

Applicazioni NMR per il controllo qualità di alimenti e caratterizzazione di matrici complesse

Eleonora Truzzi, PhD



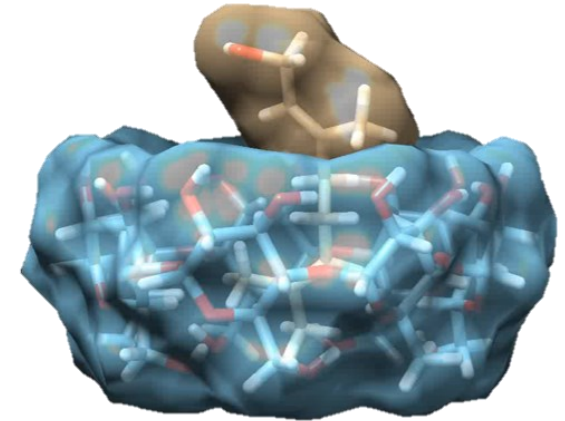
Controllo qualità integratori alimentari

qNMR



Studi interazione principio attivo – veicolo

NOESY
Tempi di rilassamento



Modelli statistici per autenticazione

Fingerprinting + chemiometria



Determinazione peso molecolare polimeri

DOSY



Controllo qualità integratori alimentari - qNMR

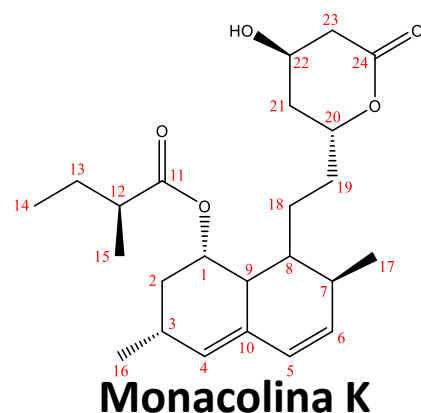


Fonte: Area Studi Mediobanca su dati Federsalus

Mercato in costante crescita → adulterazione e contraffazione per lucro.

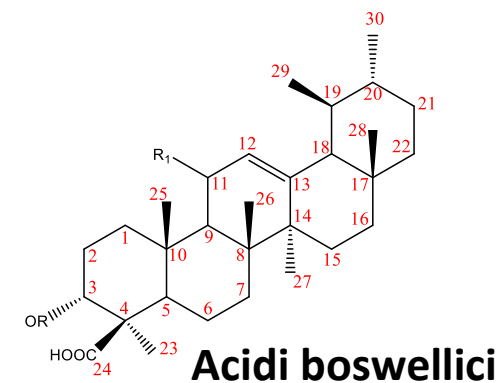
La legislazione degli integratori alimentari non richiede controlli di qualità stringenti → il titolo dei principi attivi può non essere conforme a quanto dichiarato in etichetta

Riso rosso fermentato



Allegato III della Direttiva Europea No 1925/2006 è stato modificato a giugno 2022 per diminuire il dosaggio di monacolina K da **10 mg/die** a **< 3 mg/die**

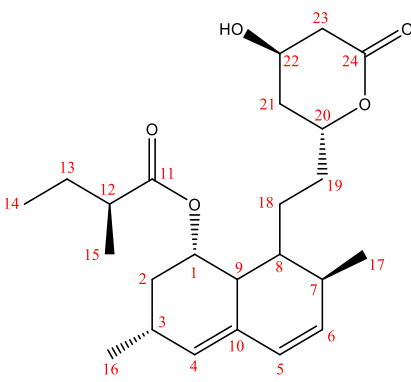
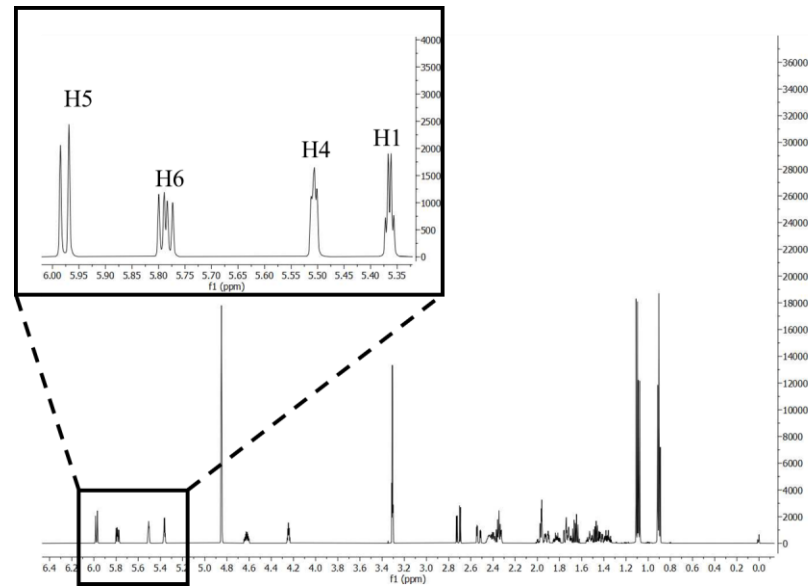
Boswellia serrata



Gli estratti prodotti in paesi asiatici sono titolati mediante metodi non selettivi → sovrastima del contenuto di BAs

Controllo qualità integratori alimentari - qNMR

Metodi cromatografici richiedono l'utilizzo di standard costosi, curve di taratura e analisi lunghe → **qNMR metodo ERETIC usando piridossina 10 mM come standard esterno.**



monacolina K

- Segnali selezionati per la quantitativa sono ben risolti e non sovrapposti a quelli di altri analiti;
- Tempi di rilassamento brevi → rapida acquisizione dello spettro ¹H-NMR (7 min) con D1 di 10 sec (5xT1).

