



Classificazione e autenticazione di oli extra-vergine di oliva italiani su base geografica. Il potenziale del fingerprinting cromatografico 2D

Introduzione

L'olio extra-vergine di oliva è un pilastro della dieta italiana e mediterranea riconosciuto globalmente come prodotto di eccellenza in virtù delle sue particolari caratteristiche nutritive e sensoriali. Di conseguenza, gli oli extra-vergini sono un prodotto commercialmente rilevante e generano interesse in particolare verso i prodotti di qualità superiore. Al fine di valorizzare questi ultimi, risulta necessaria la capacità di correlare le peculiari proprietà organolettiche con variabili quali regione di coltivazione, clima e tecnologia di estrazione. Ciò è auspicabile e allo stesso tempo sfidante per l'elevata complessità dei profili volatili responsabili del profilo aromatico.

In questo contesto, un ruolo chiave viene svolto dallo sviluppo e l'introduzione di metodologie analitiche capaci di definire in modo puntuale e dettagliato la complessa composizione chimica. Questa nota applicativa presenta l'utilizzo di un approccio cromatografico multidimensionale per qualificare, classificare e autenticare l'olio extra-vergine di oliva.

La soluzione analitica

La piattaforma utilizza un autocampionatore robotico con modalità solid-phase microextraction in spazio di testa (HS-SPME) per estrarre, isolare e concentrare i composti volatili odorigeni. Le analisi vengono eseguite da un sistema gas cromatografico bidimensionale comprensivo (GC×GC) basato su modulazione termica con raffreddamento ad azoto liquido (Loop-type Thermal Modulator, Zoex Corporation) controllata da un'unità Optimode v2.0 (SRA Instruments), accoppiato a uno spettrometro di massa a tempo di volo (BenchTOF-Select, SepSolve Analytical). La metodologia sviluppata si basa sul fingerprinting cromatografico multidimensionale e si prefigge di identificare gli analiti responsabili di un impatto significativo sull'aroma, sia positivo che negativo.

Il sistema di ultima generazione GC×GC-TOF si compone di:

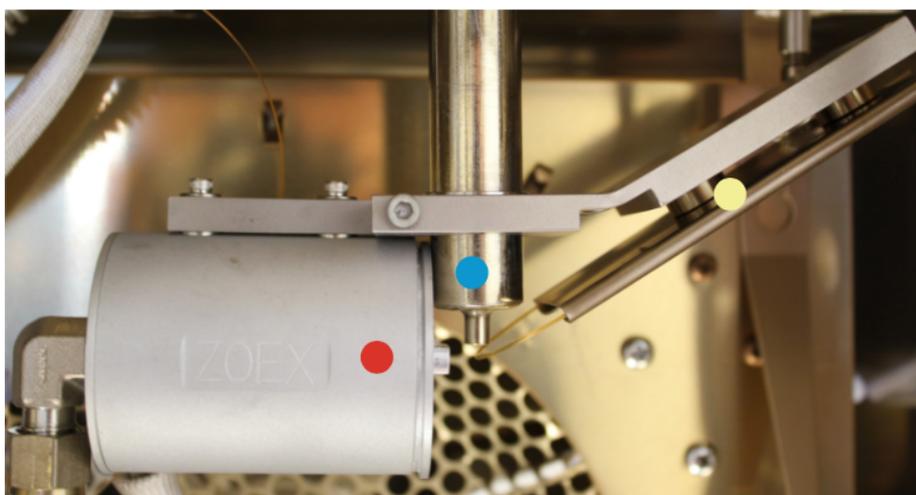
- GC Agilent 8890
- TOF SepSolve Benchtof 2
- Modulatore termico Zoex ZX1
- Optimode V.2 SRA sistema di controllo e ottimizzazione della modulazione termica



La tecnica GC×GC con modulazione termica

La GC×GC rappresenta una scelta strategica in termini di potere di separazione grazie all'utilizzo di due colonne in un'unica analisi. Un'interfaccia dedicata garantisce il completo trasferimento degli analiti dalla prima colonna, la cui separazione deve venir preservata, alla seconda con una periodicità di alcuni secondi. In questo modo tutti i componenti sono soggetti a due meccanismi di separazione consecutivi e indipendenti. I picchi vengono distribuiti in uno spazio di separazione bidimensionale secondo una precisa logica chimica disciplinata dalle proprietà chimico-fisiche, con notevole aumento del potere separativo e una ridotta incidenza di co-eluzioni. L'elevata risoluzione cromatografica così ottenuta è fondamentale per fornire profili cromatografici estremamente accurati e dettagliati utili al fingerprinting di matrici particolarmente complesse.

