

Monitoraggio in linea dello spazio di testa di oli di oliva tramite Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry

IN QUESTO LAVORO ABBIAMO VERIFICATO LA POSSIBILITÀ DI UTILIZZARE LA PROTON TRANSFER REACTION - MASS SPECTROMETRY (PTR-MS) PER IL MONITORAGGIO IN LINEA E PER INIEZIONE DIRETTA DELLO SPAZIO DI TESTA DI OLI DI OLIVA. IN UN PRIMO ESPERIMENTO LO SPAZIO DI TESTA DI UN OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA A 77 °C È STATO MONITORATO IN CONTINUO PER OLTRE 70 H OSSERVANDO LA COMPARSA DI SEGNALI RICONDUCEBILI A PRODOTTI SECONDARI DI OSSIDAZIONE E INDICANDO LA POSSIBILITÀ DI MONITORARE CON ALTA RISOLUZIONE TEMPORALE E SENZA ALCUNA PREPARATIVA L'OSSIDAZIONE DEL CAMPIONE. IN UN SECONDO ESPERIMENTO, DEGLI OLI EXTRAVERGINI DI OLIVA SONO STATI SOTTOPOSTI AD UN PROCESSO DI TERMO-OSSIDAZIONE ACCELERATO. DURANTE TALE PROCESSO SONO STATI MONITORATI SIA IL NUMERO DI PEROSSIDI, TRAMITE UN METODO SPETTROFOTOMETRICO, SIA LO SPAZIO DI TESTA MEDIANTE PTR-MS. L'INCREMENTO DEL NUMERO DI PEROSSIDI DURANTE L'ESPERIMENTO È RISULTATO ESSERE ALTAMENTE CORRELATO CON DIVERSI COMPOSTI VOLATILI CHE DERIVANO DA PROCESSI DI OSSIDAZIONE ED IN PARTICOLARE ALCUNE ALDEIDI LA CUI ORIGINE È RICONDUCEBILE ALLA DEGRADAZIONE DEGLI IDROPEROSSIDI DEGLI ACIDI GRASSI.

ONLINE MONITORING OF OLIVE OILS HEADSPACE BY PROTON TRANSFER REACTION-MASS SPECTROMETRY

IN THIS WORK WE EVALUATED THE POSSIBILITY TO USE THE PROTON TRANSFER REACTION - MASS SPECTROMETRY (PTR-MS) FOR THE ONLINE MONITORING AND DIRECT SAMPLING OF OLIVE OIL HEADSPACE. IN A FIRST EXPERIMENT, THE HEADSPACE OF AN EXTRA VIRGIN OLIVE OIL AT 77 °C WAS MONITORED CONTINUOUSLY FOR MORE THAN 70 H OBSERVING THE FORMATION OF COMPOUNDS RELATED TO SECONDARY OXIDATION PRODUCTS, SHOWING THAT IT IS POSSIBLE TO MONITOR WITH HIGH TEMPORAL RESOLUTION AND WITHOUT SAMPLE PREPARATION THE OXIDATION PROCESS OF THE OIL. IN A SECOND EXPERIMENT, EXTRA VIRGIN OLIVE OILS WERE SUBJECTED TO AN ACCELERATED THERMO-OXIDATION PROCESS. DURING THAT EXPERIMENT, PEROXIDE VALUE WAS MONITORED BY MEANS OF A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD, AND THE HEAD SPACE WAS MONITORED BY PTR-MS. INCREASING OF PEROXIDE VALUE DURING THE THERMO-OXIDATION WAS HIGHLY CORRELATED WITH SEVERAL VOLATILE COMPOUNDS ORIGINATING FROM OXIDATION PROCESSES AND IN PARTICULAR ALDEHYDES ARISING FROM LIPID HYDROPEROXIDES.

