

Verifica degli acidi grassi negli alimenti funzionali e nei cosmetici

Questa nota applicativa descrive l'utilizzo dell'analizzatore Raman istantaneo Metrohm Mira P per l'identificazione e la verifica degli acidi grassi, simili a quelli presenti nei cosmetici o nei nutraceutici. I nutraceutici sono prodotti di derivazione alimentare che pretendono di fornire ulteriori benefici per la salute oltre al valore nutrizionale di base. Mentre l'industria della salute personale si sposta verso trattamenti omeopatici naturali, molti nuovi prodotti riportano vantaggi nell'integrare la dieta con vitamine e acidi grassi, come gli oli che sono fonti di vitamina E

ma non aumentano il colesterolo LDL ("cattivo"). Alcuni nutraceutici sono regolamentati dalla FDA, mentre altri no. Indipendentemente da ciò, per i produttori è importante che i loro prodotti rispettino le normative interne ed esterne. La determinazione dell'identità e della purezza degli ingredienti sono essenziali per la qualità del prodotto e l'ispezione degli ingredienti prima dell'inizio del processo di produzione eviterà costosi ritardi e una qualità del prodotto inferiore agli standard.

INTRODUZIONE

Gli acidi grassi devono essere verificati durante i processi produttivi. Le somiglianze negli acidi grassi possono rendere difficile l'identificazione dell'esatto acido grasso attraverso gli algoritmi di correlazione di Pearson; tuttavia, la verifica del valore p garantisce che nella produzione venga utilizzato il materiale corretto. MIRA P è uno spettrometro Raman portatile progettato per l'identificazione e la verifica rapida e non distruttiva dei campioni. L'identificazione dei campioni comporta la misurazione di uno spettro del campione e la sua correlazione con gli spettri esistenti in una libreria. Il risultato viene quindi visualizzato con una correlazione di Pearson. La verifica dei campioni viene eseguita con un set di addestramento degli spettri che contiene la variabilità accettata tra diversi campioni dello stesso materiale. Il set di addestramento viene analizzato con l'analisi delle

componenti principali (PCA) e riportato come percentuale di probabilità che il campione misurato rientri in un livello di confidenza impostato dall'operatore. In genere, per la verifica dei materiali viene utilizzato un livello di confidenza del 95%. Sebbene siano utili sia l'identificazione da una libreria che la verifica con un set di addestramento, la verifica è in grado di rilevare differenze molto piccole nei campioni. Gli acidi grassi e l'alcol grasso discussi in questa Application Note saranno l'acido laurico ($C_{11}H_{23}CO_2H$), l'acido miristico ($C_{13}H_{27}CO_2H$), l'acido palmitico ($C_{15}H_{31}CO_2H$), l'acido stearico ($C_{17}H_{35}CO_2H$) e l'alcol stearilico ($C_{17}H_{37}OH$). La **Figura 1** mostra gli spettri di questi materiali e le somiglianze spettrali, illustrando la difficoltà di differenziazione sulla sola correlazione.

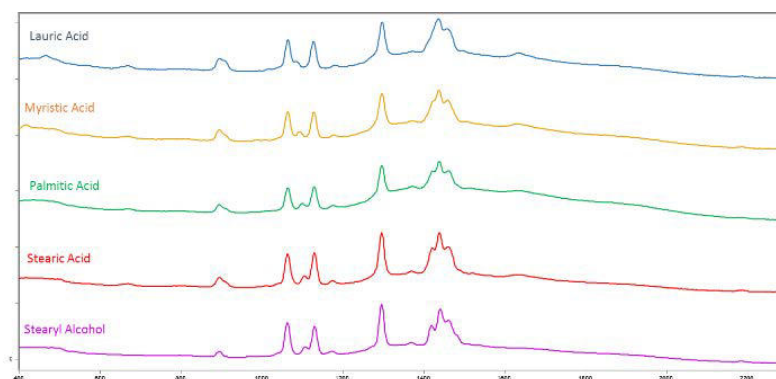


Figure 1. Spettri Raman degli acidi grassi e degli alcol grassi discussi in questa Application Note

ANALISI

Creazione di una procedura operativa (OP)

Nel software MiraCal, selezionare la scheda Procedure operative e creare un nuovo OP "Acidi grassi". I parametri sono impostati su potenza laser 5, media 1 e tempo di integrazione automatica. Acquisisci uno

spettro di ciascun campione con l'OP, nomina attentamente ciascun campione e sincronizza i dati con il database del software MiraCal.

