



Svelare la complessità chimica degli oli essenziali tramite la tecnica GC×GC-TOFMS

Introduzione

Gli oli essenziali oggi trovano ampio utilizzo in diversi ambiti quali quello alimentare, cosmetico (fragranze, oli per massaggi, etc.) e medico. Sono prodotti di origine vegetale caratterizzati dalla presenza di numerosi composti appartenenti a molteplici classi chimiche (alcoli, aldeidi, chetoni, terpeni, etc.), nell'ordine delle centinaia, che incidono sulle proprietà del prodotto finale, determinandone la qualità. Una metodologia analitica in grado di caratterizzare la composizione chimica in modo accurato e dettagliato è quindi auspicabile. Dal punto di vista analitico, ciò presenta difficoltà con tecniche di separazione convenzionali a causa dell'elevata complessità delle matrici, in particolare per la determinazione di composti in tracce potenzialmente rilevanti per le proprietà organolettiche.

La gas cromatografia bidimensionale comprehensive (GC×GC) rappresenta una scelta strategica: l'utilizzo simultaneo di due colonne indipendenti con differente selettività aumenta il potere di separazione e riduce il numero di co-eluzioni.

I composti vengono distribuiti in un piano bidimensionale secondo una rigida logica chimica disciplinata dalle proprietà chimico-fisiche, garantendo una migliore separazione.

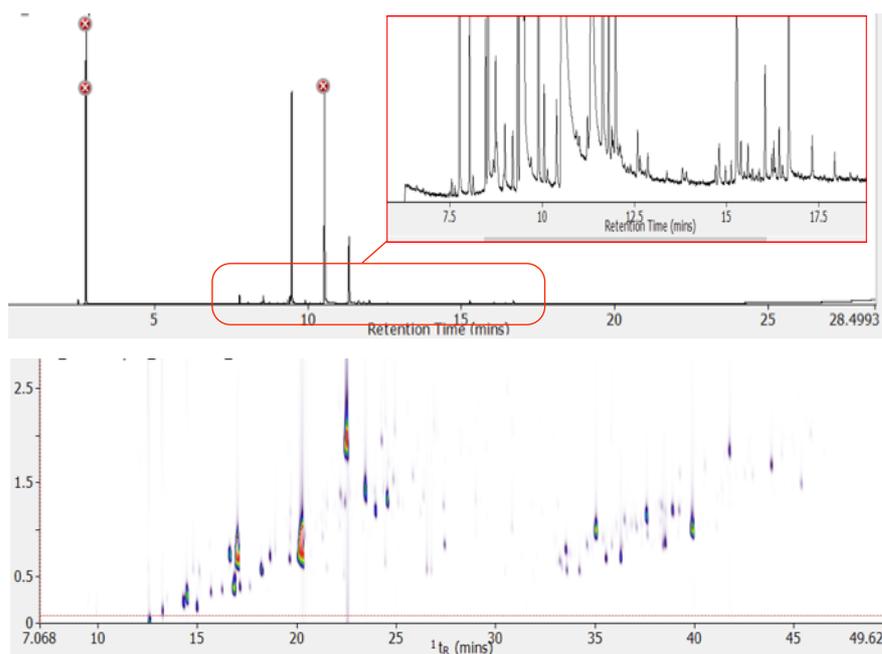
In questo lavoro si mostra il valore aggiunto della GC×GC in combinazione alla spettrometria di massa a tempo di volo (TOF-MS) per la caratterizzazione e la classificazione di oli essenziali.



Le analisi GC×GC-TOFMS sono state eseguite con lo spettrometro di massa a tempo di volo BenchTOF2-TI (SepSolve Analytical).

Per le separazioni 2D sono stati utilizzati due diversi approcci

- **Modulazione termica** - modulatore termico a loop con unità di refrigerazione a circuito chiuso ZX2 (ZOEX Corporation).
- **Modulazione a flusso** - piattaforma microfluidica a flusso - Modulatore a flusso differenziale invertito INSIGHT™ (SepSolve Analytical).



Esempio di cromatogramma 1D non risolto per un campione di olio essenziale e il corrispondente cromatogramma 2D che svela l'elevata complessità chimica.

Dettagli sperimentali

Gli oli essenziali sono stati prodotti da foglie di lavanda (*Lavandula Officinalis* L., *Lavandula Angustifolia* Miller) e rosmarino (*Rosmarinus Officinalis* L. *Camphoriferum/Verbenoniferum/Cienoliferum*) raccolte in Italia per distillazione in corrente di vapore. In questo processo l'acqua è portata ad ebollizione per generare una corrente di vapore che viene diretta attraverso il materiale vegetale per estrarre l'olio. La condensazione in fase liquida dà luogo a una soluzione bifasica di acqua e fase organica. La fase acquosa viene scaricata per gravità, mentre quella organica è raccolta come prodotto finale.

