



Fingerprinting cromatografico bidimensionale come naso elettronico ad intelligenza artificiale per autenticare l'olio extra-vergine di oliva

Introduzione

L'Unione Europea (EU) è il più grande produttore e consumatore di olio di oliva. In quanto tale, implementa numerosi metodi ufficiali per la categorizzazione dei prodotti al fine di promuovere una loro corretta etichettatura e combattere le frodi alimentari per proteggere produttori e consumatori. Gli oli extra-vergini, considerati di qualità superiore per le loro caratteristiche compositive e sensoriali, sono soggetti a normative particolarmente stringenti introdotte nel 1992. Se i criteri definiti per la loro classificazione non vengono rispettati, un prodotto non può venir etichettato come "extra-vergine". In tal senso risultano cruciali le proprietà organolettiche e l'assenza di difetti sensoriali, aspetti determinati prevalentemente dal profilo aromatico.

La valutazione sensoriale degli oli d'oliva è attualmente eseguita da un panel di esperti formato per identificare e classificare le proprietà olfattive e gustative secondo descrittori predefiniti. Un supporto oggettivo da parte di una metodologia analitica robusta, selettiva, accurata e sensibile, sarebbe auspicabile. Ciò risulta tuttavia difficoltoso in virtù della straordinaria complessità e varietà di composti volatili presenti negli oli di oliva.

