



Elisabetta Brenna, Giovanni Fronza, Claudio Fuganti
Dipartimento di Chimica, Materiali ed Ingegneria Chimica
Politecnico di Milano
e CNR - Istituto di Chimica del Riconoscimento
Molecolare
elisabetta.brenna@polimi.it

LA RINTRACCIABILITÀ DEI COMPOSTI ORGANICI

Parte prima: metodi chimici

In campo agroalimentare, in campo farmaceutico e forense la (rin)tracciabilità è impiegata come criterio per raggiungere la sicurezza per i consumatori e per combattere frodi ed attività illecite. In questo lavoro vengono presentati i principali metodi chimici utili a ricostruire la storia sintetica di alimenti, farmaci e droghe.

Negli ultimi anni il concetto di "tracciabilità" ha assunto crescente importanza sia nel settore agroalimentare, sia in quello farmaceutico. La crisi legata al verificarsi di casi di BSE negli uomini, i problemi posti in questo periodo dall'influenza aviaria e l'allarmante diffondersi di farmaci contraffatti ci hanno imposto di prestare maggiore attenzione all'origine dei cibi e delle medicine che consumiamo.

Tracciabilità dei prodotti agroalimentari

Dal 1° gennaio 2005 è entrata in vigore la normativa europea che impone all'industria alimentare la rintracciabilità degli alimenti durante tutte le fasi della filiera produttiva. Il

regolamento europeo (EC) No. 178/2002 definisce *"rintracciabilità la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di un animale destinato alla produzione alimentare o di una sostanza destinata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione"*.

La rintracciabilità è, quindi, un sistema in grado di identificare i flussi materiali delle componenti di un prodotto, i soggetti che hanno preso parte alla sua produzione e le azioni legate ad essa. Deve permettere di individuare chi ha fornito le materie prime introdotte nel ciclo di lavorazione e chi ha ricevuto i prodotti usciti da tale ciclo. Le informazioni da raccogliere sull'alimento

devono riguardare anche il luogo geografico di produzione o, nel caso di animali, il paese di allevamento, il luogo in cui è stato lavorato e trasformato prima di giungere al consumatore finale, le caratteristiche del prodotto e il metodo seguito per la produzione. In tal modo vengono salvaguardate sia la sicurezza sia la qualità. In generale vengono impiegati i seguenti criteri:

- i) definizione del paese di origine/lavorazione/produzione;
- ii) etichettatura con codice a barre o con codici più leggibili da parte del consumatore;
- iii) messa in atto dei sistemi HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) che mirano a identificare ed analizzare i danni associati ai differenti stadi del processo produttivo di una derrata alimentare.

Tracciabilità dei prodotti farmaceutici e delle droghe di abuso

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stabilisce che *la contraffazione dei prodotti medicinali consiste nell'etichettare un prodotto medicinale finito (o un ingrediente per la preparazione di un prodotto medicinale finito) in modo erraneo al riguardo della sua identità, composizione e/o origine, deliberatamente e fraudolentemente* [1]. Vengono riconosciuti i seguenti tipi di farmaci contraffatti [2]:

- i) farmaci che non contengono il principio attivo dichiarato in etichetta (circa il 43%);
- ii) farmaci che contengono un principio attivo diverso da quello dichiarato in etichetta, di solito meno efficace e meno costoso (7%);
- iii) farmaci che contengono il principio attivo dichiarato in etichetta, ma proveniente da un produttore diverso, o in dose inferiore a quella dichiarata (50%).

Secondo stime dell'OMS [3], il 7% dei farmaci venduti nel mondo è contraffatto, con punte del 30% in Brasile e del 70% in alcuni paesi africani. Il 70% dei casi di contraffazione riguarda i Paesi in via di sviluppo, a causa della scarsità di regolamentazione e controllo sull'importazione, produzione, e commercializzazione dei farmaci.

Anche in campo farmaceutico diventa di primaria importanza riuscire a ricostruire la storia di un farmaco, per poter risalire con certezza al produttore ed avere garanzie sull'effettiva composizione e sulla qualità del principio attivo. Per quanto riguarda i farmaci, tutti quelli prodotti e venduti in Europa sono sottoposti a norme severe che ne regolano la composizione, i procedimenti di fabbricazione e la qualità. Sotto l'egida del Consiglio d'Europa, la "Direzione europea per la qualità dei medicinali" (European Directorate for the Quality of Medicines - EDQM) svolge oggi questa

azione di controllo. Tale istituzione, creata nel 1995, ha completato il processo di armonizzazione delle farmacopee dei paesi europei, ha istituito una rete europea di laboratori di controllo dei farmaci, e controlla la qualità del farmaco dall'elaborazione alla commercializzazione.