Questa metodologia è stata scelta perché permette una produzione semplice su piccola scala e l'estrazione non prevede l'utilizzo di solventi chimici, eliminando la necessità di passaggi di purificazione per rendere i prodotti idonei allo scopo alimentare.

Dei prodotti commerciali sono stati analizzati come materiale di riferimento per valutare un eventuale impatto del processo di produzione.

Modulazione termica

La modulazione termica offre:

- potere di separazione ottimale
- massima sensibilità per il processo di identificazione (flusso interamente diretto al rivelatore TOF)
- caratterizzazione puntuale e approfondita.

Modulatore termico a loop Zoex con unità di refrigerazione a circuito chiuso ZX2 (ZOEX Corporation).

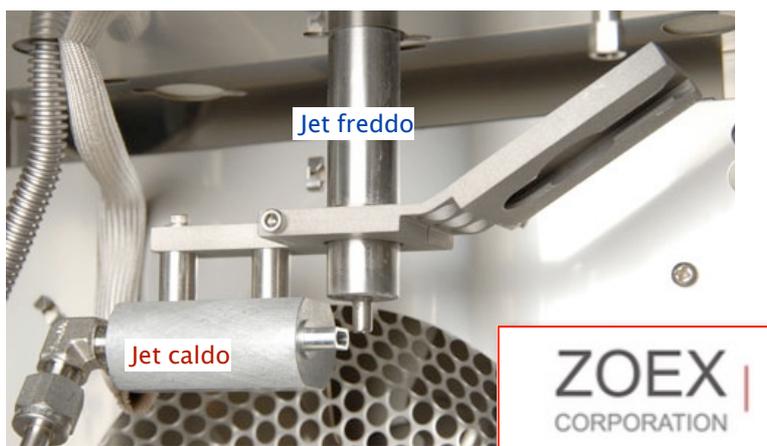
I modulatori termici Zoex impiegano un tratto di colonna capillare avvolto a loop.

Il processo in dual-stage è raggiunto usando solamente un jet caldo e uno freddo, minimizzando l'hardware richiesto.

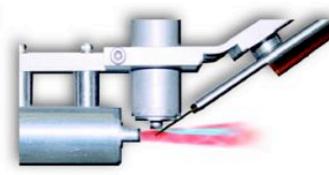
Durante il primo ciclo, i composti intrappolati sono rimobilizzati nel loop per una seconda focalizzazione, a cui segue una rapida iniezione in banda stretta sulla seconda colonna.

Il modello Zoex ZX2 effettua il raffreddamento del gas del jet freddo con uno scambiatore refrigerante a ciclo chiuso, senza bisogno di liquidi criogenici. Ciò permette di ridurre i costi di operazione rispetto ai sistemi con raffreddamento ad azoto liquido.

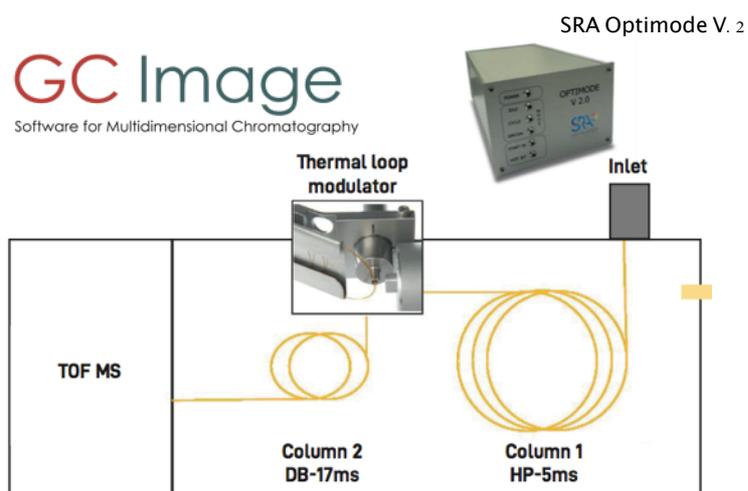
La temperatura di raffreddamento con il modulatore ZX2 è di circa -90°C, permettendo l'intrappolamento dei composti a partire dal punto di ebollizione del n-eptano.



Jet freddo: condensa la frazione di analiti in colonna



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



Il controller SRA Optimode V.2 è in grado di gestire in modo accurato e preciso i due eventi di raffreddamento e riscaldamento del capillare di modulazione, cuore del sistema dual-stage del modulatore termico. Ciò rende possibile ottimizzare il metodo in modo più flessibile e dettagliato, ottimizzando le prestazioni e allo stesso tempo riducendo il consumo di risorse.

