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 (RIN)TRACCIABILITÀ DEI COMPOSTI ORGANICI

Parte seconda: determinazione dei rapporti isotopici

La determinazione dei rapporti isotopici ha trovato largo impiego nell'analisi di aromi naturali e natural-identici, nella caratterizzazione dell'origine di alimenti, farmaci e droghe di abuso.
In questa seconda parte viene mostrato come la tecnica della determinazione dei rapporti isotopici, illustrata nella parte prima, sia stata di aiuto nel risalire all'origine di alimenti, farmaci e droghe.

Aromi naturali e natural-identici

Nell'industria alimentare riveste notevole importanza la possibilità di discriminare gli aromi naturali, cioè di origine estrattiva o preparati da precursori naturali attraverso metodi biocatalitici, da aromi aventi la stessa costituzione molecolare, ma preparati per sintesi, cioè i cosiddetti *"aromi natural-identici"*. È possibile distinguere campioni dello stesso aroma di origine naturale o sintetica mediante la spettroscopia di risonanza magnetica del deuterio. In passato ci siamo occupati di determinare mediante tale tecnica l'origine di alcuni aromi di importanza alimentare, quali etanolo [1], *cis*-3-esenolo [2], raspberry ketone [3], acido fenilacetico [4] e resveratrolo [5] (Fig. 1). Abbiamo verificato la possibilità di distinguere i campioni di origine estrattiva naturale, da quelli naturali preparati per vie enzimatiche, e da quelli natural-identici fatti per sintesi chimica. In Fig. 2, ad esempio, sono riportati i valori delle frazioni molari delle posizioni 1 e 3 del *cis*-3-esenolo (cioè i valori di (D/H) delle posizioni 1 e 3 rapportati alla somma dei D/H di tutte le posizioni della molecola). La Fig. 2 mette in evidenza la possibilità di discriminare campioni di *cis*-3-esenolo di varie origini.

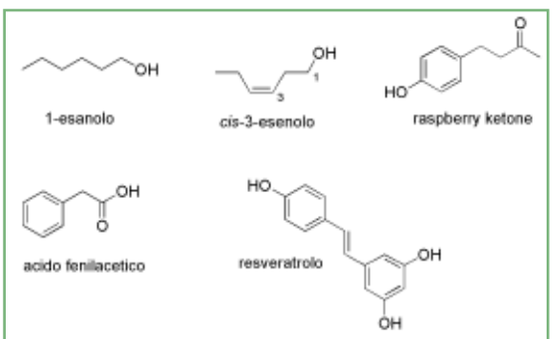


Fig. 1

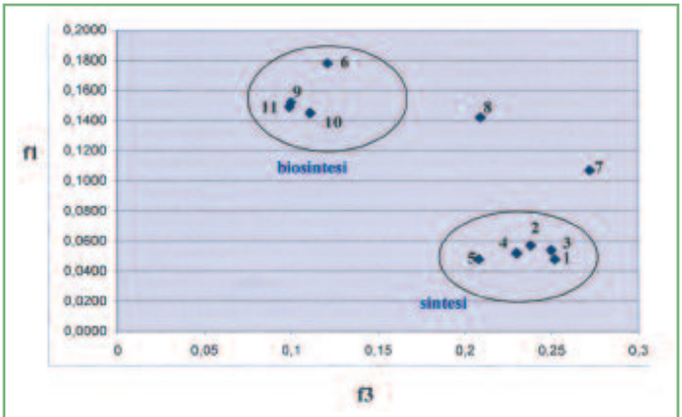


Fig. 2 - Rappresentazione grafica delle frazioni molari f1 vs f3 per i seguenti campioni di cis-3-esenolo: i) naturali biosintetici 6,9,10,11; ii) sintetici commerciali 1,2,3,4; iii) naturale estrattivo 7; (iv) naturale estrattivo/biosintetico 8

