



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE, BIOLOGICHE,
FARMACEUTICHE ED AMBIENTALI

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE
DOCTOR OF PHILOSOPHY IN CHEMICAL SCIENCES
S.S.D. CHIM/10 CHIMICA DEGLI ALIMENTI

**Determinazione di molecole bioattive presenti in matrici
complesse mediante tecniche cromatografiche
convenzionali ed avanzate**

Tesi di dottorato:

Maria Rita Testa Camillo

Tutor:

Chiar.mo Prof. Francesco Cacciola

Coordinatrice:

Chiar.ma Prof.ssa Concetta De Stefano

XXXVI CICLO (AA 2022-2023)

Scopo della tesi

CAPITOLO 1. La Cromatografia Liquida.

CAPITOLO 2. Uso della cromatografia liquida accoppiata a diversi rivelatori per la determinazione di molecole bioattive in campioni di oli extravergine d'oliva aromatizzati.

CAPITOLO 3. Estrazione e separazione cromatografica mediante l'uso di fluidi supercritici.

CAPITOLO 4. Determinazione di pesticidi chirali nei semi di canapa mediante un sistema on-line di estrazione e separazione cromatografica a fluidi supercritici.

CAPITOLO 5. Cromatografia a fluidi supercritici accoppiata alla spettrometria di massa per la determinazione dei composti eterociclici ossigenati presenti negli oli essenziali agli agrumi e nei profumi aromatizzati agli agrumi.

Riferimenti bibliografici

Scopo della tesi

Il lavoro scientifico svolto durante i tre anni del corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche, ha avuto come oggetto di studio, l'impiego di metodiche HPLC convenzionali ed avanzate per l'analisi di molecole bioattive in matrici complesse.

E' stata effettuata la determinazione di numerose molecole bioattive presenti negli oli extravergine d'oliva aromatizzati, mediante l'uso della cromatografia liquida accoppiata a diversi rivelatori al fine di evidenziare differenze qualitative e quantitative in relazione all'agente aromatizzante e al metodo di aromatizzazione.

Inoltre, l'attività di ricerca si è incentrata sullo sviluppo e la validazione di metodi analitici sostenibili che riducono l'uso di solventi organici e di conseguenza la produzione di rifiuti, al fine di garantire la sicurezza dell'operatore e dell'ambiente.

E' stata ottimizzata una nuova metodica analitica SFE-SFC-QqQMS che prevede l'uso di un fluido supercritico (CO₂) per l'estrazione e la successiva enantioseparazione dei pesticidi chirali presenti in nove campioni di semi di *Cannabis Sativa L.*

Infine, per la caratterizzazione qualitativa e quantitativa dei composti eterociclici ossigenati (cumarine, furocumarine, polimetossiflavoni) presenti nei derivati agrumari, è stato sviluppato un nuovo metodo analitico SFC-QqQMS, a basso impatto ambientale che ha permesso la separazione di tutte le molecole in esame in meno di otto minuti. Il metodo ottimizzato è stato applicato con successo per investigare la presenza dei composti eterociclici dell'ossigeno in tredici oli essenziali e in trenta profumi commerciali.

Gli approcci investigati, grazie all'elevata capacità separativa, si sono rivelati particolarmente utili per l'analisi di diverse matrici complesse, anche quando i composti erano presenti in tracce nei prodotti finiti (alimenti e cosmetici).

Capitolo 1. La cromatografia liquida

1.1 La Cromatografia

La cromatografia è una tecnica analitica ampiamente utilizzata per la separazione, determinazione e identificazione di composti chimici presenti in miscele complesse. Essa rappresenta la tecnica strumentale di indagine più diffusa grazie all'elevato potere di risoluzione e alla sua versatilità, è possibile infatti, applicarla alla quasi totalità delle molecole presenti in natura.

Negli ultimi decenni, le applicazioni della cromatografia sono aumentate in maniera esponenziale, sia per la crescente necessità di disporre di metodiche all'avanguardia per la caratterizzazione di miscele complesse, sia per la messa appunto di nuove tecniche cromatografiche; proprio per questo, vista la presenza di numerose tecniche, risulta difficoltoso dare una definizione univoca al termine "cromatografia".

Ad oggi, la definizione di cromatografia, ufficialmente riconosciuta dalla IUPAC è: "La cromatografia è un metodo fisico di separazione in cui i componenti da separare vengono distribuiti tra due fasi, una delle quali è stazionaria (fase stazionaria) mentre l'altra (fase mobile) si muove in una direzione definita" [1].

In tutte le separazioni cromatografiche il campione viene solubilizzato in una fase mobile, che può essere un gas, un liquido o un fluido supercritico e successivamente quest'ultima viene forzata attraverso una fase stazionaria immiscibile, che viene mantenuta ferma in una colonna o su di una superficie solida.

Le due fasi vengono scelte in modo tale che i componenti si distribuiscano a gradi variabili tra esse. I componenti che vengono trattiene debolmente dalla fase stazionaria viaggiano in modo rapido e saranno i primi ad essere eluiti; mentre, i componenti che vengono più fortemente trattiene dalla fase stazionaria si muovono più lentamente con il flusso della fase mobile ed eluiscono alla fine. In questo modo, i componenti della miscela iniziale, risulteranno essere separati in bande discrete e possono essere analizzati qualitativamente e quantitativamente [2].

Il principale criterio di classificazione dei diversi metodi cromatografici si basa sullo stato fisico delle fasi mobile e stazionaria, solitamente specificando solo la fase mobile, si parla quindi di cromatografia liquida (LC) di gascromatografia (GC) e di cromatografia con fluidi supercritici (*supercritical fluid chromatography*, SFC), a seconda che la fase mobile sia rispettivamente un liquido, un gas o un fluido supercritico.

1.2 Cromatografia liquida

La cromatografia liquida (*liquid chromatography* o, brevemente, LC) è la tecnica analitica più versatile e tutt'oggi la più diffusa. La separazione è basata sulla distribuzione selettiva dei singoli componenti di una miscela tra la fase stazionaria (materiale di rivestimento della colonna) e la fase mobile (solvente liquido).

A differenza di quanto avviene in gascromatografia (GC), in LC qualunque sia il meccanismo di separazione, i soluti interagiscono sia con la fase mobile che con la fase stazionaria. Infatti, con la fase mobile liquida, il soluto subisce quantomeno delle interazioni che possono essere ricondotte alla solvatazione.

Le tecniche di cromatografia liquida sono spesso classificate in base al meccanismo di separazione o al tipo di fase stazionaria, possono essere quindi divise in:

- **Cromatografia di ripartizione (o Liquido-liquido LLC)** nella quale la fase stazionaria e quella mobile sono entrambe liquide e immiscibili fra loro. La fase stazionaria è adsorbita su un supporto solido inerte e la separazione avviene grazie alla diversa distribuzione di due o più soluti fra le due fasi liquide.
- **Cromatografia di adsorbimento (o Liquido-Solido LSC)** nella quale la fase stazionaria è solida; in questo caso il solido non è semplicemente un supporto inerte, ma è in grado di adsorbire superficialmente i soluti, per cui è un adsorbente. Questo tipo di cromatografia è basata sull'interazione tra i siti attivi dell'adsorbente solido (generalmente silice o allumina) ed i gruppi funzionali presenti nelle molecole dei soluti da separare. Queste interazioni sono il risultato di un fenomeno di competizione tra le molecole della fase mobile e del soluto per i siti attivi.

Per quanto concerne sia la cromatografia di ripartizione che la cromatografia di adsorbimento, è bene fare un'ulteriore distinzione che tiene conto della polarità delle due fasi; distinguiamo la **cromatografia in fase normale**, nella quale la fase stazionaria è di natura fortemente polare (ad es. silice o silice sostituita con gruppi polari quali ciano- o nitro-) mentre la fase mobile è apolare (solitamente esano o etere

isopropilico) dalla **cromatografia in fase inversa**, nella quale la fase stazionaria ha carattere non polare (ad es. silice sostituita con gruppi apolari quali l'ottil o ottadecil) mentre la fase mobile è polare (come acqua o alcol).

- **Cromatografia a scambio ionico** utilizzata per separare composti ionici e ionizzabili. La fase stazionaria è caratterizzata da una superficie ionica avente carica opposta a quella del campione, mentre la fase mobile è un tampone acquoso contenente un sale che fornisce un controione la cui carica è dello stesso segno dei composti da separare ma di segno opposto a quella della fase stazionaria. La separazione è basata sulla competizione delle molecole di soluto e del controione nell'occupare i siti attivi della fase stazionaria. Gli scambiatori cationi contengono gruppi solfonici (fortemente acidi) o carbossilici (debolmente acidi) mentre gli scambiatori anionici contengono gruppi amminici terziari (fortemente basici) oppure gruppi amminici primari (debolmente basici);
- **Cromatografia a esclusione dimensionale o per permeazione su gel (SEC)** la fase stazionaria è costituita da un gel poroso, avente pori di dimensioni simili alle molecole da separare (setacci molecolari inorganici, tipo zeoliti, oppure polimeri organici di porosità controllata). La separazione avviene in base alle diverse dimensioni dei soluti. I soluti troppo grandi sono esclusi da tutti i pori poiché incapaci di penetrare la fase stazionaria porosa e quindi attraversano più rapidamente la colonna, mentre i soluti di dimensione minore sono trattenuti dalla fase stazionaria poiché penetrano all'interno dei pori dell'impaccamento e quindi impiegano più tempo ad eluire dalla colonna. È una tecnica utilizzata soprattutto per separare componenti a peso molecolare elevato (polimeri, proteine).
- **Cromatografia per affinità** si basa su interazioni biologiche altamente specifiche tra due molecole, come interazioni tra enzima e substrato, recettore e ligando, o anticorpi e l'antigene.

Il principio che regola tutti i processi cromatografici è quello della migrazione differenziale dei componenti della miscela tra le due fasi: la fase stazionaria tende a trattenere i componenti, mentre la fase eluente li trascina con sé lungo tutto il percorso cromatografico.

Le due fasi vengono scelte in modo tale che i componenti si distribuiscano tra esse: i componenti che presentano elevata affinità per la fase stazionaria vengono trattenuti maggiormente nella colonna e vengono eluiti per ultimi, al contrario quelli con bassa affinità per la fase stazionaria vengono eluiti più rapidamente.

In questo modo, i componenti della miscela iniziale risulteranno essere separati in bande discrete e possono essere analizzati qualitativamente e quantitativamente [3].

1.3 Cromatografia liquida ad alte prestazioni

Nella cromatografia liquida ad alta prestazione o HPLC (dall'inglese "*High Performance Liquid Chromatography*") vengono utilizzati sistemi prettamente automatizzati, che permettono di ottenere delle separazioni in tempi rapidi e ad alta risoluzione. In pochi minuti è possibile effettuare separazioni di miscele anche molto complesse e determinare la composizione quantitativa oltre a ottenere informazioni sulla natura chimica delle sostanze analizzate [4].

Sono molteplici le caratteristiche peculiari delle tecniche HPLC, tra le più importanti rientrano l'ampia scelta di fasi stazionarie impiegate nell'impaccamento delle colonne, diametro totale dell'impaccamento e diametro particellare essenzialmente ridotti (rispettivamente di 2-5 mm e tra i 2-10 μm), alte pressioni di esercizio, con un flusso costante e riproducibile generato da pompe ad alta pressione, colonne di 10-25 cm impaccate con materiali a granulometria molto fine (3-10 μm), separazioni rapide ad alte risoluzione ed efficienza.

A differenza della GC, è possibile analizzare composti termolabili e non volatili, separare numerose sostanze aventi differente peso molecolare, identificare composti presenti in tracce (a concentrazioni dell'ordine di parti per trilione) ed inoltre il volume di campione da iniettare può essere notevolmente maggiore (anche 100 μL) che in GC [5]. Gli svantaggi della tecnica HPLC consistono nei costi notevoli della strumentazione e dei materiali di consumo, nella necessità di manodopera specializzata

e dell'accoppiamento con idonei sistemi di rivelazione spettroscopici per l'identificazione dei picchi. La possibilità di intervenire sia sulle caratteristiche della fase stazionaria che sulla natura della fase mobile, ha permesso lo sviluppo di numerose tecniche HPLC.

1.4 Fase stazionaria

I tipi di particelle che costituiscono la fase stazionaria sono essenzialmente due: le *particelle pellicolari* e le *particelle porose*. Le prime sono costituite da un nucleo non poroso di forma sferica rivestito da un sottile strato di materiale microporoso, con uno spessore di 1-3 μm . Il diametro medio dell'intera particella è di 10-50 μm . Di fatto, queste particelle sono usate solo per le precolonne di protezione [4]; mentre le *particelle microporose* possono essere sferiche oppure di forma irregolare, con diverso grado di porosità; hanno un diametro medio che va da 2 a 10 μm per ridurre i fenomeni di allargamento della banda cromatografica.

Vengono maggiormente utilizzate le fasi stazionarie impaccate con particelle sferiche, quest'ultime presentano maggiore efficienza e riproducibilità, e inoltre la presenza dei pori consente un aumento dell'area superficiale della fase stazionaria.

La qualità dell'analisi dipende soprattutto dalla natura della fase stazionaria, dalle dimensioni della colonna e dall'impaccamento delle particelle che costituiscono il supporto inerte. Il materiale principalmente impiegato è la silice costituita da atomi di silicio legati con quattro atomi di ossigeno alle estremità a formare i "silanoli". Nelle colonne in fase inversa (RP) la silice è legata a gruppi apolari definiti organosilani in cui R è generalmente una catena ramificata C8 o C18 atomi di carbonio (octadecile od octile), oppure un butile, un cicloesile od un fenile. La maggior parte delle colonne HPLC opera in fase inversa. Nelle colonne in fase normale (NP) la silice risulta legata a gruppi polari, quali cianopropile, amminopropile, N-propiletildiammino.

In generale le fasi stazionarie sono apolari o a bassa polarità rispetto alla fase mobile, mentre il soluto deve possedere caratteristiche polari, in modo da essere adsorbito dalla fase fissa e competere in tal senso con la fase mobile, anch'essa polare.