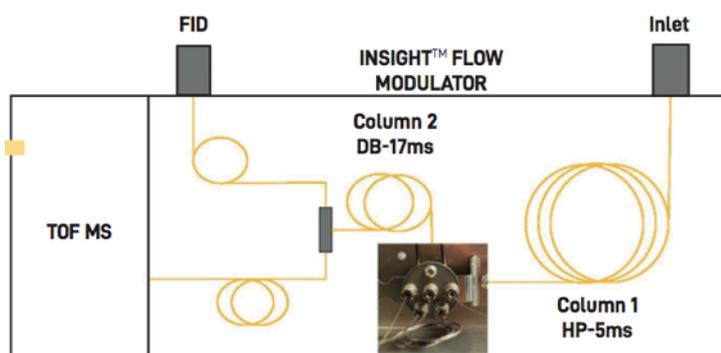
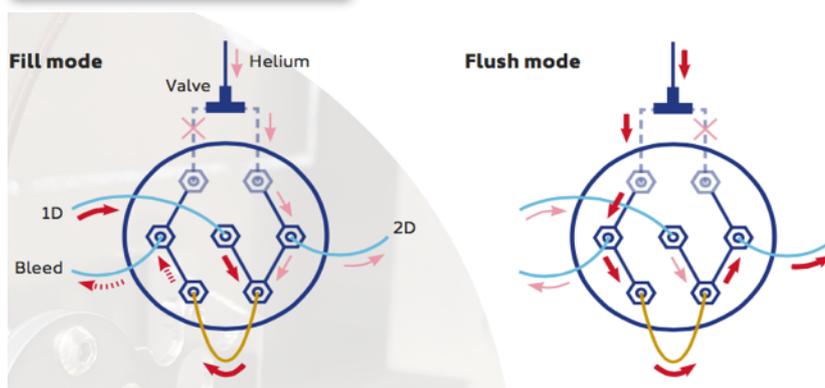
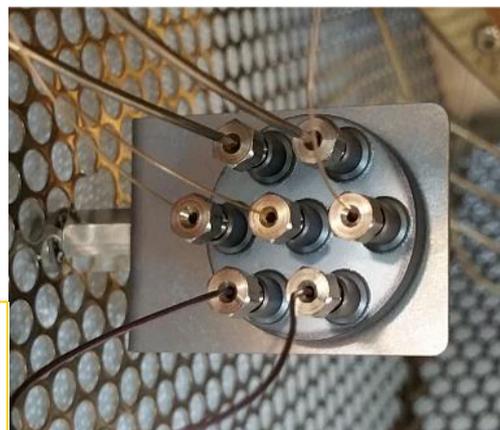
Modulazione a flusso - piattaforma microfluidica a flusso

La modulazione a flusso offre:

- eccellente ripetibilità e accessibilità.
- modulazione dei composti più volatili.
- quantificazione robusta con esteso intervallo di linearità con il segnale FID.

Modulatore a flusso differenziale invertito INSIGHT™ (SepSolve Analytical).

Il Reverse FM INSIGHT™ è basato sulla tecnica di campionamento "REVERSE FILL/ FLUSH" attraverso l'uso di un loop a volume variabile, che oltre ad offrire una notevole semplicità operativa permette di ottenere maggiore flessibilità nello sviluppo del metodo. La modulazione del flusso implica semplicemente l'uso di una valvola, controllata via SW, che permette la selezione di flussi dei gas di trasporto e lavaggio per "riempire" e "svuotare" un loop di campionamento. Il modulatore a flusso INSIGHT™ grazie al funzionamento senza liquidi criogenici consente di beneficiare della piena potenza della tecnica GC×GC per la separazione dei picchi.



Al modulatore INSIGHT™ può essere abbinato:

- il kit di controllo per la linea di spurgo
- e un purged splitter per semplificare la configurazione del rilevamento parallelo, ad esempio l'acquisizione simultanea di dati FID e TOFMS.