Creazione e test della libreria di acidi grassi

Dai campioni salvati utilizzando l'OP "Acidi grassi", è possibile creare la libreria degli acidi grassi. Selezionare la scheda Librerie e denominare la nuova libreria "Libreria di acidi grassi". Aggiungere i campioni raccolti in precedenza alla "Libreria degli acidi grassi" e salvarli. Successivamente, crea un nuovo OP con il nome "Library Testing" e imposta i parametri su potenza laser 5, media di 1 e tempo di integrazione

automatica. Con la scheda Valutazioni selezionata, spuntare la casella di identificazione e selezionare la "Libreria degli acidi grassi". Salva l'OP "Library Testing" e sincronizzalo con il tuo sistema. Il sistema può ora essere utilizzato per confrontare i campioni con la "Libreria degli acidi grassi". Un esempio di punteggi di corrispondenza per ciascun campione di acidi grassi è illustrato nella **Tabella 1**.

Creazione e test del set di allenamento per gli acidi grassi con valore p

Selezionare l'OP "Acidi grassi" creato nell'esperimento precedente e procedere alla raccolta di circa 20 spettri di ciascun campione di acidi grassi. Una volta terminato, collegare lo strumento al software MiraCal e sincronizzare i dati con il database. Il passaggio successivo consiste nel creare un set di addestramento per ciascun campione. Selezionare la scheda Training Sets nel software e procedere con la creazione di nuovi training set per ciascun materiale inserendo il nome del campione come nome del training set e aggiungendo i ~20 spettri raccolti nel

passaggio precedente. Una volta creati e salvati tutti e 5 i set di formazione, il passaggio successivo consiste nel creare nuovi OP che corrispondono a ciascun set di formazione. Tutti e cinque gli OP avranno gli stessi parametri di acquisizione: integrazione automatica, potenza laser 5 e media impostata su 1. Nella scheda Valutazione dell'OP, selezionare la casella Verifica per ciascun OP e aggiungere il set di formazione corrispondente premendo il pulsante "Imposta Training". Una volta terminato, salvare ciascun OP e

sincronizzare il database del software per aggiungere gli OP al sistema. Ora misura uno spettro di ciascun campione rispetto a ciascun OP. I risultati

Superato/Fallito sono registrati nella **Tabella 2**.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Come abbiamo visto in precedenza, la semplice corrispondenza delle librerie (correlazione di Pearson) non sempre identifica accuratamente il materiale corretto quando nella libreria sono presenti altri

materiali simili. I punteggi di corrispondenza di materiali simili possono differire solo di 0,01-0,03 Hit Quality Index (HQL), che è difficile da interpretare e riduce la confidenza dell'analisi (**Tabella 1**).

Tabella 1. Valori di correlazione di Pearson tra diversi acidi grassi e alcol grasso testati nell'Application Note.

Campione	Valore di correlazione di Pearson	Corrispondenza campione
Acido palmitico	1.00	Acido palmitico
	0.98	Acido miristico
	0.98	Acido stearico
Alcool stearilico	1.00	Alcool stearilico
	0.97	Acido stearico
	0.93	Acido palmitico
Acido laurico	1.00	Acido laurico
	0.98	Acido miristico
	0.95	Acido palmitico
Acido miristico	1.00	Acido miristico
	0.98	Acido palmitico
	0.98	Acido laurico
Acido stearico	1.00	Acido stearico
	0.97	Acido palmitico
	0.95	Alcool stearilico

La verifica misura il campione rispetto al set di addestramento selezionato e, se il campione rientra in quel set di addestramento, si ottiene un risultato positivo ("Superato"). Se il campione non rientra nel set di addestramento, si ottiene un risultato negativo ("Fallito"). Creando modelli di verifica per ciascuno dei campioni di acidi grassi e testando ciascun modello rispetto a ciascun campione, possiamo vedere che lo

strumento è sempre in grado di SUPERARE il campione corretto e FALLIRE campioni simili ma diversi. Inoltre, il risultato della verifica è di facile interpretazione (Tabella 2). Ad esempio, l'acido palmitico passa con una confidenza del 33,1% compresa nell'intervallo di confidenza del 95% impostato.

