

## **Impiego della Risonanza Magnetica Nucleare a bassa risoluzione nella scienza e tecnologia degli alimenti**

Brosio E., Chiacchierini E., Conti F., Lintas C., Sykora S.

Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione **7**, 309-314 (1978)

Questa copia, scannerizzata da un reprint, è intesa per il solo uso personale.  
Altri utilizzi richiedono il permesso della *Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione*.

Altri lavori di Stan Sykora si trovano sul sito [www.ebyte.it](http://www.ebyte.it)

Un articolo introduttivo risalente ai tempi dei primi tentativi di promozione della RMN a bassa risoluzione nel campo agroalimentare.

[An introductory article from the period of first attempts to promote low-resolution NMR in the field of food science and technology]

## Impiego della risonanza magnetica nucleare a bassa risoluzione nella scienza e tecnologia degli alimenti

### Introduzione

In un esperimento NMR ad impulsi i momenti magnetici nucleari vengono eccitati mediante un impulso di radiofrequenza (rf) della durata di alcuni  $\mu\text{sec}$ . Al termine dell'impulso i momenti magnetici nucleari danno luogo ad un segnale di decadimento della magnetizzazione chiamato « decadimento libero dell'induzione magnetica » (« *free induction decay* » o FID) in quanto ottenuto in assenza del campo a rf. La durata del FID dipende dallo stato fisico del campione variando dalle decine di  $\mu\text{sec}$  per campioni solidi ad alcuni secondi per campioni liquidi (tale limite in un esperimento a bassa risoluzione è dato naturalmente dall'omogeneità del campo magnetico statico  $H_0$ ).

In figura 1 è riportato il FID di un campione di farina.

Per notizie più dettagliate si rimanda a precedenti note che descrivono i principi fondamentali della risonanza magnetica nucleare (1) e della tecnica ad impulsi (2) ed alla letteratura specializzata (3).

Vediamo innanzitutto quali siano le informazioni ottenibili dall'analisi del FID.

#### Misura dell'ampiezza del FID

Dopo un impulso a  $90^\circ$  l'ampiezza del FID è proporzionale al numero totale di idrogeni per unità di volume presenti nel campione.

Tale parametro può quindi essere impiegato per determinare il contenuto totale di idrogeno nei prodotti in esame, per seguire processi di idrogenazione ed in generale tutte quelle trasformazioni chimico-fisiche in cui il contenuto di idrogeno gioca un ruolo significativo.

#### Misura della velocità di decadimento del FID

In pratica la misura dei tempi di rilassamento longitudinale  $T_1$ , e trasversale  $T_2$  (2,3). E' bene innanzitutto sottolineare che sia  $T_1$  che  $T_2$  possono essere usati per la caratterizzazione di un sistema chimico-fisico al pari di altri parametri quali densità, peso specifico, punto di fusione, ecc. Inoltre i tempi di rilassamento sono parametri particolarmente significativi e *sensibili* nel caso di monitoraggio di processi che av-

vengono con variazioni di mobilità intrinseca delle molecole.

Una non esponenzialità delle curve di rilassamento consente anche di distinguere tra due fasi solide o due fasi liquide. In fig. 2 è riportata la curva di decadimento dell'eco di Hahn dell' $H_2O$  in un campione di farina umidificato.

Il decadimento dell'eco (misurato con una sequenza di impulsi  $90^\circ, \tau, 180^\circ$ ) presenta una non esponenzialità dovuta alla presenza di due tipi di acqua con tempi di rilassamento notevolmente diversi. L'acqua legata alla matrice solida infatti, presenta una mobilità fortemente ridotta con conseguente diminuzione del tempo di rilassamento trasversale ( $T_2 = 1,5$  msec.). L'acqua libera invece decade con un tempo di rilassamento notevolmente più lungo ( $T_2 = 25,0$  msec). Per estrapolazione della componente che decade più lentamente si ottiene un valore proporzionale alla quantità di acqua libera; il valore iniziale è invece proporzionale alla quantità totale di acqua. Nel caso riportato in fig. 2 la percentuale di acqua legata risulta pari al 65,0%. In alcuni casi è possibile indurre tale non esponenzialità nelle curve di rilassamento in modo che possa essere sfruttata ai fini di un'analisi quantitativa. Ciò può essere fatto mediante l'aggiunta al campione di sali paramagnetici o variando la temperatura, in modo da alterare selettivamente i tempi di rilassamento di una delle due componenti.