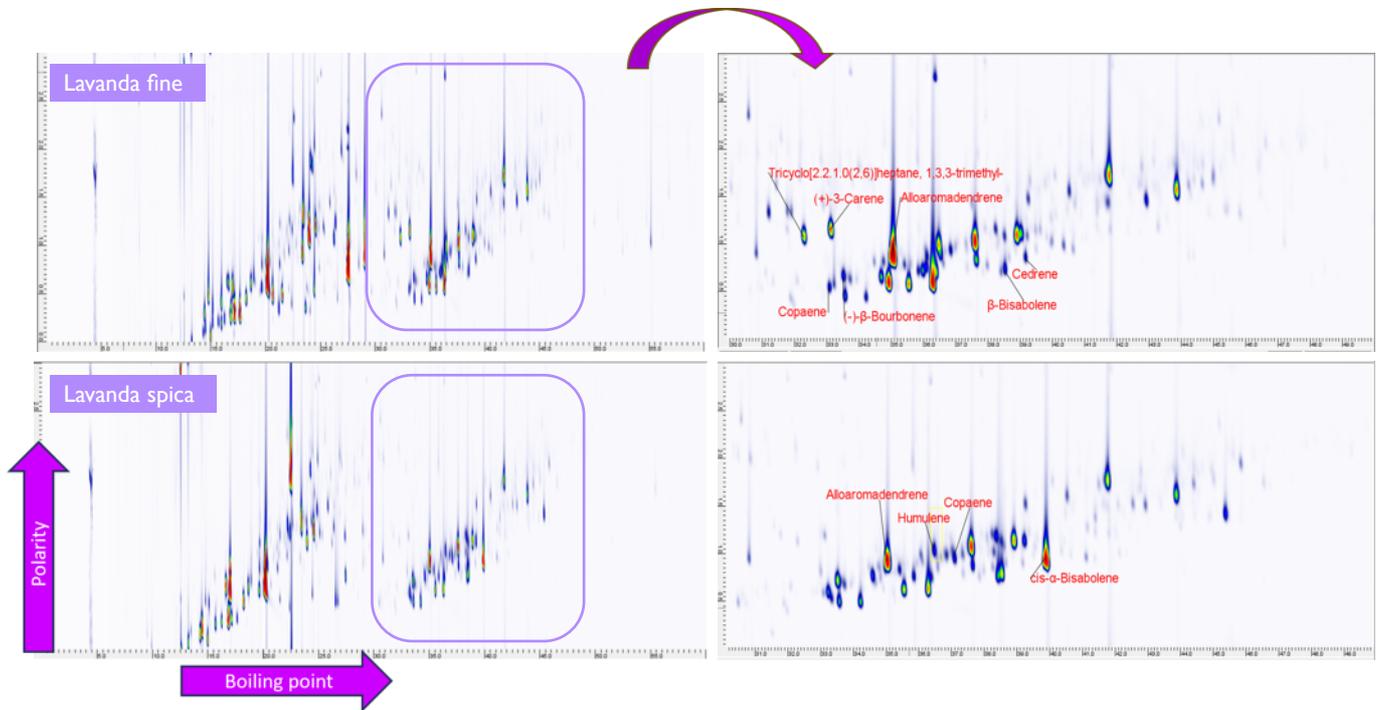
Risultati e discussione

La GC×GC-MS ha permesso di separare e rilevare efficacemente un numero significativamente più elevato di componenti rispetto al GC-MS convenzionale con entrambi gli approcci in uso.

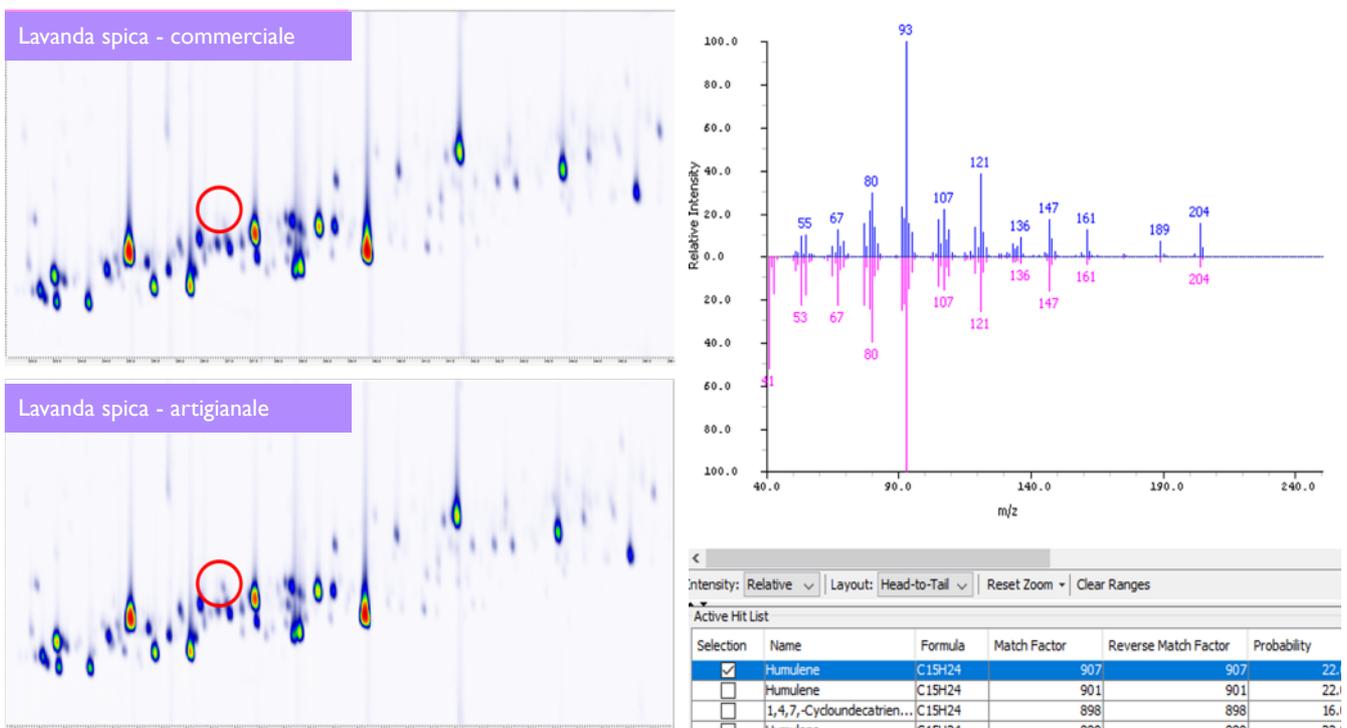
La risoluzione cromatografica avanzata mostra un effetto positivo sulla capacità di identificazione.