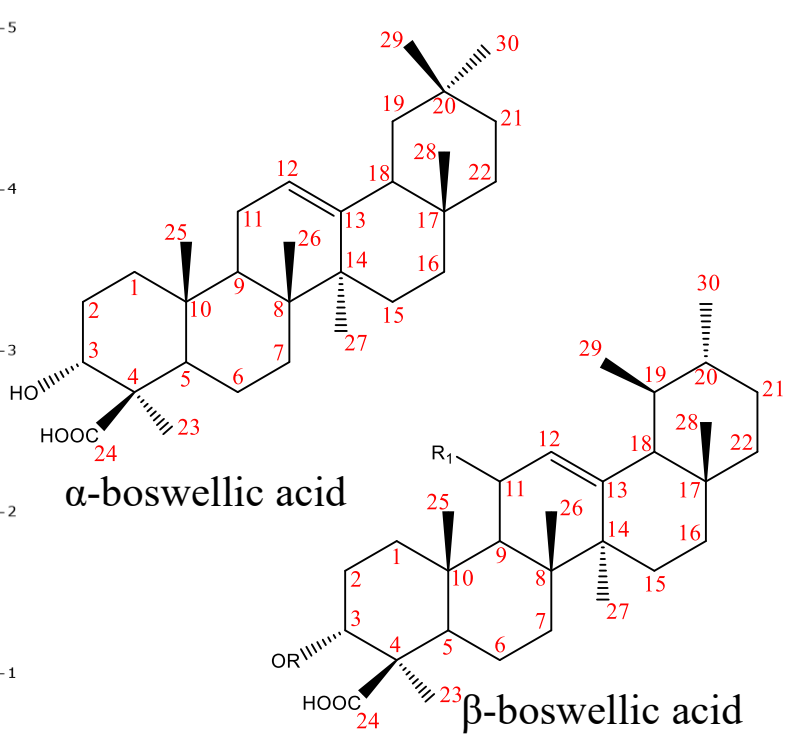
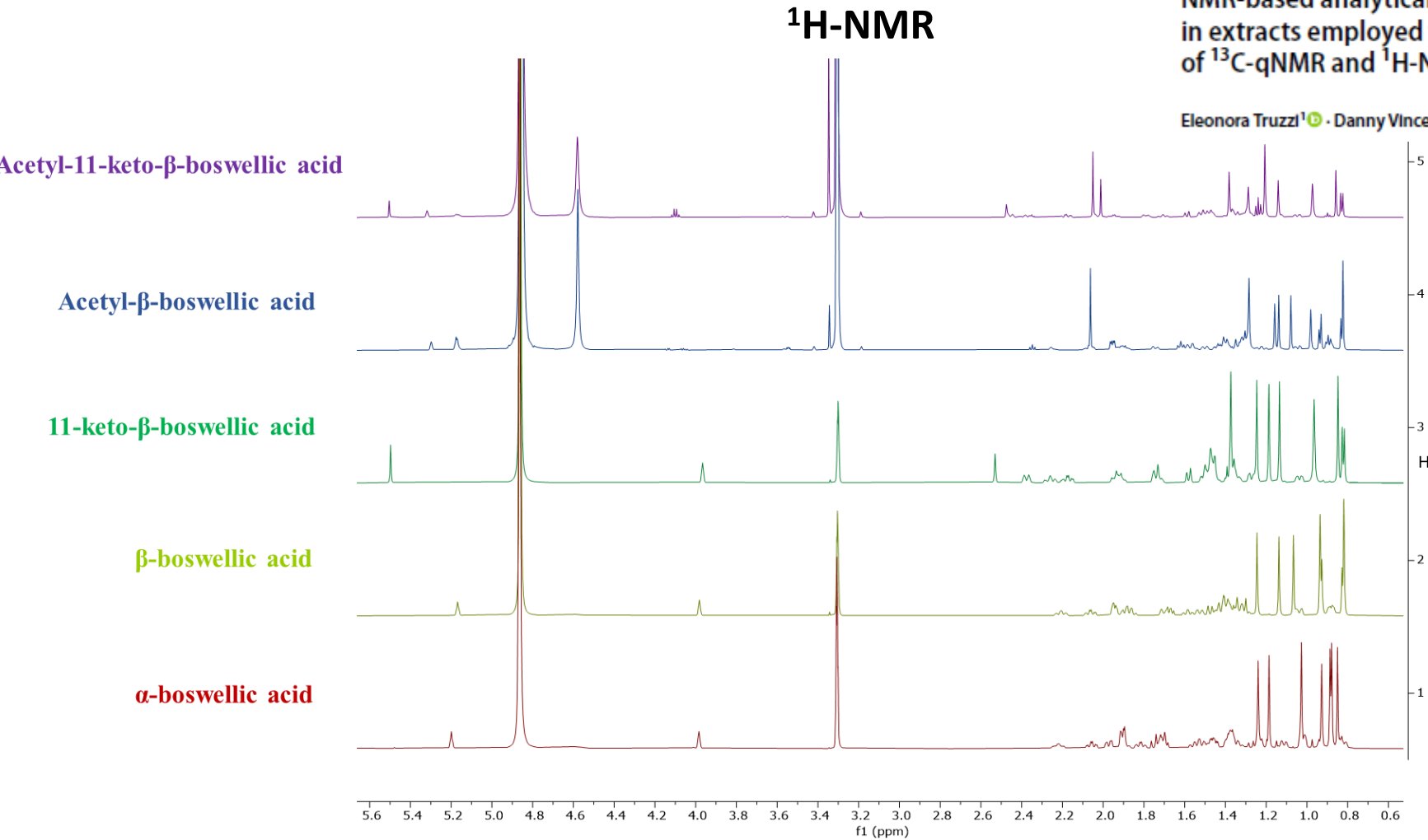
Sample	Target molecule	Compound measured per dosage unit	Compound declared per dosage unit
FS1	Monacolin K	n.d.	< 2.9 mg
FS2	Monacolin K	n.d.	< 2.9 mg
FS3	Monacolin K	2.14 ± 0.04 mg (CV% 1.86)	< 2.9 mg
FS4	Monacolin K	2.29 ± 0.71 mg (CV% 31)	2.6 mg
FS5	Monacolin K	2.44 ± 0.90 mg (CV% 36.88)	< 2.9 mg
FS6	Monacolin K	2.18 ± 0.91 mg (CV% 41.74)	< 2.9 mg

Integratori inefficaci e con effetti non riproducibili



NMR-based analytical methods for quantifying boswellic acids in extracts employed for producing food supplements: comparison of ¹³C-qNMR and ¹H-NMR/PLS-R methods

Eleonora Truzzi¹ · Danny Vincenzo Piazza² · Maria Cecilia Rossi³ · Stefania Benvenuti² · Davide Bertelli²

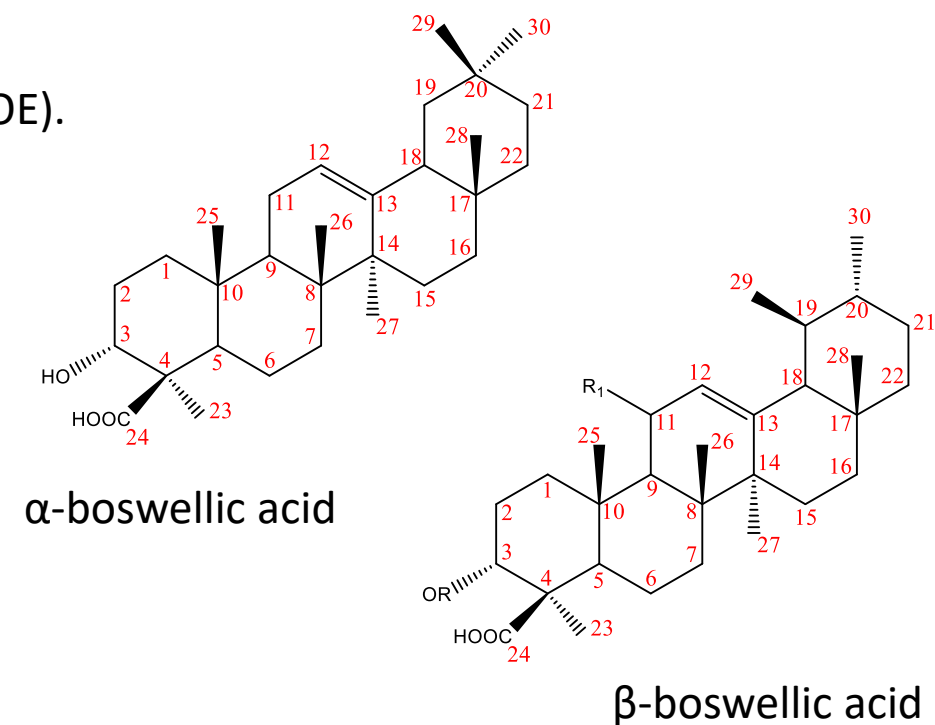
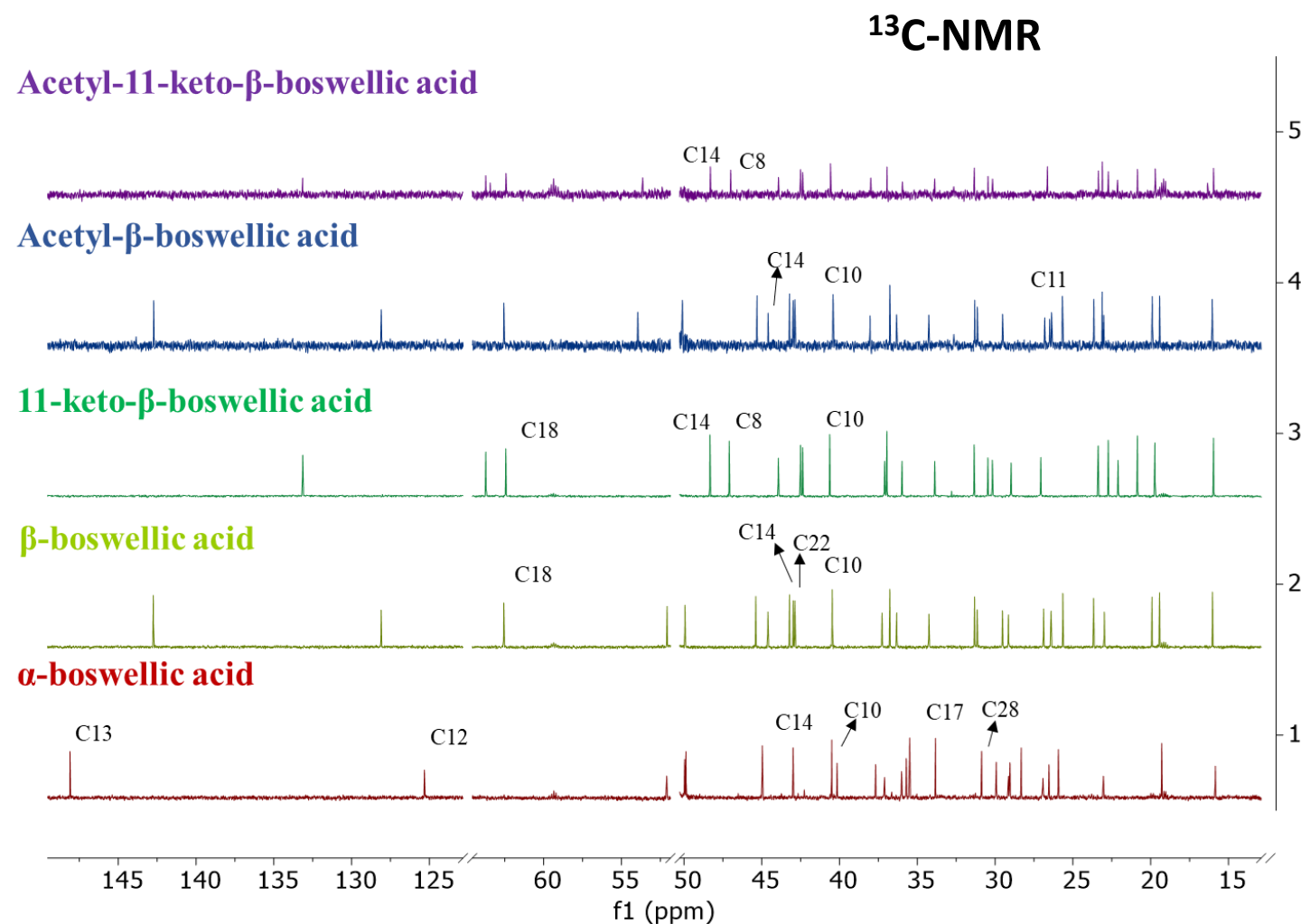


