



## Caratterizzazione dei profili volatili di vini: le potenzialità della cromatografia bidimensionale abbinata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione

### Introduzione

I vini sono caratterizzati dalla presenza di numerosi composti volatili che incidono in modo significativo, sia in positivo che in negativo, sulle proprietà organolettiche.

La composizione della frazione volatile è infatti tra i fattori cruciali che determinano gli attributi sensoriali del prodotto finale, influenzandone in modo diretto la qualità. Una metodologia analitica che dia la possibilità di caratterizzare, nell'ambito del controllo della qualità, l'insieme dei composti volatili in modo accurato e dettagliato è quindi auspicabile. Ciò ha infatti il potenziale, in combinazione all'ausilio di tecniche olfattometriche, di identificare i composti responsabili di gusto e aroma del vino e correlarne la presenza con fattori quali tipologia di uva, origine geografica, clima, lavorazione, etc. Dal punto di vista analitico ciò presenta delle difficoltà a causa dell'elevato numero di composti presenti, nell'ordine delle diverse centinaia, appartenenti a molteplici classi chimiche (alcoli, aldeidi, esteri di acidi grassi, etc.).

La gascromatografia bidimensionale comprensiva (GC×GC) rappresenta una scelta strategica in termini di potere di separazione grazie all'utilizzo di due colonne analitiche indipendenti, e quindi due differenti selettività, in un'unica analisi. Questo approccio permette di ridurre notevolmente il numero di co-eluzioni e separare con efficacia un numero superiore di analiti, distribuendo gli stessi in un piano bidimensionale (2D) secondo una precisa logica chimica disciplinata dalle loro proprietà chimico-fisiche.

In questa nota applicativa miriamo ad illustrare l'eccellente potenzialità della GC×GC basata su modulazione termica abbinata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) nell'ottica di identificare, in modo possibilmente univoco, gli analiti volatili presenti nel vino.

Nell'ambito di questo lavoro si è utilizzato un gascromatografo Agilent 7890B equipaggiato di modulatore termico con azoto liquido come refrigerante (ZXI loop-type thermal modulator - Zoex Corporation) in combinazione con un rivelatore 7200B QTOF Agilent utilizzato in full scan. I dati 2D sono stati visualizzati ed elaborati utilizzando il pacchetto software GC Image HR (Zoex Corporation).



*Sopra: Sistema di ultima generazione Agilent GC×GC-QTOF completo di modulatore termico Zoex*

### La tecnica GC×GC con modulazione termica

Il motore del sistema è l'interfaccia posizionata tra le due colonne, il modulatore. Questa accumula, focalizza e re-inietta in modo rapido frazioni dell'eluente dalla colonna primaria (1D) nella colonna secondaria (2D), dove avviene un ulteriore processo separativo. Ciò si ripete per tutta la durata della corsa cromatografica, in modo continuo ed intermittente, secondo un tempo definito nell'ordine di pochi secondi detto periodo di modulazione. Il principio di

operazione basato su una duplice focalizzazione criogenica, con conseguente rimobilizzazione termica delle molecole, permette di minimizzare la banda di re-iniezione e generare dei picchi estremamente stretti, massimizzando la risoluzione cromatografica. Una scelta adeguata di fasi stazionarie e geometria delle colonne permette di ottimizzare l'efficacia della tecnica e il numero di picchi 2D che possono venire separati nello spazio cromatografico.

### La spettrometria di massa ad alta risoluzione

Il rivelatore Agilent QTOF fornisce dati spettrali a massa accurata ad alta risoluzione che permettono di discriminare tra ioni con la stessa massa nominale ma una massa esatta differente. I valori di massa esatta, con accuratezza fino alla quarta cifra decimale, sono usati per generare con un alto grado di precisione formule con composizioni elementari compatibili.