1.5 Fase mobile

La scelta dell'opportuna fase mobile gioca un ruolo chiave nel processo di ottimizzazione del metodo cromatografico e dipende sia dalla sua forza eluente che dalla fase stazionaria impiegata. Tuttavia, è possibile definire alcuni requisiti generali a cui deve rispondere un eluente, indipendentemente dalla sua natura. Esso deve essere immiscibile con la fase stazionaria, capace di solubilizzare il campione, deve possedere ridotta viscosità, risultare compatibile con il rivelatore utilizzato, avere una bassa corrosività e volatilità, un basso costo ed un'elevata purezza ed essere facilmente reperibile [4].

In HPLC è possibile utilizzare come fase mobile un solvente o una miscela di due o più solventi, inoltre durante l'analisi si può operare mantenendo costante la composizione della fase mobile (*eluizione isocratica*), o variando la composizione percentuale dei solventi (*eluizione a gradiente*). In una miscela complessa, per separare composti che presentano polarità differente, per esempio, operando in fase inversa (fase mobile più polare della fase stazionaria, che è apolare) è necessario diminuire la polarità (cioè aumentare la forza eluente) dei solventi durante l'applicazione. In questo modo i soluti polari (meno ritenuti) vengono facilmente separati dai composti non polari (più ritenuti). La Tabella 1 elenca le fasi mobili più frequentemente usate in HPLC.

Tabella 1.1 Fasi mobili più frequentemente usate in HPLC.

Fase normale	Esano, CH ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ , CH ₃ CN, CH ₃ OH
Fase inversa	H ₂ O, CH ₃ CN, CH ₃ OH
Scambio ionico	Tamponi acquosi
Esclusione	Tetraidrofurano, toluene, CHCl ₃

1.6 Strumentazione

Generalmente, una moderna strumentazione per cromatografia liquida ad alta prestazione comprende: una serie di contenitori per la fase mobile e sistemi per il trattamento dei solventi, sistemi di pompaggio, sistemi di iniezione del campione, una colonna (talvolta preceduta da una pre-colonna), uno o più rivelatori in serie e un sistema di acquisizione dei dati che registra i segnali per la successiva elaborazione (Figura 1.1).

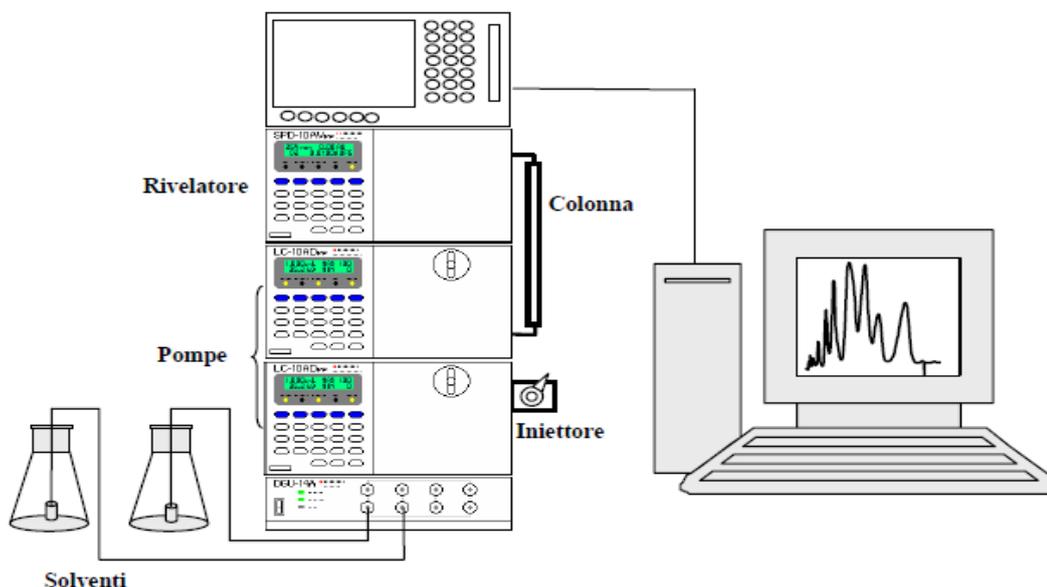


Figura 1.1 Schema di uno strumento HPLC interfacciato con un PC.

I **contenitori dei solventi** (detti “*reservoir*”) devono essere di un materiale inerte al fine di evitare qualsiasi forma di inquinamento; i materiali principalmente utilizzati sono, vetro, acciaio inox o politetrafluoroetilene (PTFE).

All'interno dei *reservoir*, sono spesso presenti i pescanti, ovvero dei filtri con pori di dimensioni dell'ordine di μm , in grado di allontanare particelle in sospensione, polveri e gas disciolti nei solventi, evitando dunque che le bolle di gas e le polveri potrebbero depositarsi all'interno delle pompe o in testa alla colonna determinando un allargamento di banda, con conseguente riduzione dell'efficienza della stessa. I *reservoir* contenenti il solvente o la miscela di solventi sono collegati alle pompe mediante un tubo di Teflon.

Le **pompe** sono considerate il componente più importante di un sistema HPLC. Esse hanno una funzione ben precisa, ovvero quella di inviare nella colonna cromatografica la fase mobile ad una pressione tale da creare il flusso desiderato.

Le pompe utilizzate in HPLC devono possedere delle caratteristiche ben definite quali: inerzia chimica, capacità di generare pressioni elevate (5000 psi), possibilità di cambiare rapidamente il solvente durante l'analisi (nel caso di eluizione a gradiente), flussi riproducibili e costanti da 0.1 a 10 mL/min, privi di pulsazioni e resistenza alla corrosione da parte dei solventi.

I tipi di pompe più utilizzate in HPLC sono principalmente tre:

- *pompe a pistoncini reciprocanti*;
- *pompe a doppia testa a pistoncini reciprocanti*;
- *pompe a siringa* (usati soprattutto per microHPLC).

Le *pompe reciprocanti* sono costituite da una camma eccentrica rotante collegata ad un motore che forza il pistone ad espellere la fase mobile all'interno di una piccola camera idraulica cilindrica, attraverso una valvola monovia (valvola di non-ritorno). Quest'ultima assicura che il liquido scorra in un'unica direzione: quando il pistone torna indietro, la valvola di mandata diretta alla colonna si chiude, mentre si apre quella di aspirazione consentendo di riempire la camera della pompa; viceversa, quando il pistone è spinto in avanti, si chiude la valvola di aspirazione e si apre quella di mandata così il solvente viene spinto nella colonna. È chiaro che sistemi del genere generano un flusso pulsato. Per questo motivo, si è cercato di ridurre al minimo questo aspetto negativo con l'introduzione delle *pompe reciprocanti a doppia testa*. In quest'ultimo caso, una camma eccentrica rotante connessa ad un motore aziona contemporaneamente i pistoncini presenti in due camere idrauliche distinte, ognuna delle quali ha una valvola d'ingresso che preleva dal serbatoio ed una valvola di uscita che invia la fase mobile alla colonna. Queste pompe forniscono un flusso quasi costante, esente da pulsazioni perché un sistema pompa mentre l'altro è in fase di aspirazione. Infine, le *pompe a siringa* sono costituite da un cilindro contenente la fase mobile compressa da un pistone, che viene fatto avanzare da un motore che aziona una vite, generando un flusso continuo, esente da pulsazioni. Le limitazioni principali sono la limitata capacità del serbatoio ed una lieve variazione di flusso all'avviamento. A valle

della pompa è necessario usare connessioni in acciaio perché il sistema è sotto pressione [3].

L'*iniettore* è un dispositivo che consente di introdurre il campione liquido direttamente nella colonna, passando dalla pressione ambiente a quella presente in testa alla colonna, senza alterare il flusso del solvente.

Gli iniettori maggiormente utilizzati in HPLC sono iniettori a valvola che consentono l'introduzione del campione con notevole riproducibilità e senza variazioni significative del flusso. Lo schema di un tipico iniettore a valvola è illustrato nella Figura 1.2 (in cui le frecce indicano la direzione di flusso del campione): si tratta di tubi capillari d'acciaio montati su un disco metallico che viene ruotato su un perno. Il campione viene introdotto, mediante una siringa o mediante un braccio automatizzato, entro un capillare di acciaio (detto *sample loop*) caratterizzato da un volume specifico. Se la valvola è in posizione di carico o *filling*, avviene il riempimento del *loop*. Al termine del processo di *filling*, la valvola viene fatta ruotare, cambiando così i collegamenti fra i circuiti idraulici. In questo modo il *sample loop* viene portato in serie al circuito della fase mobile (posizione di iniezione) e il "loop" si inserisce nel cammino della fase mobile che lo trasporta all'interno della colonna. Le connessioni tra i circuiti sono rese possibili dalla presenza di scanalature di piccole dimensioni sul rotore della valvola.

Ad oggi la maggior parte dei cromatografi è dotata di autoiniettori, ovvero dispositivi interamente automatizzati all'interno dei quali è possibile posizionare un certo numero di *vial*. Questo garantisce un alto livello di precisione, riducendo al massimo gli errori dovuti all'operatore e aumentando la riproducibilità dei dati.

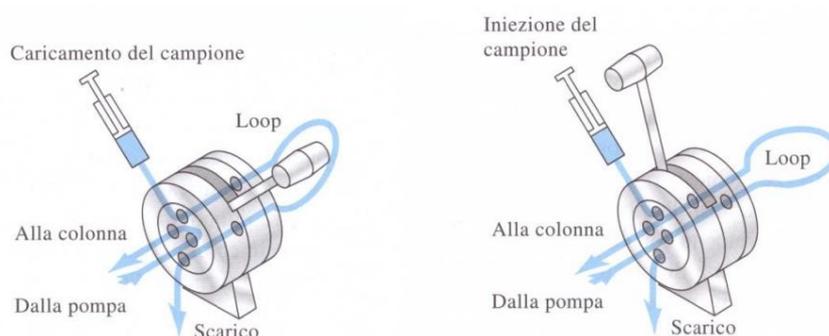


Figura 1.2 Dispositivo di campionamento per HPLC.

La separazione dei composti presenti in una miscela avviene all'interno della colonna cromatografica che può dunque essere considerato il cuore di ogni sistema cromatografico. La maggior parte delle colonne disponibili in commercio hanno una lunghezza compresa tra 3 e 25 cm, diametri interni di 2,6–3 mm o di 4,6–5 mm, e sono costruite in acciaio inossidabile [4]. Solitamente le colonne vengono commercializzate già impaccate, con particelle a granulometria molto fine (con un diametro da 3, 5 a 10 μm), infatti, le due estremità della colonna presentano filtri di acciaio sinterizzato (denominati *frit*), che evitano così la fuoriuscita della fase stazionaria. La presenza di eventuali particelle in sospensione nella fase mobile potrebbe danneggiare la colonna, pertanto in alcuni sistemi cromatografici si utilizza una precolonna (definita *guard column*), posta tra l'iniettore e la colonna, lunga pochi mm e impaccata con lo stesso tipo di materiale usato per il riempimento della colonna. E' così possibile allungare la vita di una colonna analitica e aumentare l'efficienza cromatografica della stessa.

Per molte applicazioni non è necessario il controllo preciso della temperatura, tuttavia, nella maggior parte dei casi è opportuno mantenere temperature costanti in modo da consentire una buona riproducibilità analitica.

Variazioni minime della temperatura possono avere un effetto notevole sugli equilibri termodinamici che si instaurano all'interno della colonna durante il processo cromatografico. In particolare, un incremento di questo parametro si traduce nella:

- riduzione della viscosità della fase mobile (e, quindi, delle pressioni di esercizio), favorendo i trasferimenti di massa;
- diversa solubilità degli analiti nella fase mobile e stazionaria;
- aumento della velocità di migrazione ionica nei sistemi a scambio ionico;
- riduzione della durata della colonna e dei tempi di analisi;
- picchi più simmetrici ed una selettività minore.

Gli strumenti di nuova generazione sono equipaggiati con *forni* all'intero dei quali alloggiando le colonne cromatografiche, è possibile così mantenere una temperatura costante durante tutta l'analisi in un intervallo variabile da 10 a 150 °C (anche se le separazioni in cromatografia liquida avvengono soprattutto a temperature vicine a quelle ambiente 20-40 °C). Il controllo della temperatura viene effettuato da appositi *termostati* che controllano le temperature della colonna.

Al termie della colonna cromatografica sono posti uno o più *rivelatori* disposti in serie.

1.6.1 Sistemi di rivelazione in LC

Il sistema di rivelazione (*detector*) permette di misurare un parametro caratteristico del soluto o dell'insieme soluto-fase mobile (assorbanza UV, indice di rifrazione, peso molecolare, ecc.) e di trasformarlo in un segnale elettrico che viene inviato ad un sistema di elaborazione dati.

I rivelatori per HPLC vengono divisi in due gruppi fondamentali, in *bulk property*, sensibili a proprietà specifiche dell'insieme analita-fase mobile (come l'indice di rifrazione), e in *solute property*, sensibili a caratteristiche specifiche del soluto (come l'assorbanza UV o la fluorescenza).

Nella scelta del rivelatore più adatto entrano in gioco diversi fattori, tra i più importanti rientrano: l'elevata sensibilità, la resistenza alle variazioni di temperatura e di flusso della fase mobile, ampio *range* di linearità, non contribuire all'allargamento della banda extra-colonna, infine fornire informazioni qualitative sul picco rivelato.

I rivelatori maggiormente impiegati in HPLC sono:

- **Rivelatori Spettrofotometrici e Fotometrici:** il principio di funzionamento riguarda l'assorbimento elettromagnetico del soluto nella regione del visibile e dell'ultravioletto. La concentrazione del soluto nella cella è direttamente proporzionale alla frazione di luce che passa attraverso la cella. Questi rivelatori forniscono un segnale che rappresenta il valore di assorbanza che è direttamente proporzionale alla concentrazione del campione presente nella cella. In generale uno spettrofotometro presenta: una sorgente, costituita da una lampada che emette radiazioni nel campo spettrale del visibile e dell'ultravioletto; un monocromatore per selezionare la lunghezza d'onda opportuna; un compartimento celle o cuvette in cui viene posto il campione; un trasduttore, che converte l'energia radiante in un segnale elettrico; e infine un indicatore o registratore, ovvero un dispositivo elettronico in grado di amplificare il segnale elettrico proveniente dal trasduttore.

I principali vantaggi di questo tipo di rivelatore possono essere così riassunti: semplicità di funzionamento, costi accessibili, e la possibilità di operare con i solventi comuni, poiché non interferiscono con assorbimenti di fondo elevati.