#### Analisi della forma del FID

In pratica le informazioni ottenibili sono dovute all'effetto combinato dei due parametri precedentemente visti. La forma del FID può essere utilmente sfruttata nel caso che questo contenga due componenti le cui velocità di decadimento siano molto diverse. Tale situazione si presenta, ad esempio, in un campione contenente due fasi, una solida ed una liquida. In questo caso, estrapolando il segnale al termine dell'impulso, si ottiene un valore che è proporzionale al contenuto totale di idrogeno. Misurando invece il segnale dopo un tempo sufficientemente grande perché il segnale del solido sia già decaduto, ma non troppo grande perché si noti il decadimento del segnale della fase liquida, si ottiene un valore proporzionale al contenuto di idrogeno in fase liquida. Confrontando i due valori si ricava il rapporto solido/liquido del campione.

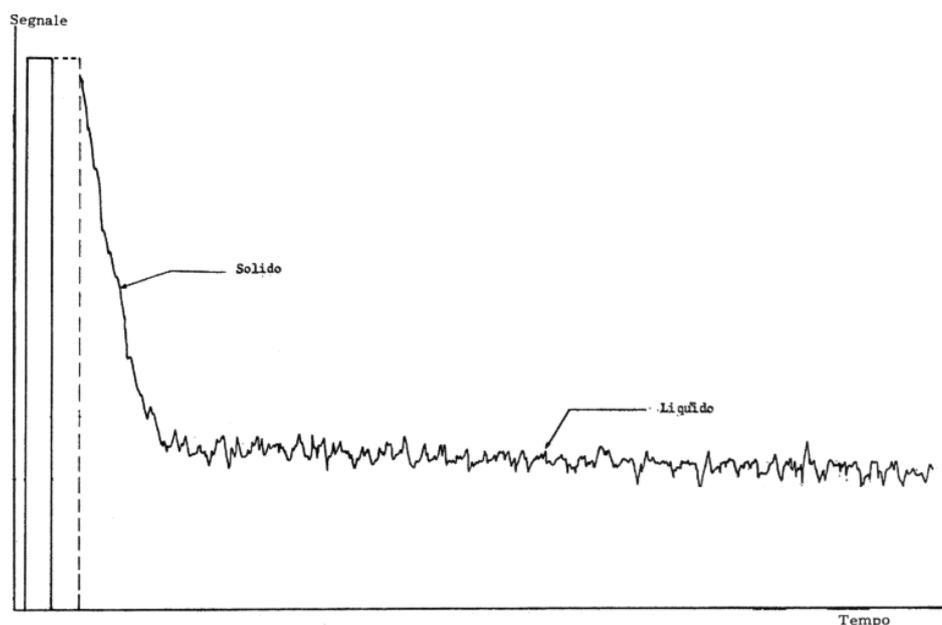


Fig. 1 - FID di un campione di farina.

Il rapporto solido/liquido può essere impiegato per la misura del contenuto di olio in semi, misura del contenuto di acqua in prodotti vari, misura delle curve di fusione e/o solidificazione dei grassi, monitoraggio di tutte le trasformazioni chimico-fisiche che portano ad un cambiamento nello stato di aggregazione del campione.

L'applicazione del metodo risulta limitata se sono presenti nel campione più fasi solide e/o liquide. In questo caso si può ricorrere a: variazioni di temperatura per distinguere componenti del sistema con diversa temperatura di fusione; rimozione di una delle due fasi per essiccazione o estrazione; uso di sostanze che legano una delle due fasi liquide in una matrice solida; uso dello scambio con  $D_2O$  per eliminare il segnale dell' $H_2O$  senza rimuoverla chimicamente.