Il cuore del sistema è l'interfaccia tra le due colonne, il modulatore. Il suo funzionamento si basa sul continuo, rapido alternarsi di due fasi: l'accumulo di brevi frazioni all'uscita dalla prima colonna e la loro periodica, rapida rimobilizzazione verso la seconda. Il funzionamento del modulatore termico si basa su un doppio stadio in cui un jet di gas freddo intrappola gli analiti, che vengono poi re-iniettati in banda stretta da un jet di gas caldo. I modulatori termici, considerati il "gold standard" della GC×GC, garantiscono elevata performance e flessibilità massimizzando la sensibilità.



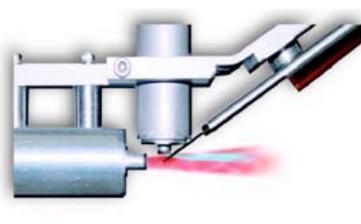
Modulatore termico Zoex ZX1.

Il getto freddo (punto blu) viene utilizzato per intrappolare gli analiti dalla prima colonna GC.

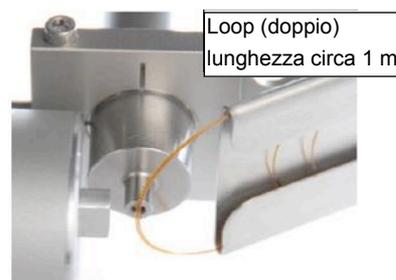
Ad intervalli di pochi secondi, il getto caldo (punto rosso) viene attivato per re-iniettare gli analiti raccolti nel loop alla seconda colonna GC. Il punto giallo mostra la posizione del supporto del loop.



Jet freddo: condensa la frazione di analiti in colonna



Jet caldo: rimobilizza la frazione e la inietta nella seconda dimensione



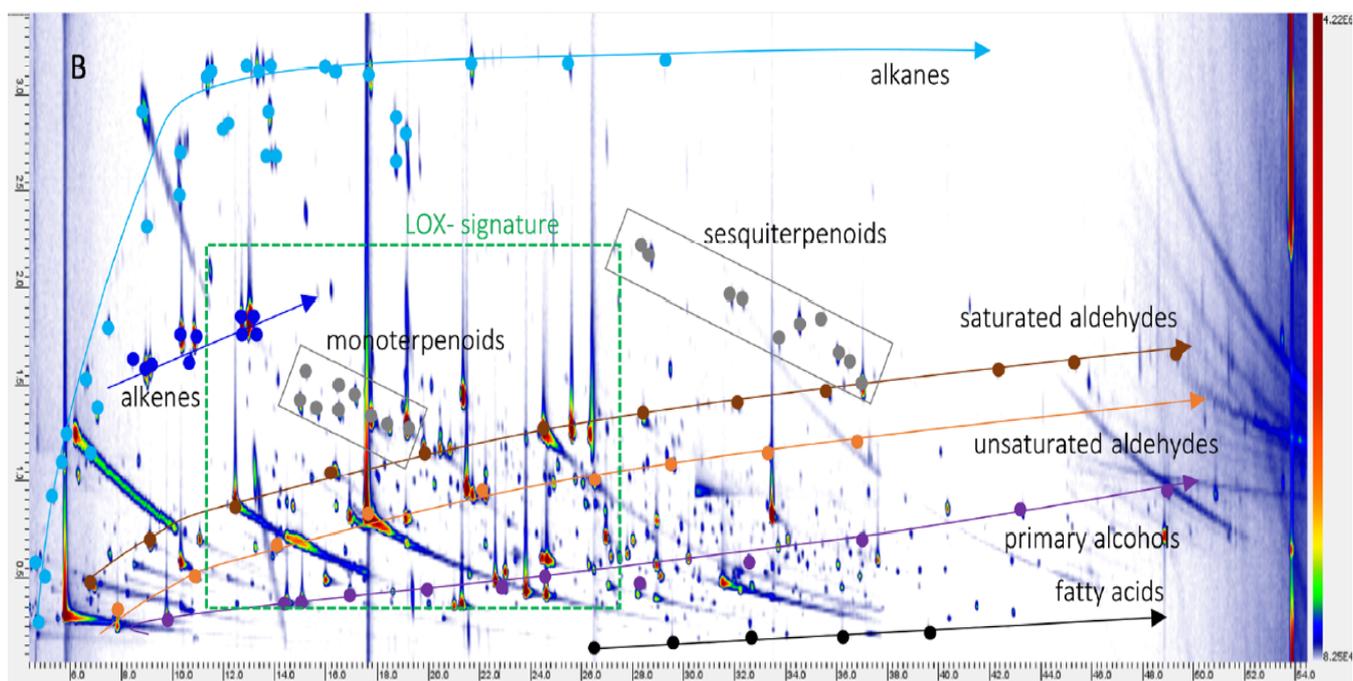
La spettrometria di massa a tempo di volo