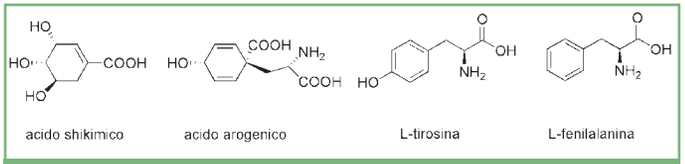


Fig. 4

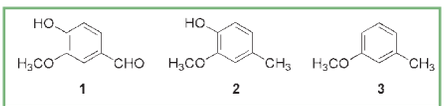


Fig. 3

I valori posizionali $\delta(^{18}O)$ di vari campioni di vanillina (**1**), determinati dai valori globali del 2-metossi-4-metilfenolo (2) (ottenuto dalla vanillina per riduzione di Clemensen) e del 3-metilanisolo (3) (ottenuto da 2 per rimozione dell'ossigeno fenolico) (Fig. 3) offrono la possibilità di distinguere la vanillina naturale, da quella preparata dalla lignina per ossidazione chimica, da quella di origine sintetica [6].

Determinazione dell'origine degli alimenti

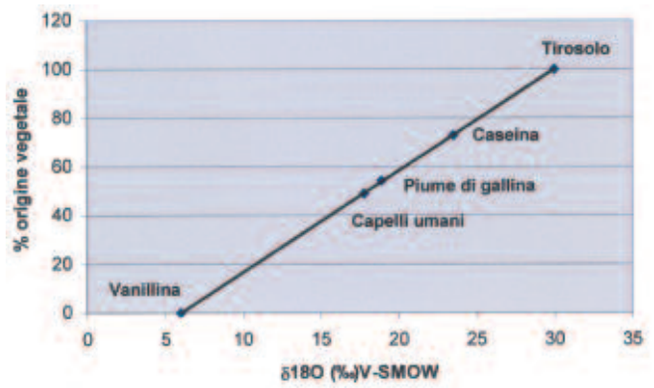
Il pattern isotopico di alcuni componenti presenti negli alimenti permette di avere informazioni sull'origine geografica degli alimenti stessi. L'idrogeno che costituisce le sostanze organiche di origine naturale è fornito dall'acqua, mentre l'ossigeno è messo a disposizione da tre fonti primarie: acqua, ossigeno ed anidride carbonica. La fonte di carbonio è l'anidride carbonica. Il rapporto $^{18}O/^{16}O$ ed anche $^{2}H/^{1}H$ degli ecosistemi terrestri dipendono largamente dalla latitudine, dalla distanza dal mare, dall'altitudine, dall'entità delle precipitazioni, dagli effetti stagionali. Il rapporto $^{13}C/^{12}C$ dipende dai meccanismi fotosintetici, con le piante C3* più impoverite di ^{13}C rispetto alle piante C4. Questa informazione viene trasmessa attraverso la catena alimentare e consente di esaminare il contributo delle piante C3 o C4 nella dieta, nonché l'origine dei prodotti alimentari. Il rapporto $^{15}N/^{14}N$ dei prodotti derivanti dagli animali dipende dall'abbondanza di ^{15}N nel foraggio, che a sua volta dipende da quella dei fertilizzanti e dell'azoto del suolo.

La composizione isotopica dell'ossigeno ($^{18}O/^{16}O$) consente di stabilire l'origine e l'autenticità di succhi di frutta, vini, carne, latte, latticini [7]. Interessanti sono anche i risultati che si possono ottenere studiando i valori medi del contenuto isotopico di carbonio e ossigeno ($\delta^{13}C$ e $\delta^{18}O$) di campioni di glicerolo di diversa provenienza [8]. Il glicerolo è il componente diffuso in tutti i grassi alimentari ed è stato verificato che la sua composizione isotopica è sensibile all'origine della matrice da cui proviene.

