

# HS-GC-IMS e SPME-GC-FID: metodi di screening e "targeted" per la classificazione degli oli vergini di oliva a supporto del Panel test, mediante studio della frazione volatile

<sup>1</sup>Panni F., <sup>1,2</sup>Valli E., <sup>1</sup>Grigoletto I., <sup>1</sup>Casadei E., <sup>1,2</sup>Cevoli C., <sup>1,2</sup>Bendini A., <sup>3</sup>Focante F., <sup>1,2</sup>Gallina Toschi T., <sup>3</sup>Savino A.F., <sup>4</sup>Carpino S.

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Cesena;

<sup>2</sup>Centro Interdipartimentale di Ricerca Industriale sull'Agroalimentare, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Cesena;

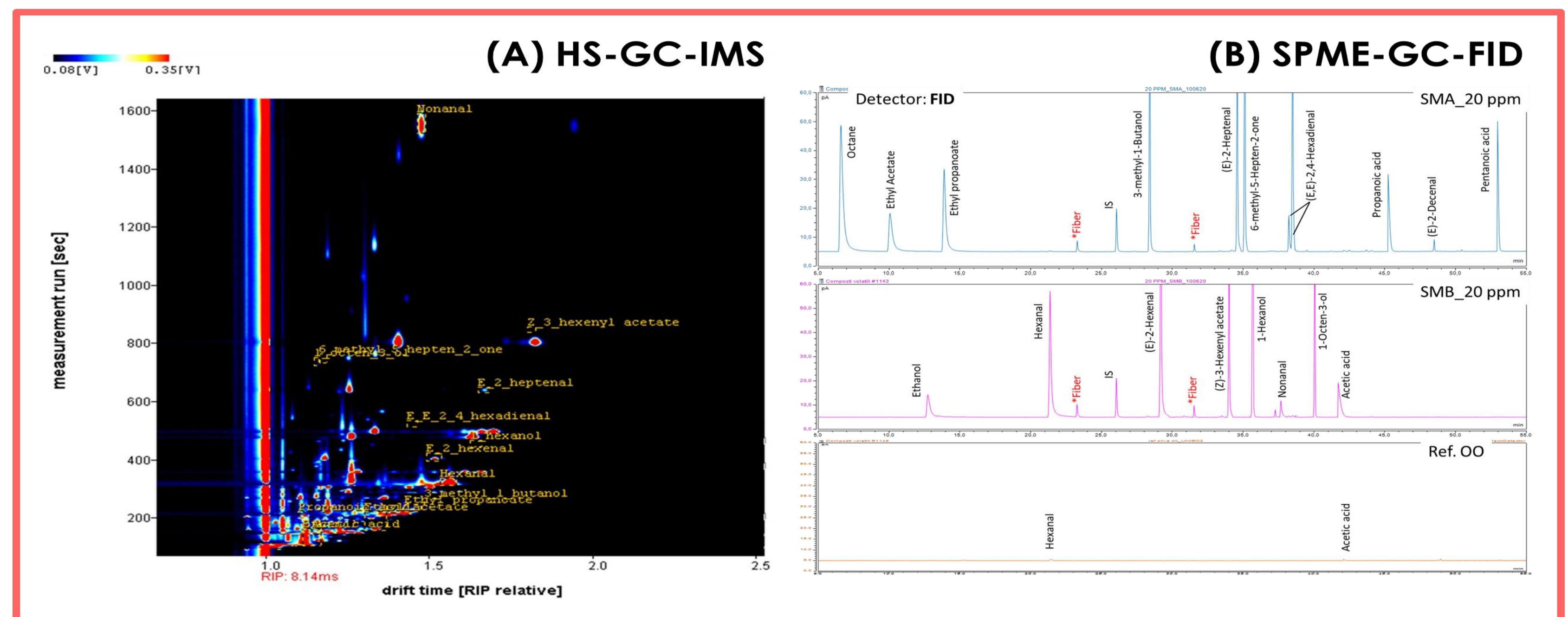
<sup>3</sup>Laboratorio di Perugia, ICQRF-MIPAAF, Via della Madonna Alta 138 c/d - 06128, Perugia;

<sup>4</sup>Ufficio PREF 4, ICQRF-MIPAAF Via Quintino Sella, 42 - 00187, Roma.

e-mail: filippo.panni2@unibo.it

**SCOPO:** il lavoro mette a confronto due diverse tecniche analitiche per lo studio della frazione volatile, ai fini della classificazione della categoria merceologica dell'olio di oliva vergine (extra vergine EVOO, vergine VOO e lampante LOO), ed ha lo scopo di essere di supporto al Panel test. In particolare è stato utilizzato un approccio *semi-targeted* basato sulla gas cromatografia accoppiata alla spettrometria a mobilità ionica (HS-GC-IMS), utile come *screening* rapido per la separazione di specifici composti volatili permettendo così la pre-classificazione di campioni di olio di oliva vergine. Parallelamente è stata applicata una analisi *targeted*, rappresentata dalla micro-estrazione in fase solida (SPME), con successiva analisi gas cromatografica (GC-FID), finalizzata all'identificazione e quantificazione degli stessi composti volatili con la possibilità di definirne limiti ed intervalli in relazione alla categoria merceologica. I modelli di calibrazione tengono conto dell'attributo positivo di fruttato e dei principali difetti sensoriali.