Gli spettrometri di massa a tempo di volo analizzano simultaneamente tutti gli ioni, massimizzando la sensibilità e fornendo spettri full-range, sia per composti target che per analiti incogniti in una singola corsa. Il loro principio di funzionamento permette di raggiungere eccellenti velocità di acquisizione senza compromettere la qualità spettrale, caratteristica che li rende ideali per i picchi molto stretti tipici della GC×GC.

Il rivelatore BenchTOF di SepSolve Analytical può associare a queste caratteristiche l'innovativa tecnologia Tandem Ionization, che permette di ottenere spettri con ionizzazione ad alta e bassa energia simultaneamente. Ciò consente di incrementare l'attendibilità dell'identificazione e ottenere una caratterizzazione esaustiva anche per i campioni più complessi, senza la necessità di modificare l'hardware o aumentare il tempo di analisi.

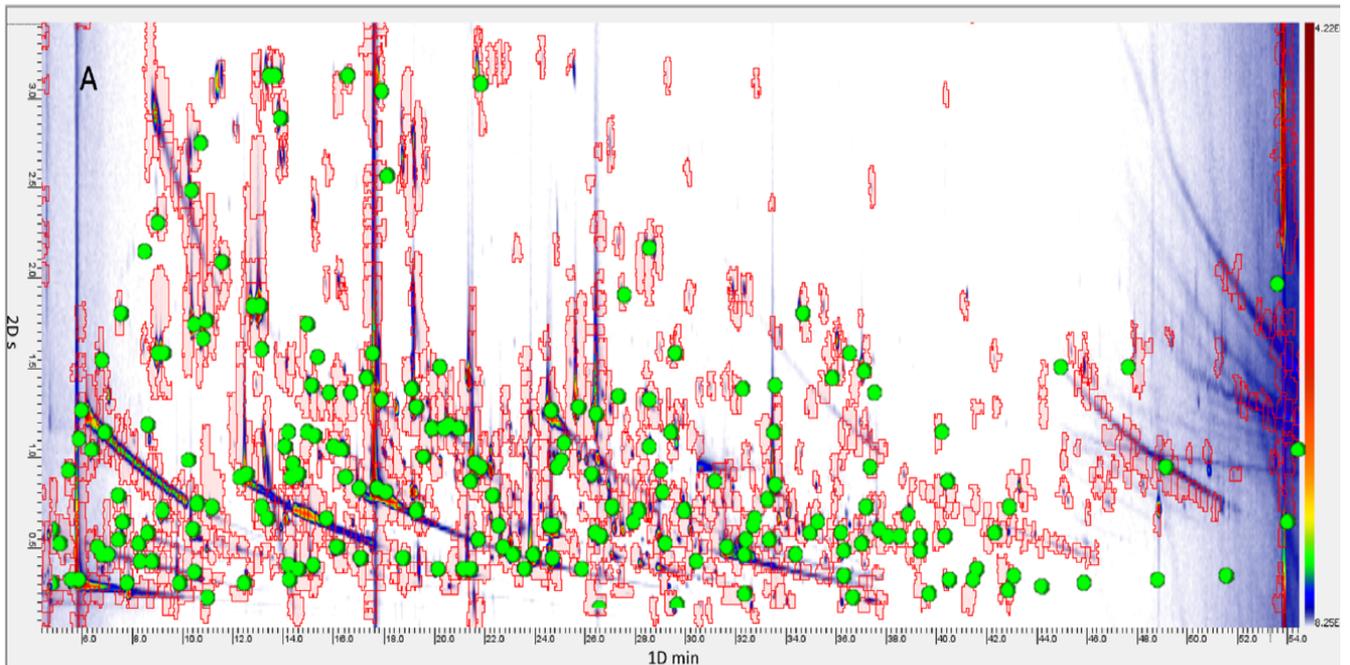
Risultati

Nell'ambito dell'analisi di profili volatili complessi, di difficile interpretazione con approcci cromatografici tradizionali, risulta evidente come la capacità separativa del sistema GC×GC permetta una caratterizzazione molto più affidabile ed esaustiva. Il numero elevato di composti separati con successo e l'elevato ordine di eluzione delle classi chimiche permettono una mappatura dettagliata e puntuale.



Esempio di profilo 2D. La ritenzione nello spazio 2D delle classi chimiche è ordinata dalla logica chimica determinata dalle colonne analitiche (polare × medio-polare) in uso. (Immagine estratta da: *J. Agric. Food Chem.* 2021, 69, 8874–8889).

Il numero più elevato di spettri puri, non inficiati da co-eluzioni, consente di sfruttare più efficacemente l'ottima qualità spettrale e la ricerca con libreria. Diventa possibile confermare l'identità di analiti target e sostanze incognite con maggior immediatezza e affidabilità. Ciò mette a disposizione set di dati molto dettagliati e informativi per