I match suggeriti dalla ricerca con libreria possono essere confermati, o confutati, dall'effettiva o mancata corrispondenza tra le formule delle molecole proposte e quelle generate dalla massa esatta acquisita sperimentalmente. In questo modo si può aumentare notevolmente la fiducia nell'identificazione.

### La piattaforma GC×GC-QTOF e i profili volatili

La tecnica GC×GC-QTOF è una soluzione di comprovato valore per la caratterizzazione in modo efficace e dettagliato di miscele (semi-)volatili. Risoluzione e selettività tipiche delle separazioni 2D, che permettono di ridurre le co-eluzioni e quindi ottenere un numero maggiore di spettri puliti, sono la base ideale per sfruttare a pieno la capacità identificativa dell'alta risoluzione.

In Figura 1 e 2 risulta evidente come il potere separativo della piattaforma permetta di ottenere una separazione altamente informativa delle complesse frazioni volatili dei vini in esame, qui campionate tramite tecnica SPME in spazio di testa. La risoluzione ottenuta sulla fase stazionaria polare della colonna secondaria agisce da eccellente valore aggiunto rispetto alla separazione ottenuta sulla prima dimensione non-polare.

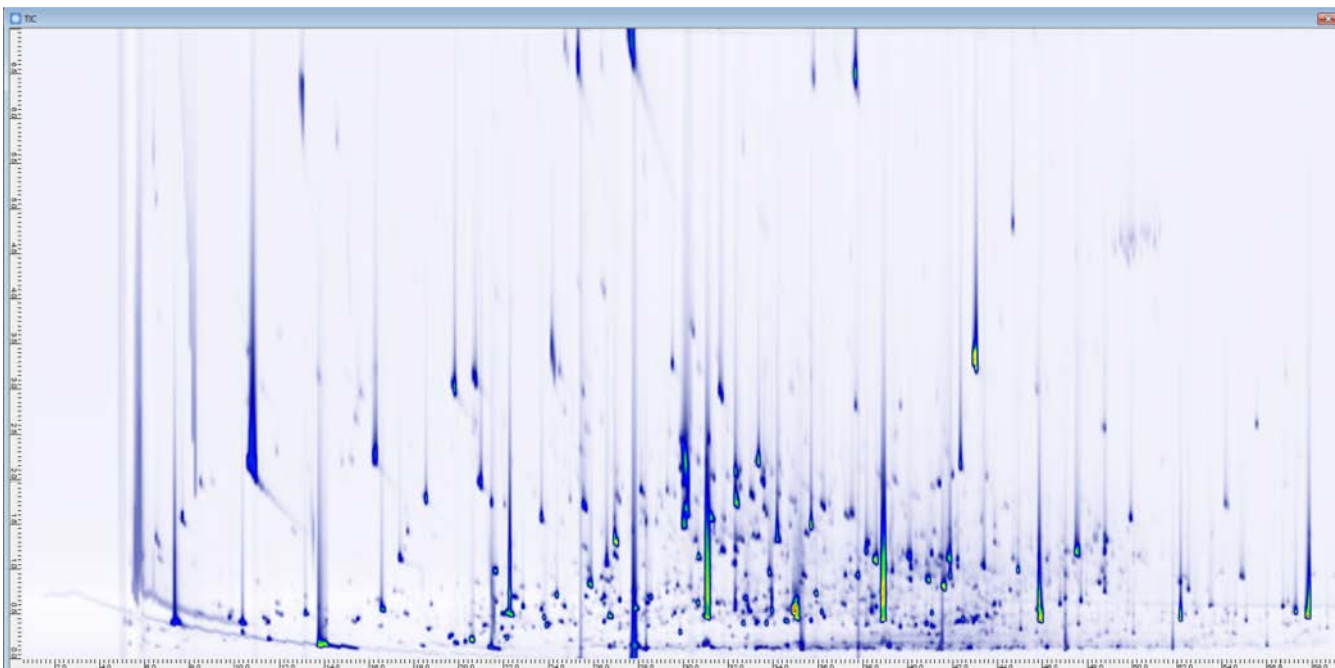


Figura 1 - Cromatogramma 2D ottenuto tramite analisi HS-SPME-GC×GC-QTOF per un campione di vino

