

Rendiconti Seminario Facoltà Scienze Università Cagliari Supplemento Vol. 70 (2000)

## Studio dell'impronta isotopica del deuterio di oli alimentari mediante la spettroscopia NMR del $^2\text{H}$ e $^1\text{H}$

PAOLA SCANO (\*), FLAMINIA CESARE MARINCOLA (\*), MARIANO CASU (\*),  
GIUSEPPE SABA (\*), ADOLFO LAI (\*)

**Abstract.** *A report is given on  $^2\text{H}$  and  $^1\text{H}$  NMR investigations of a number of triacylglycerol mixtures of edible oils and squalene samples extracted from extra virgin olive oil, shark liver and synthetic. The average numbers of hydrogen and deuterium for the olefinic, methylene and methyl sites were determined, and some parameters describing the different fractionation of deuterium in the various sites were obtained. The results have been discussed in terms of the biosynthesis steps involved in the elongation and desaturation processes of the fatty acids, and in the condensation and reduction processes of the squalene. From a principal components analysis distinct domains have been found for the squalene samples from shark liver, olive oil and synthetic.*

**Riassunto.** *Viene riportato un resoconto su alcuni studi NMR del  $^2\text{H}$  e  $^1\text{H}$  su miscele di trigliceroli di oli alimentari e campioni di squalene sintetico ed estratti da olio di oliva extra vergine e fegato di squalo. Sono stati determinati i numeri medi di idrogeno e deuterio per i siti metilici, metilenici e olefinici, e sono stati ottenuti alcuni parametri che descrivono il diverso frazionamento di deuterio nei vari siti. I risultati sono stati discussi in termini dei vari stadi della biosintesi coinvolti nei processi di elongazione e di desaturazione degli acidi grassi, e nei processi di condensazione e riduzione dello squalene. Da una analisi delle componenti principali sono stati trovati domini distinti per i campioni di squalene sintetico ed estratti da olio di oliva extra vergine e dal fegato di squalo.*

### INTRODUZIONE

Nei prodotti naturali l'atomo di idrogeno  $^1\text{H}$  è sempre accompagnato dal corrispondente isotopo pesante deuterio  $^2\text{H}$ . Il contenuto isotopico dipende da processi fisici, biochimici e fisiologici caratteristici della biosintesi. Il rapporto isotopico D/H è dell'ordine di 100-250 parti per milione, e questo rapporto varia tra prodotti naturali diversi e tra campioni della stesso prodotto ottenuto da materie prime diverse. Le variazioni del

---

(\*) Dip. Scienze Chimiche, Università degli Studi di Cagliari.

rapporto isotopico D/H sono piccole ma riproducibili e si originano da discriminazioni isotopiche indotte da processi in cui l'acqua con il suo contenuto di deuterio è direttamente coinvolta nel metabolismo fotosintetico delle piante.

Il rapporto isotopico D/H dell'acqua naturale dipende da fattori ambientali che esercitano effetti differenziati sul ciclo evaporazione/condensazione delle specie  $H_2O$ , HDO e  $D_2O$ . Una conseguenza di tali effetti è che il contenuto medio di deuterio nell'acqua diminuisce con l'aumentare della latitudine (all'equatore D/H = 155 ppm, ai poli D/H > 89 ppm), dell'altitudine, e, nella stessa regione, con l'aumentare della distanza dal mare. Anche i rapporti isotopici D/H nei vari siti molecolari dei prodotti naturali dipendono da fattori geografici e meteorologici oltre che da specifici processi metabolici preposti alla loro biosintesi.

La conoscenza del rapporto isotopico D/H nei vari siti molecolari di una data specie può dunque fornire una base di informazioni per lo studio dell'origine territoriale, della specie varietale e delle manipolazioni operate dall'uomo nel corso della lavorazione e conservazione del prodotto.

Tra le tecniche di indagine utilizzabili per le determinazioni quantitative del deuterio contenuto nelle molecole biogeniche vi sono la spettrometria di massa, che da informazioni di alta precisione, ma limitate al solo contenuto totale di deuterio nelle molecole, e la spettroscopia NMR del  $^2H$  e  $^1H$ , nota con la sigla SNIF-NMR (Site-specific Natural Isotope Fractionation), che permette l'analisi dettagliata del rapporto isotopico D/H per ciascun sito molecolare.