Abbiamo determinato mediante IRMS i valori $\delta^{13}C$ e $\delta^{18}O$ di campioni di glicerolo ottenuti dalla saponificazione di grassi animali (burro, lardo, olio di pesce, grasso bovino) e vegetali (olio di oliva, olio di soia, olio di sesamo, olio di girasole, olio di mandorla, olio di lino, olio di cotone, olio di ricino, granoturco), campioni di glicerolo ottenuti per fermentazione da granoturco, canna da zucchero e vino, campioni di glicerolo commerciale. Il contenuto totale di ^{13}C consente di distinguere il glicerolo ottenuto da piante C4, quali il mais, (media $\delta^{13}C$=-14,4‰), da quello ottenuto da piante C3, quali frumento olivo, arachidi e girasole (media $\delta^{13}C$=-30,7‰). I valori di $\delta^{13}C$ del glicerolo di origine animale sembrano dipendere dalla dieta dell'animale. Quattro campioni di burro italiano hanno mostrato valori di $\delta^{13}C$ compresi tra -23,5 e -22,9‰, mentre un campione di burro irlandese ha fornito $\delta^{13}C$=-32,7‰. Questi dati suggeriscono che il burro italiano viene da latte di mucche alimentate con piante C4 (mais) e C3 (foraggio, soia, frumento), mentre il burro irlandese viene da animali allevati con solo foraggio fresco (piante C3). Anche i valori medi –29,6, -29,0, e -25,1‰ osservati per i campioni di glicerolo da Parmigiano-Reggiano, Trentingrana, Grana Padano riflettono una diversità nell'alimentazione delle bestie dal cui latte sono preparati questi formaggi.

Interessanti sono anche i valori di $d^{18}O$ del glicerolo. Il glicerolo ottenuto dal parmigiano è meno ricco in ^{18}O ($\delta^{18}O$=11,4-12-6‰) di quello proveniente dal grana padano ($\delta^{18}O$=15,5‰): la combinazione dei valori di $\delta^{13}C$ e $\delta^{18}O$ può fornire uno strumento

** Le piante sono classificate come C3 e C4 a seconda della via seguita per la sintesi dello zucchero. Lo zucchero delle piante C3, come la vite e la barbabietola, ha un contenuto di ^{13}C inferiore a quello delle piante C4 come la canna da zucchero e il mais. Questa differenza si conserva nel contenuto di ^{13}C dei prodotti di fermentazione degli zuccheri come l'etanolo e la CO_2.*



La retta tiene conto del valore di $\delta^{18}O$ del tirosolo (derivato della tirosina, di origine vegetale 100%, OH derivante dall'acido arogenico) e del valore di $\delta^{18}O$ della vanillina (OH introdotto per ossidrilazione con ossigeno)

Fig. 5 - Correlazione dei valori di $\delta^{18}O$ dell'ossigeno fenolico dei campioni di tirosina naturale (da caseina, da capelli umani, da piume di gallina) alla loro origine da biosintesi animale e vegetale

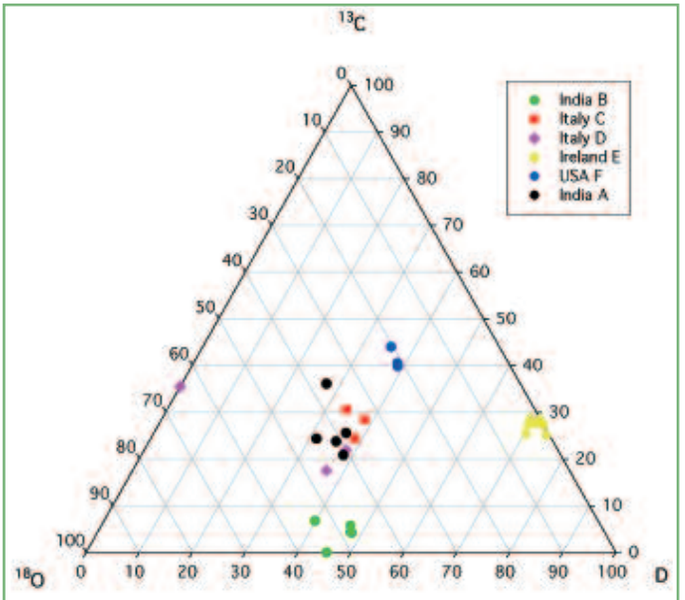


Fig. 6

per la definizione dell'"origine" di questi tipi di formaggi.