I rivelatori spettrofotometrici sono largamente impiegati per la determinazione

quantitativa dei polifenoli poiché questi sono composti che assorbono nell'UV grazie alle numerose insaturazioni che possiedono nella loro struttura molecolare. Considerato il valore nutraceutico di questa classe di composti presenti negli oli di oliva, tutti i sistemi HPLC utilizzati per l'analisi di polifenoli, sono accoppiati a rivelatori come i fotodiodi (PDA), per la loro determinazione analitica nella matrice vegetale [6].

- **Rivelatori nell'Infrarosso:** si basano sullo stesso principio dei rivelatori UV, con la differenza che l'assorbanza valutata è riferita alla regione dell'IR.
- **Rivelatori a Indice di Rifrazione:** misurano la differenza di indice di rifrazione che esiste tra la fase mobile ed il composto che eluisce dalla colonna; per questo motivo è necessario che la fase mobile impiegata abbia un indice di rifrazione notevolmente diverso da quello dell'analita. Questo tipo di rivelatore presenta una sensibilità piuttosto bassa per cui non viene sfruttato per l'analisi di componenti in tracce. Tuttavia, non è possibile lavorare nella modalità a gradiente perché variazioni della fase mobile corrispondono a una deriva della linea di base. I rivelatori a indice di rifrazione oggi usati sono di due tipi: a deflessione e a riflessione. Generalmente vengono impiegati per la determinazione di zuccheri nel miele, trigliceridi nell'olio, alcoli e polialcoli nelle bevande [7].
- **Rivelatori a Fluorescenza:** sono altamente selettivi con una sensibilità molto elevata. Il loro funzionamento si basa sulla misurazione dell'intensità della radiazione di fluorescenza emessa quando un analita viene eccitato con una radiazione UV di opportuna lunghezza d'onda. La fluorescenza più intensa si riscontra in quelle molecole che hanno gruppi funzionali aromatici o doppi legami con transizioni di bassa energia. In ambito analitico questa tecnica viene utilizzata essenzialmente in due modi: il primo, consiste nell'eccitare il campione con una radiazione ad una determinata lunghezza d'onda e registrare poi lo spettro di fluorescenza di emissione; il secondo, consiste nel fissare una lunghezza d'onda di emissione ed effettuare una scansione delle lunghezze

d'onda di eccitazione registrando l'intensità della luce emessa. L'analisi qualitativa viene effettuata mediante l'utilizzo degli spettri di emissione e di eccitazione, mentre, l'analisi quantitativa si basa sulla misura dell'intensità dell'emissione fluorescente ad una determinata lunghezza d'onda che è collegabile, in determinate condizioni, alla concentrazione del campione [4]. I rivelatori a fluorescenza per HPLC vengono anche chiamati fluorimetri e possono utilizzare diversi tipi di sorgenti di eccitazione. Quelli più semplici utilizzano una lampada a mercurio mentre quelli più sofisticati si basano su una sorgente a xeno; inoltre, per la sua sensibilità e selettività viene utilizzata anche la fluorescenza indotta da laser. In generale, questo tipo di rivelatore è ampiamente usato per la determinazione del contenuto di tocoferoli nell'olio di oliva, grazie alla capacità di emissione a 330 nm dopo essere stati sottoposti a irradiazione con una lampada allo Xeno [6].

- **Rivelatori Elettrochimici:** il meccanismo di funzionamento si basa invece sull'ossidazione o sulla riduzione di un soluto su un elettrodo e sulla misura della corrente risultante. Poiché l'entità della corrente è correlata direttamente alla concentrazione, il processo è quantitativo. Questi rivelatori si distinguono in due classi: amperometrici e polarografici. I primi sono i più diffusi mentre i secondi sono utilizzati per applicazioni particolari. La fase mobile deve essere resa elettricamente conduttiva, di solito mediante addizione di un sale. Ciò ne esclude l'utilizzo per tecniche cromatografiche caratterizzate da solventi apolari (per es. esano) e lo permette, invece, in metodiche HPLC a scambio ionico ed in fase inversa.

Il campo di applicazione di questi sistemi, sebbene meno ampio rispetto ai rivelatori UV o a fluorescenza, comprende matrici di alto interesse biochimico (per esempio, plasma ed urina), dove è estremamente utile ottenere una elevata selettività e sensibilità (10^{-11} – 10^{-12} g/mL).

Lo spettro di massa è tipico per ogni molecola, in quanto è direttamente correlato alla struttura chimica di quest'ultima e alle condizioni di ionizzazione a cui essa è sottoposta. Il campione può essere introdotto nella camera di ionizzazione sia allo stato solido, attraverso una sonda, che allo stato liquido o gassoso, usando un sistema di valvole in seguito alla separazione cromatografica.

Le componenti chiave di questo processo sono due:

- la **sorgente ionica**, la quale genera gli ioni;
- l'**analizzatore di massa**, il quale seleziona gli ioni.

La **sorgente ionica** è responsabile dunque del processo di ionizzazione. In particolare è possibile distinguere due tipologie di ionizzazione in base alla sorgente impiegata:

- Hard Ionization: nella quale viene impartita elevata energia alle molecole ed il loro rilassamento determina la rottura di legami decretando una frammentazione estesa. Gli ioni generati presentano rapporti massa/carica minori dello ione molecolare. Tra queste ritroviamo: *Electron Ionization (EI)*.
- Soft Ionization: nella quale la frammentazione avviene a bassa energia, producendo un numero inferiore di ioni. Il risultante spettro di massa spesso consiste nei picchi degli ioni molecolari (in GC-MS) o dello ione molecolare deprotonato (in LC-MS). Tra queste ritroviamo: *Electrospray Ionization (ESI)*, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)*, *Atmospheric Pressure PhotoIonization (APPI)*, *Matrix Assisted Laser Desorption (MALDI)*.

La prima applicazione della spettrometria di massa è stata ottenuta mediante un processo di hard ionization basato sull'impatto elettronico (EI) [8]. Nella ionizzazione elettronica un filamento di tungsteno incandescente emette un fascio di elettroni che, accelerati verso un anodo dalla parte opposta del filamento, acquisiscono elevata energia (circa 70 eV). Quando tali e^- collidono con la sfera elettronica di una molecola, trasferiscono ad essa la loro energia, decretando l'espulsione di un elettrone, la formazione di un radical catione e successivamente ulteriori frammentazioni. Tutti gli ioni positivi (cationi e radical cationi) sono respinti da una piastra (repeller), tenuta ad un potenziale positivo, verso una serie di piastre forate (piastre acceleratrici) tenute a potenziale positivo crescente. Durante il tragitto gli ioni subiscono un'accelerazione

proporzionale al potenziale delle piastre acceleratrici e vengono espulsi tramite una fenditura di uscita.

Questa tipologia di ionizzazione si è dimostrata utile per molecole volatili e termicamente stabili, ma non consentiva l'analisi di molecole di grandi dimensioni [9]. Inoltre, l'accoppiamento della MS con GC era più facile rispetto a quello con LC, a causa della bassa compatibilità della fase liquida con la regione di vuoto dello spettrometro di massa. Era dunque necessaria la rimozione della fase mobile prima dell'ingresso dell'analita nello spettrometro di massa, compromettendo così le prestazioni analitiche.

La ionizzazione a pressione atmosferica (API) è stata la prima tecnica che ha permesso di interfacciare direttamente LC e MS [10], seguita dalla *thermospray ionization* ([11]. Oggi, queste tecniche sono state sostituite dall' ESI (*electrospray ionization*), MALDI (*matrix assisted laser desorption ionization*), APCI (*atmospheric pressure chimica ionization*) e APPI (*atmospheric pressure photo ionization*).

Electrospray Ionization (ESI)

L'Electrospray ionization (ESI) rappresenta la tecnica di scelta per composti altamente polari, facilmente ionizzabili e con un peso molecolare compreso nel *range* tra 100 e 150×10^3 Dalton, tra cui polifenoli, proteine e basi azotate.

Le molecole del campione provenienti dal sistema LC entrano direttamente nella sorgente ionica, a flussi compresi tra quelli tipici per la cromatografia liquida convenzionale e capillare.

L'analita in soluzione passa attraverso un capillare mantenuto ad alto voltaggio (3-5 kV) posto all'entrata dello spettrometro di massa. Tale capillare è circondato da una guaina che direziona un flusso di azoto (gas nebulizzante) verso le goccioline di liquido che fuoriescono dal capillare. L'azione combinata dell'azoto e del campo elettrico produce un aerosol di goccioline contenenti ioni e solvente; successivamente si verificano l'evaporazione del solvente, la diminuzione della dimensione delle microgocce e l'incremento della densità delle cariche superficiali. Infine, la forza di repulsione tra ioni con cariche dello stesso segno supera la forza di coesione e gli ioni vengono espulsi (deadsorbiti dalla fase gassosa). Tale ionizzazione a pressione

atmosferica porta alla costituzione di uno spettro di massa spesso dominato da uno ione pseudo-molecolare con ridotta frammentazione.

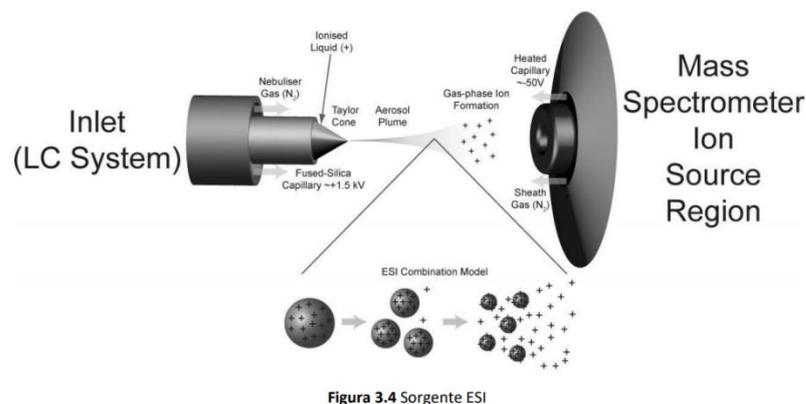


Figura 1.4 Sorgente ESI.

L'approccio **Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI)** condivide con l'ESI la caratteristica di essere adatta all'analisi di grandi molecole e presenta il vantaggio di produrre ioni a singola carica. Tuttavia, presenta la limitazione di non rivelare adeguatamente le piccole molecole.

Questa tecnica analitica è largamente utilizzata perché consente l'analisi di miscele complesse senza necessità di step di sample-preparation per l'isolamento e la purificazione degli analiti, né di una pre-separazione cromatografica, con una notevole riduzione dei tempi di analisi. Il MALDI rappresenta il metodo di scelta per polimeri sintetici nonché per la *fingerprinting* di carboidrati e proteine [12].

Il campione viene solubilizzato in un particolare solvente e posto all'interno di una camera da vuoto; grazie alla rimozione dell'aria si verifica l'evaporazione del solvente, lasciando cristalli di matrice in cui è incorporato l'analita. Successivamente le pulsazioni provenienti da un laser a $10^6 - 10^{10} \text{ W/cm}^2$ vengono focalizzate sulla superficie del campione solido ed estraggono materiale dalla superficie creando un microplasma di ioni e di molecole neutre che possono reagire tra loro in fase di vapore; le pulsazioni riescono sia a vaporizzare che a ionizzare il campione. La matrice sostanzialmente protegge il campione dalla distruzione e da essa si ottengono ioni molto più piccoli e leggeri, facilmente distinguibili dall'analita.

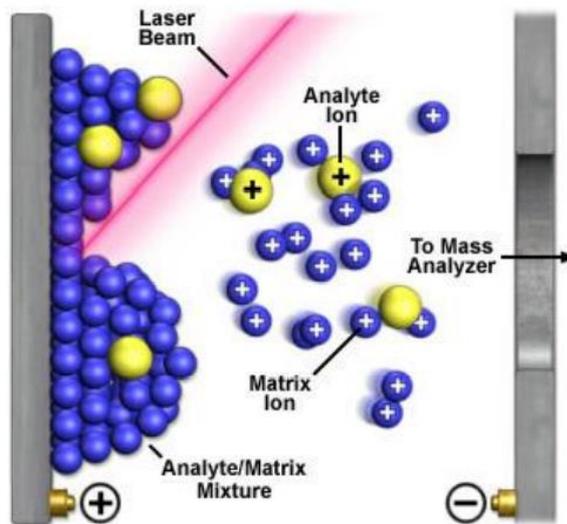


Figura 3.5 Sorgente MALDI

Figura 1.5 Sorgente MALDI.

Il metodo **Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)**, a differenza dell'ESI, è particolarmente utile per l'analisi di composti a media-bassa polarità come carotenoidi e fosfolipidi [13], con un peso molecolare compreso tra 100 a 2000 Dalton. Viene impiegato per sostanze volatili e semivolatili e non produce ioni polivalenti, per cui non è possibile analizzare campioni ad elevato PM come le proteine. Un'ulteriore differenza tra le sopracitate sorgenti ioniche è che con l'ESI si verifica una ionizzazione in fase liquida, mentre con APCI una ionizzazione in condizioni di fase gassosa. Dopo la nebulizzazione del campione promossa dal gas nebulizzante (N_2) e la vaporizzazione del solvente ad una temperatura compresa tra 250-500 °C a pressione atmosferica, il vapore risultante viene ionizzato impiegando un elettrodo a corona (sorgente di elettroni). In particolare, le molecole di solvente ionizzate si comportano da gas reagente per la ionizzazione dell'analita. Il termine "effetto corona" indica la scarica parziale intorno ad un conduttore posto ad alto potenziale; ciò determina la ionizzazione e la scarica elettrica dell'atmosfera immediatamente circostante il conduttore [14-15]. Le molecole del solvente (S), protonate in (SH^+) dall'effetto corona trasferiscono la carica alle molecole dell'analita (M) attraverso reazioni chimiche (ionizzazione chimica), ottenendo così la forma protonata (MH^+).