Fino a pochi anni fa, l'analisi dell'impronta isotopica del deuterio è stata utilizzata per l'analisi dei vini o di altri componenti molecolari contenuti in prodotti alimentari di origine vegetale e ha permesso di ottenere informazioni utili non solo per l'identificazione del sito territoriale di origine ma anche per la valutazione della qualità dei prodotti alimentari, del loro anno di produzione o di eventuali sofisticazioni ottenute per aggiunta di componenti di differente origine naturale o sintetica.

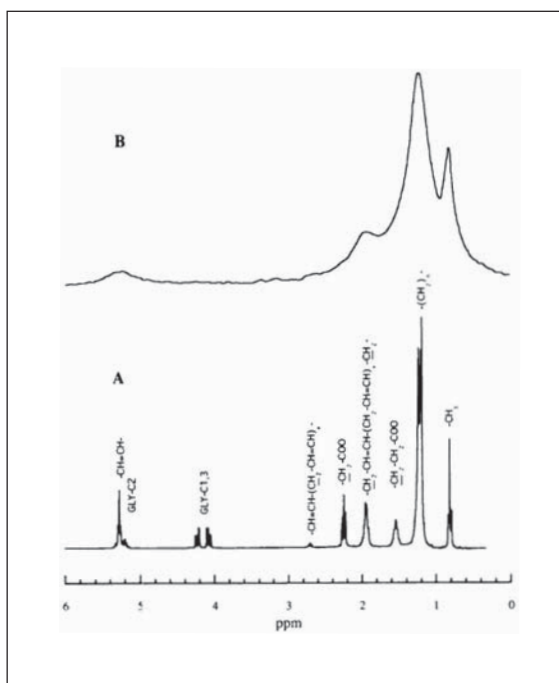
La metodologia di indagine SNIF-NMR è stata affinata nel nostro laboratorio e utilizzata per lo studio delle miscele di trigliceridi dell'olio di oliva extravergine, di oli vegetali di varia natura, e per l'analisi dello squalene contenuto nell'olio di oliva e di diversa origine [1, 2]. Qui si riporta un resoconto dei risultati di queste ricerche.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### **Analisi SNIF-NMR delle miscele di trigliceridi di campioni di olio di oliva extravergine e di oli di semi**

Tutti i campioni analizzati erano di origine commerciale. Gli oli di oliva provenivano da differenti regioni: i campioni I-III dalla Sardegna, IV e V dall'Italia meridionale, VI dall'Italia centrale e VII dall'Italia centro-settentrionale.

In Fig. 1 è mostrato uno spettro NMR del  $^1H$  (A) e del  $^2H$  (B) di una miscela naturale di trigliceridi di un olio di oliva extravergine con le relative attribuzioni. Dall'analisi delle



**Figura 1. Spettro NMR del  $^1\text{H}$  a 300 MHz (A) e del  $^2\text{H}$  a 46 MHz (B) di un campione di olio di oliva in soluzione di  $\text{CDCl}_3$ .**

aree integrate dei segnali NMR dell' $^1\text{H}$  sono state stimate le concentrazioni relative dei gruppi  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2$ - e  $-\text{CH}=\text{}$ , e da queste è stato ottenuto il numero medio di idrogeni per ciascun tipo di sito. Con una procedura analoga è stato ottenuto il numero medio di atomi di deuterio per i siti olefinici, mentre la distribuzione media di deuterio nei siti metilici e metilenici è stata stimata facendo uso di una procedura di deconvoluzione dei segnali, dal momento che vi era una parziale sovrapposizione delle risonanze, per effetto dell'allargamento dei segnali dovuto alla forte interazione quadrupolare del deuterio.

Nella Tab. 1 sono riportati i valori normalizzati delle popolazioni dell'idrogeno e del deuterio per i siti olefinici e alifatici. Da un confronto dei dati normalizzati del deuterio ( $D_i$ ) e dell'idrogeno ( $H_i$ ) per ciascun tipo di sito si osserva che per tutti i campioni i siti olefinici e metilici risultano essere notevolmente impoveriti in deuterio.