Negli anni del verificarsi dei casi umani della BSE abbiamo indagato la possibilità di discriminare proteine di origine animale o vegetale e di verificare l'aggiunta illegale di materiale di origine animale al foraggio del bestiame. La biosintesi della *L*-tirosina nelle piante avviene attraverso la via dell'acido shikimico dall'acido arogenico, con conservazione dell'ossigeno presente in posizione 4 dell'anello dell'acido arogenico come ossigeno fenolico (Fig. 4). Negli animali la tirosina viene prodotta per ossidrilazione ad opera dell'ossigeno della *L*-fenilalanina assunta con la dieta. Abbiamo trovato che il valore $\delta^{18}O$ del gruppo OH della tirosina consente di stabilirne l'origine animale/vegetale o intermedia [9]. I $\delta^{18}O$ dell'ossigeno fenolico della tirosina suggeriscono che la *L*-tirosina di origine animale è una miscela di due materiali di diversa origine, aventi un'impronta digitale ben distinta nei valori di $\delta^{18}O$. Una parte di tirosina è di origine vegetale, assunta con la dieta e portante in posizione para l'ossidrile originariamente presente nella posizione 4 dell'acido arogenico. Un'altra porzione di tirosina è sintetizzata dall'animale per ossidrilazione della fenilalanina. Quindi l'analisi del $\delta^{18}O$ dell'ossidrile della tirosina dà informazioni sulla dieta dell'animale. Assumendo come riferimento per il 100% di derivazione dall'acido arogenico il valore di $\delta^{18}O$ del tirosolo (derivato della tirosina), e per il 100% di derivazione da ossidrilazione ad opera dell'ossigeno il valore di $\delta^{18}O$ della vanillina, è possibile calcolare dai valori sperimentali di $\delta^{18}O$ della tirosina ottenuta da caseina, da piume di gallina e da capelli umani un contributo percentuale di tirosina di origine vegetale pari, rispettivamente, al 73%, 54% e 49%. Questi dati, che riportati in un diagramma mostrano un andamento lineare (Fig. 5), sono in accordo con la provenienza dei campioni in questione da organismi erbivori o onnivori. Abbiamo anche studiato mediante SNIF NMR la distribuzione di deuterio in vari campioni di tirosina e fenilalanina e abbiamo riscontrato che l'arricchimento in deuterio nelle posizioni CH_2 e CH è invertito nei due amminoacidi [10]. Il motivo di ciò sta forse nel fatto che i campioni di fenilalanina analizzati provengono da processi di fermentazione biotecnologici.

Caratterizzazione isotopica di farmaci

La composizione isotopica dei principi attivi farmaceutici e dei prodotti farmaceutici finiti dipende da due variabili:

i) la composizione farmaceutica dei materiali di partenza ("frazionamento termodinamico");

ii) il frazionamento isotopico che spesso si ha durante la sintesi ("frazionamento cinetico").

I prodotti farmaceutici possono essere caratterizzati mediante la determinazione dei rapporti isotopici, di solito $^{13}C/^{12}C$, $^{15}N/^{14}N$, $^{18}O/^{16}O$ e D/H, con la tecnica IRMS. È stato verificato che la composizione isotopica osservata è dipendente sia dalla composizione isotopica dei reagenti usati, sia dal frazionamento isotopico del processo di sintesi impiegato. Una variazione di una di queste due variabili dà luogo ad un prodotto che ha un diverso