Prima di tutto, si ha una panoramica più esaustiva del numero di composti presenti e la loro tipologia dal momento che la posizione nello spazio 2D fornisce importanti e affidabili informazioni sulle caratteristiche chimico-fisiche. In aggiunta, i dati MS beneficiano della migliore separazione fornendo spettri più puliti e quindi di più facile confronto con le librerie commerciali anche per composti meno abbondanti. Ciò permette di delineare la composizione chimica con un più elevato grado di accuratezza e affidabilità.

I tracciati 2D sono altamente informativi e dettagliati, di conseguenza si confermano eccellenti per approcci untargeted e il confronto dei campioni (fingerprinting). Grazie al loro alto grado di specificità, i pattern bidimensionali permettono di identificare differenze anche minime, utili a classificare l'origine in termini di varietà vegetali e metodo di produzione. Si è così potuto discriminare, sia per lavanda che rosmarino, tra oli prodotti da varietà diverse. Allo stesso modo, è stato possibile osservare differenze seppur minime tra gli oli essenziali prodotti dall'estrazione a vapore e gli oli commerciali, ottenendo informazioni utili sull'impatto dell'estrazione sulla composizione chimica e quindi sulle proprietà.



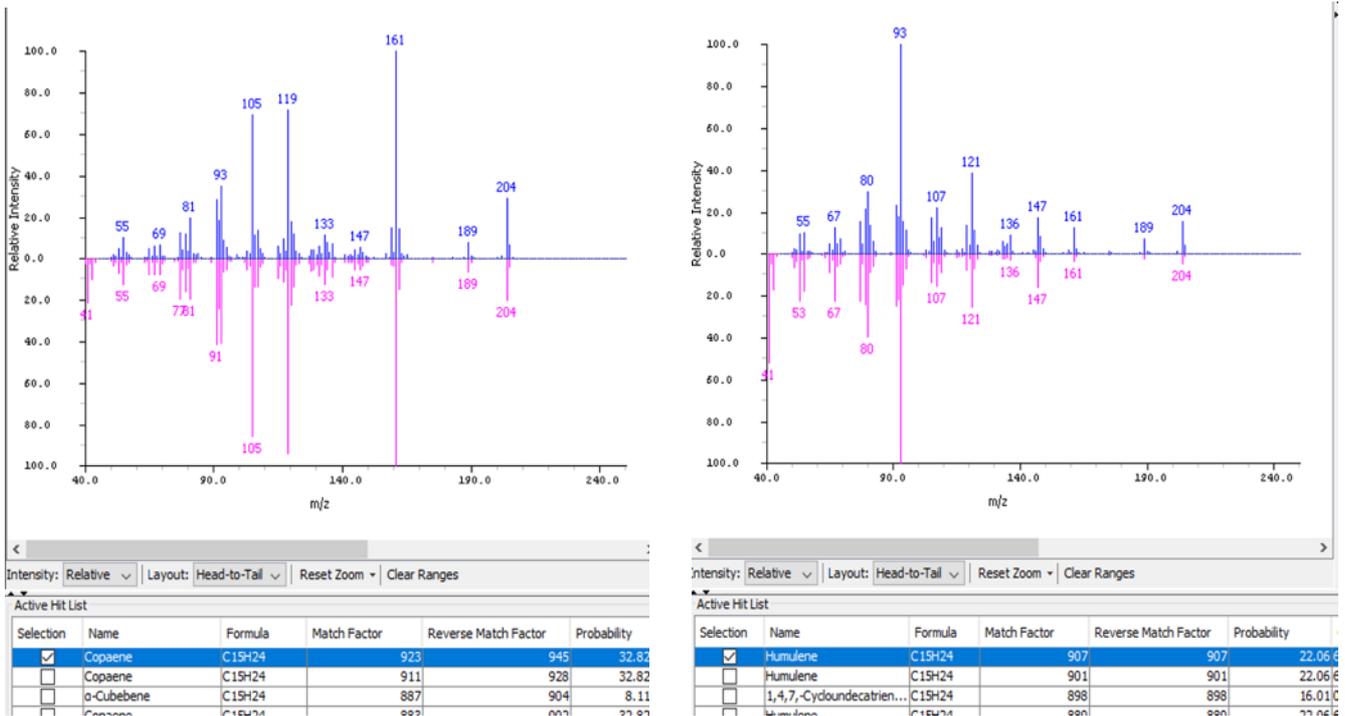
Profili e zoom di oli essenziali di lavanda di differenti varietà ottenuti con la configurazione GCxGC-TOFMS con modulatore termico.