E. APREA^{1*}, F. BIASIOLI¹, G. SANI²,
C. CANTINI², TILMANN D. MÄRK^{3,4},
F. GASPERI¹

1) ASMA RESEARCH CENTER - AGRIFOOD QUALITY DEPARTMENT, SAN MICHELE ALL'ADIGE (TN)

2) ISTITUTO PER LA VALORIZZAZIONE DEL LEGNO E DELLE SPECIE ARBOREE, CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE, SESTO FIORENTINO

3) INSTITUT FÜR IONENPHYSIK UND ANGEWANDTE PHYSIK, UNIVERSITÄT INNSBRUCK, AUSTRIA

4) DEPARTMENT OF PLASMAPHYSICS, UNIVERSITY OF BRATISLAVA, SLOVAK REPUBLIC

**) AUTORE CORRISPONDENTE: DR. EUGENIO APREA, IASMA RESEARCH CENTER, AGRIFOOD QUALITY DEPARTMENT, VIA E. MARCH 1, 38010 SAN MICHELE ALL'ADIGE (TN) - TEL. ++39 0461 615388; FAX ++39 0461 650956; E-MAIL EUGENIO.APREA@IASMA.IT.*

LAVORO PRESENTATO IN OCCASIONE DEL 20° CONGRESSO SISSG, QUALITÀ E SICUREZZA DEGLI OLI DI OLIVA: CONOSCENZE ATTUALI E PROSPETTIVE FUTURE, ROMA 7-8 GIUGNO 2007

INTRODUZIONE

L'acronimo PTR-MS sta per Proton Transfer Reaction - Mass Spectrometry e indica uno spettrometro di massa utilizzato per l'analisi dei composti organici volatili (VOCs) basato sulla ionizzazione soft delle specie chimiche aventi affinità protoniche maggiori di quella dell'acqua [1].

Le caratteristiche principali che contraddistinguono questo strumento sono:

- I) la ridotta frammentazione delle specie ionizzate che semplifica gli spettri di miscele complesse;
- II) la velocità che permette sia di seguire in linea processi che avvengono in modo relativamente rapido sia la misura di un numero elevato di campioni in tempi ragionevoli;
- III) la non invasività delle misurazioni (nessun trattamento del campione) che riduce il rischio di artefatti e preserva il campione per ulteriori analisi;
- IV) la quantificazione diretta dei composti, virtualmente, senza calibrazione [2].

Queste caratteristiche rendono il PTR-MS uno strumento particolarmente utile per lo studio della componente volatile non solo in ambito accademico ma anche in contesti applicativi come ad esempio la caratterizzazione di prodotti agro-alimentari [3-7] o lo studio delle modificazioni indotte dai trattamenti tecnologici sugli alimenti [8-9].

In questo contributo mostriamo delle applicazioni in cui la tecnica PTR-MS viene utilizzata per misurare in linea lo spazio di testa di oli di oliva e per monitorare la formazione di prodotti secondari di ossidazione durante un processo di termo-ossidazione accelerato.

La formazione dei prodotti secondari di ossidazione avviene a seguito della degradazione degli idroperossidi; questi ultimi si formano nelle prime fasi dell'ossidazione lipidica a carico degli acidi grassi per azione dell'ossigeno e favorita dalla presenza di agenti catalitici (luce, enzimi, cationi metallici, ecc.). Molti di questi composti, volatili e sensorialmente attivi, danno origine alla comparsa di difetti quando presenti al di sopra di determinate concentrazioni [10-11].

Le misure effettuate col PTR-MS mostrano una chiara correlazione tra l'incremento di specifici composti volatili e l'aumento del numero di perossidi, fornendo uno strumento per la predizione rapida di questo parametro. Inoltre, gli spettri PTR-MS possono essere correlati ad altri dati come, per esempio le valutazioni sensoriali, come mostrato in un altro lavoro [12].

MATERIALI E METODI

Misure di spazio di testa

Campioni di olio (42 oli extravergini di oliva prodotti in un impianto di tipo aziendale "Oliomio 250" della ditta Toscana Enologica Mori presso l'Istituto per la valorizzazione del legno e delle specie arboree (IVALSA-CNR) di Sesto Fiorentino (FI)) sono stati messi in bottiglie color ambra da 120 ml e tenuti in un bagno termostato durante le misurazioni. I composti organici volatili nello spazio di testa dei campioni sono stati trasferiti in continuo ($10 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) direttamente nella camera di reazione di uno strumento PTR-MS commerciale (Ionicon GmbH, Innsbruck, Austria) attraverso un capillare (fused silica uncoated, Supelco, Bellefonte, USA) dal diametro interno di 0,25 mm, tenuto alla temperatura di 70 °C. È stato acquisito l'intero spettro da m/z 20 a 260 con un tempo di scansione di 0,2 s per massa. Il volume di gas prelevato è stato rimpiazzato da un flusso di gas (azoto o aria), attraverso un secondo ago, per evitare cadute di pressione nel sistema. Tra una misura e l'altra è stato flussato azoto per circa 5 minuti per permettere la pulizia della linea di trasferimento.