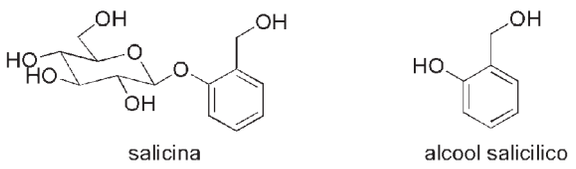


Fig. 7

profilo isotopico. Recentemente è stato dimostrato che quando la fonte dei reagenti di partenza e il processo sintetico vengono mantenuti pressoché costanti durante la preparazione di una sostanza farmaceutica, si possono osservare valori simili dei rapporti isotopici [11]. Ad esempio, sono stati determinati i rapporti isotopici ($^{13}C/^{12}C$, $^{18}O/^{16}O$, and D/H) di 26 lotti di naproxen, preparati da sei produttori diversi (Italia, India, Irlanda, USA) [12]. I grafici bivariati e trivariati dei rapporti isotopici ($\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, e $\delta^{18}O$) dei campioni di naproxen, ottenuti da differenti produttori mostrano una concentrazione dei dati in aree ben definite ("cluster"): cluster diversi individuano produttori diversi. In Fig. 6 è riportato, a titolo di esempio, un diagramma ternario ottenuto dall'elaborazione dei dati riportati in [21]. Tale lavoro indica che l'IRMS è un metodo plausibile per rintracciare i produttori di principi attivi farmaceutici. La stessa verifica è stata fatta anche per paracetamolo e acido acetilsalicilico [13], nonché per l'antiepilettico Topiramate [14].

La salicina è il glucoside responsabile delle proprietà antipiretiche ed analgesiche degli estratti della corteccia e delle foglie delle piante del genere *Salix* (Fig. 7). Sta avendo nuova diffusione come rimedio contro gli attacchi di cuore. Abbiamo verificato la possibilità di distinguere la salicina naturale da quella sintetica [15], studiando la distribuzione di deuterio sull'anello aromatico del diacetato dell'alcool salicilico, ottenuto per idrolisi con β-glucosidasi della salicina di partenza.

Caratterizzazione isotopica di droghe di abuso

La variazione dell'abbondanza isotopica del carbonio e dell'azoto dovuta ad effetti ambientali è stata impiegata per classificare l'eroina e la cocaina [16-18] a seconda dell'origine geografica.

La determinazione simultanea dei rapporti D/H in corrispondenza delle varie posizioni di una molecola mediante SNIF-NMR aumenta enormemente la capacità di discriminazione dei rapporti isotopici. La 3,4-metilendiossiamfetammina (MDA) (Fig. 8) e molti suoi derivati N-sostituiti sono diventate droghe di abuso, vendute in pastiglie con il nome di "ecstasy". I valori di $\delta^{2}H$, $\delta^{13}C$ e di $\delta^{15}N$ ottenuti mediante GC/IRMS sono stati impiegati per correlare lotti confiscati in tempi e luoghi diversi ad una possibile origine comune [19, 20]. Nel 2004 abbiamo effettuato uno studio [21] mediante ^{2}H NMR su nove campioni di N-acetil-3,4-metilendiossianfetammina (N-acetilMDA) preparati secondo le più comuni vie sintetiche, così da verificare la possibilità di ricostruire la storia sintetica di un