S A M P L E S	TRAINING SETS					
		Palmitic Acid	Stearyl Alcohol	Lauric Acid	Myristic Acid	Stearic Acid
	Palmitic Acid	PASS 0.331	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000
	Stearyl Alcohol	FAIL 0.000	PASS 0.628	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000
	Lauric Acid	FAIL 0.000	FAIL 0.000	PASS 0.127	FAIL 0.000	FAIL 0.000
	Myristic Acid	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	PASS 0.494	FAIL 0.000
	Stearic Acid	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	PASS 0.365

Tabella 2. Risultati "pass" e "fail" di campioni diversi rispetto al set di addestramento

CONCLUSIONI

L'identificazione è utile quando si identificano campioni che presentano grandi differenze negli spettri, mentre la verifica è utile quando si esaminano campioni con caratteristiche spettrali simili. Per i campioni sconosciuti, la correlazione viene utilizzata per cercare in una libreria di materiali noti per cercare di identificare quello sconosciuto. Quando è

necessario confermare l'autenticità di un campione, la soluzione migliore è la verifica del campione con il valore p. I risultati della verifica "Passato" e "Fallito" forniscono una conferma più sicura di cosa sia il campione, mentre con l'identificazione esiste la possibilità di punteggi elevati di corrispondenza con campioni molto simili tra loro.

CONTACT

Metrohm Italiana Srl
Via G. Di Vittorio, 5
21040 Origgio (VA)

info@metrohm.it

CONFIGURAZIONE



MIRA P Advanced

Metrohm Instant Raman Analyzer (MIRA) P è uno spettrometro raman palmare ad alte prestazioni utilizzabile per determinazione e verifica rapide e non distruttive di svariate tipologie di materiale tra cui principi attivi ed eccipienti farmaceutici. Nonostante le dimensioni ridotte, MIRA P è estremamente robusto e dispone di uno spettrografo ad alta efficienza dotato della tecnologia brevettata ORS (Orbital Raster Scan). MIRA P soddisfa la normativa FDA 21 CFR parte 11.

La configurazione Advanced Package comprende una lente accessoria che permette l'analisi dei materiali diretta o attraverso gli imballi originali (laser classe 3b) e un porta vial per analizzare i campioni contenuti in vial di vetro (laser classe 1).



MIRA P Basic

Metrohm Instant Raman Analyzer (MIRA) P è uno spettrometro Raman palmare ad alte prestazioni utilizzabile per determinazione e verifica rapide e non distruttive di svariate tipologie di materiale tra cui principi attivi ed eccipienti farmaceutici. Nonostante le dimensioni ridotte, MIRA P è estremamente robusto e dispone di uno spettrografo ad alta efficienza dotato della tecnologia unica ORS (Orbital-Raster-Scan). MIRA P soddisfa pienamente le direttive della normativa FDA 21 CFR Part 11.

Il pacchetto MIRA P Basic consente all'utente di adattare lo strumento MIRA P alle sue esigenze. Il pacchetto MIRA Basic è un pacchetto iniziale contenente i componenti fondamentali necessari per il funzionamento di MIRA P.

Il pacchetto base contiene gli accessori per la verifica/calibrazione MIRA, la libreria USP e l'accessorio LWD per l'analisi in flaconi o sacchetti. Uso della classe di protezione laser 3B.



MIRA P Flex

Il MIRA P Flex Package consente all'utente di adattare lo strumento MIRA P alle sue esigenze. Il Flex Package contiene tutti i componenti base per l'utilizzo di MIRA P, ma non gli accessori per la raccolta dei campioni. Per il funzionamento è necessario almeno un accessorio per la raccolta dei campioni. Il MIRA P Flex Package contiene la libreria USP, gli accessori per la calibrazione/verifica e un cavo USB. Funzionamento con classe 3B.