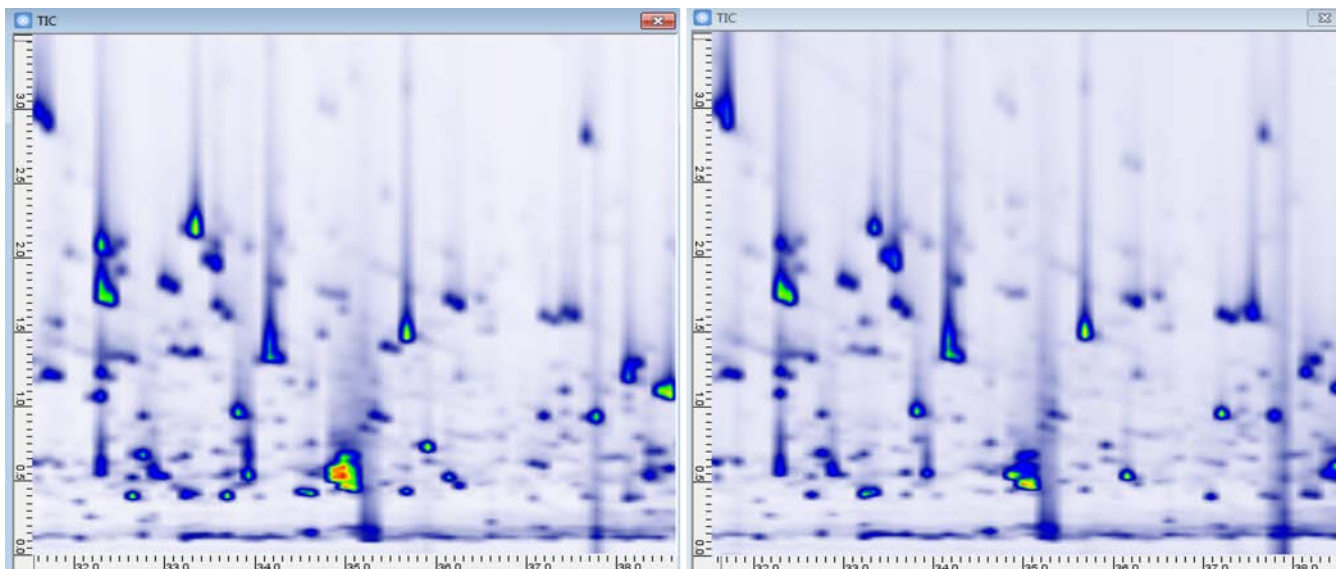


Figura 2 - Dettaglio di un'area complessa per due vini differenti. Le immagini 2D possono essere usate per analisi fingerprinting

I pattern di picchi 2D, grazie alla loro complessità e peculiarità, sono ideali per analisi di tipo fingerprinting. Essi permettono di individuare similitudini e differenze, anche minori, in modo rapido ed efficace attraverso una comparazione prettamente visiva. Un esempio del valore aggiunto fornito dall'alta risoluzione per la conferma dell'identità, di particolare efficacia in presenza di eteroatomi (O, N, S, etc.), è mostrato nelle Tabelle 1 e 2. Qui si dà riscontro, rispettivamente, della verifica di massa sullo ione molecolare per composti solforati con possibile impatto sull'aroma e della stessa valutazione per molteplici frammenti presenti dello spettro del picco identificato come acido dodecanoico, un composto odorifero con impatto negativo sull'aroma.