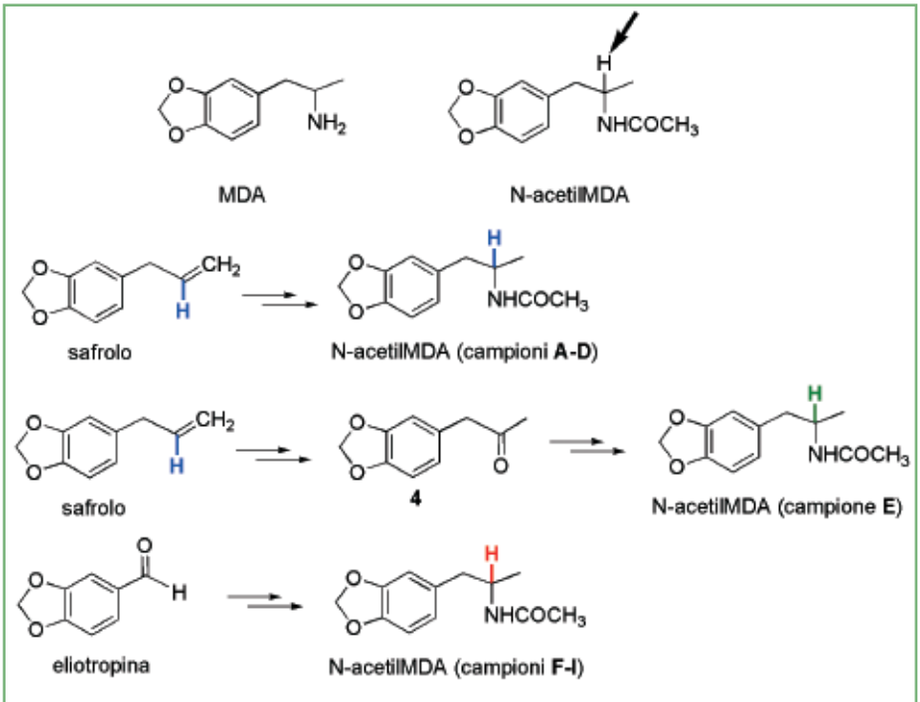


Fig. 8

Traceability of Organic Products. Part 2: Isotope Ratio Analysis

ABSTRACT

Isotope ratio analysis has been widely employed to distinguish natural and nature-identical flavours, and in the characterisation of the origin of food and drugs.

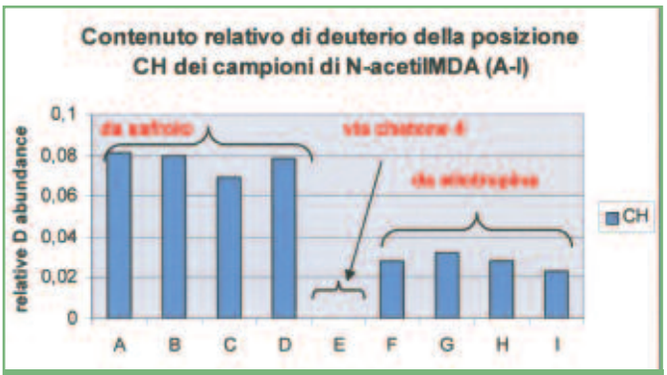


Fig. 9

dato campione mediante l'analisi del pattern isotopico. Cinque campioni erano stati preparati dal safrolo (A-E) e quattro dall'eliotropina (F-I). Il contenuto di deuterio del CH si è rivelato diagnostico per distinguere i campioni di N-acetil MDA preparati dai due diversi precursori. Le vie di sintesi a partire dall'eliotropina implicano una condensazione con nitroetano seguita da riduzione con $LiAlH_4$-H_2SO_4 o H_2. Abbiamo constatato che questo comporta un impoverimento in deuterio di tale posizione. Nei campioni preparati dal safrolo, l'atomo di idrogeno del CH è quello del safrolo di partenza, e presenta una certa ricchezza in deuterio. Quando partendo dal safrolo si passa attraverso il chetone 4 come intermedio (N-acetilMDA, campione E), si ha completa perdita di deuterio in corrispondenza del CH e non si osserva alcun segnale nello spettro del deuterio. In Fig. 9 sono riportati in un diagramma i valori relativi dell'abbondanza di deuterio della posizione CH dei vari campioni di N-acetilMDA. Il pattern del deuterio di questi campioni costituisce un'impronta digitale della molecola stessa e porta scritte le informazioni per ricostruirne la storia sintetica.