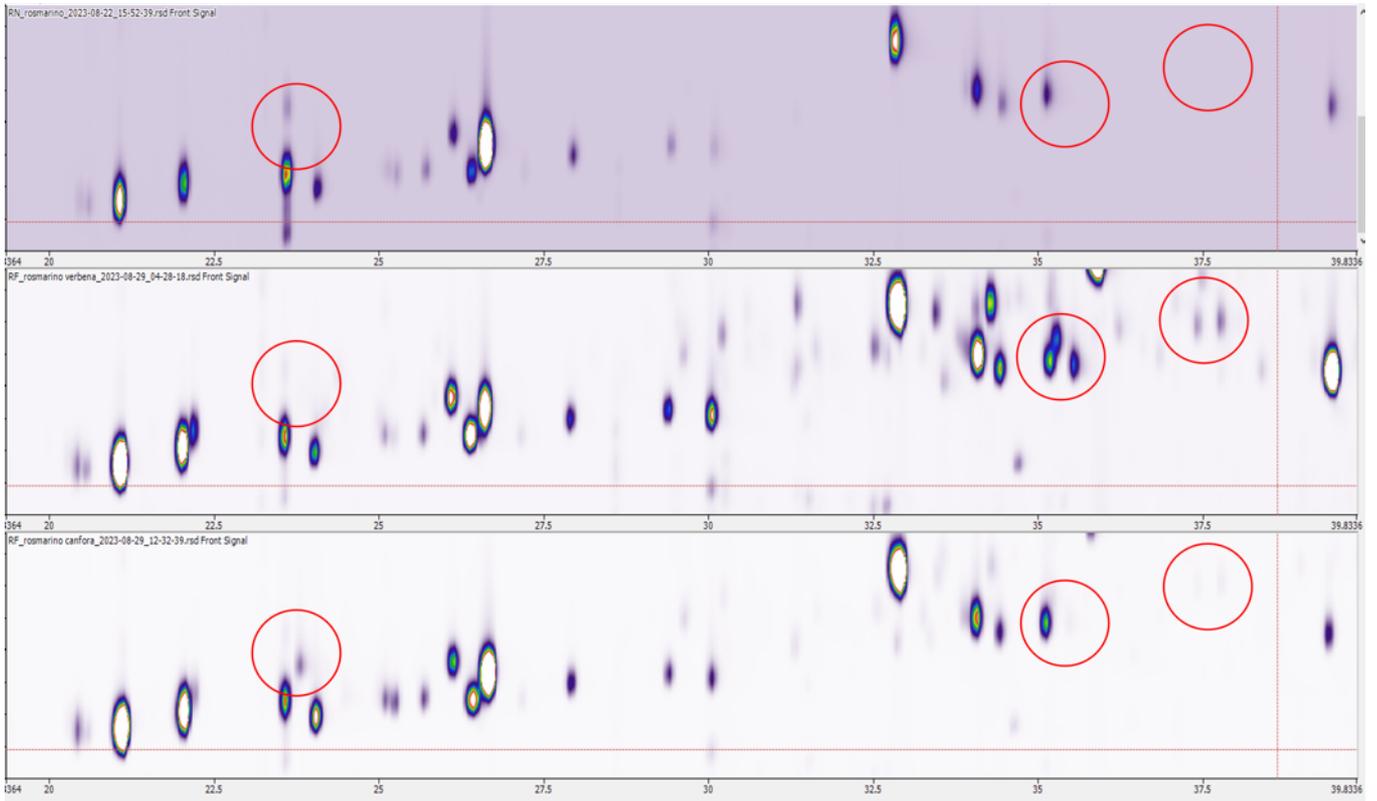
Oli essenziali di lavanda prodotti per distillazione in corrente di vapore: confronto tra un prodotto commerciale e uno artigianale.

Profili ottenuti con la configurazione GCxGC-TOFMS con modulatore termico.

Esempio di picco a livello di traccia presente solamente nel prodotto artigianale completamente separato dai componenti predominanti e identificato con buona affidabilità dalla ricerca diretta nella libreria MS. Software utilizzato per l'identificazione GC Image.



Esempi di spettri e corrispondente ricerca con libreria commerciale. Si osserva un ottimo riscontro anche a una velocità di acquisizione elevata di 100 Hz. Software GC Image.