Misure in linea di spazio di testa

Una bottiglia color ambra da 120 ml contenente 5 ml di olio extravergine di oliva e chiusa da un tappo dotato di un setto forabile è stata posta in un bagno termostato. All'interno della bottiglia è stata introdotta una termocoppia, immersa nell'olio. La temperatura del bagno termostato è stata impostata inizialmente a 40 °C; dopo circa 35 minuti, quando il campione ha raggiunto i 39 °C la temperatura del bagno termostato è stata impostata ad 80 °C. Il campione ha raggiunto la temperatura di 77 °C dopo circa 2 h, tale temperatura è rimasta costante per il proseguo dell'esperimento come riportato in Figura 2. Lo spazio di testa è stato monitorato in continuo, acquisendo uno spettro da m/z 20 a 260 con un tempo di scansione di 0,2 s per massa. Il volume prelevato è stato rimpiazzato da aria prelevata dall'esterno e filtrata attraverso un filtro a carboni attivi (Supelpure™ HC Hydrocarbon Trap, Supelco, Bellefonte, USA).

Termo-ossidazione in stufa

Delle aliquote di olio extravergine (2,5 g) sono state introdotte in bottiglie da 120 ml e poste, non tappate, in una stufa termo-ventilata (WTB Binder, Labortechnik GmbH, Tuttlingen, Germany) tenuta

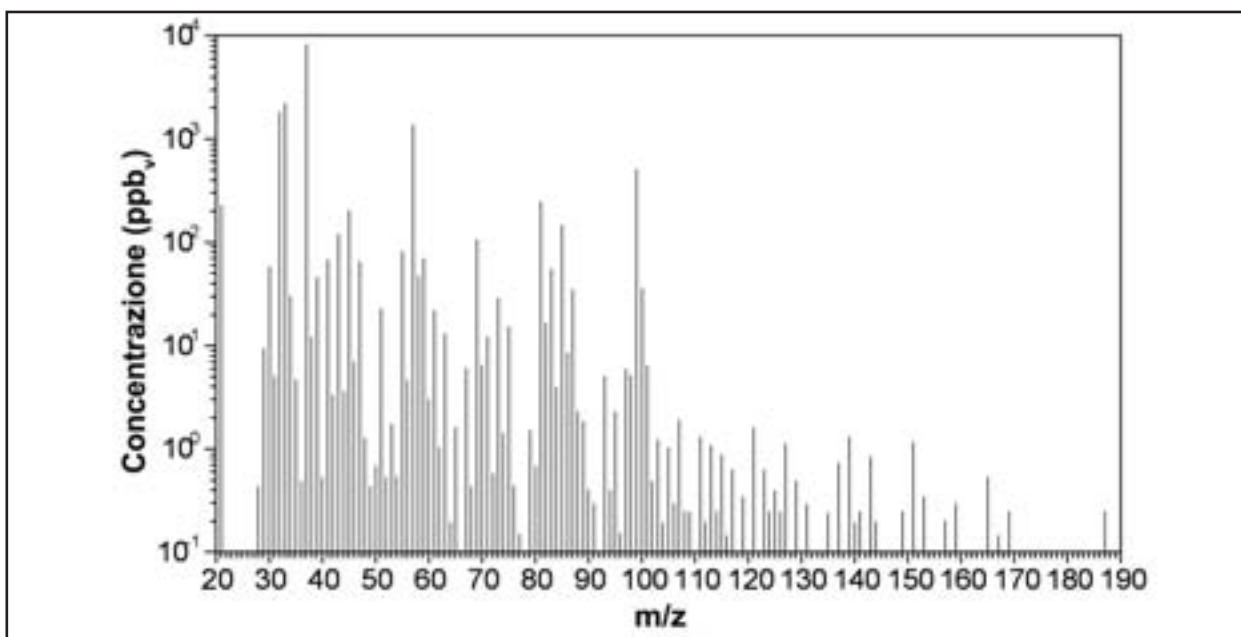


Figura 1 - Spettro PTR-MS. Profilo dello spazio di testa di un olio extravergine di oliva a 20 °C nell'intervallo di massa da m/z 20 a 190