Conclusioni

Per "rintracciare" l'origine di un composto chimico con metodi scientifici oggettivi possiamo ricostruirne la storia sintetica oppure, nel caso venga da un organismo vivente, possiamo leggere le informazioni genetiche scritte nel suo DNA. Per ricostruire la storia sintetica ci serviamo delle "tracce" che le reazioni della chimica organica lasciano nella distribuzione degli isotopi stabili degli elementi e nella struttura dei sottoprodotti. Occorre sviluppare metodi ed addestrare persone per poter raccogliere efficacemente tutti i dati che i composti organici portano impressi nella loro struttura molecolare.
L'Italia deve essere particolarmente interessata a sviluppare metodi per la rintracciabilità di alimenti e farmaci. I prodotti alimentari italiani sono molto ricercati ed apprezzati all'estero e sono soggetti ad innumerevoli tentativi di imitazione ed adulterazione. L'industria italiana del bulk farmaceutico è molto fiorente e fornisce principi attivi farmaceutici anche per l'esportazione. Occorre difendere questi prodotti farmaceutici italiani dalla concorrenza di prodotti più economici, ma di più bassa qualità, provenienti dai Paesi emergenti.
La rintracciabilità è il costo che la nostra società deve pagare alla qualità.

Bibliografia

[1] G. Fronza *et al., J. Agric. Food Chem.,* 1996, **44**, 887.
[2] M. Barbeni *et al., J. Agric. Food Chem.,* 1997, **45**, 237.
[3] G. Fronza, *et al., J. Agric. Food Chem.,* 1998, **46**, 248; G. Fronza *et al., J. Agric. Food Chem.,* 1999, **47**, 1150.
[4] J. Aleu *et al., Eur. Food Res. Technol.,* 2002, **214**, 63.
[5] G. Fronza *et al., J. Agric. Food Chem.,* 2002, **50**, 2748.
[6] G. Fronza *et al., Helv. Chim. Acta,* 200, **84**, 351.
[7] H.-L. Schmidt *et al., Chem. Unserer. Zeit.,* 2005, **39**, 90; M. Schwertl *et al., Agriculture, Ecosystems and Environment,* 2005, **109**, 153; M. Boner, H. Forstel, *Anal. Bioanal. Chem.,* 2004, **378**, 301; L. Pillonel *et al., Lebensm.-Wiss. U.-Technol.,* 2003, **36**, 615; A. Rossmann *et al., Eur. Food Res. Technol.,* 2000, **211**, 32; B.E. Kornexl *et al., Z. Lebensm. Unters., Forsch. A.,* 1997, **205**, 19; A. Rossmann *et al., Eur. Food Res. Technol.,* 2000, **211**, 32.
[8] G. Fronza *et al., J. Agric. Food Chem.,* 1998, **46,** 477; G. Fronza *et al., Rapid Commun. in Mass Spectrom.,* 2001, **15**, 763.
[9] G. Fronza *et al., Eur. Food Res. Technol.,* 2002, **215**, 55.
[10] E. Brenna *et al., J. Agric. Food Chem.,* 2003, **51**, 4866.
[11] J.P. Jasper *et al., J.Pharm. Biomed. Anal.,* 2004, **35**, 21.
[12] A.M. Wokovich *et al., J. Pharm. Biomed. Anal.,* 2005, **38**, 781.
[13] J.P. Jasper *et al., Pharm. Tech.,* 2004, **28**, 60.
[14] J.P. Jasper *et al., J.Pharm. Biomed. Anal.,* 2005, **39**, 66.
[15] E. Brenna *et al., J. Agric. Food Chem.,* 2004, **52**, 7747.
[16] F. Besacier *et al., J. Forensic Sci.,* 1997, **42**, 429
[17] J.R. Ehleringer *et al., Forensic Sci. Int.,* 1999, **106**, 27.
[18] J.R. Ehleringer *et al., Nature,* 2000, **408**, 311.
[19] F. Mas *et al., Forensic Sci. Int.,* 1995, **71**, 225; F. Palhol *et al., Anal. Bioanal. Chem.,* 2003, **376**, 486.
[20] J.F. Carter *et al., Analyst,* 2002, **127**, 830.
[21] S. Armellin *et al., Analyst,* 2004, **129**, 130.