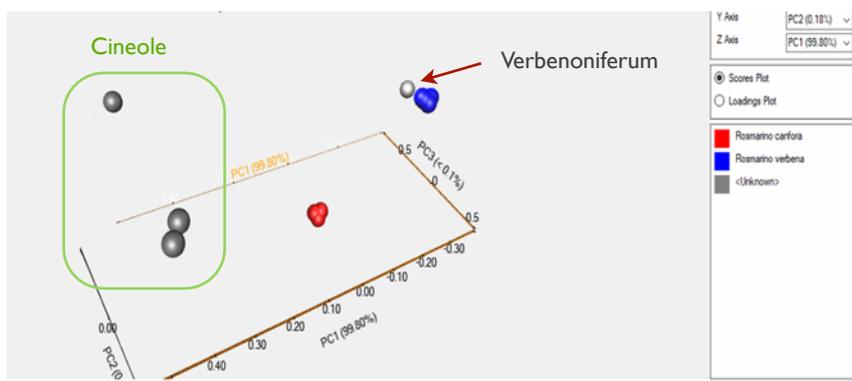


Configurazione con modulatore di flusso. Tracciati 2D del segnale al FID per oli essenziali di rosmarino di diversa origine. Anche senza la capacità di identificazione dei dati MS, i profili 2D consentono un confronto efficace tramite fingerprinting utile per la classificazione.

La qualità del software di data mining è fondamentale quanto la qualità del rilevatore di massa.

La piattaforma ChromCompare+ consente di confrontare più cromatogrammi al fine di estrarre informazioni utili sui componenti presenti indipendentemente dall'applicazione o dalla piattaforma. La funzione Feature Discovery filtra automaticamente i set di dati per trovare le differenze più significative tra i campioni. Ciò facilita l'elaborazione e riduce il numero di composti che richiedono ulteriori indagini come ad esempio la quantificazione.

È possibile creare, convalidare e testare modelli di clusterizzazione basati su matrici con caratteristiche ben definite per successivamente classificare correttamente campioni ignoti. Tali modelli sono essenziali nel controllo di qualità di routine e negli studi di autenticità, per una rapida analisi di campioni dall'origine sconosciuta e loro assegnazione automatica a una determinata classe. I flussi di lavoro semplificati, che mettono a disposizione strumenti statistici come la Principal Component Analysis (PCA) e molto altro, hanno qui permesso di ridurre al minimo le procedure laboriose e impegnative per consentire un'elaborazione dati avanzata ma (semi-)automatizzata e di facile utilizzo per la classificazione dei campioni sotto esame.

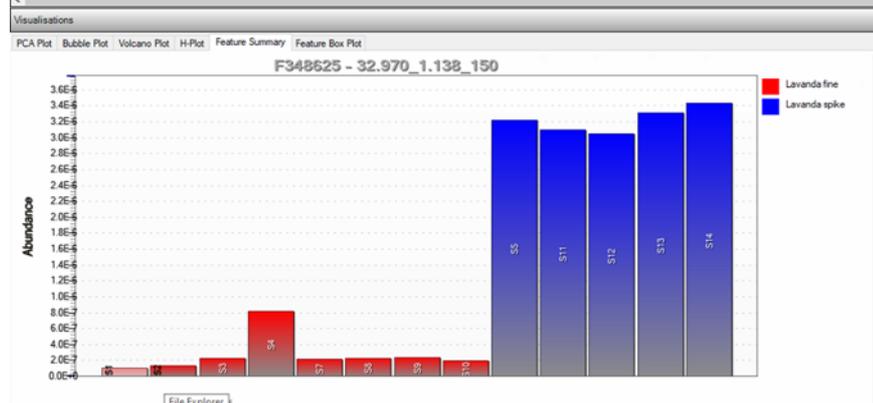


Classificazione degli oli di rosmarino provenienti da diverse varietà vegetali.

- Blu: Rosmarinus Verbenoniferum;
- Rosso: Rosmarinus Camphoriferum;
- Grigio: campioni commerciali.

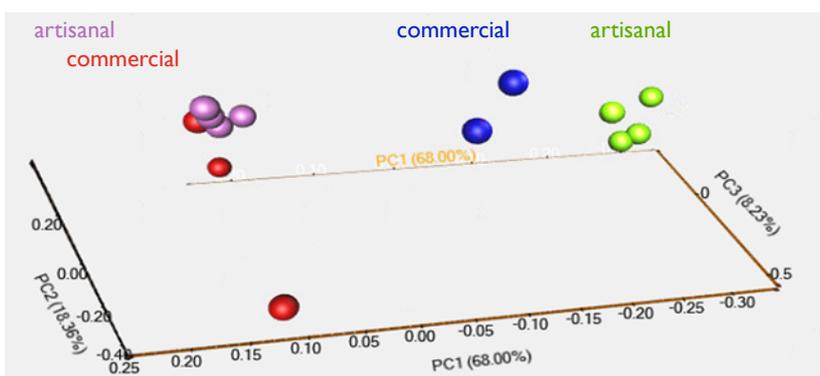
Analisi statistica eseguita tramite pacchetto software ChromCompare+.