alla temperatura di 110°C. A diversi intervalli, da pochi minuti fino a 28 ore, due campioni per volta sono stati rimossi dalla stufa, raffreddati alla temperatura di 28°C, chiusi col tappo dotato di setto forabile e dopo un'ora di equilibrio lo spazio di testa è stato misurato come sopra descritto, rimpiazzando il volume prelevato con azoto (SOL S.p.A., Italia, purity: 99,999%) per evitare l'ulteriore ossidazione del campione durante la misura.

Numero di perossidi

Il numero di perossidi, degli oli sottoposti al processo di termo-ossidazione accelerata, è stato determinato con un analizzatore automatico FOOD-LAB (CDR, Ginestra Fiorentina, Firenze, Italia, <http://foodlab.cdr-mediared.it>) su di un'aliquota di 20 µL, prelevata dagli stessi campioni su cui è stato misurato lo spazio di testa. Il metodo FoodLab è basato su di una reazione colorimetrica nella quale i perossidi R-O-O-R ossidano gli ioni Fe²⁺. Gli ioni Fe³⁺ formati nel corso dell'ossidazione, vengono complessati e formano un complesso colorato rosso la cui intensità, misurata a 505 nm, è direttamente proporzionale alla concentrazione di perossidi nel campione. I valori riportati sono espressi in meq(O₂)-kg⁻¹.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Misure in linea

In Figura 1 viene riportato un tipico profilo (spet-

tro) dello spazio di testa di un olio extravergine di oliva misurato con uno strumento PTR-MS.

Nella Figura 2 sono riportati a titolo di esempio tre dei composti volatili presenti negli oli extravergini che sono stati monitorati, esanale, *trans*-2-esenale e nonanale, scelti perché, durante la prova di termo-ossidazione mostrano tre diversi andamenti temporali che sono riconducibili alla loro diversa origine. Nella parte sinistra della Figura 2 è riportato il particolare dei primi 120 minuti durante il riscaldamento del campione da temperatura ambiente fino a 77 °C (temperatura del bagno termostatico: 80 °C). Dalla figura si vede chiaramente che l'emissione di esanale e *trans*-2-esenale, inizialmente presenti nell'olio, segue lo stesso profilo di incremento della temperatura, in quanto l'aumento di temperatura ne diminuisce la solubilità nel campione. Quando il campione raggiunge i 77°C si osserva il picco massimo di emissione; successivamente, quando la temperatura rimane costante, le concentrazioni dell'esanale e della *trans*-2-esenale cominciano a diminuire a seguito del prelievo in continuo per la misura.

Esanale e *trans*-2-esenale sono presenti negli oli di oliva sin dalla estrazione in concentrazioni sensorialmente percettibili, conferiscono infatti il tipico odore erbaceo e fruttato [11] mentre la nonanale è presente solo in tracce. La *trans*-2-esenale e l'esanale sono prodotte nelle olive ad opera di specifiche lipo-ossigenasi che agiscono rispettivamente sull'acido linolenico e linoleico [13]. L'esanale si forma anche come