Questi risultati sono stati interpretati tenendo conto dei 2 principali stadi di reazione della biosintesi degli acidi grassi, cioè il processo enzimatico di elongazione della catena, a partire dal metile terminale, e successivamente il processo di desaturazione della catena. Nel primo stadio la popolazione isotopica nei siti  $-\text{CH}_2-$  dipende dal contenuto di deuterio nell'acqua utilizzata per la biosintesi. Nel secondo stadio l'acqua può essere considerata come recettore di idrogeno ed ha un ruolo differente nel controllare il contenuto di deuterio dei siti olefinici, poiché il processo enzimatico di desaturazione sembra eliminare preferenzialmente deuterio piuttosto che idrogeno.

Sulla base di questi dati si può affermare che il contenuto di deuterio nei siti metilici

**Tabella 1. Dati<sup>(a)</sup> NMR sulla distribuzione dell'idrogeno e del deuterio (valori normalizzati) nei differenti siti dei trigliceridi contenuti in oli di oliva e di semi.**

Olio	-CH <sub>3</sub>		-CH <sub>2</sub> -			-CH=		
	H	D	H	D	R <sup>(b)</sup>	H	D	R <sup>(b)</sup>
Soia	3	2,4	26,1	27,9	2,7	3,2	2,0	0,8
Arachide	3	3,2	30,3	31,0	1,9	2,5	1,6	0,6
Girasole	3	2,5	27,4	29,3	2,6	3,1	1,7	0,6
Oliva I	3	2,6	29,0	30,1	2,4	1,8	1,1	0,7
“ II	3	2,8	29,6	30,4	2,2	1,9	1,3	0,7
“ III	3	3,2	28,7	29,2	1,9	2,0	1,3	0,6
“ IV	3	2,6	30,0	31,4	2,4	2,1	1,0	0,5
“ V	3	2,3	28,9	30,4	2,7	1,9	1,0	0,7
“ VI	3	2,4	28,9	30,4	2,6	2,0	1,1	0,7
“ VII	3	2,9	29,1	29,9	2,1	1,9	1,1	0,6

<sup>(a)</sup> H<sub>i</sub>, numero medio di atomi di idrogeno per sito, stimato dagli spettri NMR del <sup>1</sup>H dividendo le aree integrate dei gruppi -CH<sub>2</sub>- e -CH= per quella del -CH<sub>3</sub>; D<sub>i</sub>, numero medio di atomi di deuterio per sito, ottenuto dagli spettri NMR del <sup>2</sup>H come rapporto tra l'area specifica del sito e l'area totale, assunta uguale alla somma dei protoni in ciascun sito; R<sub>i</sub> (i = -CH<sub>2</sub>-, -CH=), i fattori di distribuzione interna media per ciascun tipo di sito i, sono definiti dalla relazione [3 × area del deuterio (i)/area del deuterio (-CH<sub>3</sub>)]/H<sub>i</sub>, H<sub>i</sub>' = H/n<sub>i</sub>, dove n è il numero di atomi di idrogeno in ciascun sito.

<sup>(b)</sup> L'accuratezza dei dati è entro il 10%; i fattori di probabilità statistica sono uguali al numero di atomi di idrogeno in ciascun sito.

e metilenici, che dipendono più direttamente dal grado di deuterazione dell'acqua, possono dare specifiche informazioni sugli effetti e sull'origine territoriali e meteorologici. Tuttavia una analisi più dettagliata non può essere fatta, dal momento che i dati acquisiti non soddisfano ancora i requisiti di accuratezza e precisione previsti dal metodo SNIF-NMR, e si riferiscono comunque a un numero esiguo di campioni e non possono essere considerati campioni di riferimento di origine garantita.

