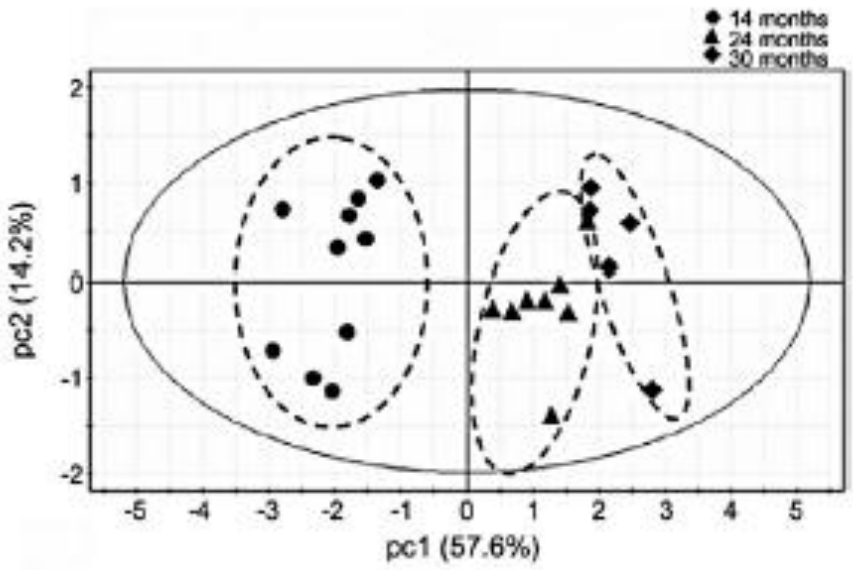


Fig. 25. O-PLS model obtained using ^{1}H NMR data from Italian Parmigiano Reggiano samples at 14 (●), 24 (▲) and 30 (♦) months of ripening. (Reproduced with permission from [201].)

Conclusioni

La metodologia NMR è uno strumento "potente" per identificare e quantificare un grande numero di composti negli alimenti.

Non richiedere necessariamente separazione e trattamento dei campioni

L'analisi statistica dei dati permette di classificare i campioni in accordo allo specifico problema (origine geografica, varietà, tecniche di produzione ecc)

Grazie e…

Ricordatebi il 19 Giugno IV workshop sulle Applicazioni della Risonanza Magnetica nelle Scienza degli Alimenti