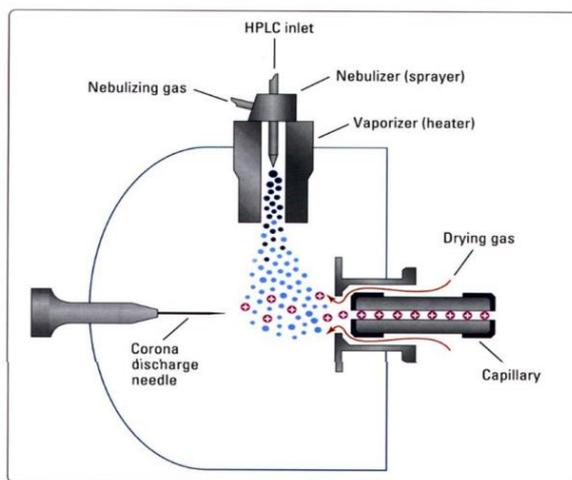


Figura 3.6 Sorgente APCI

Figura 1.6 Sorgente APCI.

Il sistema di **Fotoionizzazione a Pressione Atmosferica (APPI)** è applicabile a molti soluti analizzabili anche con APCI, ma risulta più efficace di quest'ultima nell'analisi di composti altamente apolari [14] e funziona bene con bassi flussi (<100 mL/min) (per i quali la sensibilità APCI risulta estremamente ridotta). Il sistema APPI per LC-MS è una tecnica relativamente nuova; analogamente all'APCI un vaporizzatore converte l'eluente LC in fase gassosa, ma l'elettrodo a corona è sostituito da una lampada UV (Kr). Tale lampada genera radiazioni elettromagnetiche in grado di eccitare e ionizzare la fase mobile, un additivo o gli analiti stessi. Gli ioni risultanti passano attraverso un capillare munito di orifizio nello spettrometro di massa.

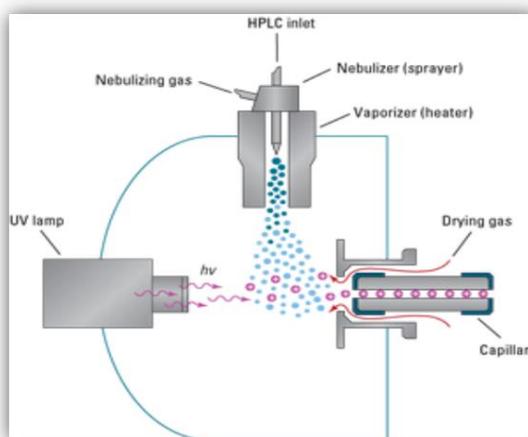


Figura 1.7 Sorgente APPI.

L'altro componente chiave dal quale dipendono le prestazioni di uno spettrometro di massa è rappresentato dall'**analizzatore**. Esso, oltre a separare tutti gli ioni secondo il loro rapporto m/z , focalizza l'insieme degli ioni aventi stesso rapporto m/z in un singolo punto focale, minimizzando le differenze nella loro quantità di moto, energia cinetica e velocità e massimizzando la trasmissione di tutti gli ioni che entrano dalla sorgente e che raggiungono il rivelatore.

Tutti gli analizzatori di massa utilizzano campi elettrici statici o dinamici e campi magnetici, usati da soli in combinazione. La maggior parte delle differenze di base tra i vari analizzatori risiede nel modo in cui questi campi elettrici vengono impiegati per far avvenire la separazione.

Con lo sviluppo di nuove interfacce, la strumentazione più vecchia è stata sostituita con sistemi quadrupoli (Q), a trappola ionica (IT) ed a tempo di volo (ToF).

Esistono svariati strumenti ibridi caratterizzati dall'alta risoluzione, da un incremento di sensibilità e da un'augmentata accuratezza di massa su di un ampio range; tra questi ricordiamo quadrupolo-ToF (Q-ToF), ion trap-ToF (IT-ToF) e triplo quadrupolo (QqQ).

L' **analizzatore di massa a singolo quadrupolo** è quello maggiormente impiegato per la facilità d'uso, l'ampio *range* di massa analizzabile, la risoluzione, buona linearità, robustezza e la qualità dello spettro di massa. E' formato da 4 barre cilindriche metalliche, di circa 20 cm, che delimitano il cammino percorso dagli ioni provenienti dalla camera di ionizzazione e diretti al detector. Le barre sono mantenute ad un potenziale elettromagnetico oscillante in modo che quando una coppia di barre ai poli opposti ha un potenziale positivo, l'altra coppia ha un potenziale negativo e viceversa. Gli elettroni, accelerati dalle piastre acceleratrici, entrano nel tunnel delimitato dalle barre metalliche, respinti dai poli positivi ed attratti dai poli negativi; tuttavia a causa dell'oscillazione del quadrupolo gli ioni assumono una traiettoria a zig zag e si scaricano su una delle barre ad eccezione di quelli che, per una certa frequenza di oscillazione, hanno un'energia cinetica tale che il loro moto diventa sinusoidale (ioni specifici con un determinato valore m/z) riuscendo così ad uscire dal tunnel e ad entrare nel sistema di rivelazione.

Gli **strumenti a triplo quadrupolo** (QqQ) rappresentano, ai giorni nostri, i rivelatori di scelta per eseguire analisi mirate con elevata selettività e sensibilità. Q1 e Q3 operano come effettivi quadrupoli filtrando gli ioni in relazione alla combinazione di corrente continua e radio frequenza, invece, Q2 opera similmente ad una trappola ionica in cui è applicata solo una radio frequenza per frammentare gli ioni. Normalmente la frammentazione caratterizzata dal maggior rapporto segnale/rumore è scelta per l'analisi quantitativa, mentre una seconda o più frammentazioni sono necessarie per eseguire con elevato grado di sicurezza l'identificazione del composto. Inoltre, il rapporto tra le intensità delle due transizioni è tipico dello specifico composto e dovrebbe rimanere stabile lungo l'intervallo di linearità [16].

L'**analizzatore a Trappola Ionica** (IT) può essere considerato una variante dell'analizzatore a quadrupolo, dal momento che invece di consentire agli ioni di attraversare il campo quadrupolare, li trattiene al suo interno e progressivamente li rilascia verso il rivelatore mediante una variazione del campo elettrico. Tale analizzatore è costituito da tre elettrodi, uno posto al centro ad anello e gli altri due a calotta agli estremi; la trappola consente di trattenere gli ioni. L'elettrodo circolare emette una radio-frequenza che stabilizza gli ioni nella trappola, mentre ai due elettrodi a calotta viene applicata una corrente continua ed alternata. L'applicazione di un campo magnetico ausiliario nei due elettrodi consente agli ioni di acquisire differente energia cinetica in funzione della loro massa, di modo che possano essere decelerati e dunque essere intrappolati all'interno della trappola ionica, con la possibilità di subire un'ulteriore frammentazione per esperimenti MS in tandem (MS o MS/MS) [17]. Per ottenere la massima efficienza gli ioni devono essere concentrati vicino al centro, dove i campi di cattura sono prossimi all'ideale: ciò si ottiene introducendo un gas di smorzamento (elio o argon) che raffredda gli ioni iniettati e contrasta la loro repulsione che potrebbe comportare una significativa perdita dell'efficienza di trasmissione, compromettendo così la sensibilità. Variando la combinazione di tensioni applicate si ottengono diversi valori della soglia limite, per cui escono dalla trappola ionica anche gli ioni con valore m/z inferiore al valore soglia; invece agendo sui due elettrodi a calotta si può impostare anche una soglia inferiore e decidere di far uscire dalla trappola solo i frammenti che hanno un rapporto m/z compreso tra il valore minimo ed

il valore massimo. È possibile addirittura avvicinare notevolmente la soglia minima e la soglia massima al fine di far uscire selettivamente il frammento con il rapporto m/z desiderato; ciò è fattibile applicando una corrente alternata ai due elettrodi.

Gli **analizzatori a tempo di volo** (TOF) presentano i vantaggi dell'alta velocità di scansione (fino a 20000 scans/s), dell'alta risoluzione (usando un riflettore) e praticamente nessun limite sul *range* di massa (consente la simultanea rivelazione di tutti gli ioni nel range di massa).

Nello spettrometro di massa TOF gli ioni che si sono formati in una sorgente ionica vengono accelerati ad alta velocità da un campo elettrico verso un analizzatore. Quest'ultimo consiste in un "tubo di transito" lungo e di circa 1-2 m, gli ioni lo attraversano e giungono successivamente nel rivelatore. Quelli più pesanti si spostano più lentamente, quelli più leggeri più rapidamente. La velocità che uno ione raggiunge è inversamente proporzionale alla sua massa, più precisamente è inversamente proporzionale alla radice quadrata del suo valore m/z . Dal momento che la distanza che intercorre tra la sorgente ionica e il rivelatore è fissa, il tempo necessario affinché uno ione attraversarsi l'analizzatore in linea retta è inversamente proporzionale alla sua velocità e quindi proporzionale alla sua massa. Pertanto ogni valore m/z ha uno specifico tempo di volo dalla sorgente al rivelatore. Per aumentare la risoluzione, la traiettoria degli ioni viene deviata da uno specchio elettrostatico, il *reflectron*. Attraverso quest'ultima la dispersione di ioni con uguale valore m/z viene minimizzata, aumentandone la focalizzazione e migliorando notevolmente la risoluzione. L'aspetto critico dello strumento è rappresentato dalla necessità di produrre gli ioni a un tempo e a una posizione iniziali noti con accuratezza. Questi vincoli limitano gli spettrometri TOF a utilizzare tecniche di ionizzazione pulsata, che includono il desorbimento da plasma e da laser [18].

Gli ioni, separati dall'analizzatore di massa, giungono al **rivelatore** e vengono dunque convertiti in segnale elettrico. Il rivelatore più semplice è la coppa di Faraday, una struttura di metallo con un piccolo orifizio, collegata a terra tramite un resistore. Gli ioni raggiungono l'interno della coppa e vengono neutralizzati accettando o donando e^- nel momento in cui ne colpiscono le pareti. La coppa trasmette una corrente attraverso il resistore, che viene amplificata e rivelata.

Il rivelatore maggiormente impiegato in spettrometria di massa è il moltiplicatore elettronico (EM), costituito da una serie di elettrodi a cascata che determinano un'accelerazione degli ioni ad elevata velocità. Quando uno ione arriva sul primo elettrodo (dinodo di conversione), questo emette un fascio di elettroni che colpisce il secondo elettrodo, il quale a sua volta emette una quantità maggiore di elettroni e così via, generando una corrente. Il risultato è una forte amplificazione del segnale che viene poi digitalizzato ed elaborato dal calcolatore dello spettrometro per la presentazione dello spettro di massa. I moltiplicatori di elettroni possono essere a dinodi discreti o a dinodi continui (*channeltron*, *microchannel plate* o *microsphere plate*).

Riferimenti bibliografici

- [1] Chromatography, su Goldbook.IUPAC.org, IUPAC Gold Book.
- [2] Douglas A. Skoog, F. James Holler and Stanley R. Crouch, Principles of instrumental analysis.
- [3] Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R. (2017). Principles of instrumental analysis.
- [4] Cozzi R., Protti P., Ruaro T. (2017). Elementi di analisi chimica strumentale, II edizione, 2013.
- [5] Tsuchiya H., Sato M., Hirotsugu K., Okubo T. (1997). Journal of Chromatography B, 703, 253-258.
- [6] Dugo L., Russo M., Cacciola F., Mandolino F., Salafia F., Vilmercati A., Fanali C., Casale M., De Gara L., Dugo P., Mondello L., Rigano F. (2020) Determination of the Phenol and Tocopherol Content in Italian High-Quality Extra-Virgin Olive Oils by Using LC-MS and Multivariate Data Analysis. Food Analytical Methods. 13, 1027–1041.
- [7] Cabras P., Tuberoso C. (2014). Analisi dei prodotti alimentari, PICCIN.
- [8] Thomson J.J. (1913). Rays of positive electricity and their application to chemical analyses. London: Longmans, Green & Co.
- [9] Bleakney W. (1929). Physical Review. 34, 157-160.
- [10] Horning E.C., Horning M.G., Carroll D.I., Dzidic I. (1973). Analytical Chemistry. 45, 936-943.
- [11] Blakley C.R., Carmody J.J., Vestal M.L. (1980). J. Journal of the American Chemical Society. 102, 5931-55933.
- [12] Karas M., Gluckmann M., Schafer J. (2000). Journal of Mass Spectrometry. 35, 1-12.
- [13] Robb D.B., Covey T.R., Bruins A.P. (2000). Analytical Chemistry. 72, 3653-3659.

- [14] Horning E. C., Carroll I., Haegele K. D., Horning M. G., Stillwell R. N. J. (1974). *Journal of Chromatographic Science*. 12, 725-729.
- [15] Whitehouse C. M., Dreyer R. N., Yamashita M., Fenn J. B. (1985). *Analytical Chemistry*. 57, 675- 679.
- [16] European Communities "Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results." *Official Journal of the European Communities* L 221.
- [17] March R.E., Todd J.F. (2009). *Practical Aspects of Trapped Ion Mass 67 Spectrometry, Volume V: Applications of Ion Trapping Devices*. CRC press, New York.
- [18] Silverstein R.M., Webster F.X., Kiemle D.J. (2006). *Identificazione Spettrometrica di Composti Organici*, 12-13.

Capitolo 2. Uso della cromatografia liquida accoppiata a diversi rivelatori per la determinazione di molecole bioattive in campioni di oli extravergine d'oliva aromatizzati.

2.1 Introduzione

L'olio extravergine d'oliva (EVOO) è uno dei componenti principali della dieta mediterranea. La sua centralità in ambito nutrizionale non è dovuta solo alle sue caratteristiche organolettiche ma è dovuta soprattutto alle sue proprietà nutraceutiche. Gli effetti benefici dell'olio di oliva sono correlati alla composizione in acidi grassi ben bilanciata (rapporto acido oleico/ acido linoleico > 7) e alla presenza di molecole bioattive quali tocoferoli e polifenoli che svolgono un'importante funzione antiossidante. In particolare i tocoferoli bloccano la perossidazione degli acidi grassi insaturi innescata dai radicali liberi mentre i composti fenolici esercitano un'attività di *radical-scavenging*. Il potere antiossidante di questi composti viene esercitato anche in vivo. Per questa ragione l'EFSA (*European Food Safety Authority*) ha sottolineato la correlazione tra molecole bioattive dell'olio d'oliva ed effetti benefici sulla salute umana riconoscendo alcuni *claims* nutrizionali. La presenza di questi composti potenzialmente bioattivi rende l'olio extra vergine di oliva un alimento funzionale; inoltre, la loro attività antiossidante fa sì che gli oli abbiano una *shelf-life* più lunga e che in cottura siano meno soggetti all'ossidazione.