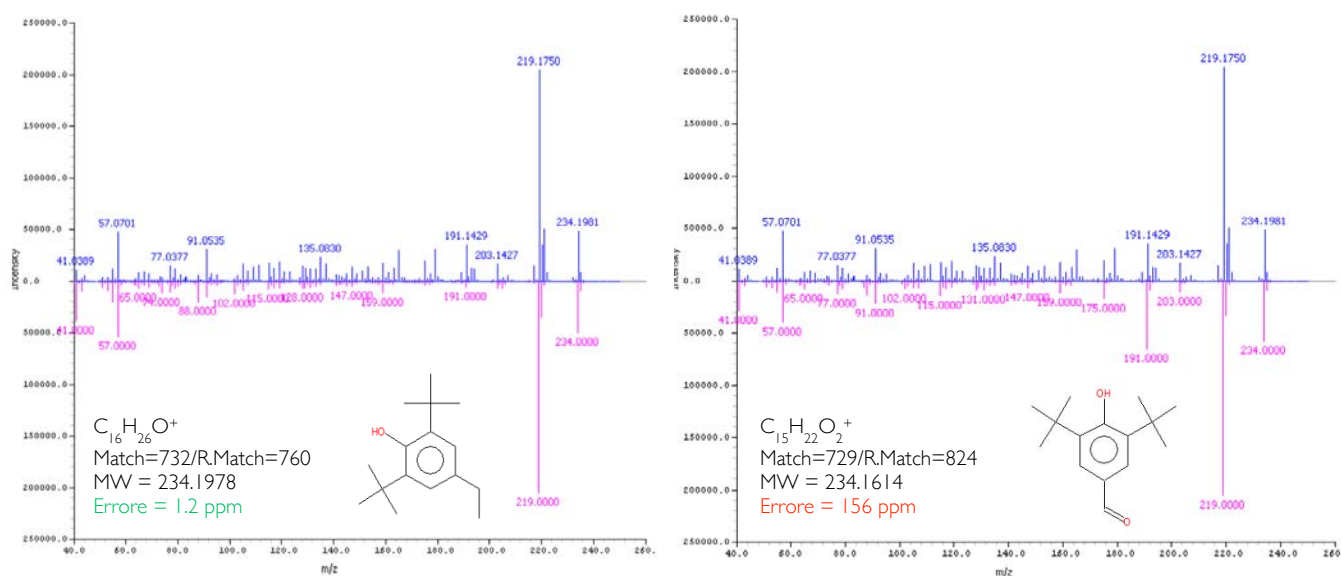
Composto	Formula	Massa teorica	Syrah			Merlot		
			Massa Sperimentale	Differenza (mmu)	Errore (ppm)	Massa Sperimentale	Differenza (mmu)	Errore (ppm)
Dimethyl disulfide	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> S <sub>2</sub> <sup>+</sup>	93.9905	93.9908	0.27	2.9	93.9903	-0.20	2.1
Methyl ethyl disulfide	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> S <sub>2</sub> <sup>+</sup>	108.0062	108.0059	-0.30	2.8	108.0059	-0.28	2.6
1,3-Oxathiane	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> OS <sup>+</sup>	104.0290	104.0293	0.26	2.5	104.0285	-0.53	5.1
3(2H)-Thiophenone, dihydro-2-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> S <sup>+</sup>	116.0290	116.0292	0.14	1.2	116.0291	0.06	0.5

**Tabella 1** - Esempi di valutazione della massa accurata per lo ione molecolare di composti solforati. La massa esatta è estratta all'apice del picco bidimensionale

Ione (m/z)	Formula	Massa teorica	Massa Sperimentale	Differenza (mmu)	Errore (ppm)
200 (M <sup>+</sup> )	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	200.1771	200.1768	-0.25	1.3
171	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	171.1380	171.1382	0.25	1.5
157	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	157.1223	157.1227	0.41	2.6
143	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	143.1067	143.1070	0.36	2.5
129	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	129.0910	129.0914	0.40	3.1
115	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	115.0754	115.0757	0.30	2.6
101	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	101.0597	101.0597	<0.01	<0.1