## Applicazioni

### Determinazione del contenuto di solido nei grassi

Il contenuto di fase solida è un parametro molto importante nella industria dei grassi alimentari.

Tale parametro viene infatti impiegato nel controllo dei processi di idrogenazione e interesterificazione come pure nel controllo di alcune importanti proprietà tecnologiche di margarine.

Il metodo generalmente accettato per la determinazione del rapporto solido/liquido di un grasso è quello dilatometrico. Tale metodo è però, laborioso e richiede un tempo di misura abbastanza lungo. La tecnica NMR ad impulsi consente invece una determinazione del rapporto solido/liquido molto rapida e completa-

mente automatizzata (la percentuale di solido appare direttamente su un voltmetro digitale) e può quindi essere impiegata in analisi in continuo (4). La determinazione del rapporto solido/liquido mediante la tecnica NMR ad impulsi si basa, come abbiamo già detto, sul fatto che la magnetizzazione dovuta alla componente solida del campione decade molto più rapidamente (in un tempo dell'ordine di grandezza delle decine di  $\mu\text{sec}$ ) di quella liquida (alcuni msec). In fig. 3 è riportato in modo schematico il FID di un campione di margarina. Misurando l'altezza del segnale al tempo  $G_T$  dopo l'impulso a  $90^\circ$  si ottiene un valore,  $T$ , proporzionale al contenuto totale di idrogeni presenti nel campione. Misurando invece l'altezza del segnale al tempo  $G_L$ , sufficientemente lungo affinché la componente solida sia completamente decaduta, ma non troppo lungo affinché non si osservi un decadimento apprezzabile della componente liquida, si ottiene un valore,  $L$ , proporzionale al contenuto di idrogeni in fase liquida. Valori caratteristici dei tempi  $G_T$  e  $G_L$  sono 10  $\mu\text{sec}$  e 100  $\mu\text{sec}$  rispettivamente.

Il segnale NMR non può essere misurato immediatamente dopo l'impulso a  $90^\circ$  ( $G_T=0$ ) perché, a causa della notevole potenza dell'impulso di radiofrequenza, il ricevitore del segnale risulta inibito per un certo tempo (tempo morto). Il valore  $\bar{T}$  va quindi corretto mediante un coefficiente empirico  $f$ , che tenga conto del decadimento della magnetizzazione durante il tempo morto del ricevitore. Tale coefficiente di estrapolazione  $f$  dipende dal tipo di solido e dal valore del tempo di misura  $G_T$ . La percentuale di solido del campione risulta quindi

$$\% S = \frac{f(\bar{T} - L)}{f(\bar{T} - L) + L} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

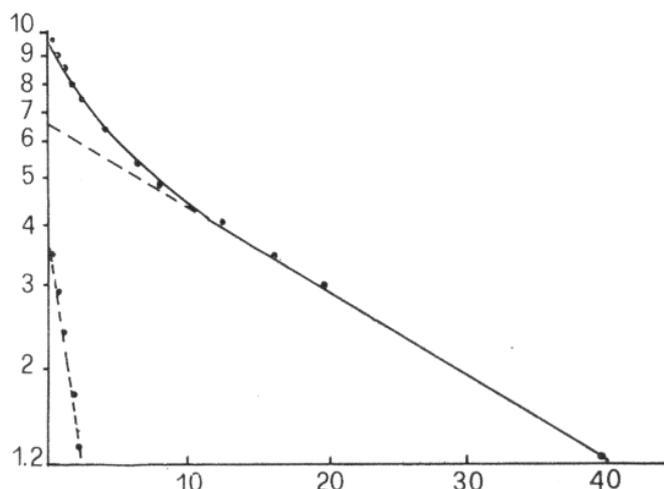


Fig. 2 - Decadimento dell'eco di Halm per un campione umidificato di farina.