Dal connubio tra olio EVOO ed ingredienti tipici della dieta mediterranea (agrumi, erbe e alcune spezie) nascono gli oli d'oliva aromatizzati. Si tratta di condimenti di alta qualità in cui le proprietà nutraceutiche dell'olio vengono ulteriormente migliorate dall'aggiunta di molecole bioattive provenienti dall'ingrediente aromatizzante.

Sono tre le metodiche ad oggi conosciute per la loro produzione: la pianta aromatica può essere aggiunta prima o dopo il processo di estrazione delle olive [1], un olio essenziale può essere aggiunto direttamente nell'olio d'oliva [2]. Nel primo caso, come ampiamente riportato in letteratura, una delle tecniche di predilezione prevede la co-estrazione dell'agente aromatizzante con le olive, solitamente eseguita per molitura e malassazione [3]. D'altra parte, l'agente aromatizzante può essere posto direttamente a contatto con l'olio (contatto per infusione), monitorando diverse condizioni, quali ad esempio, il tempo di esposizione e la temperatura [1]. Il processo di infusione è sicuramente quello più utilizzato a livello domestico o artigianale.

L'uso di piante aromatiche e medicinali per aromatizzare gli EVOO arricchisce l'olio sia dal punto di vista sensoriale aumentando le note olfattive del cibo, che nutrizionale, numerosi lavori di ricerca presenti in letteratura hanno dimostrato come l'aroma possa

garantire anche una maggiore stabilità ossidativa, limitando l'ossidazione della frazione lipidica dell'olio [3,4]. Tuttavia la presenza degli aromatizzanti potrebbe mascherare eventuali difetti sensoriali nell'olio d'oliva promuovendo dunque possibili frodi alimentari.

La composizione chimica dell'EVOO, così come quella dell'oliva, è fortemente influenzata dalla varietà dell'olivo (*cultivar*), dalle condizioni climatiche, dal grado di maturazione della drupa e dal mese di raccolta. Tutti questi fattori influenzano il contenuto di acidi grassi e molecole bioattive (fenoli e vitamina E).

Parte del lavoro di tesi è stato dedicato allo studio di diciotto campioni di campioni di EVOO aromatizzati provenienti da diverse regioni italiane, al fine di evidenziare differenze qualitative e quantitative in relazione all'agente aromatizzante e al metodo di aromatizzazione.

La determinazione degli analiti è stata effettuata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata a diversi sistemi di rivelazione: un fluorimetro per i tocoferoli e un rivelatore spettrofometrico accoppiato ad uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo (PDA-MS) per i polifenoli. Inoltre, per completare la caratterizzazione degli oli aromatizzati agli agrumi (limone, bergamotto e mandarino) sono stati analizzati anche i composti eterociclici ossigenati, quali cumarine, furocumarine e polimetossiflavoni, molecole che caratterizzano la principali della frazione non volatile degli oli essenziali agli agrumi, mediante UHPLC-MS.

2.2 Materiali e metodi

2.2.1 Standard e solventi

Gli standard di α -, β -, γ -, e δ -tocoferolo e α -tocotrienolo utilizzati per la costruzione delle rette di calibrazione sono stati forniti da Extrasynthase (Genay Cedex, Francia) e sono stati conservati a temperatura di -20 °C in *vials* di vetro ambrato per evitare alterazioni.

Gli standard dei composti fenolici sono stati l'etil gallato ($\geq 96\%$), luteolina ($\geq 97\%$), oleuropeina ($\geq 98\%$), apigenina ($\geq 99\%$), idrossitirosolo ($\geq 90\%$) e tirosolo ($\geq 95\%$) acquistati da Merck Life Science (Merck KGaA, Darmstadt, Germania).

Per l'analisi cromatografica dei composti eterociclici aromatici, invece, sono stati utilizzati come standard 35 composti eterociclici (standard analitico di grado > 98%) e 6 alchilaril chetoni (acetofenone, propiofenone, butirrofenone, valerofenone, esanofenone, eptanofenone). In particolare, 20 furocumarine (FC): Angelicina, Bergamottina, Bergaptene, Biacangelicina, Biacangelicolo, Cnidicina, Cnidilina, Epossibergamottina, Eraclenina, Imperatorina, Isobergaptene, Isoimperatorina, Isopimpinellina, Ossipeucedanina, Phypeucedanina, 8-geranilossipsoralene; 8 cumarine (Cs): Auraptene, Citroptene, Epossiauraptene, Erniarina, Isomeranzina, Meranzina, Meranzina idrato, 5-geranilossi-7-metossicumarina e 7 polimetossiflavoni (PMF): Gardenina A, Gardenina B, Nobiletina, Sinensetina, Tangeretina, Tetra-O-metilscutellareina, 5-O-demetilnobiletina. Anche questi sono stati acquistati da Merck Life Science (Merck KGaA, Darmstadt, Germania).

2.2.2 Campioni

Sono stati analizzati diciotto oli extravergine d'oliva aromatizzati provenienti da diverse regioni italiane e tutti prodotti nell'anno 2019/2020. Di questi oli 5 sono aromatizzati agli agrumi (2 mandarino, 2 limone e 1 bergamotto), 3 aromatizzati al Peperoncino, 3 aromatizzati con erbe della famiglia delle *Lamiaceae* (salvia, basilico, origano), 2 aromatizzati con piante erbacee appartenenti alla famiglia delle Zingiberaceae (zenzero e cardamomo), 2 aromatizzati ai funghi (funghi porcini e tartufo bianco), 1 all'Aglio, 1 alla Rosa e 1 alla Senape (Tabella 2.1).

Tutti i campioni sono stati conservati a -20 °C in flaconi di vetro ambrato con tappi ermetici per proteggerli dagli effetti ossidativi della luce e dell'aria.

Tabella 2.1 Tipologia degli EVOO, origine e metodo di preparazione.

Numero	EVOO aromatizzato	Origine	Metodo di Preparazione
1	Olio ai funghi porcini	Lazio	Infusione in olio extra vergine di oliva di funghi porcini
2	Olio all'aglio	Lazio	Infusione in olio extra vergine di oliva di aglio
3	Olio alla salvia	Lazio	Infusione in olio extra vergine di oliva di salvia
4	Olio all'origano	Lazio	Infusione in olio extra vergine di oliva di origano
5	Olio al mandarino	Puglia	Frangitura contemporanea di olive e mandarini freschi interi.
6	Olio al mandarino	Molise	Uso di oli essenziali al mandarino come agenti aromatizzanti.
7	Olio al limone	Puglia	Frangitura contemporanea di olive e limoni freschi e interi.
8	Olio al limone	Molise	Uso di oli essenziali al limone come agenti aromatizzanti.
9	Olio al bergamotto	Molise	Uso di oli essenziali al bergamotto come agenti aromatizzanti.
10	Olio allo zenzero	Molise	Frangitura contemporanea di olive e radici di zenzero.
11	Olio al basilico	Molise	Frangitura contemporanea di olive e foglie di basilico.
12	Olio al cardamomo	Molise	Frangitura contemporanea di olive e semi di cardamomo precedentemente tostati.
13	Olio al peperoncino	Molise	Infusione in olio extravergine di oliva di un peperoncino affumicato di origine cilena e un peperoncino di zona.
14	Olio alla senape	Molise	Infusione in olio extra vergine di oliva di senape.
15	Olio alla rosa	Molise	Infusione in olio extra vergine di oliva di petali di rosa.
16	Olio al peperoncino	Trentino-Alto Adige	Frangitura contemporanea di olive e peperoncino.
17	Olio al peperoncino	Puglia	Infusione in olio extravergine di oliva di peperoncino fresco.
18	Olio al tartufo bianco	Molise	Infusione in olio extra vergine di oliva di tartufo bianco.

2.2.3 Determinazione Vitamina E

Per quanto riguarda la determinazione dei tocoferoli, non è stato necessario eseguire una procedura estrattiva degli analiti.

Tutti i campioni sono stati analizzati senza alcun pretrattamento. Prima dell'analisi cromatografica, ciascun campione è stato diluito con esano (1:10, 1:15 o 1:30 v/v) al fine di quantificare α , β , γ -tocoferolo e α -tocotrienolo in una singola analisi, la durata della corsa cromatografica era di 10 minuti. Ogni campione è stato analizzato tre volte consecutivamente.

2.2.3.1 Determinazione mediante NP-HPLC/FLD

Le analisi HPLC sono state eseguite con un sistema Shimadzu (Shimadzu, Milano, Italia), che include un controller CBM-20A, due pompe a doppio pistone LC-30 AD, un *degasser* DGU-20A SR, un auto-campionatore SIL-30 AC, un forno CTO-20 AC, dove è posta la colonna cromatografica e un rivelatore di fluorescenza RF-20AXS con una cella con capacità di 12 μL , una lampada allo xeno. L'acquisizione dei dati è stata eseguita da LCMS solution Ver. 5.85 software (Shimadzu).

La separazione dei tocoferoli e dei tocotrienoli è stata effettuata mediante l'impiego di una colonna Ascentis Si (250 x 4.6 mm I.D., 5 μm il diametro delle particelle interne), la fase mobile impiegata era composta da *n*-esano e isopropanolo (99:1; v/v). Le analisi sono state eseguite in modalità isocratica con un flusso di 1.7 mL min⁻¹; la temperatura del forno era di 25°C e il volume di iniezione era 5 μL . L'identificazione e la quantificazione sono state condotte utilizzando un rivelatore a fluorescenza a una lunghezza d'onda di eccitazione di 290 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 330 nm.

2.2.3.2 Validazione del metodo

Per quantificare α , β , γ , e δ -tocoferolo e α -tocotrienolo nei campioni presi in esame, sono state usate le rette di calibrazione precedentemente create da Dugo e collaboratori [5]. In breve, cinque soluzioni a diverse concentrazioni di ciascun componente, nell'intervallo compreso tra 5 e 0.005 mg L⁻¹, preparate diluendo una soluzione madre di 100 mg L⁻¹ e utilizzando *n*-esano come solvente, sono state analizzate per cinque

volte consecutive mediante NP-HPLC nelle stesse condizioni cromatografiche ottimizzate per i campioni.

2.2.4 Determinazione Polifenoli

Per investigare il contenuto di polifenoli presenti nei campioni EVOO aromatizzati oggetto di ricerca, sono state eseguite delle procedure di estrazione su ciascun campione e successivamente ogni estratto è stato caratterizzato tramite RP-HPLC-PDA/MS.

2.2.4.1 Estrazione

Per estrarre la frazione fenolica, 1 mL di EVOO è stato diluito con 1 mL di *n*-esano; la soluzione è stata poi trattata con 1 mL di una miscela metanolo/acqua (60:40, v/v), agitata per 5 minuti e posta per 2 minuti in un bagno ad ultrasuoni. Successivamente la soluzione è stata centrifugata per 10 minuti a 3000 rpm in modo da consentire la separazione della componente fenolica da quella lipidica. La fase acquosa contenente la frazione fenolica è stata recuperata e lavata con 1 mL di *n*-esano per eliminare ulteriori tracce di olio. Infine, sono stati aggiunti 20 μ L di standard interno (etil gallato 10 mg in 10 mL di metanolo) e analizzata. Ciascun campione è stato analizzato in triplicato.

2.2.4.2 Determinazione mediante RP-HPLC-PDA/MS

Le analisi HPLC sono state effettuate con uno strumento Shimadzu Prominence LC-20A (Shimadzu, Kyoto, Japan) dotato di un *degaser* (DGU-20A5), un auto-campionatore (SIL-20A), due pompe a doppio pistone (LC-20 AD), un rivelatore a fotodiodi (SPD-M20A) e uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo (LCMS-2020) con una sorgente di ionizzazione elettrospray (ESI), operante sia in modalità di ionizzazione negativa che positiva.

La separazione è stata condotta su una colonna Ascentis Express C18 (150 \times 4.6 mm I.D., 2,7 μ m diametro particellare) utilizzando come fase mobile A: Acqua acidificata con lo 0.1% di acido formico, e fase B: acetonitrile acidificato con lo 0.1% di acido formico e il flusso è stato impostato a 1 mL min⁻¹. L'analisi è stata condotta operando

in gradiente: 0 min., 10% B; 4 min., 35% B; 12 min., 47% B; 12.5 min, 60% B; 16 min., 75% B; 21 min., 100% B. Tutte le analisi sono state eseguite a temperatura ambiente e il volume d'iniezione era di 5 μ L.

L'identificazione è stata effettuata mediante l'impiego di un PDA (con lunghezza d'onda impostata a 280 nm) e spettrometro di massa con sorgente ESI nelle seguenti condizioni: tempo dell'evento 0.5 s, flusso del gas nebulizzante N₂ 1.5 L/min, flusso di gas di essiccazione N₂ 5 L/min, temperatura del blocco termico 300 °C, temperatura della DL (linea di desolvatazione) 280 °C. Per la quantificazione dei composti fenolici dell'olio è stato utilizzato il monitoraggio singolo ione (SIM): idrossitirosolo (153 *m/z*), oleuropeina aglicone (377 *m/z*), ligstroside aglicone (361 *m/z*), oleocantale (303 *m/z*), oleaceina (319 *m/z*), apigenina (269 *m/z*), luteolina (285 *m/z*), acido elenolico (241 *m/z*), 10-idrossi-oleuropeina aglicone (393 *m/z*). Per il tirosolo la quantificazione è avvenuta al PDA, considerata la scarsa ionizzazione alla massa.

2.2.4.3 Validazione del metodo

Il metodo cromatografico è stato validato determinando la linearità, la ripetibilità e il recupero dell'estrazione a due livelli di fortificazione; i limiti di rivelabilità (LOD); e i limiti di quantificazione (LOQ) sono stati calcolati sulla base del rapporto segnale rumore (3:1 e 10:1). Per la costruzione delle rette di calibrazione sono state preparate soluzioni per ciascun standard a 4 diverse concentrazioni (1 mg L⁻¹, 25 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, 100 mg L⁻¹). I derivati e gli isomeri dell'oleuropeina aglicone, dell'acido elenolico, del ligstroside aglicone e dell'oleaceina sono stati quantificati con la retta di calibrazione dell'oleuropeina aglicone. Il tirosolo è stato quantificato con la retta di calibrazione del tirosolo al PDA.