Approccio ¹H qNMR non applicabile

	R	R ₁
β-boswellic acid	H	H
Acetyl-β-boswellic acid	Ac	H
11-keto-β-boswellic acid	H	=O
Acetyl-11-keto-β-boswellic acid	Ac	=O

Controllo qualità integratori alimentari - qNMR

Sequenza Bruker “zgpg_pisp_f2.fas”, quantitativa (abbattimento dell’effetto NOE).



	R	R ₁
β -boswellic acid	H	H
Acetyl- β -boswellic acid	Ac	H
11-keto- β -boswellic acid	H	=O
Acetyl-11-keto- β -boswellic acid	Ac	=O

Segnali risolti con i più «bassi» tempi di rilassamento → D1 50 sec, tempo di acquisizione totale **3h 37 min!!!**

Approccio ^{13}C -qNMR non conveniente rispetto a metodi cromatografici

	αBA	βBA	KBA	AKBA	AβBA	AαBA	Total BAs
ext1	4.90	9.54	3.22	2.46	6.83	1.73	28.68
ext2	6.12	12.58	3.56	2.24	6.01	3.77	34.27
ext3	6.42	13.19	4.13	2.74	6.33	<LOQ	32.80
ext4	7.24	15.53	4.29	3.54	10.10	4.41	45.12
ext5	4.69	11.14	3.40	1.92	5.56	2.21	28.92
ext6	5.03	8.67	3.92	2.42	5.19	2.14	27.37
ext7	4.18	16.13	2.51	3.18	6.72	3.17	32.40
ext8	3.96	11.74	2.55	2.32	10.61	2.47	29.10
ext9	4.70	13.70	3.13	1.59	6.81	2.67	32.59
ext10	4.56	9.61	4.20	1.90	3.76	<LOQ	24.03
ext11	3.37	6.42	3.07	1.79	3.89	<LOQ	18.53
ext12	5.84	13.61	5.50	4.31	8.68	3.00	40.92
ext13	5.77	13.79	4.39	1.98	7.17	3.10	36.20
ext14	0.94	0.93	<LOQ	0.60	1.02	<LOQ	3.50
ext15	6.47	9.20	3.94	2.57	7.79	3.38	33.35
ext16	6.36	14.57	5.19	3.16	9.17	3.18	41.62
ext17	8.13	14.63	4.10	4.39	9.46	3.14	43.84
ext18	1.53	0.41	0.59	0.71	0.32	n.d.	3.57
ext19	7.94	14.24	6.23	3.31	6.87	2.81	41.40
ext20	6.53	17.90	4.67	2.80	6.22	2.48	35.28
ext21	6.97	14.30	4.06	3.62	9.93	4.06	42.93
ext22	1.89	3.53	1.58	0.89	2.06	<LOQ	9.94
ext23	4.30	8.66	2.86	1.98	5.84	4.04	27.68
ext24	2.66	5.22	2.01	1.76	3.95	<LOQ	15.60
ext25	8.03	16.43	5.12	2.98	9.92	3.46	45.94
ext26	4.51	8.61	2.25	1.82	5.15	1.74	24.08
ext27	5.50	13.31	3.91	3.66	8.50	2.30	37.17
ext28	6.19	19.47	4.91	4.50	7.63	2.74	44.91
ext29	3.21	4.31	2.45	2.55	5.08	<LOQ	17.61
ext30	7.45	20.03	5.57	6.22	9.57	3.73	52.58
ext31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ext32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ext33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