Nella presente nota applicativa viene illustrato l'utilizzo di un approccio cromatografico multidimensionale con rivelazione in parallelo come naso elettronico ad intelligenza artificiale (AI smelling machine) per qualificare, categorizzare e autenticare l'olio di oliva. Questa metodologia si prefigge lo scopo di fornire un supporto strumentale capace di correlare la percezione sensoriale alla composizione chimica in modo obiettivo, efficace e automatizzato.

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

- GC Agilent 8890
- MSD 5977B Agilent con High Efficiency Source (HES)
- Campionatore MPS Gerstel
- Modulatore a flusso Agilent

La soluzione analitica

La piattaforma utilizza un autocampionatore robotico con funzionalità solid-phase microextraction (SPME) in combinazione con l'approccio multiple headspace extraction (MHE). Ciò permette di estrarre, isolare e concentrare i composti volatili odoriferi in modo esaustivo per ottenere una quantificazione accurata.

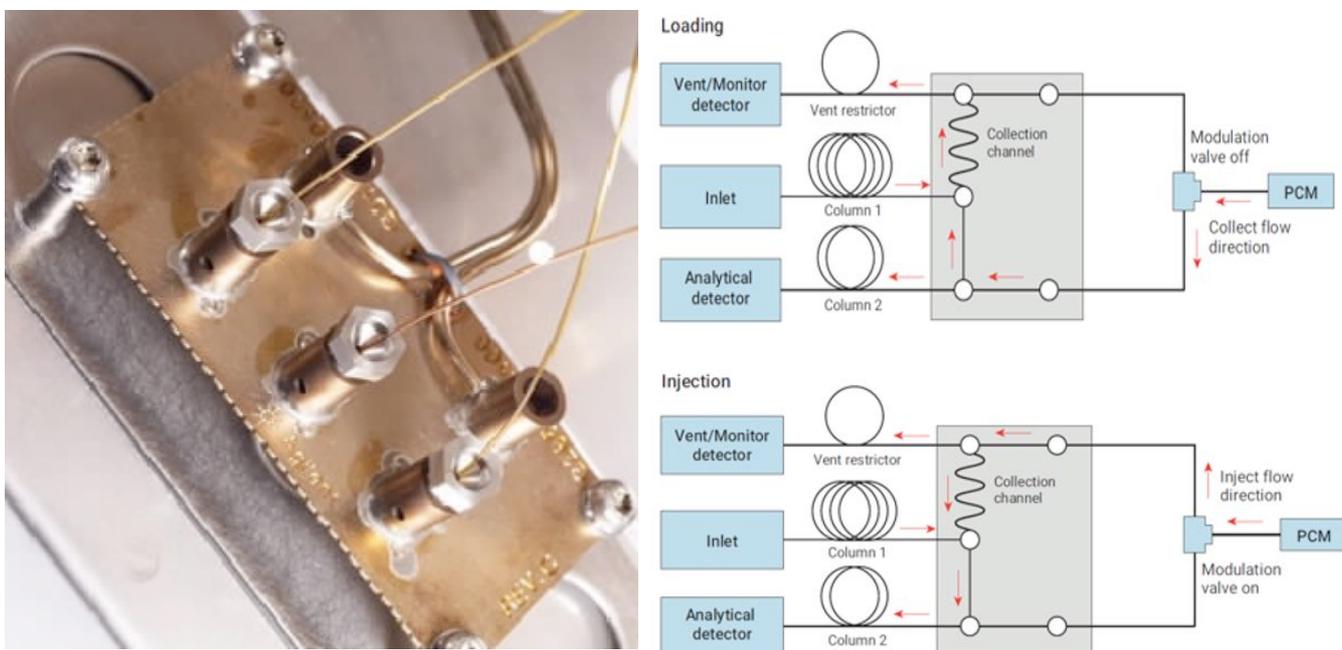
Le analisi vengono eseguite da un sistema gas cromatografico bidimensionale comprehensive (GC×GC) Agilent basato su modulazione differenziale a flusso. La rivelazione utilizza due canali in parallelo consistenti in un FID e uno spettrometro di massa Agilent MSD 5977B con High Efficiency Source (HES). 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, analogamente a quanto fatto dal naso umano.