**Tabella 2** - Valutazione multi-frammento della massa accurata per il picco identificato come acido dodecanoico, un composto odorifero con impatto negativo sull'aroma. Le formule associate ai frammenti sono determinate, tenendo conto della struttura molecolare, tramite la funzione MS Interpreter di NIST

In Figura 3 viene presentato un esempio di spettro con identificazione potenzialmente ambigua tramite libreria. I due primi possibili match, entrambi di peso molecolare nominale 234 m/z, hanno profilo spettrale ed indici di ritenzione simili. L'alta risoluzione è in grado di discriminare tra le formule proposte, con semplicità ed in maniera univoca, grazie alla capacità di differenziare la massa dei gruppi funzionali aldeidico (CHO<sup>+</sup>, 29.0022 m/z) ed etilico (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub><sup>+</sup>, 29.0386 m/z).



**Figura 3** - Esempio di identificazione ambigua tramite libreria (NIST) risolta grazie alla massa accurata ad alta risoluzione



Circa 300 picchi non soggetti a co-eluzioni sono stati identificati nei vini analizzati basandosi sulla corrispondenza con la libreria in uso e convalidando l'identità tramite l'ausilio degli indici di ritenzione nonché della massa accurata per lo ione molecolare. Un'ulteriore conferma della corretta identificazione chimica può essere fornita dalla posizione nello spazio 2D, in cui le varie classi chimiche e i relativi sottogruppi di omologhi sono distribuiti secondo una struttura altamente ordinata.