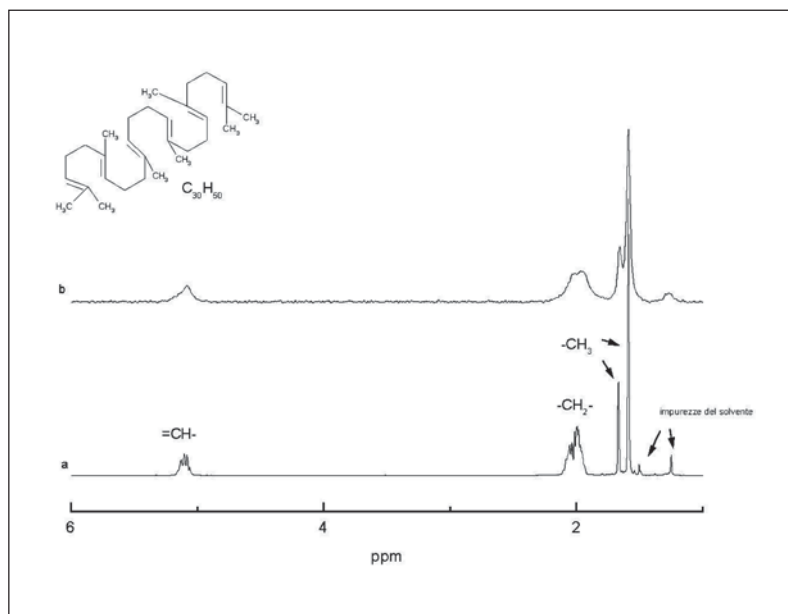
#### **Analisi SNIF-NMR dello squalene di origine vegetale (olio di oliva), animale (squalo) e sintetico**

Lo squalene è un isoprenoide (Fig. 2) presente nei tessuti animali e vegetali. Esso è contenuto nel fegato di squalo ad elevate concentrazioni, ed è presente anche nell'olio di oliva (circa 0,5%).

Sono stati studiati campioni di squalene sintetico commerciale, e una serie di campioni ottenuti per estrazione dal fegato di squalo e dall'olio extravergine di oliva.

Nella Fig. 2 sono riportati un tipico spettro NMR del <sup>1</sup>H dello squalene con l'assegnazione delle risonanze (a) e il corrispondente spettro NMR del <sup>2</sup>H (b).

Per investigare la distribuzione di deuterio lungo la catena dello squalene sono state



**Figura 2. Spettro NMR del  $^1\text{H}$  a 300 MHz (a) e del  $^2\text{H}$  a 46 MHz (b) di un campione di squalene.**

misurate le aree integrate dei segnali del deuterio per i gruppi  $-\text{CH}_2\text{D}$ ,  $-\text{CHD}-$  e  $-\text{CD}=\text{}$  utilizzando una procedura di deconvoluzione. I dati normalizzati sono riportati nella Tab. 2.

Dall'analisi dei dati si può vedere che per tutti i campioni di origine naturale la distribuzione del deuterio in ciascun sito devia dai valori statistici teorici e mostra un arricchimento di deuterio nel sito  $=\text{CD}-$ . Inoltre, per lo squalene di origine vegetale si ha un arricchimento di deuterio nel gruppo metilico e una riduzione nel metilene, mentre un andamento opposto si osserva per i campioni di squalene estratto dal fegato di squalo.