La tecnica GC×GC con modulazione a flusso

La GC×GC rappresenta una scelta strategica in termini di potere di separazione grazie all'utilizzo di due colonne analitiche 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. La risoluzione cromatografica così ottenuta è fondamentale per fornire profili cromatografici accurati e dettagliati utili al fingerprinting di matrici particolarmente complesse.

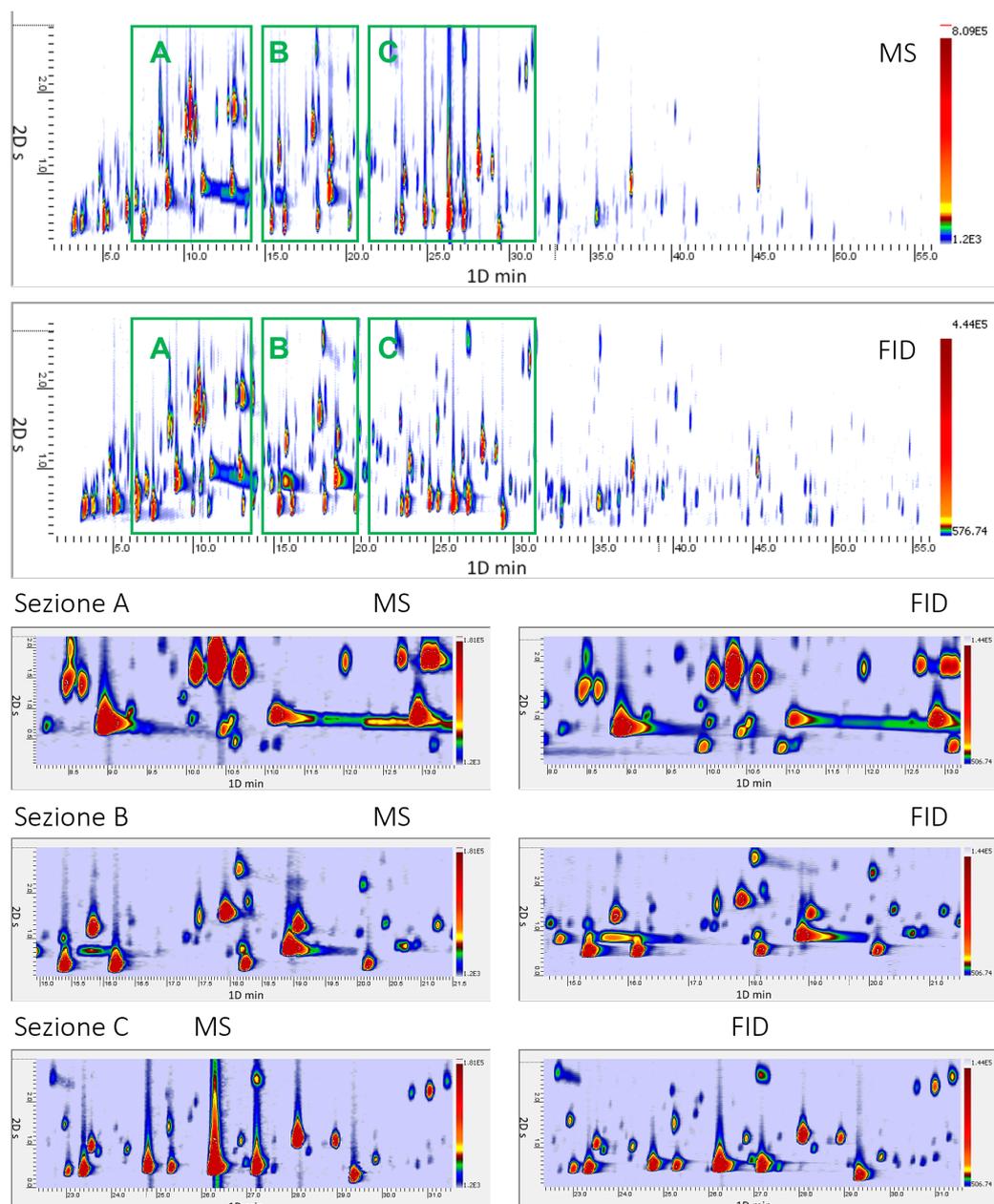
Il cuore del sistema è l'interfaccia tra le due colonne, il modulatore. Il suo funzionamento si basa sul continuo, rapido alternarsi di due fasi: l'accumulo di brevi frazioni all'uscita dalla prima colonna e la loro periodica, rapida rimobilizzazione verso la seconda. Il modulatore a flusso di Agilent, basato sulla collaudata Capillary Flow Technology, utilizza un flusso ausiliario controllato da una valvola a 3 vie per dirigere il gas di trasporto e produrre un'accurata dinamica di modulazione. Questo approccio accessibile ma efficace garantisce prestazioni elevate, stabilità e semplicità di utilizzo adatto all'uso di routine.



La rivelazione in parallelo consente di beneficiare dell'eccellente intervallo di linearità e robustezza del FID a fini quantitativi e, allo stesso tempo, sfruttare lo spettrometro di massa per l'identificazione di composti sia target che ignoti. L'utilizzo di un sistema a scansione offre vantaggi in termini di robustezza e riduzione dei costi, rendendo la piattaforma accessibile.