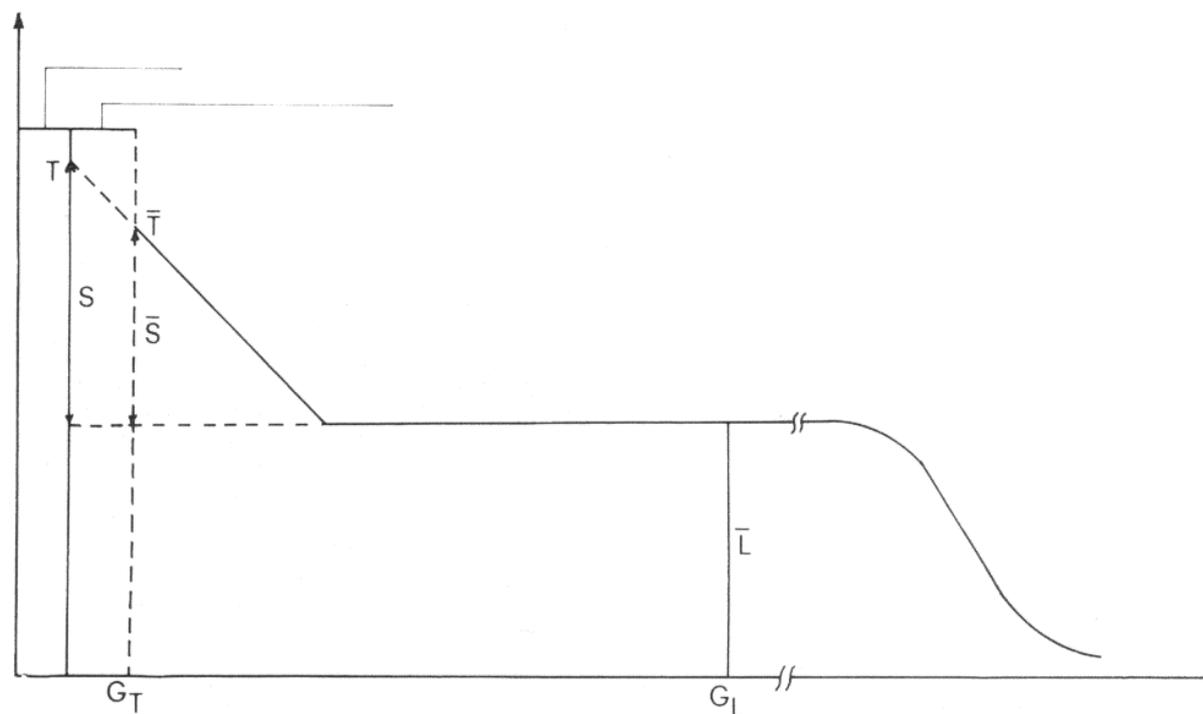


Fig. 3 - FID di un campione di margarina.

Il valore del fattore  $f$  può essere determinato usando come riferimento un metodo di misura indiretto. Tale metodo consiste nel misurare l'altezza del segnale dovuta al liquido alla temperatura di misura, portare il campione ad una temperatura cui sia tutto liquido e ripetere la misura. La percentuale di liquido (e/o solido) così ottenuta viene quindi impiegata per il calcolo di  $f$ .

Il valore di  $f$  si è visto essere dipendente, per lo stesso tipo di grasso e per lo stesso valore del tempo di misura  $G_T$ , anche dalla percentuale di fase solida del campione per cui per il calcolo della eq. 1) può essere impiegata una procedura iterativa partendo con un valore arbitrario di  $f$ , fino ad avere valori consi-

stenti della %  $S$ . La deviazione standard della misura risulta pari allo 0,5%.

#### Determinazione del contenuto di acqua nel latte in polvere e nella cagliata scremata

Il contenuto di acqua gioca un ruolo determinante nelle proprietà chimico-fisiche e biochimiche e nel processo di conservazione di molti alimenti. Per il latte in polvere è opportuno mantenere il contenuto di acqua tra il 2% ed il 5%. Per molti alimenti invece la legge prescrive un contenuto massimo di acqua: per la crema di formaggio tale limite è pari all'80%.