Per quanto riguarda le droghe illecite, la possibilità di rintracciarne l'origine è di aiuto nello svolgimento delle indagini volte ad individuare i laboratori clandestini. Risulta, infatti, di enorme importanza stabilire se partite di droga confiscate in luoghi diversi provengano o meno dallo stesso produttore. L'analisi dell'aspetto esteriore, ad esempio della forma delle pastiglie in caso di droghe tipo Ecstasy, e l'analisi degli eccipienti possono solo dare delle indicazioni, ma non delle risposte certe, a riguardo della provenienza comune o meno.

Metodi chimici per la tracciabilità dei composti organici

In campo agroalimentare, in campo farmaceutico e forense la tracciabilità è impiegata come criterio per raggiungere la sicurezza per i consumatori e per combattere frodi ed attività illecite. Finora la tutela dei pro-

dotti è stata legata, essenzialmente, ad una tracciabilità di tipo "cartaceo" ma, per individuare imitazioni o frodi, si ha necessità di definire una tracciabilità "oggettiva" basata su criteri che fanno riferimento a misure scientifiche. Occorre mettere a punto dei metodi chimici sicuri per verificare la storia di un prodotto e sviluppare nuove figure professionali esperte nella certificazione "scientifica" dell'origine di un farmaco o di un alimento. Tale certificazione deve andare oltre i codici a barre e i foglietti illustrativi, e deve servirsi di "markers molecolari" che rechino dettagli sull'origine del composto in esame.

I metodi che sono attualmente presi in considerazione sono l'analisi del DNA e la determinazione dei rapporti isotopici per i composti che vengono da organismi viventi. Per i prodotti di sintesi, oltre alla determinazione dei rapporti isotopici, si può ricorrere alla cosiddetta analisi delle impurezze ("impurity profile").

A) Analisi del DNA

Negli ultimi anni le tecniche basate sull'analisi del DNA sono diventate sempre più importanti per la determinazione dell'autenticità dei cibi. Esse funzionano bene sia



Standard di riferimento internazionali

Elemento	δ	Rapporto misurato (R)	Standard Internazionali	R, Standard internazionali
Idrogeno	δD	$^2H/^1H$ $^2H/^1H$	Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW) Standard Light Antarctic Precipitation (SLAP)	0,00015575 0,000089089
Carbonio	$\delta^{13}C$	$^{13}C/^{12}C$	Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB)	0,0112372
Azoto	$\delta^{15}N$	$^{15}N/^{14}N$	Air	0,003676
Ossigeno	$\delta^{18}O$	$^{18}O/^{16}O$ $^{18}O/^{16}O$ $^{18}O/^{16}O$	Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW) Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) Standard Light Antarctic Precipitation (SLAP)	0,0020052 0,0020672 0,0018939
Zolfo	$\delta^{34}S$	$^{34}S/^{32}S$	Canyon Diablo Troilite (CDT)	0,045005

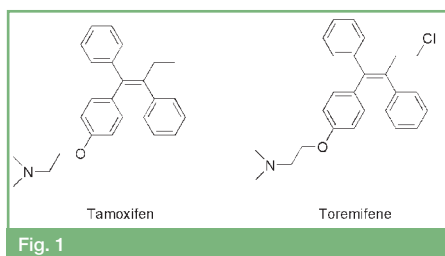


Fig. 1

sui cibi crudi, sia su quelli sottoposti a sterilizzazione/cottura o ad elaborate lavorazioni, poiché il DNA è più resistente di altri markers alla distruzione causata dalla lavorazione dei cibi. Possiedono un'elevata capacità di discriminazione, poiché la definizione di una varietà o di una specie dipende dalla sequenza del DNA nel suo genoma.

Al momento i metodi di analisi basati sul DNA fanno uso della PCR (Polymer Chain Reaction). Ci sono implicazioni tecniche importanti che suggeriscono l'uso della PCR per amplificare il DNA derivato dai cibi [4]. La tecnica è stata impiegata con successo per identificare i tipi di carne e di pesce presenti in un alimento [5], per distinguere il riso Basmati di alta qualità da altre varietà di riso meno pregiate a "chicco lungo" [6], per la tracciabilità dell'olio di oliva [7], per individuare la presenza di OGM nei cibi [8]. Recentemente è stata applicata anche

per individuare l'adulterazione del caffè premium Arabica con altre varietà meno pregiate [9].