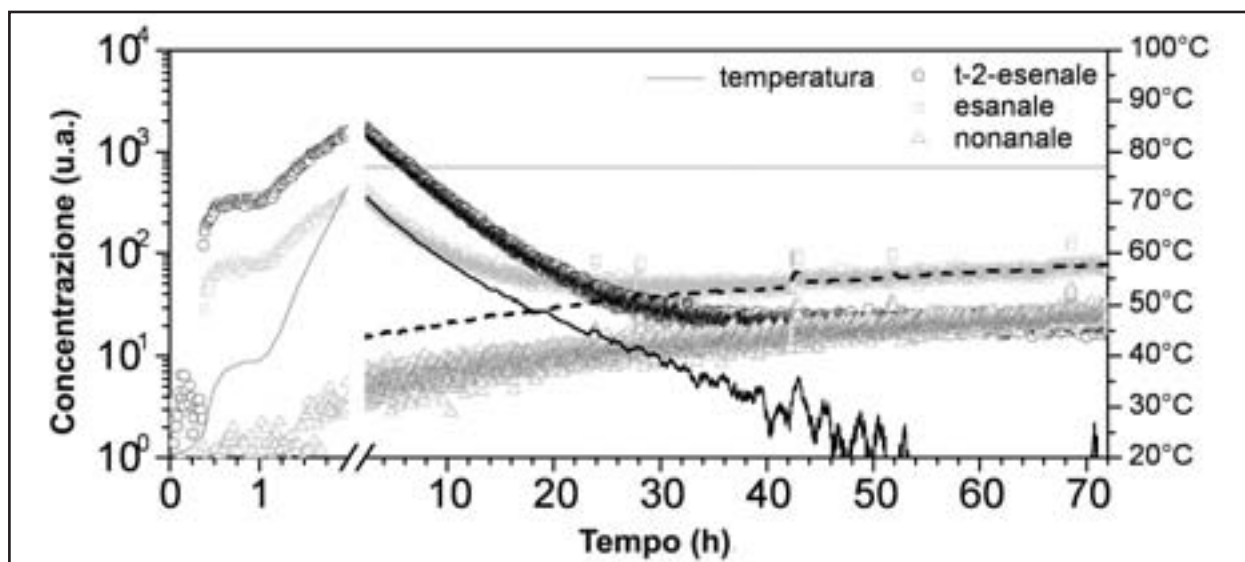


Figura 2 - Misura in linea. Profilo temporale dell'evoluzione di alcune aldeidi in un olio extravergine di oliva riscaldato fino a 77 °C. La linea grigia continua indica il profilo della temperatura durante il riscaldamento del campione. Le linee nere tratteggiate indicano i due contributi al segnale dell'esenale: con la linea nera continua il composto presente nel campione all'inizio della misura e con la linea nera tratteggiata quello che si forma durante l'esperimento

prodotto secondario di ossidazione a seguito della degradazione degli idroperossidi [11]. Infatti, dagli andamenti in Figura 2 si osserva che, mentre la concentrazione della *trans*-2-esenale continua a diminuire nel tempo, la concentrazione di esenale dopo circa 30 h comincia a crescere indicando la formazione di ulteriore esenale. La nonanale è un prodotto secondario di ossidazione che deriva dalla scissione β -omolitica del 9- e del 10- idroperossido dell'acido oleico; essa presenta un odore tipico, descritto come grasso, cera e vernice [14]. Dalla Figura 2 si vede come l'incremento di nonanale sia costante nel tempo presentando un andamento simile a quello dell'esenale nel tratto di curva dopo le 30 h.

È possibile separare il segnale dell'esenale in due distinte curve (linee nere sottili in Fig. 2): la prima curva descrive l'andamento della quota di esenale che si forma a seguito dalla degradazione degli idroperossidi (linea nera tratteggiata) e che è stata estrapolata dal rapporto tra il segnale della nonanale e dell'esenale calcolato nell'ultima parte delle curve (p.e. dopo 60 h, Fig.2); la seconda curva, invece, descrive l'andamento dell'esenale di origine endogena (linea nera continua) inizialmente presente nel campione e ottenuta come differenza tra il segnale totale di esenale e la curva descritta dalla linea nera tratteggiata.

I dati riportati in Figura 2 mostrano che con la tecnica PTR-MS è possibile seguire in tempo reale sia il profilo dei composti volatili inizialmente presenti in

un olio sia il monitoraggio di composti di neoformazione come, in questo caso, i prodotti dei processi di ossidazione.

Da segnalare, inoltre, che dalla pendenza del segnale in scala semilogaritmica è possibile calcolare, in modo rapido ed accurato, il coefficiente di ripartizione tra olio ed aria di diversi volatili [15]; tale parametro è di fondamentale importanza per la stima delle soglie olfattive dei composti odorosi.