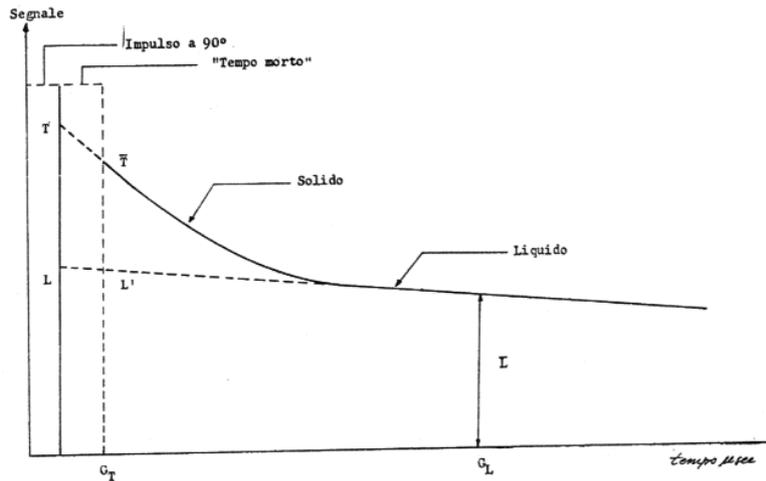


Fig. 4 - FID di campione di farina.

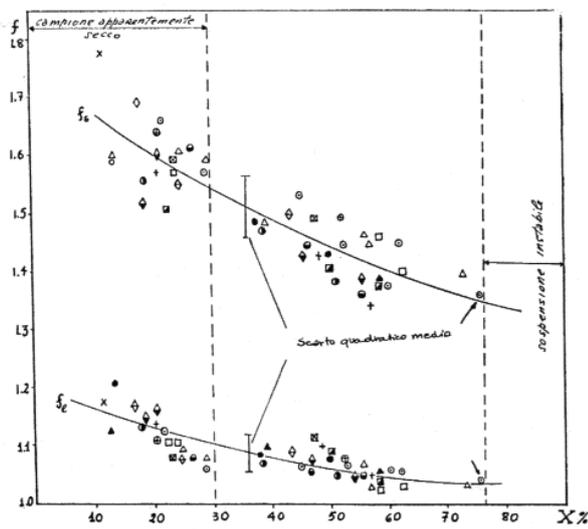


Fig. 5 - Coefficienti di estrapolazione  $f_s$  e  $f_l$  per campioni differenti in funzione del contenuto percentuale di umidità,  $X\%$  ( $C_T = 9 \mu \text{ sec.}$ ) ( $C_L = 90 \mu \text{ sec.}$ ).

- |                             |                           |
|-----------------------------|---------------------------|
| ● Farina grano tenero       | △ Farina grano duro       |
| ● Pasta (100% grano tenero) | ▲ Pasta (100% grano duro) |
| □ Farina riso               | ■ Riso macinato           |
| ◇ Farina granturco          | ○ Orzo macinato           |
| ● Fecola di patate          | ■ Fagioli macinati        |
| ◇ Lenticchie                | + Pasta glutinata         |
| × Grissini                  | ● Pane                    |

Anche nella determinazione del contenuto di acqua in questo tipo di prodotti la tecnica NMR ad impulsi (5) si pone come tecnica alternativa rispetto alle tecniche tradizionali quali quella di essiccamento sottovuoto generalmente impiegata (tempi di misura dell'ordine di grandezza delle ore).

Per la misura del contenuto di acqua nel latte in polvere si è misurata l'altezza del segnale NMR dopo un impulso a  $90^\circ$  per tempi sufficientemente lunghi ( $\sim 100 \mu \text{ sec}$ ) affinché la componente del segnale dovuta al solido fosse decaduta completamente. Tale misura è risultata ben correlata con il contenuto di acqua

determinato mediante il metodo indipendente dell'essiccamento sotto vuoto. Per aumentare il valore del rapporto segnale/rumore, tipicamente basso per campioni polverizzati, successive misure sono state accumulate e mediate. Ciò ha comunque lasciato inalterata la caratteristica di rapidità del metodo: per l'accumulo e la media di 180 misure è necessario un tempo totale di misure di 72 sec. La deviazione standard delle misure riportate (segnale NMR vs. contenuto di acqua) è risultata pari allo 0,20%.