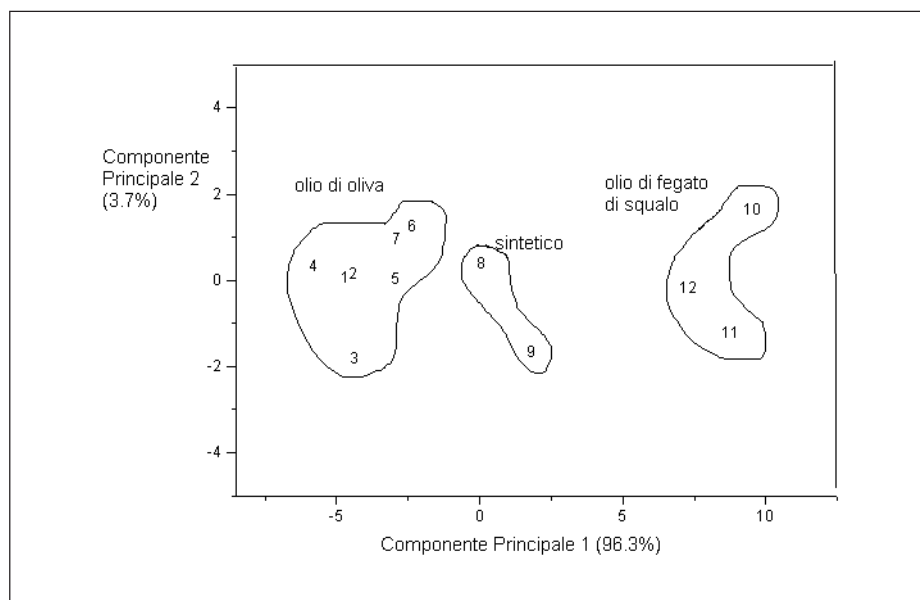
Un confronto del grado di deuterazione dei siti metilici e metilenici dello squalene vegetale con quello riscontrato per i corrispondenti siti trigliceridi (Tab. 1) mostra che le distribuzioni rispettive di deuterio sono caratterizzate da un ordine invertito. Questo risultato non è sorprendente dal momento che la via biosintetica degli acidi grassi si differenzia da quella dello squalene. Infatti, la biosintesi degli acidi grassi è costituita fondamentalmente da due stadi di reazione: l'elongazione e la deidrogenazione delle catene alifatiche; la biosintesi dello squalene invece coinvolge vari stadi di condensazione e riduzione con dislocazione di idrogeno che può redistribuire il deuterio lungo la catena.

Complessivamente questi risultati mettono in evidenza le grandi potenzialità di informazioni che si possono ottenere dall'uso della tecnica SNIF-NMR per elucidare i meccanismi preposti alla sintesi dei prodotti naturali come gli acidi grassi e lo squalene. In particolare, dai dati di distribuzione del deuterio nei siti molecolari, elaborati con il

**Tabella 2. Dati NMR del deuterio per campioni di squalene di diversa origine.**

		$F_i^{(a)}$	CH <sub>2</sub> D 48	CHD 40	CD 12
Olio di oliva	campione				
	1	$f_i^{(a)}$	51,75	35,64	12,61
	2	$f_i$	51,54	35,79	12,67
	3	$f_i$	52,40	36,54	11,06
	4	$f_i$	52,39	34,74	12,87
	5	$f_i$	50,60	36,92	12,48
	6	$f_i$	49,63	36,92	13,45
Sintetico	campione				
	8	$f_i$	48,38	39,00	12,62
	9	$f_i$	48,14	41,02	10,84
Fegato di squalo	campione				
	10	$f_i$	41,38	45,50	13,12
	11	$f_i$	43,20	45,97	10,83
	12	$f_i$	43,74	44,51	11,75

(a)  $F_i$  e  $f_i$  sono normalizzati a 100;  $F_i = P_i/P$  è la frazione molare teorica, dove  $P_i$  è il numero di posizioni equivalenti degli atomi di idrogeno in ciascun sito -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>- e -CH= e  $P$  è il numero stechiometrico di atomi di idrogeno nella molecola;  $f_i = A_i/A$  è la frazione molare osservata, dove  $A_i$  è l'area totale di ciascun gruppo metilico metileno e olefinico e  $A$  è l'area totale dello spettro del deuterio.

**Figura 3. Domini di appartenenza dei campioni di squalene di diversa origine.**

metodo delle componenti principali, è stato possibile riconoscere l'origine animale, vegetale e sintetica dello squalene come efficacemente illustrato in Fig. 3, dove si riconosce l'esistenza di tre domini distinti per i campioni di squalene studiati.

Va infine sottolineato che i dati complessivamente raccolti non sono stati ancora sufficienti per fornire specifiche informazioni sull'origine territoriale dei prodotti naturali fin qui studiati.

#### **BIBLIOGRAFIA**

- [1] A. LAI, M. CASU, G. SABA, F.P. CORONGIU, M.A. DESSI, *Magn. Reson. Chem.* 33, 163-166 e riferimenti ivi inclusi (1995).
- [2] M. DEIANA, F.P. CORONGIU, M.A. DESSI, P. SCANO, M. CASU, A. LAI, *Magn. Reson. Chem.* 39, 29-32 e riferimenti ivi inclusi (2001).