**INTRODUZIONE:** un ruolo cruciale per la classificazione degli oli di oliva vergini è svolto dall'analisi sensoriale (Panel test) il cui obiettivo principale è quello di definire l'appartenenza di un campione ad una categoria merceologica identificando e quantificando l'intensità del fruttato e degli eventuali difetti. Fruttato, altre note positive e difetti, percepiti per via olfattiva e retro-olfattiva, sono legati alla presenza di molecole volatili che si originano dalla via della lipossigenasi o da processi fermentativi/degradativi dovuti a microrganismi (ad esempio, difetti di muffa, avvinato, riscaldamento, ecc.) o da reazioni chimiche (ossidazione dei lipidi, responsabile del difetto rancido) (Kalua et al., 2006). Per questo motivo, l'identificazione e la quantificazione dei composti volatili nell'aroma dei VOO sono di grande importanza (Cavalli et al., 2004). In tale contesto, questa ricerca mira a sviluppare strategie diagnostiche capaci di combinare risultati sensoriali e strumentali con tecniche diverse e con finalità complementari.

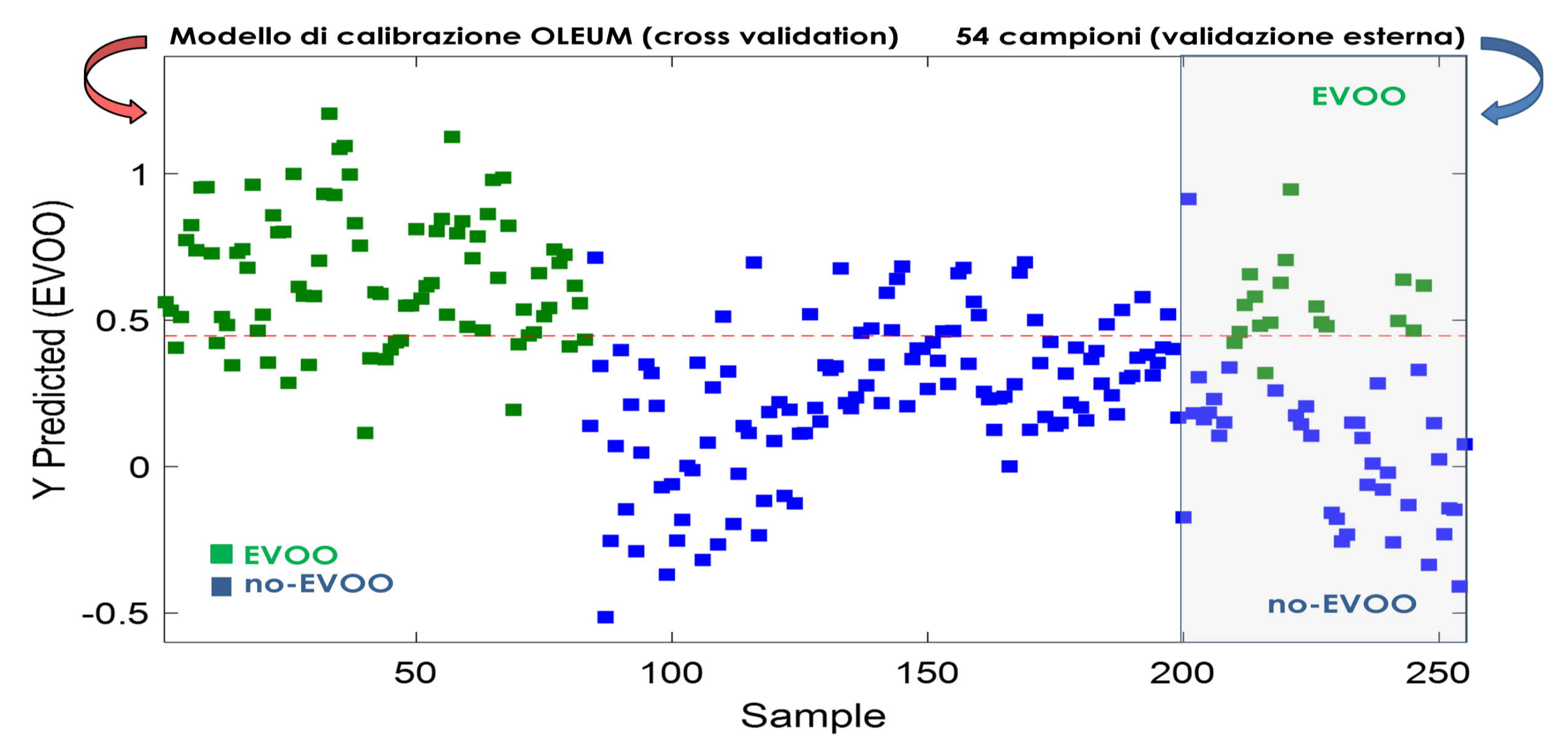


**Figura 1:** (A) esempio di cromatogramma 3D (mappa di calore), ottenuto dall'analisi HS-GC-IMS di un campione di olio di oliva vergine; (B) esempi di cromatogrammi ottenuti dall'analisi SPME-GC-FID di miscele standard contenenti 18 composti volatili selezionati altamente diagnostici.

**MATERIALI E METODI:** 54 campioni di olio di oliva vergine sono stati selezionati e valutati sensorialmente da 4 panel ufficiali (ICQRF - Laboratorio di Perugia, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Agenzia delle Dogane e dei Monopoli di Roma e Agenzia delle Dogane e dei Monopoli di Bari). I dati sensoriali ottenuti da ciascun panel sono stati elaborati applicando l'**albero decisionale** sviluppato nell'ambito del progetto H2020 OLEUM (Barbieri et al., 2020). In parallelo, lo spazio di testa dei 54 campioni selezionati è stato analizzato mediante due diverse tecniche analitiche per l'analisi separativa dei composti volatili (HS-GC-IMS e SPME-GC-FID). Le condizioni analitiche utilizzate sono state rispettivamente quelle di Valli et al., 2020 per HS-GC-IMS e Casadei et al., 2021 per SPME-GC-FID. Con i risultati ottenuti dalle due tecniche analitiche e la classificazione sensoriale robusta, ottenuta sulla base dei risultati dei 4 panel, è stato possibile effettuare le seguenti elaborazioni:

- **HS-GC-IMS:** applicazione del **modello di classificazione PLS-DA** messo a punto da Alma Mater Studiorum - Università di Bologna (Valli et al., 2020) sfruttando le aree presenti sul cromatogramma 3D (mappa di calore) e corrispondenti a 15 segnali (Figura 1A) associati a composti volatili correlati a specifici attributi sensoriali positivi e/o negativi degli oli di oliva vergini (indagini analitiche nell'ambito del progetto europeo H2020 OLEUM);