Per la determinazione del contenuto di acqua nella cagliata scremata la misura del segnale NMR dopo un impulso a  $90^\circ$  è risultata poco sensibile alle variazioni del contenuto di acqua. Al contrario per questi intervalli di concentrazione di  $H_2O$  ( $70 \div 80\%$ ) il contenuto di acqua è risultato correlato alla ampiezza dell'eco di spin ottenuto con una sequenza di impulsi  $90^\circ, \tau, 180^\circ$ . Riportando in grafico il valore dell'ampiezza dell'eco per un valore di  $\tau = 15 \text{ msec}$  normalizzato rispetto all'ampiezza del segnale dopo un impulso a  $90^\circ$  (la normalizzazione viene effettuata per avere delle misure indipendenti dal peso del campione) contro il contenuto di acqua si ottiene una correlazione lineare con deviazione standard pari a 0,38%. Il valore del rapporto segnale/rumore in questo tipo di misure non ha reso necessario il processo di accumulo e di media. I risultati ottenuti sono dipendenti dalla temperatura per cui occorre una preequilibratura del campione alla temperatura del probe.

#### Determinazione del contenuto di acqua in alimenti ricchi di amido

La determinazione del valore del rapporto solido/liquido è stata impiegata per la misura del contenuto di umidità in sostanze in cui la fase liquida è costituita da acqua (contenuto di olio  $\sim 1\%$ ) e la fase solida è costituita essenzialmente da amido (6). Le sostanze esaminate sono: farina, semola, farina di granturco, farina di riso, riso intero, orzo intero, fecola di patate, lenticchie, fagioli, pasta di semola e di farina, pasta glutinata e differenti tipi di pane. In fig. 4 è riportato in maniera schematica il FID di un campione di farina. La misura del contenuto di acqua si basa sulla misura delle altezze del segnale  $\bar{I}$  e  $\bar{L}$  a due opportuni tempi

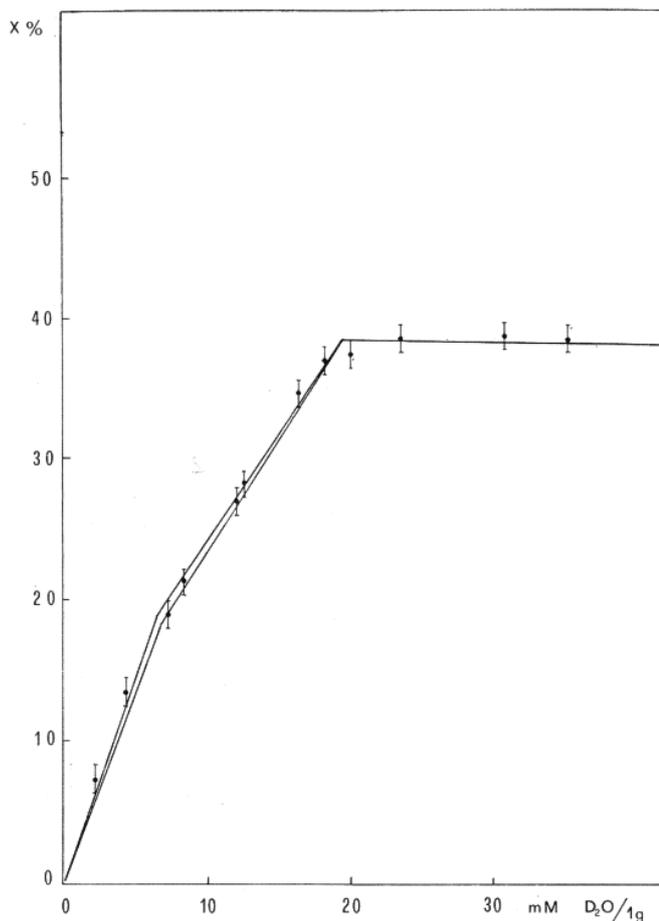


Fig. 6 - Dipendenza della percentuale di fase liquida della quantità di  $D_2O$  aggiunta.