ID	Name	Frequency	Status	Significance	Fold Change	Weight	Comment	S1	S2	S3
F537910	90.517_3.238_201	14	Auto	N/A	0	1		2.5176E-08	8.19423E-08	
F465422	43.797_3.238_121	14	Auto	N/A	0	1		3.21573E-07	1.35789E-06	
F335769	31.850_1.138_95	14	Auto	N/A	0	1		5.30982E-07	6.93075E-07	
F348625	32.970_1.138_150	14	Auto	N/A	0	1		9.99324E-08	1.37398E-07	
F158936	15.610_2.538_109	14	Auto	N/A	0	1		2.15696E-07	2.51279E-07	
F350099	33.157_0.438_150	14	Auto	N/A	0	1		1.06391E-07	1.67712E-07	
F382399	36.143_0.438_303	14	Auto	N/A	0	1		1.03162E-08	1.03041E-08	
F146177	17.781_1.138_414	17	Auto	N/A	0	1		6.57262E-10	1.17761E-09	



Esempio di feature caratteristica per una varietà di lavanda (spica, in blu) identificata tramite flusso di lavoro semi-automatizzato con la piattaforma software ChromCompare+.

Posizione nello spazio 2D e ione permettono un successivo tentativo di identificazione tramite ricerca con libreria commerciale.



Classificazione di olio di lavanda in base a varietà e produzione.

- Rosso/Rosa: Lavandula Officinalis L. Angustifolia Miller (SPICA);
- Blu/Verde: Lavandula Officinalis L. (FINE).

Analisi statistica eseguita tramite pacchetto software ChromCompare+.

Esempio di lista di composti identificati per un campione di olio (lavanda Spica) tramite libreria commerciale. La tabella, non esaustiva, riporta le identificazioni con Match Factor migliore di 900 senza necessità di flussi di lavoro laboriosi o lunghi quali la deconvoluzione.

Compound Name	Retention I (min)	Retention II (sec)	Volume	Hit I Match Factor	Hit I Reverse Match Factor
β -Myrcene	14,95	0,378	51548765,86	934	951
α -Pinene	12,55	3,00	945870,62	932	937
Camphene	13,25	0,334	35226470,84	932	932
Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,3,3-trimethyl-	12,55	0,19	182812939,73	931	939
Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, acetate	16,80	0,59	229508737,53	929	943
Camphor	22,45	2,88	65123971,19	929	946
trans- β -Ocimene	17,10	0,60	37584455,55	928	932
γ -Terpinene	18,20	0,78	93379518,65	928	933
Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1S)-	22,50	2,20	1051225337,09	924	951
Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)	14,45	0,51	202256130,67	923	938
Butanoic acid, 3-methyl-, hexyl ester	26,75	0,77	6832634,20	923	953
α -Pinene	12,55	0,39	5275485,29	922	936
(1S)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	12,45	3,01	294420,72	921	926
Camphene	13,20	0,62	359708,66	918	952
Camphene	13,20	0,67	1580189,62	918	958
3-Octanone	14,75	0,78	5318397,32	914	965
α -Phellandrene	15,65	0,54	20873993,42	913	931
p-Cymene	16,60	0,94	135307271,55	913	946
p-(1-Propenyl)-toluene	24,25	2,14	15906628,04	913	952
γ -Terpinene	14,30	0,43	63468380,95	911	938
Butanoic acid, 2-methyl-, hexyl ester	26,50	0,78	17501618,48	909	923
(-)- β -Bourbonene	33,50	0,99	33423399,29	909	914
Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,3,3-trimethyl-	17,60	0,60	8304868,00	908	928
Butanoic acid, 3-methyl-, hexyl ester	26,75	1,15	723225,81	908	949
Copaene	33,05	0,86	1590186,70	908	941
Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1 α ,4 α , β ,8 α)-	38,90	1,40	56864674,72	908	935
Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	13,45	0,47	2904553,46	907	948
γ -Terpinene	18,65	0,93	38343867,93	907	927
4-Terpinenyl acetate	21,25	1,13	4255140,15	907	925
β -Bisabolene	38,50	1,06	47286765,89	907	932
1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	16,20	0,57	20026901,18	905	919
Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	19,60	0,90	30145527,70	905	915
4-Terpinenyl acetate	23,90	1,41	64119654,30	903	925
Cyclohexane, 1-methylene-4-(1-methylethenyl)-	16,85	0,66	36201095,56	902	905
Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)-	14,45	2,99	404092,10	901	940
(+)-3-Carene	27,40	1,04	15703847,61	901	902
Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7,7-trimethyl-	12,00	3,12	819616,84	900	914
α -Phellandrene	12,20	3,078	820995,13	900	917
Butanoic acid, hexyl ester	24,40	0,86	5346978,48	900	953

Conclusioni

- La GC \times GC-MS è uno strumento molto potente per la profilazione dettagliata di miscele complesse come gli oli essenziali.
- La composizione chimica degli oli di lavanda e rosmarino è stata caratterizzata con molte più informazioni rispetto alle tecniche di separazione convenzionali.
- I profili 2D caratteristici si sono dimostrati molto efficaci nell'evidenziare le differenze utili alla classificazione.
- Gli strumenti di analisi multivariata utilizzati si sono rivelati utili per poter effettuare un'elaborazione dei dati più avanzata e informativa in modo efficace ma accessibile.