Termo-ossidazione accelerata

Di seguito sono riportati i risultati di un secondo esperimento in cui i campioni di olio sono stati sottoposti ad un processo accelerato di termo-ossidazione a 110 °C. In Figura 3 sono riportati gli andamenti di alcuni dei composti volatili formati come prodotti secondari di ossidazione. L'eptanale, l'ottanale ed la *trans*-2-ottenale derivano dalla scissione β -omolitica del 11-idroperossido rispettivamente dell'acido linoleico, oleico e linolenico [12] e sono associati alla percezione sensoriale del rancido [11]. Contestualmente all'aumento della concentrazione di questi volatili nello spazio di testa degli oli, si osserva un aumento del numero di perossidi che mostra un andamento simile (Fig 4). Di fatto, la concentrazione di queste sostanze risulta essere fortemente correlata (Fig. 5) con il numero di perossidi [12]; questo risultato indica che tali composti sono tutti possibili candidati da utilizzare per la stima di questo parametro, almeno nell'intervallo di concen-

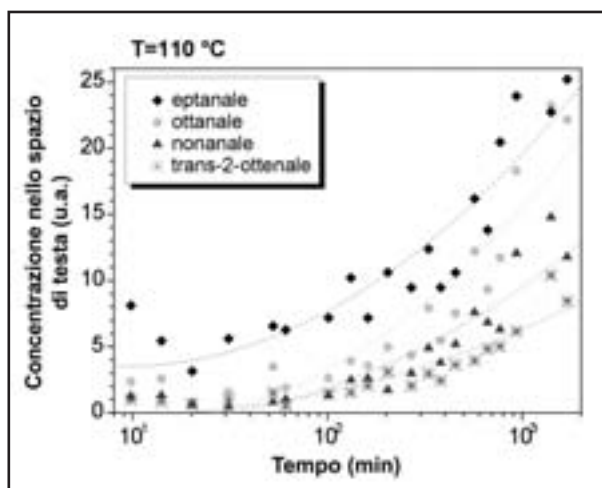


Figura 3 - Profilo temporale della concentrazione di alcune aldeidi nello spazio di testa di oli extravergini di oliva durante il processo di termo-ossidazione accelerata

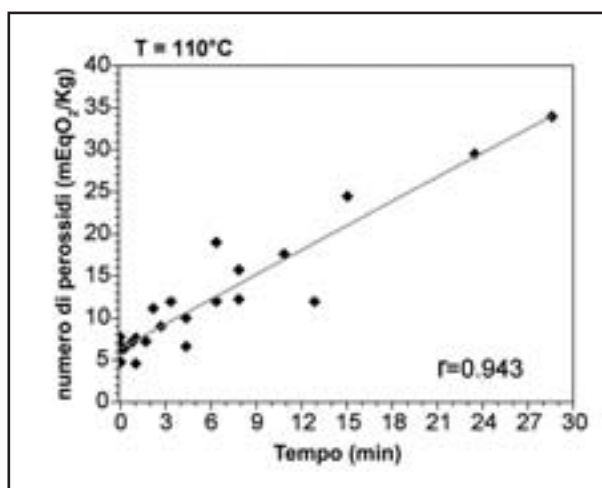


Figura 4 - Andamento temporale del numero di perossidi durante il processo di termo-ossidazione accelerata. r : coefficiente di correlazione lineare

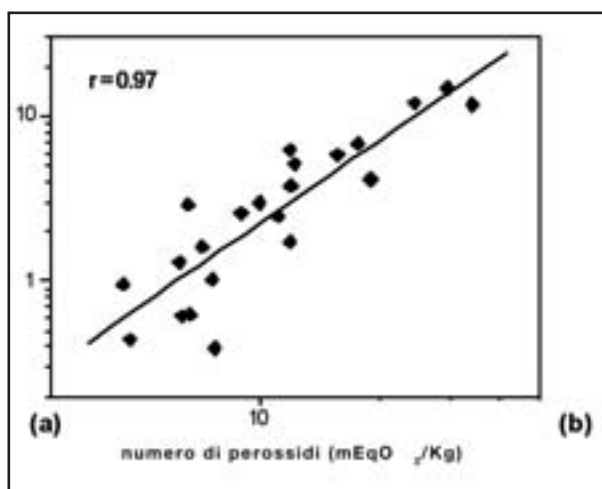


Figura 5 - Correlazione tra il numero di perossidi ed il segnale del nonanale (a) e dell'ottanale (b). r : coefficiente di correlazione lineare

trazioni considerato in questo studio. È stato possibile, inoltre, utilizzare l'intero spettro per costruire modelli generalizzati di predizione sia per la classificazione degli oli rancidi che per la stima del numero di perossidi come mostrato in un altro lavoro [12].