┆ Punti sperimentali; — Punti calcolati.

$G_T$  e  $G_L$ . Come si vede la componente della magnetizzazione dovuta alla fase liquida decade in modo insolitamente veloce indicando una drastica diminuzione di mobilità dell'acqua legata alla matrice amilacea. Per la determinazione del contenuto di acqua,  $X$ , occorrerà quindi estrapolare alla fine dell'impulso sia il valore del segnale  $\bar{T}$ , letto al tempo  $G_T$  che quello  $\bar{L}$ , letto al tempo  $G_L$ . I valori dei coefficienti di estrapolazione  $f_s$  ed  $f_L$  dipendono dalla natura della fase solida e liquida e dalla posizione dei tempi di misura  $G_T$  e  $G_L$  rispettivamente. I valori dei coefficienti  $f_s$  ed  $f_L$  sono stati ricavati per estrapolazione grafica effettuata registrando l'intero FID. Questo è senz'altro il metodo più diretto ed accurato. I risultati ottenuti, mentre non hanno indicato una differenza del valore dei coefficienti di estrapolazione nelle diverse sostanze esaminate (la matrice solida è essenzialmente la stessa) hanno mostrato una dipendenza del valore dei coefficienti  $f_s$  ed  $f_L$  dal contenuto di umidità del campione (fig. 5). Il calcolo del contenuto di umidità  $X$  è stato effettuato mediante la relazione

$$X = \frac{f_L \bar{L}}{f_L \bar{L} + f_s (\bar{T} - L')} \quad (\text{Eq. 2})$$

usando una procedura iterativa.

Per un valore arbitrario di  $X$  vengono calcolati, mediante i dati riportati in fig. 5, i valori dei coefficienti  $f_s$  ed  $f_L$  che vengono impiegati per il calcolo di  $X$  mediante la (eq. 2). Tale procedimento viene ripetuto fino ad avere un valore consistente di  $X$ .

Per poter usare la tecnica NMR come metodo indipendente per la misura del contenuto di acqua occorre trasformare il contenuto di acqua,  $X$ , misurato in termini di contenuto di idrogeno in contenuto di acqua misurato in termini di peso del campione,  $W$ . Tali grandezze risultano correlate infatti:

$$X = \frac{\alpha A}{\alpha A + \beta B}; \quad W = \frac{A}{A + B}$$

dove  $A$ : contenuto in grammi di fase liquida

$B$ : contenuto in grammi di fase solida

$\alpha$  e  $\beta$ : abbondanza di idrogeno nelle due fasi per cui:

$$W = \frac{X}{X + k(1 - X)} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\text{dove } K = \frac{\alpha}{\beta}$$

Conoscendo  $k$ , il valore di  $W$  può essere ricavato dalla misura di  $X$ .

Il valore di  $k$  può essere ricavato mediante il « metodo dell'aggiunta standard » in cui una nota quantità di  $H_2O$  viene aggiunta al campione e dall'aumento del valore di  $X$  si misura il valore di  $k$  mediante la relazione

$$k = \frac{1}{m} \left[ \frac{1}{(1 - X^1)} - \frac{1 + mX}{(1 - X)} \right] \quad (\text{Eq. 4})$$

dove  $X^1$  è il valore di  $X$  dopo l'aggiunta standard. Dalla misura dei due valori  $\bar{T}$  ed  $\bar{L}$  effettuata dallo strumento si può misurare il valore del contenuto di acqua per peso di campione facendo uso delle Eqs. 3 e 4.

L'intero procedimento può essere automatizzato e facendo uso di un calcolatore tascabile richiede un tempo di misura complessivo di 30 sec.

Un'altra interessante applicazione della tecnica NMR ad impulsi consiste nello studio dell'interazione tra molecole di acqua e matrici solide. Abbiamo già visto come una non esponenzialità della curva di decadimento dell'eco consenta di determinare la quantità relativa di acqua libera e legata in un campione di farina. Uno studio del legame tra acqua e diverse matrici solide quali amido, cellulosa, alginato di sodio e pectina basato sulla misura di  $T_2$  è già riportato in letteratura (7).