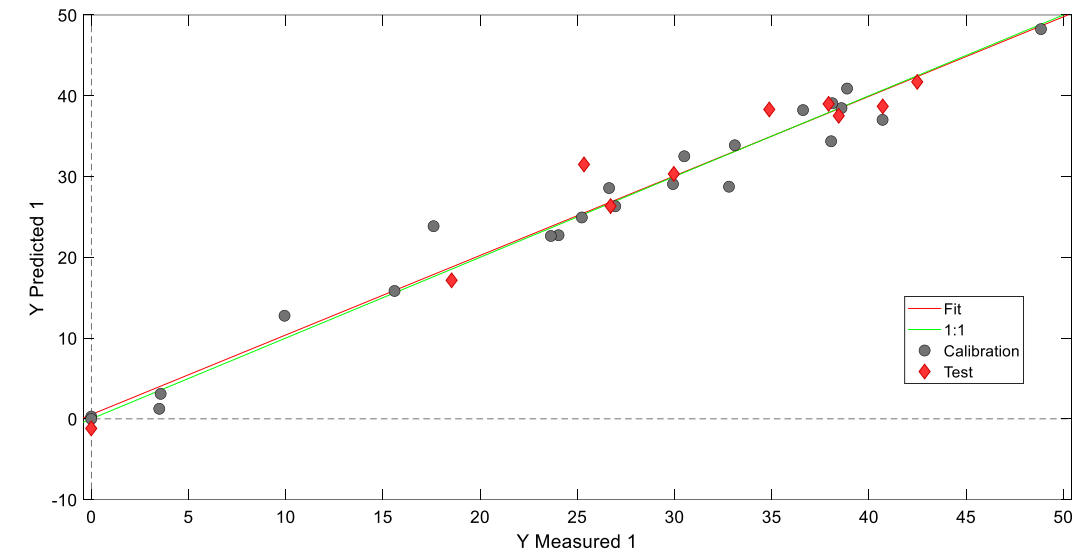
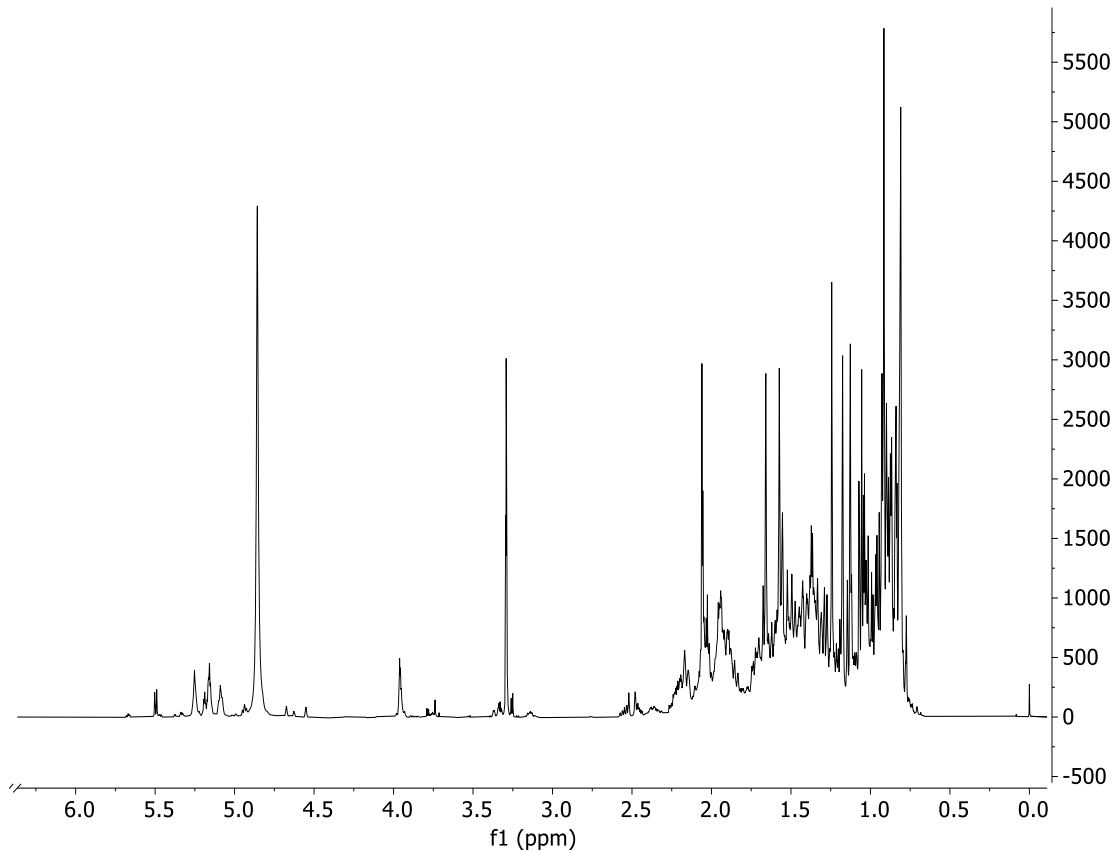
**Titolo totale di BAs dichiarati
dal produttore > 65%**

**Abbiamo alternative
per uno screening
veloce??**

Partial Least Squares Regression

Matrice X: spettri ^1H degli estratti

Matrice Y: % BAs determinata dal metodo ^{13}C -qNMR



Il modello ci permette di quantificare velocemente (7 min) il contenuto totale di BAs in un campione incognito utilizzando lo spettro protonico

Studio interazione principio attivo – veicolo



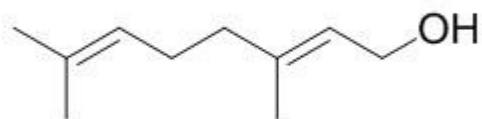
- Trasportare il principio attivo in specifici distretti del corpo;
- **Aumentare la solubilità del principio attivo;**
- **Migliorare la biodisponibilità e incrementare le attività benefica.**

Studio dell'interazione tra il veicolo (complessi di ciclodestrine, nano- o micro-particelle, liposomi ...) e il principio attivo è fondamentale per comprendere come i sistemi di veicolazione sono in grado di migliorare la somministrazione.

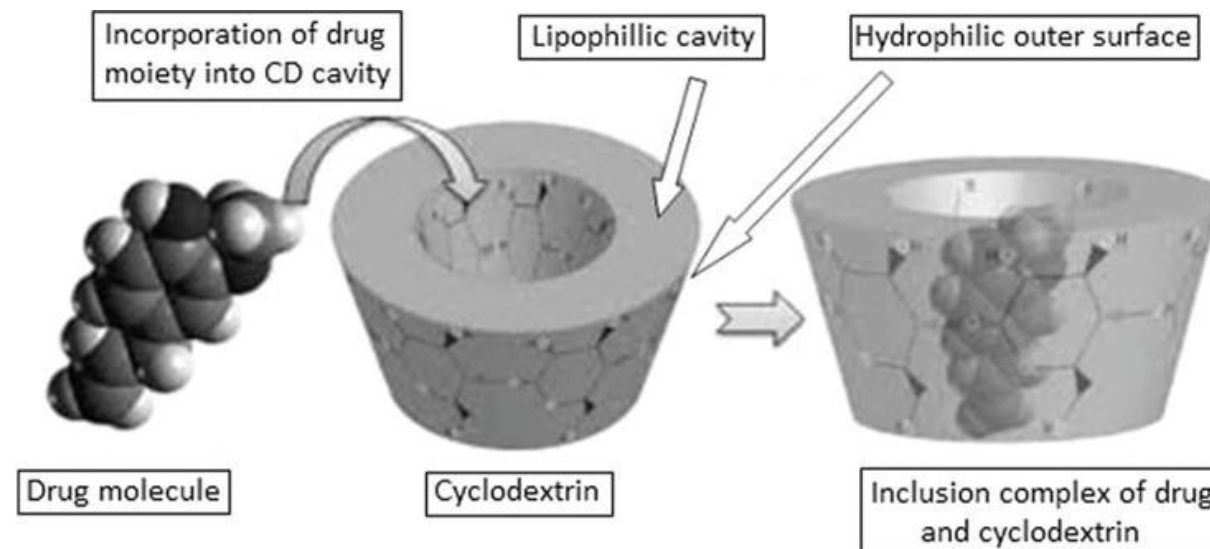
NMR può essere usato in diversi modi per lo scopo attraverso:

- 1. Shift dei segnali;**
- 2. Effetto NOE;**
- 3. Tempo di rilassamento.**

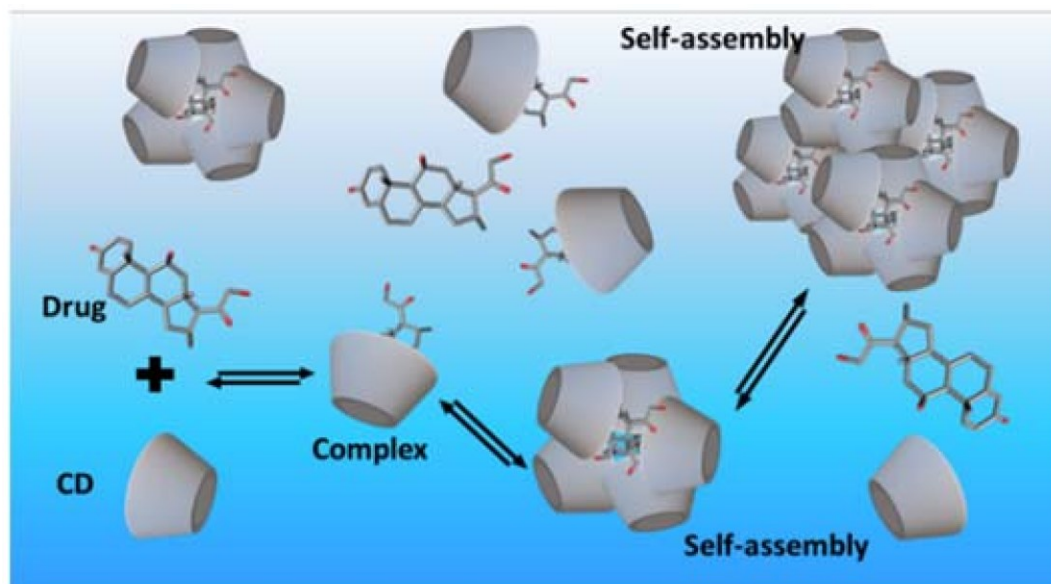
Geraniolo



Complessi di inclusione



Complessi di inclusione/macrocomplessi



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Journal of Controlled Release