- **SPME-GC-FID:** identificazione e quantificazione di **18 composti volatili** (Figura 1B) particolarmente rilevanti, e successiva verifica della categoria merceologica stimata in relazione a **limiti ed intervalli** preliminarmente studiati nell'ambito del progetto OLEUM su un set di 60 campioni analizzati da Alma Mater Studiorum - Università di Bologna.

## RISULTATI E DISCUSSIONE:



**Figura 2:** variabile Y predetta dal modello PLS-DA (EVOO vs no-EVOO), in cross validation ed in validazione esterna (area azzurra).

Categoria	n° campioni correttamente classificati	% campioni correttamente classificati
EVOO	15/18	83.3
VOO	16/20	80.0
LOO	16/16	100.0
TOT	47/54	87.0

**Tabella 1:** numeri e percentuali di campioni classificati, mediante il modello PLS-DA basato sui risultati delle analisi HS-GC-IMS, in maniera coerente rispetto alla categoria merceologica definita dall'analisi sensoriale.

Concentrazione (mg/kg)	Ottano	Etil acetato	Etanolo	Etil propanoato	Esanale	3-Metil-1-butanolo	(E)-2-esenale	(Z)-3-esenil acetato	(E)-2-eptenale	6-metil-5-epten-2-one	1-esanolo	Nonanale	1-octen-3-olo	(E,E)-2,4-esadienale	Acido acetico	Acido propanoico	(E)-2-decenale	Acido pentanoico
<b>EVOO</b>																		
Media	0.13	0.16	3.11	0.02	0.95	0.33	7.88	1.09	0.05	0.05	0.84	0.44	0.99 ↑	0.00	0.54	0.04	0.02 ↑	0.03
Min OLEUM	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.00	0.62	0.38	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00
Max OLEUM	0.22	1.82	22.82	0.37	1.98	0.69	31.35	4.21	2.79	2.10	3.86	17.14	0.03	1.72	12.51	0.50	0.00	0.35
<b>VOO</b>																		
Media	0.30	0.42	16.46 ↑	0.00	0.48 ↓	0.57	0.89 ↓	0.70	0.06	0.04	0.49	0.63 ↓	0.46 ↑	0.01 ↓	0.33 ↓	0.04	0.20	0.02
Min OLEUM	0.00	0.00	0.00	0.00	0.53	0.05	1.32	0.33	0.00	0.00	0.00	1.18	0.00	0.09	0.39	0.00	0.00	0.00
Max OLEUM	0.83	0.75	15.10	0.30	3.70	1.00	32.43	3.82	1.89	2.90	2.18	14.34	0.06	1.19	15.18	0.62	1.36	0.59
<b>LOO</b>																		
Media	3.05	1.04	20.47	1.01	4.61	2.25	0.95	0.30	0.77	0.48	2.59	4.85	0.43	0.16	0.85	0.96	3.11	0.29
Min OLEUM	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.00	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27	0.00	0.00	0.24	0.00	0.00	0.00
Max OLEUM	1.52	1.96	23.02	0.10	5.91	1.93	25.89	1.12	3.40	1.51	2.33	16.19	0.17	0.97	8.84	1.03	1.32	0.47