Il valore di  $T_2$  è risultato aumentare in funzione del contenuto di  $H_2O$  per tutti i campioni. In corrispondenza dello stesso contenuto di  $H_2O$  i valori di  $T_2$  per la cellulosa sono risultati eccezionalmente lunghi rispetto alla pectina e all'alginato di sodio indicando una minor forza del legame tra acqua e matrice solida. Le curve di decadimento dell'eco per campioni di amido mostrano inoltre una non esponenzialità indicando la presenza di due tipi di acqua con differente mobilità.

Recentemente (8) è stato presentato un metodo che consente una descrizione abbastanza dettagliata del contenuto e del comportamento degli « idrogeni scambiabili » di una matrice solida, intendendo per idrogeni scambiabili quelli appartenenti a gruppi funzionali (COOH,  $NH_2$ , OH) e quelli appartenenti a molecole di acqua di cristallizzazione.

Il metodo si basa sullo scambio chimico degli idrogeni appartenenti ad una matrice solida mediante l'aggiunta di una quantità nota di  $D_2O$  in modo che essi appaiano come « mobili » ovvero contribuiscano alla componente del FID che decade lentamente (componente liquida). Un'ovvia applicazione di tale metodo è la determinazione del contenuto totale di idrogeni scambiabili presenti nel campione.

La percentuale di idrogeni resi « mobili » dipende chiaramente dalla quantità di  $D_2O$  aggiunta.

Tale dipendenza è sensibile al modo con cui l'acqua interagisce con la matrice solida e consente di distinguere tra differenti tipi di idrogeni scambiabili e di ottenere informazioni sul meccanismo di idratazione.

In fig. 6 è riportata la dipendenza della percentuale di idrogeni mobili dalla quantità di  $D_2O$  in moli per grammo di materiale anidro per un campione di semola la cui matrice solida è costituita essenzialmente da amido.

La curva sperimentale è stata interpretata sulla base di un modello basato sul concetto di siti di idratazione ed ha consentito una descrizione sofisticata del

tipo di siti di idratazione e della loro quantità relativa.

Un'altra possibilità che il metodo offre consiste nel seguire le cinetiche in quei casi in cui la velocità di scambio è abbastanza lenta (con tempi dell'ordine di secondi). Tali studi possono essere interessanti nello studio dell'assorbimento e della diffusione dell'acqua in sostanze solide tipo legno, minerali, semi etc.

## Bibliografia

1. E. Brosio, M. Paci, C. Lintas, Introduzione alla Risonanza Magnetica Nucleare Riv. Soc. It. Sci. Alim. (1977) 1, 9.
2. E. Brosio, A. Di Nola, M. Paci, Risonanza Magnetica Nucleare ad Impulsi Riv. Soc. It. Sci. Alim. (1978).
3. Farrar T.C., Becker E.D., Pulsed and Fourier Transform NMR Academic Press (1971).
4. Van Putte K., and Van den Enden J., Fully Automated Determination of Solid Fat Content by Pulsed NMR J. Am. Oil Chem. Soc. (1974) 51, 316.
5. Hester R.E., and Quine D.E.C., Quantitative analysis of food products by pulsed NMR. I. Rapid determination of water in skim milk powder and cottage cheese curds J. Fd. Technol. (1976) 11, 331.
6. E. Brosio, F. Conti, C. Lintas and S. Sykora, Moisture determination in starch-rich food products by pulsed nuclear magnetic resonance J. Fd. Technol. (1978) 13, 107.
7. Leung H.K., Stenberg M.P., Wei L.S. and Nelson A.I., Water binding to macromolecules J. Food Science (1976) 41, 297.
8. E. Brosio, F. Conti, M. Paci, S. Sykora Low resolution, Pulsed NMR studies of water binding and of exchangeable hydrogen content in solids J. of Magnetic Resonance (submitted).