B) Determinazione dei rapporti isotopici

La distribuzione degli isotopi stabili degli atomi che costituiscono una molecola non è statistica, ma dipende dal modo in cui la molecola si è formata. Gli stadi sintetici possono discriminare gli isotopi leggeri o pesanti di un certo elemento: la composizione isotopica (espressa dai valori di $^2H/^1H$, $^{13}C/^{12}C$, $^{18}O/^{16}O$, $^{15}N/^{14}N$) risulta influenzata dalle trasformazioni subite dalla molecola stessa e ne conserva fedele memoria.

Due sono le tecniche possibili per determinare i rapporti isotopici:

i) Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS);

ii) SNIF NMR Site-specific Natural Fractionation misurata mediante risonanza magnetica nucleare.

Nella prima tecnica il campione viene trasformato, secondo la procedura dell'analisi elementare organica, in H_2 , N_2 , SO_2 , CO e CO_2 . Tale miscela viene analizzata mediante uno

spettrometro di massa ad alta risoluzione. Il rapporto isotopico dell'elemento X (δX) nel campione è espresso come differenza in parti per mille rispetto al valore assunto in uno standard di riferimento fissato dall'International Atomic Energy Authority (IAEA, Vienna): $\delta X (\text{‰}) = [(R_{\text{campione}} - R_{\text{standard}}) \cdot 1000]$.

Nel caso del carbonio, ad esempio, R è il rapporto $^{13}C/^{12}C$ e lo zero di riferimento è il valore assunto da R nel Pee Dee Belemnite, un carbonato di calcio proveniente da un rostro di belemnite del periodo Cretaceo della formazione "Pee-Dee" dello Stato della Carolina del Sud (USA). Il suo rapporto isotopico assoluto $R = ^{13}C/^{12}C$ è pari a 0,0112372.

I materiali che hanno rapporti $^{13}C/^{12}C > 0,00112372$ hanno valori positivi di δ , e quelli con rapporti $^{13}C/^{12}C < 0,00112372$

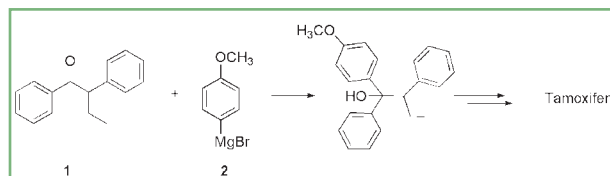


Fig. 2

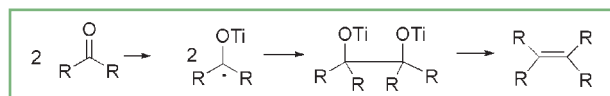


Fig. 3

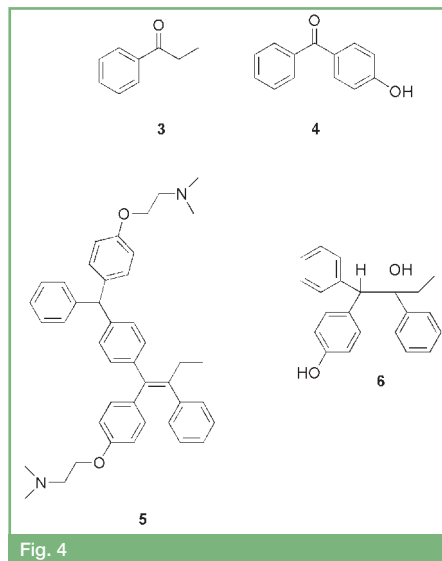


Fig. 4

hanno valori di δ negativi. La Tabella mostra i valori degli standard internazionali di riferimento e i loro valori di rapporto isotopico assoluto. Alcuni elementi, come l'ossigeno e l'idrogeno, hanno più di un standard di riferimento.

La tecnica dello SNIF-NMR consente di determinare simultaneamente il contenuto di deuterio per ogni posizione della molecola, purché lo spettro ^2H NMR presenti segnali ben separati. Nel 1990 la Comunità Europea ha adottato ufficialmente il metodo SNIF-NMR (EC2676/90) per individuare l'adulterazione del vino operata per aggiunta di zucchero.

Le aree dei segnali NMR, misurate in opportune condizioni sperimentali, sono proporzionali al numero dei nuclei responsabili dei segnali di risonanza stessi. La frazione molare degli isotopomeri monodeuterati può essere calcolata direttamente dallo spettro NMR del deuterio.