2.2.5 Analisi di composti eterociclici ossigenati

L'analisi dei composti eterociclici ossigenati (CEO) è stata condotta solo sugli oli aromatizzati agli agrumi, in quanto questi composti sono tipici di questi alimenti. In particolare, sono stati analizzate le Cumarine (C), le Furocumarine (FC) e i Polimetossiflavoni (PMF).

Prima delle analisi HPLC, 0,1 g di ogni EVOO aromatizzato agli agrumi sono stati pesati in un matraccio e portati al volume finale 1 mL con *n*-esano.

I risultati quantitativi sono stati corretti tenendo conto della diluizione operata.

2.2.5.1 Determinazione mediante UHPLC-MS

Le analisi per la determinazione del contenuto di C, FC e PMF presenti nei 5 campioni di EVOO aromatizzati agli agrumi sono state effettuate utilizzando un sistema di cromatografia liquida Nexera X2 accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo LCMS-8060 (Shimadzu, Duisburg, Germania). Il sistema UHPLC è dotato di un *degaser* DGU-20A5R, due pompe LC-30AD, un forno CTO-20AC e un autocampionatore SIL-30AC. Per la separazione è stata utilizzata una colonna Ascentis Express C18 (50 × 4.6 mm I.D., 2.7 μm diametro particellare). Come fasi mobili sono stati utilizzate una miscela acqua/metanolo/THF (85:10:5, v/v) e una miscela metanolo/THF (95:5, v/v) che rappresentano rispettivamente il solvente A e B. La separazione cromatografica è stata eseguita con il seguente gradiente: 0 -4.5 min, 15-28% B; 4.5 - 7.0 min., 28-60% B; 7-11 min., 60-85% B, seguito da 3 min. di lavaggio della colonna. Il volume di iniezione era di 2 μL, il flusso di 2 mL min⁻¹ e la temperatura del forno di 40 °C. Sono stati applicati i seguenti parametri APCI: Temperatura dell'interfaccia 450 °C; Temperatura della DL 300°C, Temperatura del Blocco Termico 300 °C; Flusso del gas di essiccazione 15 L/min; Gas CID (Dissociazione indotta da collisione) 270 kPa.

Gli analiti target in esame C, FC e PMF sono stati rilevati in modalità di acquisizione Monitoraggio di Reazioni Multiple (MRM) attraverso un metodo sincronizzato, applicando finestre di acquisizione specifiche a seconda del tempo di ritenzione di ciascun target. In questo modo è stato possibile ottenere 10 scansioni per picco, come richiesto per una corretta quantificazione.

2.2.5.2 Validazione del metodo

Il metodo utilizzato è stato sviluppato e validato da Arigò e colleghi [6,7]. La caratterizzazione quantitativa dei campioni è stata effettuata utilizzando rette di calibrazione nell'intervallo compreso tra 0.05 e 100 mg L⁻¹ (0.05; 0.1; 1; 5; 10; 25; 50

e 100 mg L^{-1} , con cinque repliche per ciascuna concentrazione); solo i punti con un coefficiente di variazione percentuale (CV%) inferiore a 20 sono stati considerati per la costruzione della curva. Il Limite di detenzione LOD e di quantificazione LOQ sono stati misurati secondo le Guide Eurachem, sono state eseguite 10 replicate per campioni con basse concentrazioni degli analiti.

2.3 Risultati e discussioni

2.3.1 Tocoferoli e tocotrienoli negli oli aromatizzati

L'identificazione di tocoferoli e tocotrienoli è stata effettuata mediante l'utilizzo di NP-HPLC accoppiato ad un fluorimetro ed ogni composto è stato confermato con gli standard. La Tabella 2.1 riporta i tocoferoli identificati e quantificati nei diciotto campioni presi in esame.

In tutti i campioni aromatizzati, l' α -tocoferolo è l'isomero presente a maggior concentrazione ad eccezione dell'olio aromatizzato al basilico, dove l' α -tocotrienolo è presente in concentrazione maggiore rispetto agli altri tocoferoli. Per tutti gli EVOO aromatizzati la concentrazione degli isomeri della vitamina E rientra nei valori degli EVOO italiani di alta qualità [8] ad eccezione dell'olio aromatizzato al cardamomo, che ha un valore di α -tocoferolo di $41.14 \pm 1.19 \text{ mg L}^{-1}$, e dell'olio aromatizzato all'origano che ha un alto valore di δ -tocoferolo ($1.0 \pm 0.28 \text{ mg L}^{-1}$) a differenza di tutti gli altri oli.

In generale, i risultati ottenuti garantiscono che questi oli contengono un alto valore di molecole antiossidanti (isomeri della vitamina E).

Tabella 2.2 Risultati quantitativi dei tocoferoli e tocotrienoli espressi in mg/kg \pm deviazione standard (n=3) negli oli aromatizzati

Campione	α -tocoferolo	α -tocotrienolo	β - tocoferolo	γ -tocoferolo	δ -tocoferolo
1	169.3 \pm 0.07	5.0 \pm 0.10	3.4 \pm 0.05	7.8 \pm 0.03	<LoD
2	159.0 \pm 1.88	4.7 \pm 0.41	3.5 \pm 0.70	8.3 \pm 0.99	<LoD
3	72.8 \pm 0.04	3.1 \pm 0.07	2.7 \pm 0.18	6.4 \pm 0.32	<LoD
4	84.1 \pm 1.08	4.1 \pm 0.16	3.2 \pm 0.13	64.7 \pm 0.24	1.0 \pm 0.28
5	90.5 \pm 0.87	3.6 \pm 0.20	3.8 \pm 0.07	9.0 \pm 0.53	<LoD
6	75.5 \pm 0.44	4.2 \pm 0.32	3.0 \pm 0.20	11.4 \pm 0.62	<LoD
7	178.9 \pm 4.45	18.1 \pm 2.16	5.4 \pm 0.64	16.6 \pm 1.92	<LoD
8	101.8 \pm 0.03	5.1 \pm 0.13	3.3 \pm 0.10	10.4 \pm 0.08	<LoD
9	101.7 \pm 0.96	6.4 \pm 0.38	3.1 \pm 0.39	9.6 \pm 0.45	<LoD
10	100.4 \pm 2.83	4.2 \pm 0.03	4.2 \pm 0.20	11.1 \pm 0.25	<LoD
11	73.6 \pm 4.64	102.8 \pm 9.00	7.9 \pm 2.58	20.3 \pm 2.63	<LoD
12	41.1 \pm 1.19	13.9 \pm 1.57	4.6 \pm 0.56	12.5 \pm 0.83	<LoD
13	86.2 \pm 2.17	5.1 \pm 0.27	3.0 \pm 0.07	9.0 \pm 0.47	<LoD
14	84.5 \pm 0.49	4.4 \pm 0.00	3.1 \pm 0.11	8.5 \pm 0.44	<LoD
15	90.2 \pm 0.31	5.0 \pm 0.31	4.1 \pm 0.26	11.8 \pm 0.65	<LoD
16	108.1 \pm 0.25	3.5 \pm 0.44	3.0 \pm 0.04	8.9 \pm 0.43	<LoD
17	136.1 \pm 1.04	4.8 \pm 0.22	3.4 \pm 0.21	13.6 \pm 0.25	<LoD
18	113.3 \pm 0.43	5.3 \pm 0.48	3.6 \pm 0.24	11.5 \pm 0.37	<LoD
<i>Range</i> ^c	70.2 - 376.3	1.3 - 6.7	1.1 - 9.2	1.1 - 25.9	<LoD

^c[5,8]

2.3.2 Composti fenolici negli oli aromatizzati

Tutti gli oli aromatizzati che sono stati analizzati presentano un profilo fenolico in accordo con quello degli EVOO di alta qualità [8,5], ciò che li differenzia è la variabilità del contenuto totale di ciascuna molecola (Tabella 2.3).

Per quanto riguarda gli oli aromatizzati agli agrumi, tutti e 5 i campioni mostrano un profilo qualitativo identico, ma presentano delle differenze in termini di concentrazione media totale dei polifenoli, ad esempio nel campione 9 (olio aromatizzato al bergamotto) è pari a 1505.13 mg L⁻¹ mentre nel campione 5 (l'olio aromatizzato mandarino) è pari a 537.47 mg L⁻¹.

L'elevata quantità di polifenoli dipende in particolar modo dal contenuto di oleuropeina aglicone, oleaceina e acido elenolico. Negli oli analizzati, è stata rilevata una concentrazione media totale di 388.48 mg L⁻¹ di oleuropeina aglicone con un intervallo che varia da un minimo di 160.38 mg L⁻¹ nel campione 5 ad un massimo di 591.57 mg L⁻¹ nel campione 9, a differenza della concentrazione media dell'oleuropeina aglicone di 928.6 mg L⁻¹ presente negli EVOO di alta qualità che hanno un intervallo che va da 51.6 a 3482.4 mg L⁻¹ [5]. Mentre l'oleaceina e l'acido elenolico sono presenti in EVOO aromatizzati agli agrumi con una concentrazione media totale rispettivamente di 209.74 mg L⁻¹ e di 147.77 mg L⁻¹.

Le quantità media degli altri composti minoritari presenti negli oli aromatizzati agli agrumi sono: idrossitirosolo 117.17 mg L⁻¹, tirosolo 9.06 mg L⁻¹, luteolina 22.28 mg L⁻¹ e apigenina 5.95 mg L⁻¹. Il campione 7 e 9 mostrano i valori di concentrazione più elevati in idrossitirosolo.

Per quanto riguarda i gli oli aromatizzati al peperoncino (campione 13,16,17), la concentrazione media totale dei polifenoli varia da un massimo di 2396.73 mg L⁻¹ nel campione 13, ad un minimo di 912.47 mg L⁻¹ nel campione 16 a cui segue il campione 17 con un valore medio di 1300.1 mg L⁻¹. Dunque, è possibile affermare che il campione 13 ottenuto per frangitura contemporanea di olive e peperoncini ha una concentrazione di polifenoli nettamente più alta rispetto agli altri due oli ottenuti per infusione. Questo evidenzia come la frangitura contemporanea di olive e l'agente aromatizzante sia il metodo migliore per la preparazione di un olio aromatizzato. Entrando più nel dettaglio in merito ai diversi composti fenolici presi in esame, negli oli analizzati è stata rilevata una concentrazione massima di oleuropeina aglicone pari

a 1086.69 mg L⁻¹ nel campione 13 con un valore massimo nettamente più alto rispetto ai valori riscontrati nei campioni 17 e 16, di 524.90 mg L⁻¹ e 302.74 mg L⁻¹, rispettivamente. L'oleaceina è presente negli oli aromatizzati al peperoncino con una concentrazione media totale di 292.56 mg L⁻¹; mentre l'acido elenolico si ritrova in concentrazione media totale di 216.00 mg L⁻¹. Le quantità media degli altri composti minoritari presenti negli oli aromatizzati al peperoncino sono: idrossitirosolo 63.03 mg L⁻¹, tirosolo 7.6 mg L⁻¹, luteolina 66.60 mg L⁻¹. L'apigenina, invece, è presente in quantità rilevabile soltanto nel campione 13 in cui troviamo una concentrazione di 2.43 mg L⁻¹. Nei due oli aromatizzati ai funghi il contenuto totale di polifenoli va da un massimo di 1957.68 mg L⁻¹ nel campione 1 ad un minimo di 1763.27 mg L⁻¹ nel campione 18. Il composto fenolico presente in maggiori quantità è l'oleuropeina aglicone, con un valore di 1033.27 mg L⁻¹ nel campione 1 e di 783.64 mg L⁻¹ nel campione 18; a seguire l'oleacina con una concentrazione media di 303.69 mg L⁻¹ e l'acido elenolico con una concentrazione media di 291.42 mg L⁻¹. Per il resto, i due campioni di oli aromatizzati ai funghi presentano un profilo qualitativo identico con variazioni solo quantitative; fatta eccezione per l'oleocantale presente nel campione 1 in una concentrazione pari a di 2.74 mg L⁻¹ mentre nel campione 18 è presente in tracce.

Per quanto riguarda gli oli aromatizzati con piante appartenenti alla famiglia delle *Zingiberaceae*, campione 10 (olio allo zenzero) e campione 12 (olio al cardamomo) la concentrazione media di polifenoli varia da un massimo di 760.44 mg L⁻¹ nel campione 10 a un minimo di 475.01 mg L⁻¹ nel campione 12. Anche in questo caso, l'alta quantità dei polifenoli totali dipende in particolar modo dal contenuto dell'oleuropeina aglicone, dell'oleaceina e dell'acido elenolico presenti rispettivamente in una concentrazione media di 177.71 mg L⁻¹, 225.47 mg L⁻¹ e 78.69 mg L⁻¹.

Infine, per quanto riguarda i campioni 3, 4, 11, 14, 2, 15 mostrano tutti un profilo qualitativo identico, con differenze relative alle quantità. Tra questi, l'olio a maggior contenuto di polifenoli è il campione 4 con una concentrazione di 2193.46 mg L⁻¹; mentre l'olio a minor contenuto è il campione 11 con una concentrazione di polifenoli di 817.05 mg L⁻¹.

In tutti i suddetti campioni, il composto fenolico maggiormente presente è l'oleuropeina aglicone con una concentrazione media di 547.39 mg L⁻¹, il valore

massimo si riscontra nel campione 2 pari a 998.21 mg L⁻¹ mentre il valore minimo si ritrova nel campione 11 pari a 236.17 mg L⁻¹. L'unica differenza qualitativa è nel campione 14, nel quale non è stata rilevata la presenza di apigenina al contrario degli altri oli.

Tabella 2.3 Risultati quantitativi dei polifenoli espressi in mg/kg \pm deviazione standard (n=3) negli oli aromatizzati.