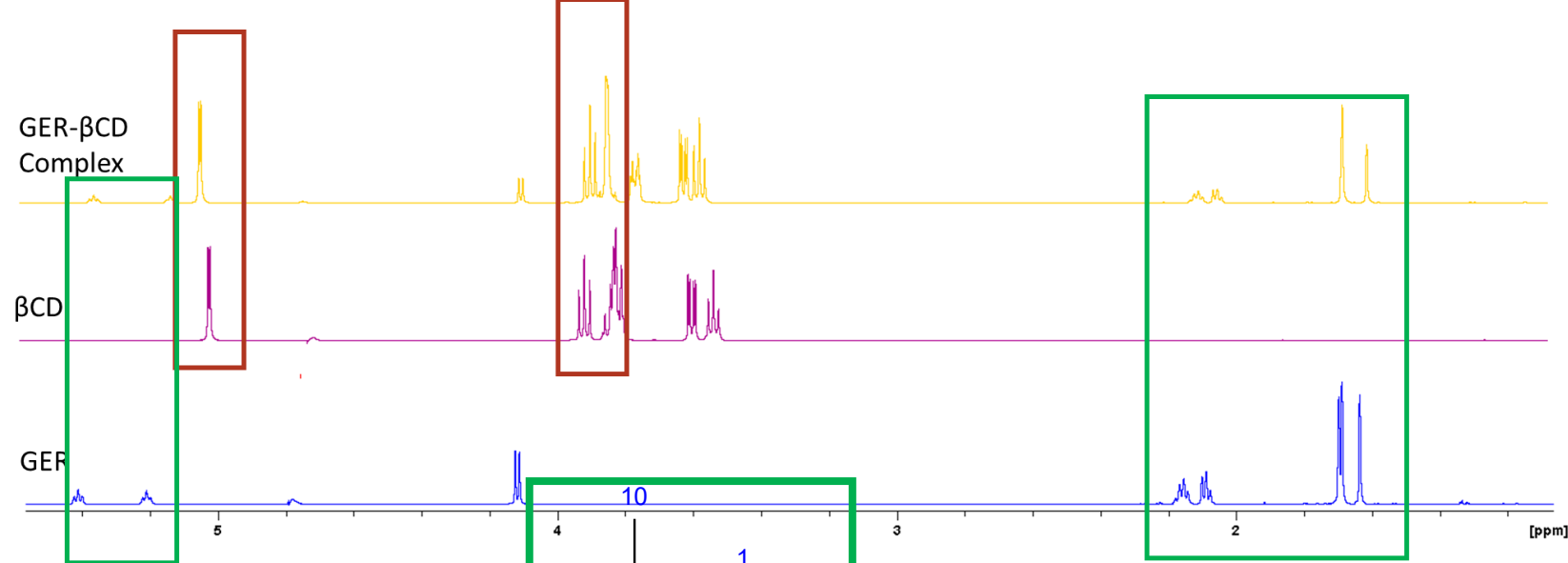
journal homepage: www.elsevier.com/locate/jconrel



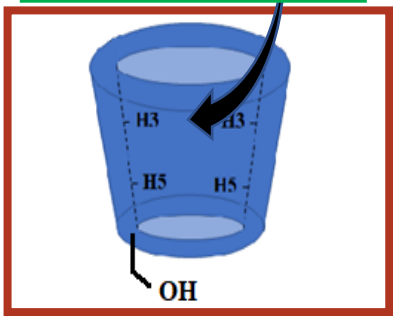
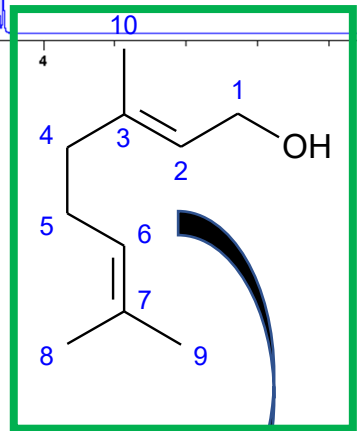
Nasal biocompatible powder of Geraniol oil complexed with cyclodextrins for neurodegenerative diseases: physicochemical characterization and in vivo evidences of nose to brain delivery

Eleonora Truzzi ^{a,1}, Cecilia Rustichelli ^{a,1}, Edilson Ribeiro de Oliveira Junior ^b, Luca Ferraro ^c, Eleonora Maretta ^a, Daniel Graziani ^d, Giada Botti ^e, Sarah Beggiato ^f, Valentina Iannuccelli ^a, Eliana Martins Lima ^b, Alessandro Dalpiaz ^{e,*}, Eliana Leo ^{a,*}

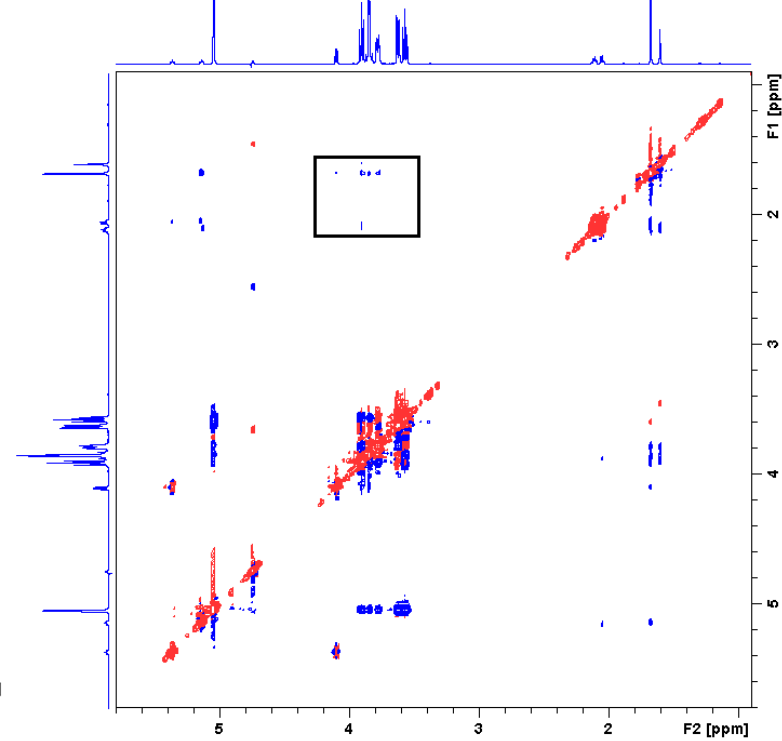
1. Shift dei segnali



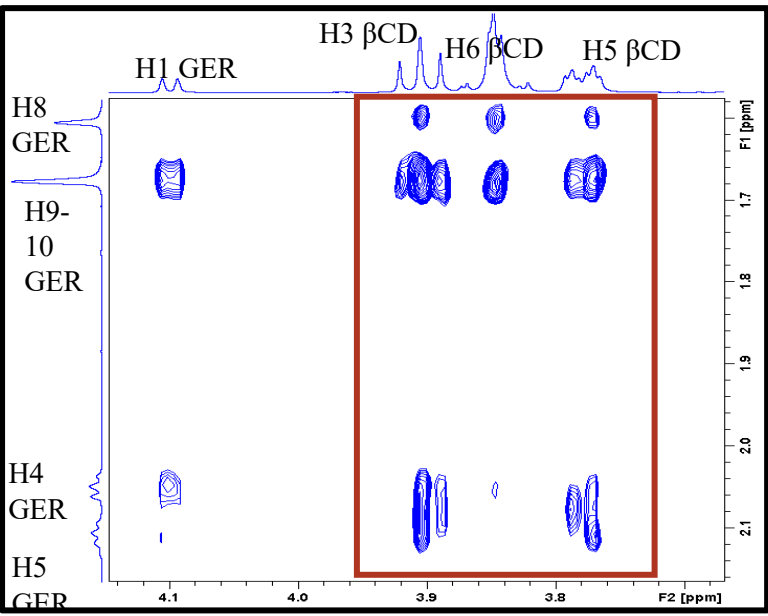
¹H-NMR, sequenza Bruker “zgcprr”