In assenza di uno standard isotopico, lo spettro NMR del deuterio consente già di

calcolare la distribuzione relativa di deuterio nei diversi siti della molecola.

In presenza di una sostanza di riferimento, il cui rapporto isotopico sia stato precedentemente calcolato, è possibile determinare i valori $(\text{D}/\text{H})_i$ in corrispondenza della posizione i -esima della molecola. Lo standard impiegato comunemente è la tetrametilurea, il cui valore di D/H viene calcolato mediante IRMS rispetto alla scala SMOW. I valori posizionali di D/H sono espressi in ppm.

Nella seconda parte del lavoro verrà illustrato come la tecnica della determinazione dei rapporti isotopici sia stata di aiuto nel risalire all'origine di alimenti, farmaci e droghe.

C) Determinazioni delle impurezze

Le impurezze presenti nei farmaci sono regolate per legge [10]: quelle presenti sopra una certa soglia, che è fissata in base alla dose giornaliera del farmaco, devono essere identificate. Indicativamente: dose giornaliera ≤ 2 g/di 0,1% soglia per l'identificazione; dose giornaliera ≥ 2 g/di soglia per l'identificazione 0,05%. Il cosiddetto "impurity profile", cioè la descrizione delle impurezze identificate e non identificate presenti in un farmaco, può offrire anche indizi importanti sulla via sintetica seguita per ottenere il farmaco stesso, poiché la struttura di alcuni sottoprodotti può essere correlata al metodo di sintesi. L'analisi delle impurezze sta diventando ormai una procedura consolidata per deli-

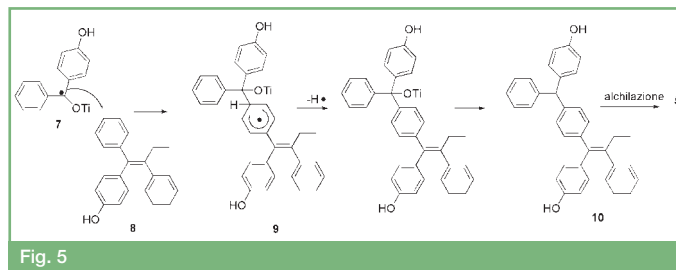


Fig. 5

neare l'impronta digitale del farmaco e fissare i dettagli della sua storia sintetica.

A questo proposito ci siamo occupati in passato di identificare le impurezze contenute in campioni commerciali di Tamoxifen [11] e Toremifene [12] (Fig. 1).

Il Tamoxifen è il farmaco antiestrogeno più impiegato nella terapia ormonale del tumore al seno. La via di sintesi convenzionale comporta la reazione del derivato 1 con il Grignard 2, seguita da disidratazione, idrolisi del metil etere ed alchilazione (Fig. 2). Una via di sintesi alternativa coinvolge l'accoppiamento di Mc Murry per generare lo scheletro triaril sostituito. Il meccanismo della reazione è riportato in Fig. 3: si ha un iniziale accoppiamento di due specie radicaliche a dare un composto 1,2 diossigenato ("titanium pinacolate"), che subisce deossigenazione nelle

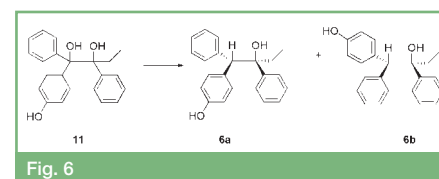


Fig. 6

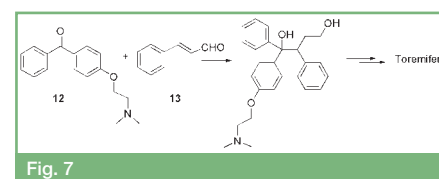


Fig. 7

Traceability of Organic Products. Part 1: Chemical Methods

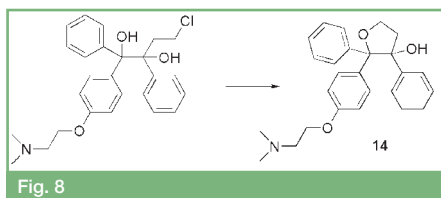
In the field of food and drug industry and in forensic science, traceability is an essential tool to ensure the use of safe products and to fight counterfeiting and illicit business. In this work the main chemical methods to establish the synthetic origin of food, and drugs are reviewed.

ABSTRACT

condizioni di reazione.