Composti	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 13	Campione 16	Campione 17	Campione 15
Idrossitirosolo	24.9 \pm 1.29	37.11 \pm 3.61	366.43 \pm 28.13	63.33 \pm 1.77	94.45 \pm 1.67	64.78 \pm 3.17	65.16 \pm 0.47	59.17 \pm 4.12	46.79 \pm 1.65
Tirosolo	5.51 \pm 0.03	8.94 \pm 0.16	6.88 \pm 0.19	10.30 \pm 0.08	14.63 \pm 0.12	8.72 \pm 0.35	8.08 \pm 0.02	6.00 \pm 0.04	6.40 \pm 0.23
Acido elenolico	54.05 \pm 1.94	127.11 \pm 3.25	92.82 \pm 2.82	239.26 \pm 12.83	225.61 \pm 8.63	131.39 \pm 13.16	392.20 \pm 6.18	124.42 \pm 4.09	123.13 \pm 5.13
10-Idrossi-oleuropeina aglicone	70.97 \pm 3.08	127.60 \pm 4.63	61.34 \pm 7.16	158.86 \pm 9.54	241.65 \pm 12.69	143.68 \pm 4.63	247.92 \pm 5.62	181.93 \pm 2.56	115.03 \pm 6.47
Oleuropeina aglicone	160.38 \pm 3.47	269.81 \pm 13.05	370.19 \pm 10.97	550.47 \pm 12.43	591.57 \pm 33.17	302.74 \pm 14.35	1086.69 \pm 16.87	524.90 \pm 11.10	267.88 \pm 14.90
Luteolina	24.59 \pm 1.06	23.87 \pm 0.10	11.50 \pm 0.14	26.89 \pm 0.81	24.54 \pm 0.27	47.32 \pm 1.30	114.52 \pm 3.46	37.97 \pm 1.81	53.49 \pm 2.46
Oleaceina	149.36 \pm 4.64	188.12 \pm 5.93	238.00 \pm 11.59	237.61 \pm 15.02	235.64 \pm 3.74	182.17 \pm 4.84	379.58 \pm 4.74	315.93 \pm 15.28	254.25 \pm 6.81
Ligstroside aglicone	29.29 \pm 0.68	32.24 \pm 2.15	36.79 \pm 3.56	54.01 \pm 2.04	66.41 \pm 3.47	31.67 \pm 1.74	100.15 \pm 0.33	49.78 \pm 3.76	27.02 \pm 0.46
Apigenina	6.54 \pm 0.17	4.24 \pm 0.46	9.6 \pm 0.22	4.61 \pm 0.36	4.81 \pm 0.12	-	2.43 \pm 0.43	<LoQ	<LoQ
Oleocantale	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
Totale	524.51 \pm 11.41	819.12 \pm 29.19	1193.54 \pm 55.19	1345.01 \pm 46.13	1499.26 \pm 55.76	912.47 \pm 34.72	2396.73 \pm 26.18	1300.1 \pm 28.23	893.99 \pm 35.04

Continuazione **Tabella 2.3**

Composti	Campione 10	Campione 12	Campione 11	Campione 3	Campione 4	Campione 1	Campione 18	Campione14	Campione 2
Idrossitirosolo	40.90 ± 3.02	25.73 ± 1.74	91.68 ± 4.24	225.74 ± 5.68	215.73 ± 2.39	33.01 ± 1.43	200.03 ± 3.44	37.85 ± 2.30	45.45 ± 2.76
Tirosolo	7.63 ± 0.03	7.31 ± 0.03	14.88 ± 0.26	15.61 ± 0.51	13.78 ± 0.52	2.36 ± 0.18	11.07 ± 0.24	7.01 ± 0.44	5.61 ± 0.08
Acido elenolico	106.41 ± 2.21	50.97 ± 2.66	107.87 ± 2.30	423.28 ± 1.62	530.23 ± 4.13	218.49 ± 14.67	364.35 ± 15.02	127.87 ± 2.26	302.33 ± 9.91
10-Idrossi- oleuropeina aglicone	79.84 ± 4.16	45.76 ± 0.87	127.90 ± 5.88	275.68 ± 0.77	278.13 ± 8.79	111.46 ± 2.10	127.92 ± 5.01	115.88 ± 2.30	129.79 ± 7.33
Oleuropeina aglicone	237.09 ± 5.52	118.33 ± 1.87	236.17 ± 13.88	684.26 ± 19.56	793.23 ± 8.72	1033.27 ± 31.51	783.64 ± 24.59	304.57 ± 9.48	998.21 ± 47.73
Luteolina	21.99 ± 1.42	15.97 ± 0.90	20.78 ± 0.90	33.30 ± 0.48	22.55 ± 0.70	45.32 ± 2.69	26.45 ± 0.73	49.14 ± 0.20	43.74 ± 0.96
Oleaceina	243.54 ± 5.88	207.40 ± 3.40	189.29 ± 5.89	187.83 ± 6.19	221.32 ± 2.30	449.49 ± 12.99	157.89 ± 3.80	216.05 ± 3.85	410.02 ± 19.06
Ligstroside aglicone	23.04 ± 0.62	3.54 ± 0.19	23.49 ± 0.09	174.74 ± 10.83	114.45 ± 2.52	57.56 ± 3.40	87.88 ± 2.51	31.17 ± 1.69	63.79 ± 1.21
Apigenina	-	-	5.01 ± 0.24	8.28 ± 0.31	4.1 ± 0.23	3.98 ± 0.65	4.1 ± 0.12	-	2.15 ± 0.44
Oleocantale	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	2.74 ± 0.21	<LoD	<LoD	1.92 ± 0.12
Totale	760.44 ± 18.26	475.01 ± 6.76	817.05 ± 29.97	2028.72 ± 175.85	2193.46 ± 22.93	1957.68 ± 64.42	1763.27 ± 25.30	889.5 ± 12.98	2000.01 ± 8.37

2.3.3 Composti eterociclici ossigenati negli oli aromatizzati

I composti eterociclici ossigenati (CEO) sono presenti principalmente nella frazione non volatile degli oli essenziali di agrumi spremuti a freddo. Questi composti giocano un ruolo molto importante nella caratterizzazione degli oli essenziali, infatti la composizione sia qualitativa che quantitativa della frazione non volatile è caratteristica di ciascun olio [9].

I profili qualitativi dei CEO nei due EVOO aromatizzati al mandarino possono essere paragonabili a quelli del corrispondente olio essenziale spremuto a freddo, costituito da PMF [10]. I profili dei due oli hanno mostrato però differenze dal punto di vista quantitativo, come si può osservare nella Tabella 2.4.

Per quanto riguarda la composizione in PMF, la nobiletina è il composto maggiormente presente con 78.0 mg L^{-1} e 8.0 mg L^{-1} nei campioni 5 e 6, rispettivamente. Nel campione 5 la nobiletina è seguita dalla tangeretina (9.0 mg L^{-1}) e dalla tetra-O-metilscutellareina (4.22 mg L^{-1}). Il rapporto tra i componenti principali risulta uguale nei due campioni di mandarino; in particolare, la proporzione tra nobiletina/tangeretina/tetra-O-metilscutellareina è pari a 19:2:1 e 14:4:1 per i campioni 5 e 6, rispettivamente. Tuttavia, nel campione 6, il terzo composto quantitativamente più alto è la 5-O-demetilnobiletina a discapito del tetra-O-metilscutellareina. Le quantità totali di PMF è risultata pari a 98.0 mg L^{-1} per il campione 5 e 13.0 mg L^{-1} per il campione 6. Questa differenza può essere attribuita ai diversi ingredienti aggiunti e ai processi di produzione impiegati per aromatizzare l'olio. In particolare, ciò può essere dovuto all'utilizzo del frutto intero per il campione 5 e alla sola aggiunta di olio essenziale di mandarino spremuto a freddo nel campione 6.

Per quanto riguarda i due EVOO aromatizzati al limone, sono stati quantificati concentrazioni diverse di furocumarine (FC) e le cumarine (C), e solo in uno dei due campioni sono state rilevate tracce di PMF. In particolare, oltre alla presenza di CEO tipici dei frutti di limone, il campione 8 ha mostrato la presenza di nobiletina, tangeretina e 5-O-demetil-nobiletina, PMF normalmente presenti negli oli essenziali pressati a freddo di mandarino e arancia dolce [11].

La bergamottina è il composto più abbondante nel campione 7, pari a 1.40 mg L⁻¹, mentre il campione 8 ne contiene 1.08 mg L⁻¹. Quest'ultimo però presenta quasi 4 mg L⁻¹ di biacanangelicolo, che non è stato rilevato nel campione 7.

Come per gli oli aromatizzati al mandarino, anche in questo caso, un EVOO è stato aromatizzato con l'aggiunta di olio essenziale e l'altro è stato aromatizzato attraverso la spremitura simultanea di olive e limoni interi.

Il campione 9 aromatizzato al bergamotto è stato preparato utilizzando l'olio essenziale di bergamotto; ciò significa che il suo profilo di CEO dovrebbe corrispondere a quello di un olio essenziale di bergamotto. Questo campione però ha mostrato la presenza di cnidilina (< LoQ) che è un composto tipico della limetta; e 8-geranilossipsoralene (0.41 mg/L) caratteristico della limetta e del limone ma non del bergamotto [7]. L'olio aromatizzato è prodotto dalla spremitura contemporanea di olive e frutti interi, la correlazione tra la composizione CEO dell'olio e le specie degli agrumi utilizzati per conferire l'aroma risulta di difficile interpretazione a causa di tutti i fattori che devono essere presi in considerazione nella valutazione dei risultati. La prima considerazione si basa sull'utilizzo del frutto intero come ingrediente della preparazione, ciò comporta la presenza di CEO contenuti negli oli essenziali ma anche nelle bucce e nel succo. Il secondo fattore è legato al comportamento di alcuni CEO in condizioni acide, ad esempio a contatto con il succo del frutto [9]. Un'altra variabile è la fase di centrifugazione del processo di produzione dell'olio d'oliva, durante la quale i composti più polari possono disperdersi nella fase acquosa. Questa fase della produzione incide drasticamente sulla quantità di polifenoli contenuti nei prodotti finali. Ad esempio, la perdita di componenti idrosolubili, come i polifenoli, è proporzionale alla quantità di acqua utilizzata durante questo processo. Per lo stesso motivo, i CEO più polari potrebbero essere eliminati in questo *step*.

Al contrario, l'aggiunta degli oli essenziali aromatizzanti al termine del processo produttivo dovrebbe determinare una corrispondenza tra la caratterizzazione qualitativa tra i profili CEO dell'essenza e quelli del campione analizzato. Tenendo conto dell'importanza che sta ricevendo negli ultimi anni il contenuto di C e FC negli alimenti, è possibile affermare che tutti i campioni analizzati si possono considerare assolutamente sicuri per la salute umana per la bassa quantità di CEO rilevata.

Tabella 2.4 Risultati quantitativi dei composti eterociclici ossigenati espressi in mg/kg \pm deviazione standard (n=3) negli oli aromatizzati.

Composti	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9
Bergamottina	-	< LOQ	1.40 \pm 0.034	1.08 \pm 0.009	1.29 \pm 0.024
Bergaptene	< LOQ	-	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Biacangelicolo	-	-	-	3.91 \pm 0.107	-
Cnidicina	-	-	< LOQ	0.12 \pm 0.005	0.032 \pm 0.002
Cnidilina	-	-	-	-	< LOQ
Isoimperatorina	-	-	< LOQ	0.14 \pm 0.002	< LOQ
Isopimpinellina	-	-	< LOQ	-	0.01 \pm 0
Ossipecedanina	-	-	0.17 \pm 0.007	1.88 \pm 0.069	0.1 \pm 0.001
Ossipecedanina idrato	-	-	-	0.25 \pm 0.003	-
Fellopterina	-	-	-	0.43 \pm 0.029	-
8-geranilossipsoralene	-	-	< LOQ	1.05 \pm 0.062	0.41 \pm 0.008
Totale furocumarine	-	-	1.57 \pm 0.041	8.68 \pm 0.286	1.84 \pm 0.035
Citroptene	-	-	0.198 \pm 0.008	3.97 \pm 0.192	0.18 \pm 0.004
Erniarina	-	-	0.06 \pm 0.004	< LOQ	0.05 \pm 0.004
Meranzina	-	-	-	< LOQ	-
5-geranilossi-7-metossicoumarina	-	< LOQ	1.24 \pm 0.017	0.73 \pm 0.008	1.19 \pm 0.025
Totale cumarine	-	-	1.50 \pm 0.029	4.70 \pm 0.2	1.42 \pm 0.033
Gardenina A	1.44 \pm 0.008	0.67 \pm 0.003	-	0.62 \pm 0	-
Gardenina B	< LOQ	< LOQ	-	-	-
Nobiletina	78.4 \pm 2.0	8.19 \pm 0.28	-	0.29 \pm 0.003	-
Sinensetina	3.04 \pm 0.04	0.14 \pm 0.004	-	-	-
Tangeretina	9.00 \pm 0.11	2.30 \pm 0.055	-	0.302 \pm 0	-
Tetra-O-metilscutellareina	4.22 \pm 0.07	0.60 \pm 0.004	-	-	-
5-O-demetilnobiletina	1.95 \pm 0.04	0.96 \pm 0.027	-	0.45 \pm 0.001	-
Totale polimetossiflavoni	98.0 \pm 2.27	12.9 \pm 0.37	-	1.67 \pm 0.004	-
Totale	98.0 \pm 2.27	12.9 \pm 0.37	3.06 \pm 0.07	15.05 \pm 0.49	3.26 \pm 0.068

2.4 Conclusioni

Dati i risultati ottenuti è possibile affermare che i metodi HPLC si sono dimostrati particolarmente utili per l'analisi approfondita degli oli extravergini di oliva aromatizzati. In particolare, hanno permesso di valutarne la genuinità mediante l'esame del contenuto di vitamina E, fenoli e CEO nel caso di oli aromatizzati agli agrumi.

Per tutti i campioni in esame, la concentrazione degli isomeri della vitamina E rientra nei valori degli oli extravergini di oliva italiani di alta qualità, fatta eccezione per l'olio aromatizzato al cardamomo, la cui concentrazione di α -tocoferolo è più bassa (41.14 mg L⁻¹), e per l'olio aromatizzato all'origano in cui, a differenza degli altri oli è stata riscontrata la presenza di δ -tocoferolo (1.0 mg L⁻¹). In generale, i risultati ottenuti garantiscono la presenza di un alto contenuto di isomeri della vitamina E.

Anche i valori del profilo fenolico degli oli aromatizzati sono comparabili con quelli degli EVOO ad alta qualità superando, in alcuni campioni, le indicazioni nutrizionali dell'EFSA.

Grazie all'aggiunta di agenti aromatizzanti è stato riscontrato un effettivo incremento della componente antiossidante nell'olio extravergine di oliva con effetti positivi sia sulla *shelf-life* del prodotto che sulla salute dei consumatori.