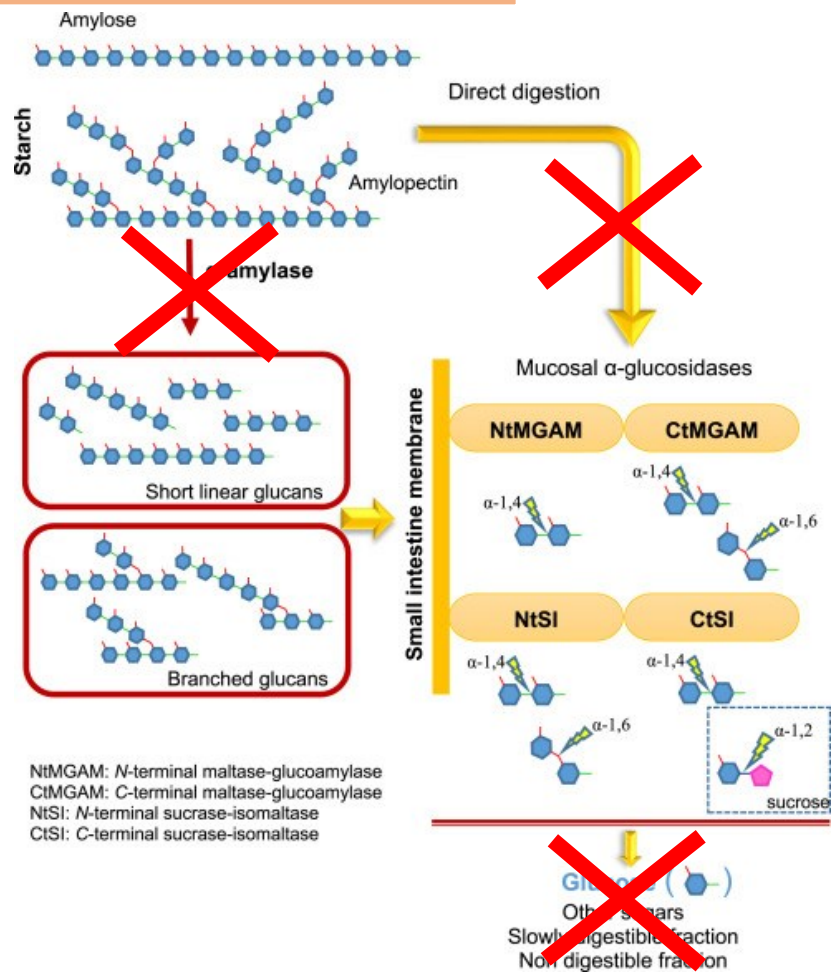
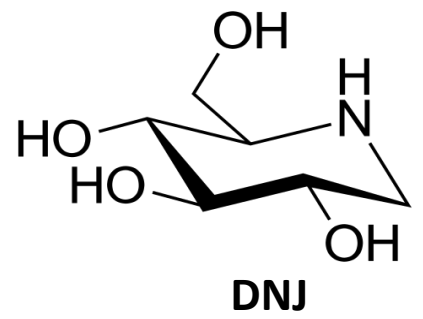
2. Effetto NOE



ROESY, sequenza Bruker “roesyphpr”



Studio interazione principio attivo – veicolo



Imminozucchero assorbito a livello intestinale ed eliminato velocemente dal circolo sistemico a causa della sua elevata solubilità in fluidi acquosi → la sua azione sia a livello intestinale che sistemico è scarsa.



A contatto con il fluido intestinale si solubilizza prontamente, quando incorporato nelle particelle si solubilizza lentamente perché trattenuto dalle microparticelle.

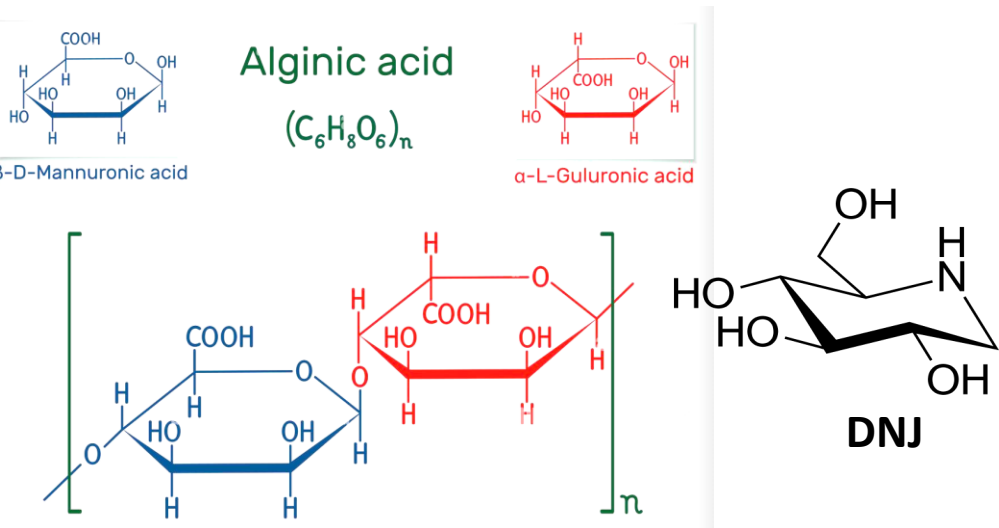
→ azione del DNJ è prolungata nel tempo perché viene assorbito un po' per volta

Perché considerando l'alta solubilità dell'imminozucchero??

3. T1p (relaxation in the rotating frame)

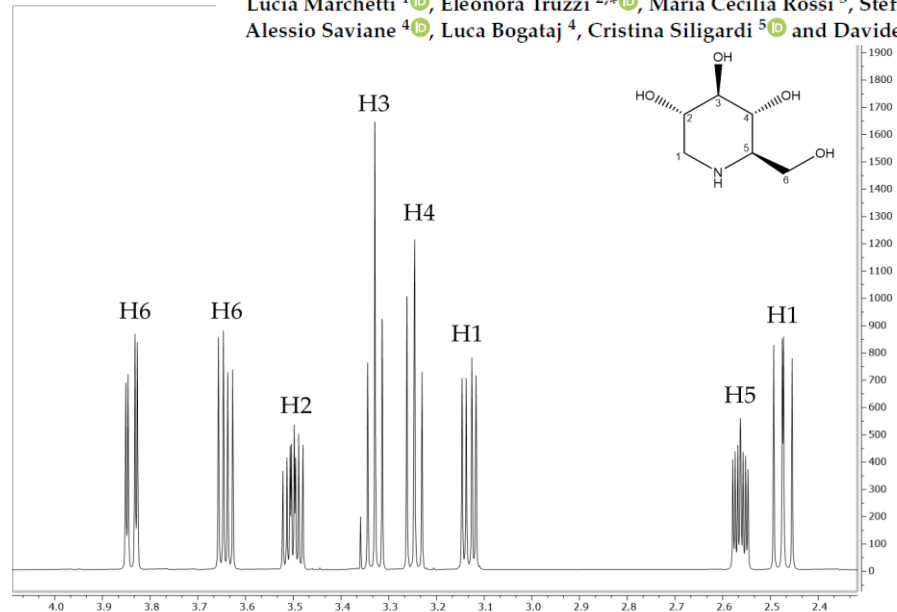
Sequenza Bruker “t1rho_esgp2d”