caratterizzare tutti i componenti volatili rilevabili. In questo contesto ciò viene sfruttato tramite un approccio fingerprinting combinato Untargeted and Targeted (UT) per catturare ed estrarre la ricca firma chimica dei campioni in modo univoco ed esaustivo. A tal scopo si analizzano sia picchi identificati/target (composti odoriferi identificati con attendibilità) che peak-regions, aree cromatografiche contenenti uno o più picchi, generate previo allineamento dei cromatogrammi sfruttando tempi di ritenzione nelle due colonne e informazioni spettrali per stabilire una solida corrispondenza tra i profili 2D. La procedura è eseguita automaticamente tramite la componente Investigator del pacchetto software GC Image (Zoex Corporation). L'insieme di elementi così ottenuti come output possono venir analizzati grazie all'ausilio diversi software/approcci statistici per identificare markers caratteristici, singoli o come insieme di composti, e quindi classificare con successo i campioni in base alla loro origine di produzione.



Cromatogramma 2D della frazione volatile di un olio extravergine di oliva esaustivamente mappata con approccio Untargeted and Targeted (UT). Peak-regions illustrate come aree in rosso; analiti identificati/target evidenziati come cerchi verdi (Immagine estratta da: J. Agric. Food Chem. 2021, 69, 8874–8889).

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco - Università degli Studi di Torino, nelle persone della Prof.ssa Chiara Cordero e del Prof. Carlo Bicchi, per aver messo a disposizione i dati utilizzati nella presente nota applicativa e per averne contribuito alla stesura. Il lavoro è oggetto di pubblicazione: Stilo, F. et al, (2021) Journal of Agricultural and Food Chemistry, 69(31), 8874-8889
 La procedura di Untargeted and Targeted Fingerprinting è descritta nel dettaglio nella pubblicazione: <https://www.jove.com/it/t/61529/chromatographic-fingerprinting-template-matching-for-data-collected>