Risultati

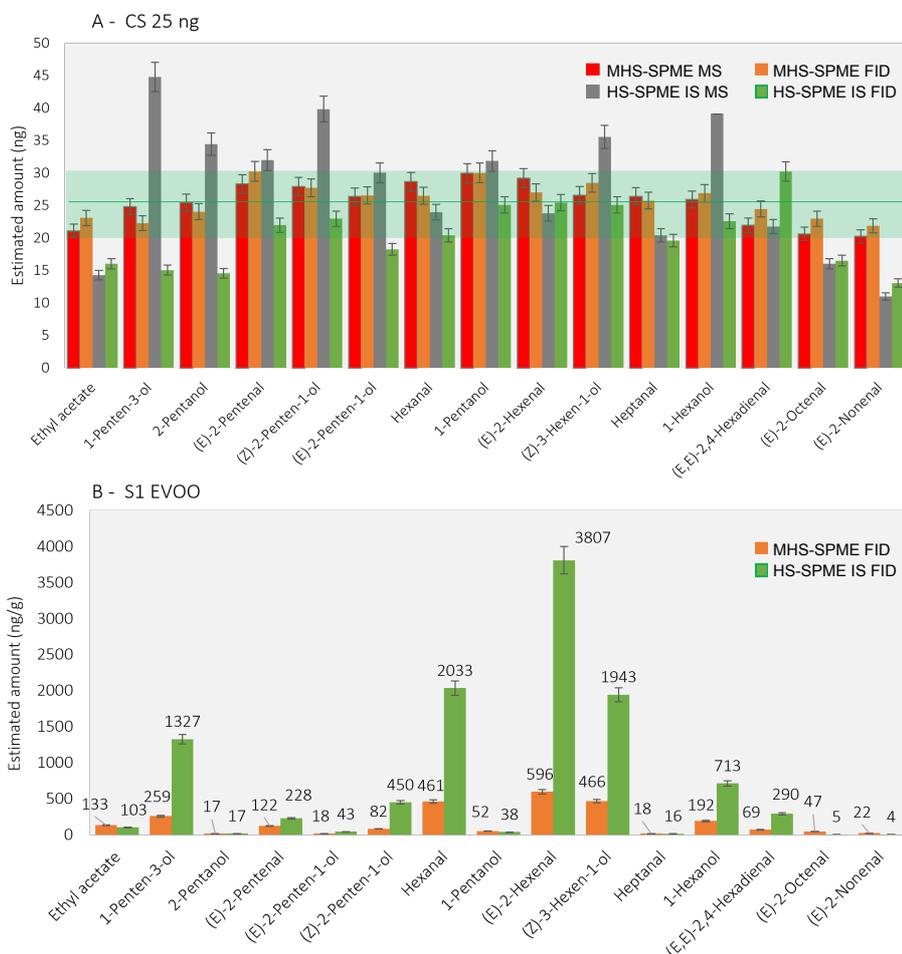
Nell'ambito dell'analisi di profili volatili complessi, di difficile interpretazione con approcci cromatografici tradizionali, risulta evidente come la capacità separativa del sistema GC×GC permetta una caratterizzazione molto più affidabile ed esaustiva. Il numero elevato di composti separati con successo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



Immagini del pattern di volatili del campione S#1 EVOO dalla Sicilia analizzato da una combinazione di colonne polare × semi-polare (i.e., PEG × OV1701) e risultanti dal rilevamento parallelo MS e FID. Le aree ingrandite del piano cromatografico (rettangoli verdi I - IA, II - IB, e III - IC) evidenziano la complessità dei modelli e la risoluzione cromatografica dei cluster di analiti.

(Immagine modificata rispetto al contributo originale: [F.Stilo et al \(2021\), Journal of Chromatography A 1650 \(2021\) 462232](#)).

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 odorigeni 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. I risultati:



Istogrammi che illustrano l'accuratezza di MHS-SPME rispetto a HS-SPME con normalizzazione tramite standard interno su (A) per un valore nominale di 25 ng (barre verdi e arancioni). I valori attesi (i.e. 25 ng) sono contrassegnati dalla linea verde mentre la banda evidenzia una tolleranza di errore $\pm 20\%$. In B, viene mostrata la precisione per un campione EVOO. I risultati corrispondono ai valori medi delle analisi replicate ($n=3$). (Immagine modificata rispetto al contributo originale: [F. Stilo et al \(2021\), Journal of Chromatography A 1650 \(2021\) 462232](https://doi.org/10.1002/jlms.462232)).

L'approccio MHS-SPME-GC×GC-MS/FID si propone come un potente strumento analitico aggiuntivo per il controllo qualità e la valorizzazione degli oli extra-vergini di oliva. L'elevata versatilità permette di eseguire fingerprinting cromatografico esteso a componenti volatili sia target che untargeted, nonché la profilazione quantitativa di markers di interesse.

I risultati confermano un corretto sviluppo di modelli atti a discriminare gli oli su base geografica, mentre la quantificazione tramite MHS-SPME aumenta notevolmente l'accuratezza.

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: F. Stilo et al (2021), Journal of Chromatography A 1650 (2021) 462232

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>