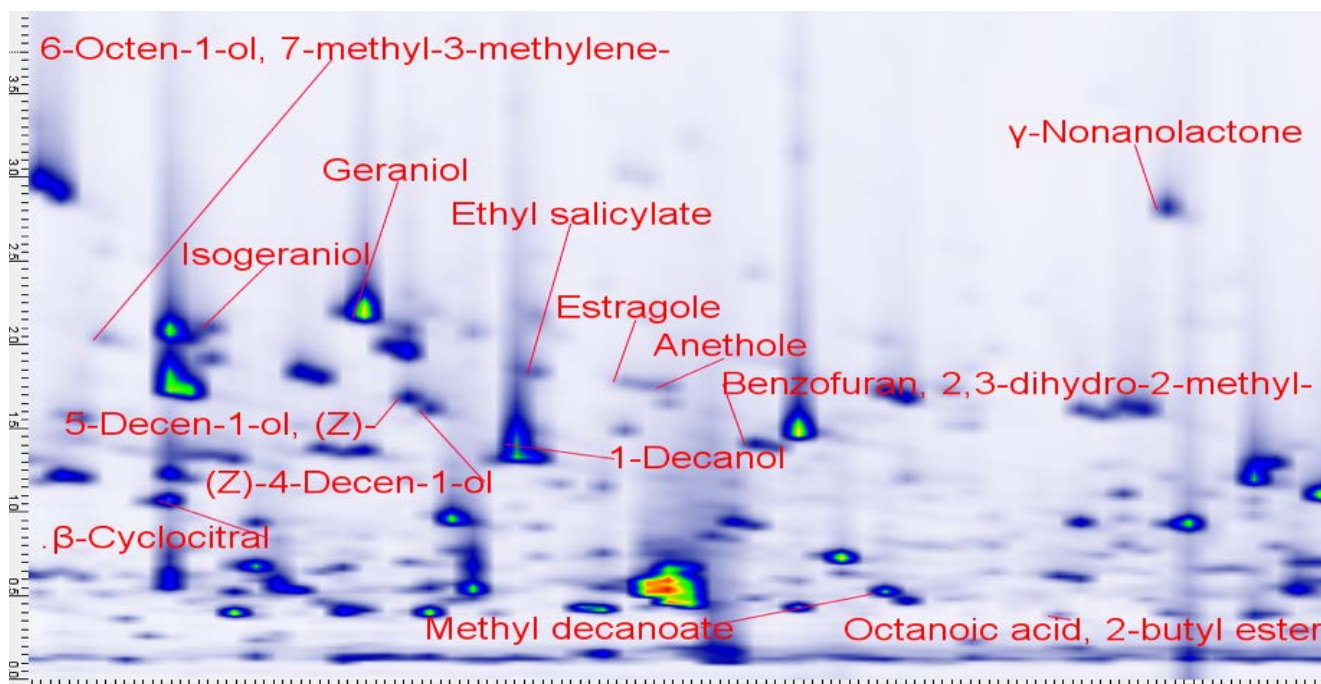


Figura 4 - Esempio di screening in modalità untargeted con relativa identificazione

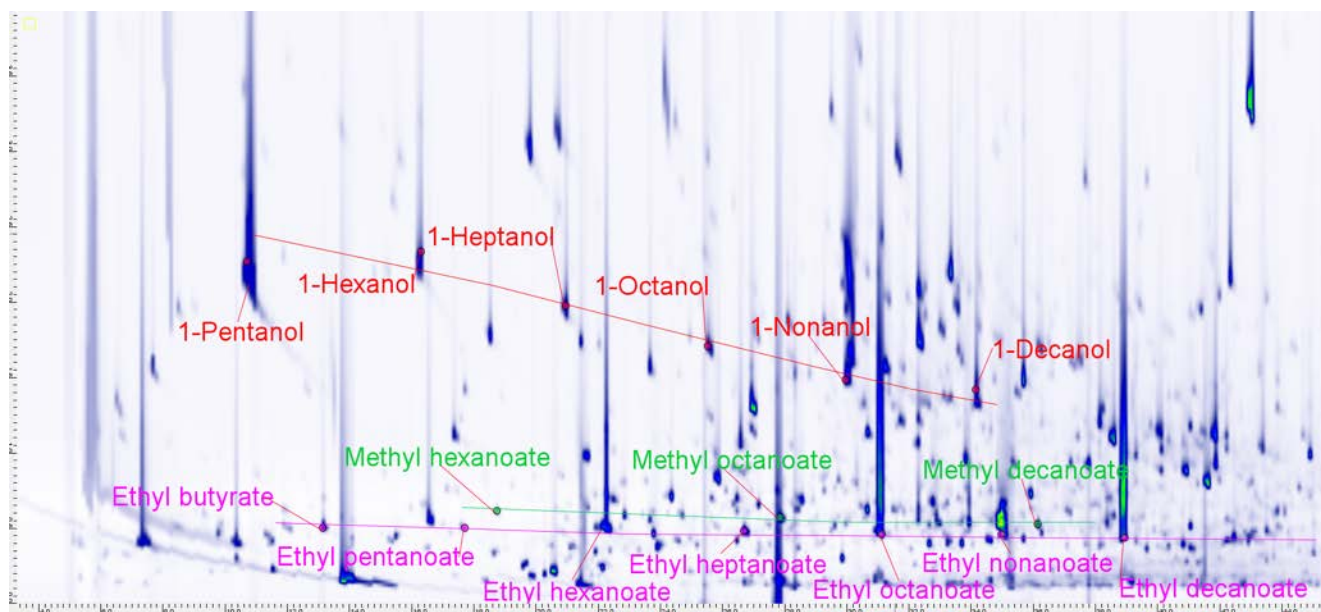


Figura 5 - Esempio di logica chimica nello spazio 2D. Le classi chimiche e i loro omologhi sono distribuiti in modo ordinato in base alle loro proprietà chimico-fisiche (volatilità/polarità). Gruppi: alcoli lineari (rosso) ed esteri metilici (verde)/etilici (rosa) di acidi grassi lineari saturi

#### Ringraziamenti

Si ringrazia Illva Saronno S.p.A., nella persona del Dr. Dimitri Cagni, per aver messo a disposizione i dati utilizzati nella presente nota applicativa e per averne contribuito alla stesura.