**Tabella 2:** per i 18 composti volatili considerati (analisi SPME-GC-FID) sono stati riportati rispettivamente, in riferimento a ciascuna categoria merceologica: Media (concentrazione media calcolata sulle singole concentrazioni dei 54 campioni analizzati), Min OLEUM (concentrazione limite inferiore calcolata nell'ambito del progetto OLEUM), Max OLEUM (concentrazione limite superiore calcolata nell'ambito del progetto OLEUM). In verde sono evidenziate le concentrazioni che rientrano all'interno degli intervalli (Min OLEUM < Media categoria < Max OLEUM), per ciascuna categoria; in rosso sono evidenziate le concentrazioni che si discostano (superiori ↑ o inferiori ↓) da questi intervalli. I risultati sono soddisfacenti: solo per un composto (1-octen-3-olo) è stata riscontrata negli EVOO una concentrazione media superiore a quella ipotizzata in OLEUM come limite massimo, tuttavia bisogna considerare che: a) il metodo strumentale è pensato a conferma o disconferma della classificazione effettuata dal Panel e non applicabile da solo; b) gli intervalli sono in corso di finalizzazione e la definizione dei loro estremi migliora con l'inclusione di un numero sempre più alto di campioni.

**CONCLUSIONI:** sono stati messi in relazione i risultati ottenuti dall'analisi HS-GC-IMS (metodo di *screening semi-targeted*) con quelli ottenuti dall'analisi SPME-GC-FID (metodo *targeted*, e quindi validabile, candidato ad una inclusione nei regolamenti di legge, per i casi di disaccordo tra due panel). L'elaborazione dei dati ha portato anche alla verifica dei limiti ed intervalli dei 18 composti volatili ritenuti altamente diagnostici, calcolati nell'ambito del progetto OLEUM, per ciascuna categoria merceologica (EVOO, VOO, LOO). I risultati, anche se solo su altri 54 campioni sensorialmente analizzati in maniera robusta (4 panel) appaiono molto in linea con le precedenti elaborazioni e possono essere utili per la finalizzazione di tali limiti. Riguardo al metodo HS-GC-IMS, può essere efficacemente utilizzato come metodo di *screening* rapido per la prioritizzazione dei campioni di olii vergini da sottoporre al Panel test o come conferma del dato sensoriale in particolare in azienda. Per quest'ultimo utilizzo è molto importante che la classificazione fornita dal HS-GC-IMS sia la medesima del metodo *targeted* SPME-GC-FID.

**BIBLIOGRAFIA:** Cavalli J. F., Fernández X., Lizzani-Cuvelier L., Loiseau A. M. (2004). Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oil by HS-SPME: identification of quality-freshness markers. Food Chemistry, 88, 151-158; Kalua C. M., Allen M. S., Bedgood Jr. D. R., Bishop A. G., Prenzler P. D., Robards K. (2006). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. Food Chemistry, 273-286; Barbieri S., Brkić Bubola K., Bendini A., Bučar-Miklavčić M., Lacoste F., Tibet U., Winkelmann O., García-González D.L., Gallina Toschi T. (2020). Alignment and proficiency of virgin olive oil sensory panels: the OLEUM Approach. Foods, 9, 355; Valli E., Panni F., Casadei E., Barbieri S., Cevoli C., Bendini A., García-González D.L., Gallina Toschi T. (2020). An HS-GC-IMS Method for the Quality Classification of Virgin Olive Oils as Screening Support for the Panel Test. Foods, 9(5), 657; Casadei E., Valli E., Aparicio R.R., Ortiz-Romero C., García-González D.L., Vichi S., Quintanilla-Casas B., Tres A., Bendini A., Gallina Toschi T. (2021). Peer inter-laboratory validation study of a harmonized SPME-GC-FID method for the analysis of selected volatile compounds in virgin olive oils. Food Control, 123.