In due diversi prodotti commerciali, preparati per accoppiamento di

Mc Murry del propiofenone (3) con il 4-idrossibenzofenone (4), abbiamo isolato ed identificato due diverse impurezze, 5 e 6, strettamente correlate al metodo di sintesi (Fig. 4). Un'ipotesi circa la formazione dell'impurezza 5 è riportata in Fig. 5: il radicale 7, che è considerato un possibile intermedio dell'accoppiamento di Mc Murry,



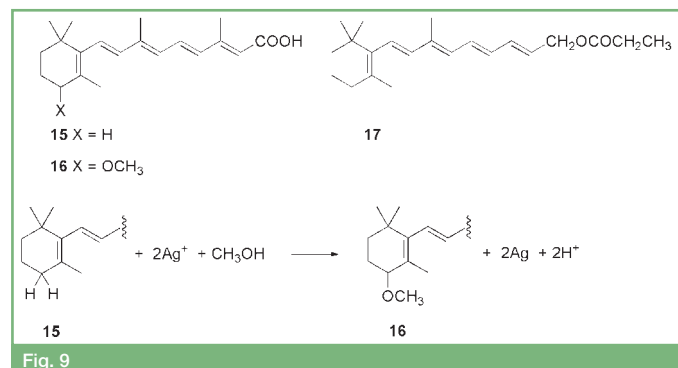
può dare addizione su uno degli anelli aromatici del composto 8, precursore del Tamoxifen.

L'intermedio 9, dopo perdita di un radicale H, può subire deossigenazione nelle condizioni di reazione a dare 10.

L'impurezza 6 è una miscela di due diastereoisomeri, 6a e 6b. La sua formazione è attribuita alla parziale riduzione con zinco del pinacolo intermedio 11 (Fig. 6).

Le due impurezze 5 e 6 non potrebbero formarsi nella via di sintesi convenzionale riportata in Fig. 2. La loro struttura rivela il coinvolgimento di un accoppiamento di Mc Murry come stadio chiave della sintesi.

Il Toremifene è un analogo del Tamoxifen, preparato per reazione del derivato 12 con la cinnamaldeide 13 (Fig. 7), seguita da disidratazione e clorurazione dell'OH primario. Una via di sintesi alternativa passa attraverso un accoppiamento di Mc Murry. Nel campione di Toremifene che avevamo a



disposizione abbiamo isolato l'impurezza 14, anch'essa strettamente correlata ai metodi di sintesi, come evidenziato in Fig. 8, dato che si ottiene per chiusura intramolecolare del pinacolo, intermedio dell'accoppiamento di Mc Murry. Anche in questo caso la presenza dell'impurezza consente di discriminare le due vie di sintesi.

Ci siamo anche occupati di isolare e caratterizzare in un campione di Tretinoin (15) l'impurezza 16 [13]. Ancora una volta la struttura dell'impurezza porta informazioni sulla via sintetica (Fig. 9). Stadio chiave della sintesi è la reazione della vitamina A propionato (17) con Ag_2O in metanolo in presenza di KOH. L'impurezza 16 si può formare in seguito alla ossidazione della posizione allica 4 ad opera dell' $\text{Ag}(\text{I})$ in presenza di metanolo.



Bibliografia

- [1] FIP Statement of Policy on Counterfeit Medicines, *Int. Pharmacy J.*, 2003, **17**(2), 11.
- [2] World Health Assembly, Counterfeit drugs: Threat to Public Health, vol. 55, World Health Assembly, Geneva 2002.
- [3] The Pharmaceutical Security Institute, 1999 PSI General Assembly meeting at Worldwide Headquarters of Merck & Co, INC.
- [4] M. Woolfe, S. Primrose, *TRENDS in Biotech.*, 2004, **22**, 222.
- [5] R. Meyer *et al.*, *J. AOAC Int.*, 1994, **77**, 617; D.J. Hunt *et al.*, *Food Chem.*, 1997, **60**, 437; T. Matsunaga *et al.*, *Meat Sci.*, 1999, **51**, 143; V.J. Russell *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 2184; G.L. Hold *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 1175.
- [6] H.F.J. Bligh, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2000, **35**, 257.
- [7] S. Pafundo *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 6995.
- [8] C. Peano *et al.*, *Anal. Biochem.*, 2005, **344**, 174.
- [9] C. Martellosi *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 8432.
- [10] J. Roy, *PharmSciTech*, 2002, **3**(2), article 6 (www.aapspharmscitech.org)
- [11] S. Armellin *et al.*, *Pharm. Ind.*, 2004, **66**, 224.
- [12] E. Brenna *et al.*, *Pharm. Ind.*, 2005, **67**, 1214.
- [13] G. Allegrone *et al.*, *Biorg. & Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 3528.