In conclusione, questo studio dimostra che il PTR-MS permette il monitoraggio diretto dello spazio di testa di oli a diverse temperature in modo rapido, semplice e senza nessun trattamento del campione (estrazione e/o concentrazione dei volatili) e, in particolare, di seguire il processo di ossidazione di un olio di oliva, fornendo informazioni quantitative su composti di interesse tecnologico e sensoriale.

Alcuni composti monitorati, in particolare aldeidi, sono fortemente correlati col numero di perossidi misurato in maniera indipendente. Se tali risultati verranno confermati su oli mantenuti nelle normali condizioni di conservazione, questo metodo potrebbe essere proposto per la determinazione rapida e non invasiva del numero di perossidi oltre che per studiare la cinetica stessa di formazione e rilascio dei composti volatili medesimi.

RINGRAZIAMENTI

Lavoro parzialmente finanziato dal progetto PAT-CNR AGRIND.

BIBLIOGRAFIA

- [1] W. Lindinger, J. Hirber, H. Paretzke, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **129**, 79-88 (1993).
- [2] W. Lindinger, A. Hansel, A. Jordan, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **173**, 191-241 (1998)
- [3] F. Gasperi, G. Gallerani, A. Boschetti, F. Biasioli, A. Monetti, E. Boscaini, A. Jordan, W. Lindinger, S. Iannotta, *J. Sci. Food Agric.* **81**, 357-363 (2001).
- [4] E. Aprea, F. Biasioli, S. Carlin, G. Versini, T.D. Märk, F. Gasperi, *Rapid Commun. Mass Sp.* **21**, 2564-2572 (2007).
- [5] E. Aprea, F. Biasioli, F. Gasperi, D. Mott, F. Marini, T.D. Märk, *Int. Dairy J.* **17**, 226-234 (2007).
- [6] F. Biasioli, F. Gasperi, E. Aprea, I. Endrizzi, V. Framondino, F. Marini, D. Mott, T.D. Märk, *Food Qual. Prefer.* **17**, 63-75 (2006).
- [7] P. M. Granitto, F. Biasioli, E. Aprea, D. Mott, C. Furlanello, T. D. Märk, F. Gasperi. *Sensor. Actuat. B-Chem.* **121**, 379-385 (2007).

- [8] F. Biasioli, F. Gasperi, E. Aprea, L. Colato, E. Boscaini, T. Märk. *Int. J. Mass Spectrom.* 223-224, 343-353 (2003).
- [9] D. Jaksch, R. Margesin, T. Mikoviny, J.D. Skalny, E. Hartungen, F. Schinner, N.J. Mason, T.D. Märk. *Int. J. Mass Spectrom.* 239, 209-214 (2004).
- [10] EEC. Official Journal of the European Union, Regulation no. 796/2002 of 6 May 2002.
- [11] M.T. Morales, J.J. Rios, R. J. Aparicio, *Agric. Food Chem.* 45, 2666-2673 (1997).
- [12] E. Aprea, F. Biasioli, G. Sani, C. Cantini, T. D. Märk, F. Gasperi, *J. Agric. Food Chem.* 54, 7635-7640 (2006).
- [13] M. Ridolfi, S. Terenziani, M. Patumi, G. Fontanazza, *J. Agric. Food Chem.* 50, 835-839 (2002).
- [14] S.P. Kochhar, In *Food Taints and Off-Flavours*; M. J. Saxby, Ed., Blackie Academic & Professional, 150-201, London, UK 1993.
- [15] E. Aprea, F. Biasioli, T. D. Märk, F. Gasperi. *Int. J. Mass Spectrom.* 262, 114-121 (2007).

Ricevuto 17 ottobre 2007, accettato 10 dicembre 2007