Consigliato quando la mobilità delle molecole in soluzione è lenta e si ha a che fare con macromolecole



La diminuzione del T1p suggerisce una ridotta mobilità del DNJ in soluzione → interazione tra specifici protoni del DNJ con il polisaccaride delle microparticelle

Article
Alginate-Based Carriers Loaded with Mulberry (*Morus alba* L.) Leaf Extract: A Promising Strategy for Prolonging 1-Deoxynojirimycin (DNJ) Systemic Activity for the Nutraceutical Management of Hyperglycemic Conditions
Lucia Marchetti ¹, Eleonora Truzzi ^{2,*}, Maria Cecilia Rossi ³, Stefania Benvenuti ¹, Silvia Cappellozza ⁴, Alessio Saviane ⁴, Luca Bogataj ⁴, Cristina Siligardi ⁵ and Davide Bertelli ^{1,*}



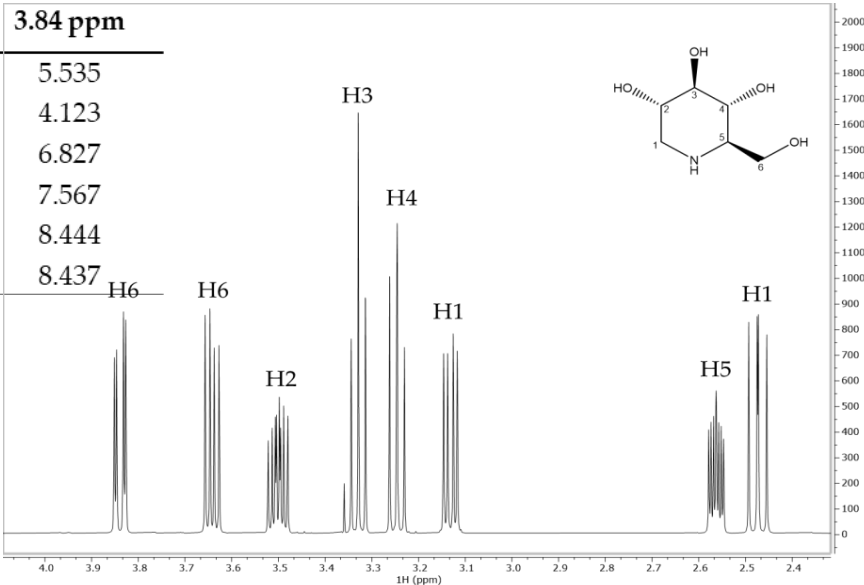
DNJ	T1ρ DNJ (s)	T1ρ DNJ + ALG (s)	Δ(s)
H1	0.535	0.440	−0.095
H1	0.663	0.530	−0.133
H2	1.760	1.390	−0.370
H3	1.810	1.430	−0.380
H4	1.801	1.401	−0.400
H5	0.963	0.640	−0.323
H6	0.679	0.548	−0.131
H6	0.680	0.517	−0.163

3. Tempo di rilassamento T1 (longitudinal relaxation time)

DNJ (mM)	T1 H1 2.47 ppm (s)		T1 H1 3.13 ppm (s)		T1 H2 3.50 ppm (s)		T1 H3 3.33 ppm (s)		T1 H4 3.24 ppm (s)		T1 H5 2.56 ppm (s)		T1 H6 3.64 ppm (s)		T1 H6 3.84 ppm (s)	
	DNJ	DNJ + ALG	DNJ	DNJ + ALG	DNJ	DNJ + ALG	DNJ	DNJ + ALG	DNJ	DNJ + ALG	DNJ	DNJ + ALG	DNJ	DNJ + ALG	DNJ	DNJ + ALG
4	0.671	0.545	0.781	0.597	2.422	1.438	2.505	1.934	0.818	0.523	1.468	1.048	0.827	0.618	2.542	1.742
5	0.670	0.538	0.784	0.560	2.382	1.346	2.501	1.837	0.817	0.523	1.469	0.963	0.820	0.592	2.533	1.569
10	0.662	0.559	0.771	0.604	2.337	1.532	2.440	2.036	0.806	0.579	1.432	1.061	0.808	0.630	2.463	1.810
15	0.666	0.580	0.774	0.607	2.347	1.607	2.459	2.075	0.811	0.597	1.435	1.071	0.814	0.637	2.468	1.861
20	0.661	0.584	0.770	0.605	2.324	1.739	2.431	2.124	0.806	0.616	1.422	1.080	0.806	0.650	2.440	1.893
25	0.654	0.584	0.760	0.637	2.212	1.780	2.323	2.090	0.794	0.669	1.403	1.070	0.787	0.695	2.386	1.860

DNJ (mM)	1/ΔR (s-1)								
	H1 2.47 ppm	H1 3.13 ppm	H2 3.50 ppm	H3 3.33 ppm	H4 3.24 ppm	H5 2.56 ppm	H6 3.64 ppm	H6 3.84 ppm	
4	2.900	2.534	3.539	8.485	1.450	3.663	2.445	5.535	
5	2.730	1.960	3.095	6.919	1.453	2.796	2.129	4.123	
10	3.600	2.789	4.448	12.297	2.056	4.095	2.860	6.827	
15	4.492	2.813	5.097	13.288	2.262	4.222	2.929	7.567	
20	5.040	2.823	6.900	16.819	2.613	4.491	3.358	8.444	
25	5.420	3.936	9.114	20.837	4.260	4.508	5.945	8.437	

R = velocità di rilassamento



È possibile utilizzare questi risultati per determinare le costanti di associazione, Ka

$$L + M \rightleftharpoons LM \quad K_a = \frac{[LM]}{[L][M]}$$

3. Tempo di rilassamento T1 (longitudinal relaxation time)

$$R_{obs} = p_f R_f + p_b R_b$$

pf: fraction of the free ligand
pb: fraction of the associated ligand
Rf: Relaxation rate in the free state
Rb: Relaxation rate in the associated state

Assuming that the fraction of the free ligand is far higher than that of the associated form

($p_b \ll 1$), and taking $p_b + p_f = 1$:

$$\Delta R = R_{obs} - R_f \cong p_b R_b$$

(1)

The association constant K_a can be expressed as:

$$\zeta_a = \frac{[LM]}{[L][M]} = \frac{[LM]}{[L]([M_0] - [LM])}$$

(2)

$$[LM] = \frac{K_a [L] M_0}{1 + K_a [L]}$$

(3)

Where $[M_0]$ is the initial concentration of the macromolecule
Since p_b is the fraction of the associated ligand, then:

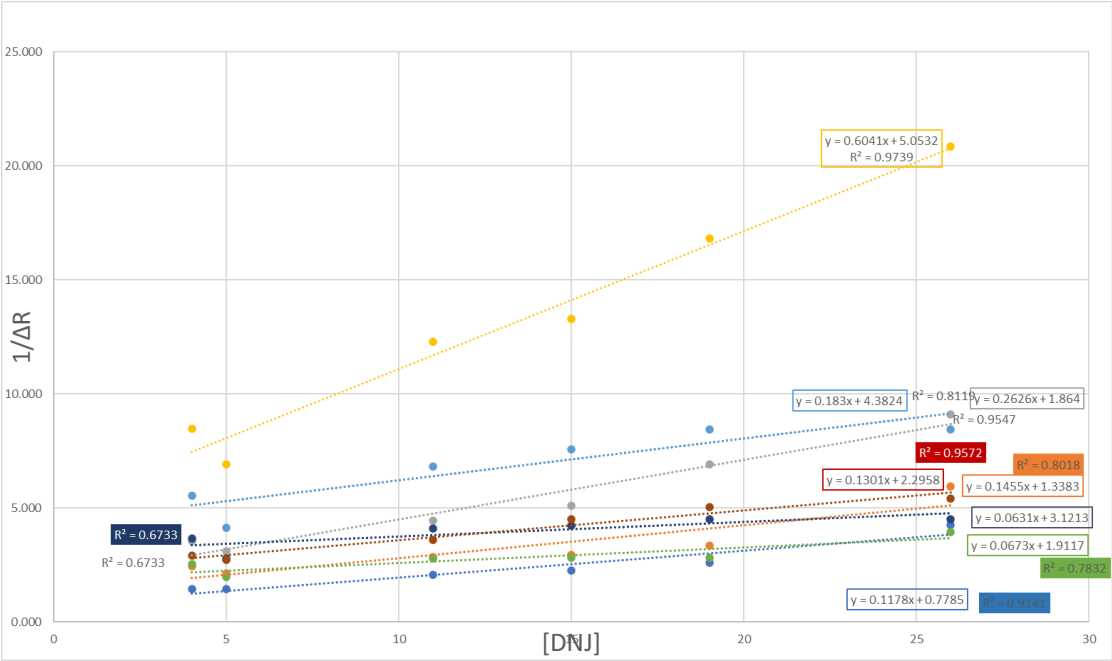
$$p_b = \frac{[LM]}{[L] + [LM]} \cong \frac{[LM]}{[L]}$$

(4)

Finally, by substitution of (3) in (4) and then in (1), the following equation is obtained:

$$\frac{1}{\Delta R} = \left(\frac{1}{K_a} + [L] \right) \frac{1}{R_b [M_0]}$$

(5)

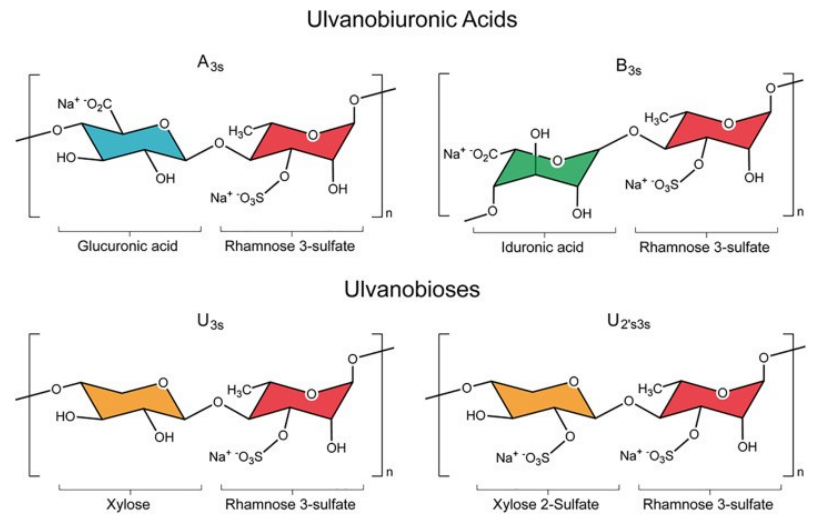


DNJ (mM)	1/ΔR (s-1)							
	H1 2.47 ppm	H1 3.13 ppm	H2 3.50 ppm	H3 3.33 ppm	H4 3.24 ppm	H5 2.56 ppm	H6 3.64 ppm	H6 3.84 ppm
4	2.900	2.534	3.539	8.485	1.450	3.663	2.445	5.535
5	2.730	1.960	3.095	6.919	1.453	2.796	2.129	4.123
10	3.600	2.789	4.448	12.297	2.056	4.095	2.860	6.827
15	4.492	2.813	5.097	13.288	2.262	4.222	2.929	7.567
20	5.040	2.823	6.900	16.819	2.613	4.491	3.358	8.444
25	5.420	3.936	9.114	20.837	4.260	4.508	5.945	8.437
-1/Ka	-17.646	-28.406	-7.098	-8.365	-6.609	-49.466	-9.198	-23.948
Ka	57	35	141	120	151	20	109	42

Determinazione peso molecolare polimeri

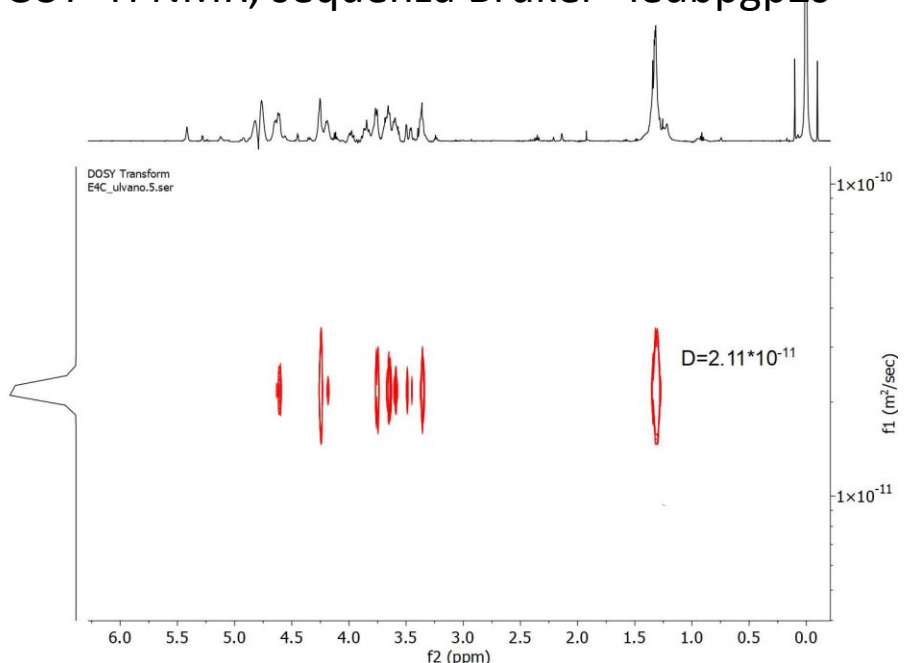


Ulva lactuca

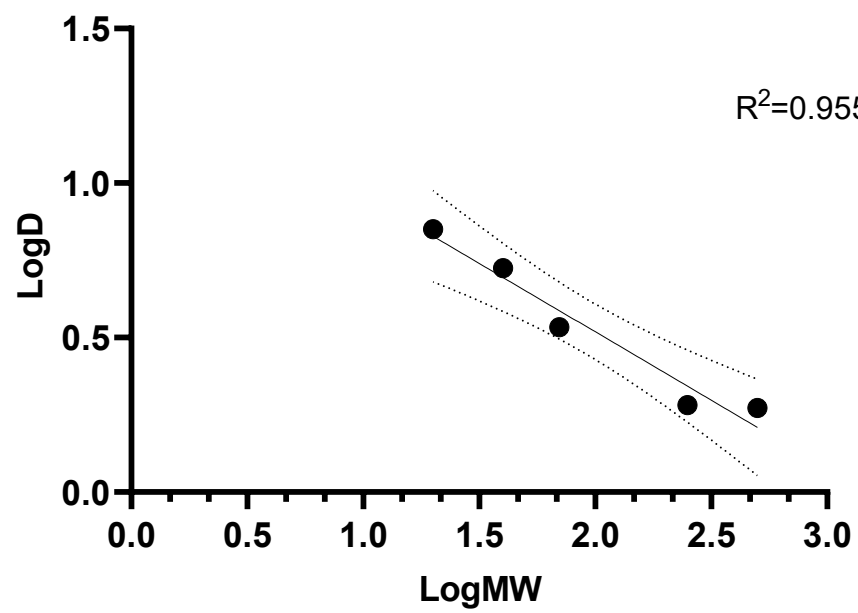


Attività prebiotiche ed immunostimolanti correlate al peso molecolare

DOSY ¹H NMR, sequenza Bruker “ledbpgp2s”



Curva di regressione destrani 20 – 500 kDa



187 kDa

Grazie

Prof. Davide Bertelli
Dott.ssa Maria Cecilia Rossi