Infine, per quanto riguarda i risultati ottenuti dei CEO analizzati nei cinque oli aromatizzati agli agrumi, si evince che il profilo dei CEO di ogni campione riflette quello della specie di *Citrus* utilizzata per aromatizzare l'olio EVO; tuttavia, la composizione quali-quantitativa varia considerevolmente a seconda della tecnica impiegata nel processo produttivo per ottenere il prodotto finito.

Riferimenti bibliografici

- [1] Sousa A., Casal S., Malheiro R., Lamas H., Bento A., Pereira J. A. (2015). Aromatized olive oils: Influence of flavouring in quality, composition, stability, antioxidants, and antiradical potential. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 22-28.
- [2] Asensio CM., Nepote V., Grosso NR (2013) Consumers' acceptance and quality stability of olive oil favoured with essential oils of different oregano species. *International Journal of Food Science & Technology* 48:2417–2428.
- [3] Baiano A., Terracone C., Gambacorta G., Notte EL. (2009) Changes in quality indices, phenolic content and antioxidant activity of favored olive oils during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86:1083–1092.
- [4] Benkhoud H., M'Rabet Y., Gara ali M., Mezni M., Hosni K. (2022) Essential oils as favoring and preservative agents: impact on volatile profile, sensory attributes, and the oxidative stability of favored extra virgin olive oil. *Journal of Food Processing and Preservation* 46: e15379.
- [5] Dugo L., Russo M., Cacciola F., Mandolino F., Salafia F., Vilmercati A., Fanali C., Casale M., De Gara L., Dugo P., Mondello L., Rigano F. (2020) Determination of the Phenol and Tocopherol Content in Italian High-Quality Extra-Virgin Olive Oils by Using LC-MS and Multivariate Data Analysis. *Food Analytical Methods*. 13, 1027–1041.
- [6] Arigò A, Rigano F, Micalizzi G, Dugo P, Mondello L. (2019). Oxygen heterocyclic compound screening in Citrus essential oils by linear retention index approach applied to liquid chromatography coupled to photodiode array detector. *Flavour and Fragrance Journal*, 34, 349-364.
- [7] Arigò A., Dugo P., Rigano F., Mondello L. (2021). Linear Retention Index Approach applied to Liquid Chromatography coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry to determine Oxygen Heterocyclic Compounds at Trace Level in Finished Cosmetics. *Journal of Chromatography A*, 1649, 462183.

- [8] Rózanska A., Russo M., Cacciola F., Salafia F., Polkowska Z., Dugo P., Mondello L. (2020). Concentration of Potentially Bioactive Compounds in Italian Extra Virgin Olive Oils from Various Sources by Using LC-MS and Multivariate Data Analysis. *Foods*, 16.
- [9] Dugo, P., Mondello, L., Stagno d'Alcontres I., Cavazza A., and Dugo, G. (1997). Oxygen heterocyclic compounds of citrus essential oils. *Perf. Flav.* 22 (1):25-30.
- [10] Russo M., Arigò A., Calabrò M. R., Farnetti S., Mondello L., Dugo P. (2016). Bergamot (*Citrus Bergamia* Risso) as a Source of Nutraceuticals: Limonoids and Flavonoids. *Journal of Functional Foods* 20 (January) 2016: 10–19.
- [11] Russo M., Rigano F., Arigò A., Dugo P. & Mondello L. (2021). Coumarins, Psoralens and Polymethoxyflavones in Cold-pressed Citrus Essential Oils: a review. *Journal of essential oil research*.

**Capitolo 3. Estrazione e separazione cromatografica
mediante l'uso di fluidi supercritici.**

3.1 I fluidi supercritici

La cromatografia a fluidi supercritici (SFC) è una tecnica ibrida tra la cromatografia liquida e la gascromatografia con alcune delle migliori caratteristiche di entrambe e prevede l'utilizzo di un fluido supercritico come fase mobile.

Secondo la definizione IUPAC, un fluido supercritico è qualsiasi elemento, sostanza o miscela riscaldato al di sopra della temperatura critica (T_c) e pressurizzato al di sopra della pressione critica (P_c). Una sostanza, a valori di temperatura e pressione superiori, rispettivamente, a T_c e P_c , assume caratteristiche fisiche particolari intermedie tra quelle di un liquido e quelle di un gas. I fluidi supercritici infatti possiedono densità e coefficiente di diffusione simili a quelli di un liquido e viscosità simile a quelle di un gas (Tabella 3.1).

Tabella 3.1 Proprietà dei fluidi supercritici rispetto a liquidi e gas

STATO FISICO	Densità (Kg/m ³)	Viscosità (cP)	Diffusibilità (mm ² /s)
Gas	1	0,01	1-10
Fluido Supercritico	100-800	0,05-0,1	0,01-0,1
Liquido	1000	0,5-1,0	0,001

L'esistenza dei fluidi supercritici può essere spiegata attraverso i diagrammi di fase ovvero grafici rappresentativi delle fasi presenti in un sistema all'equilibrio in funzione di alcuni parametri, quali temperatura e pressione, in condizioni di equilibrio termodinamico.

Il diagramma di fase di un composto puro evidenzia le aree nelle quali esso esiste sotto forma di solido, liquido o gas; il punto triplo rappresenta i valori di temperatura e pressione in cui le tre fasi sono in equilibrio tra loro, mentre il punto critico segna la fine della curva di equilibrio liquido/vapore. Al di sopra della temperatura critica non c'è alcuna transizione di fase che consenta al fluido di passare allo stato liquido, qualunque sia la pressione applicata (Figura 3.1).

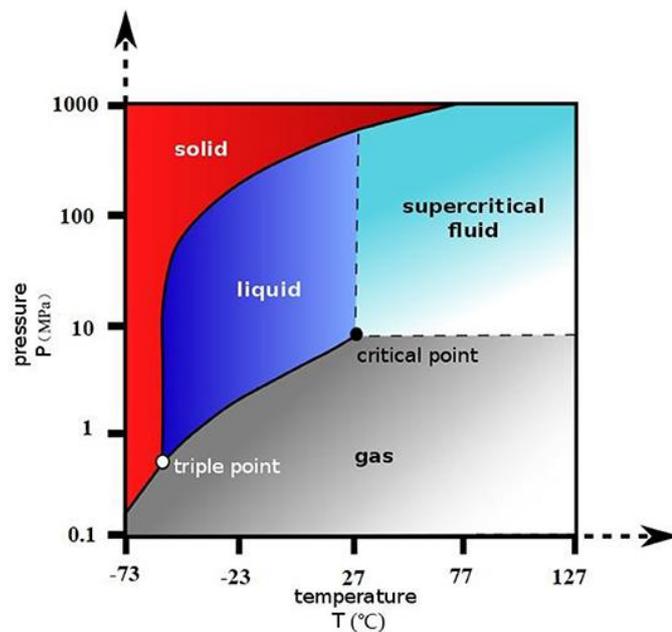


Figura 3.1 Rappresentazione schematica di un diagramma di fase di un composto puro.

Ciò che rende i fluidi supercritici interessanti è la possibilità di poter modificare le loro proprietà fisiche da valori tipici della fase gassosa a valori tipici di quella liquida, agendo sulle condizioni termodinamiche del sistema. Per esempio, è possibile aumentare la densità di un fluido supercritico (aumentandone quindi il potere solvente) semplicemente aumentando la pressione del sistema [1].

Il principale vantaggio nell'uso dei fluidi supercritici è che sono poco costosi, inoltre permettono di effettuare estrazioni veloci ed hanno un minor impatto ambientale rispetto ai comuni solventi organici.

Numerosi composti, in forma liquida o gassosa possono essere portati nel loro stato supercritico ma solo alcuni di essi sono applicabili da un punto di vista pratico, poiché devono avere un basso peso molecolare, una temperatura critica (T_C) vicino alla temperatura ambiente (T_C 10-40 $^{\circ}\text{C}$) e una pressione critica (P_C) non troppo alta (40-60 atm). Nella tabella 3.2 sono riportati i punti critici di alcuni composti utilizzati come fluidi supercritici [2].

Tabella 3.2 Temperature e pressioni critiche di di alcuni composti utilizzati come fluidi supercritici.

<i>Solvente</i>	<i>T_c (°C)</i>	<i>P_c (atm)</i>	<i>Densità critica (g/mL)</i>
Anidride carbonica	31,3	72,9	0,448
Protossido di azoto	36,5	71,7	0,450
Etano	32,3	48,1	0,200
Propano	96,7	41,9	0,217
<i>n</i> -Pentano	196,6	33,3	0,232
Metanolo	240,5	78,9	0,272
Etanolo	243,0	63,0	0,276
Clorotrifluorometano	28,0	38,7	0,579
Isopropanolo	235,3	47,0	0,273
Ammoniaca	132,4	112,5	0,235
Acqua	374,2	214,8	0,320

3.2 Anidride carbonica supercritica

Il fluido supercritico maggiormente utilizzato è l'anidride carbonica in virtù della bassa tossicità, inerzia chimica e non infiammabilità, l'alta diffusività e la bassa tensione superficiale [3]. In particolare la CO₂ è la miglior fase mobile per la cromatografia a fluidi supercritici, il suo punto critico è di 7.38 MPa e 31,1 °C [4] il che significa che lo stato supercritico è facilmente accessibile e sicuro per l'analisi di sistemi biomolecolari, composti farmaceutici e numerose molecole termicamente labili. Mentre come è possibile osservare nella tabella 3.2, composti che a temperatura ambiente sono in fase liquida presentano un punto critico molto elevato, come ad esempio l'acqua, e per tanto tali sostanze sono difficilmente applicabili in campi in cui i materiali da trattare sono ad esempio termolabili. Un altro svantaggio dei composti con elevato punto critico è di tipo economico, infatti nelle applicazioni industriali risulta oneroso il raggiungimento e il mantenimento di pressioni molto elevate, non strettamente richieste con solventi come la CO₂. Quest'ultima infatti è il fluido supercritico più usato principalmente per il suo basso costo, ma anche perché è facilmente reperibile in commercio ad elevata purezza. Inoltre presenta il vantaggio di essere un gas a temperatura e pressione ambiente, fattore che ne rende facile la rimozione dopo il processo per cui è impiegata.

Lo svantaggio principale legato all'uso della CO₂ è rappresentato dalla sua natura non polare. Essa, infatti, presenta una polarità simile a quella dell'esano, per tanto in alcuni casi è necessario aggiungere piccole percentuali di modificanti polari per aumentarne il potere solubilizzante in presenza di analiti polari.

I modificanti più utilizzati sono il metanolo e l'acetonitrile sia puri che in miscela con piccole percentuali di acqua. La scelta del modificante è strettamente correlata alla solubilità dell'analita che allo stato liquido deve mostrare un'ottima solubilità per la specie in esame. Anche l'acqua può essere utilizzata come co-solvente per modificare la polarità della CO₂; minime quantità di acqua, già presenti nel campione o aggiunte come modificante, ottimizzano ad esempio il processo estrattivo degli analiti più polari e la loro separazione cromatografica.

3.3 Estrazione con fluidi supercritici

L'estrazione con fluidi supercritici, o *supercritical fluid extraction* (SFE), rappresenta una valida alternativa ai sistemi classici di estrazione con solvente in quanto limita il consumo di solventi organici, riduce i tempi di analisi e può essere facilmente automatizzata.

Come già discusso nel paragrafo precedente, i fluidi supercritici hanno densità simile a quella di un liquido e viscosità simile a quella di un gas, poiché il potere solvente di un fluido è direttamente correlato alla densità, ne consegue che, rispetto a una classica estrazione con solvente, l'estrazione con un fluido supercritico di comparabile potere solvatante (densità) richiede meno tempo. Grazie alla minore viscosità, il fluido supercritico è inoltre in grado di penetrare in profondità nella matrice del campione; pertanto il trasferimento di massa (diffusione) dell'analita dalla matrice risulterà più rapido rispetto a quello dell'estrazione classica con solvente. Tutto ciò può significare minor consumo di solvente e, di conseguenza, costi ridotti rispetto alle tradizionali estrazioni. Inoltre, scegliendo opportunamente il fluido supercritico, le condizioni di temperatura e pressione e la modalità di raccolta del campione, l'estrazione può essere resa altamente selettiva nei confronti dell'analita di interesse. Ciò significa che gli estratti ottenuti conterranno meno interferenti rispetto a quelli ottenuti con solventi organici, e non necessiteranno quindi di ulteriore purificazione prima della determinazione analitica finale.

Altri vantaggi che offre questa tecnica sono la possibilità di automazione e l'applicabilità a svariati settori: alimentare, farmaceutico, ambientale.

Oltre il 90% delle applicazioni SFE utilizza CO₂ supercritica. Quest'ultima presenta maggiori vantaggi rispetto alle altre sostanze utilizzabili come fluidi supercritici, oltre a essere priva di tossicità, non infiammabile e riciclabile, a temperatura e pressione ambiente è un gas, ciò che la rende facilmente separabile dal soluto una volta terminato il processo estrattivo [1].

3.3.1 Strumentazione

Gli elementi fondamentali di un estrattore per SFE sono riportati nella figura 3.2. Il cuore del sistema è rappresentato da una pompa ad alta pressione in grado di raggiungere pressioni operative di circa 680 atm. Alcuni sistemi sono muniti di una seconda pompa per l'eventuale aggiungere un modificatore polare.

Il fluido viene fatto fluire costantemente all'interno della cella, l'estrazione è generalmente condotta in celle d'acciaio, munite di filtri d'acciaio (*fritts*) rimovibili e guarnizioni a tenuta a entrambe le estremità. La camera termostata contenente la cella di estrazione può essere dotata di valvole multivia per gestire più celle contemporaneamente. La successiva unità di depressurizzazione è costituita da un capillare di restrizione che può essere in silice fusa, acciaio o materiale polimerico. In sequenza è posto un restrittore che ha la funzione di mantenere la pressione all'interno della cella al di sopra della P_c e controllare la velocità di flusso del fluido supercritico attraverso il campione. Il capillare può essere termostato per evitare ostruzioni al suo interno, causate da depositi di soluto.

Infine, una valvola posta tra la cella e il capillare permette di effettuare estrazioni sia in modalità statica, mantenendo il campione a contatto per un certo tempo con il fluido senza far passare quest'ultimo attraverso il restrittore, sia in modalità dinamica, facendo fluire in continuo il fluido supercritico attraverso il campione e il sistema di depressurizzazione.

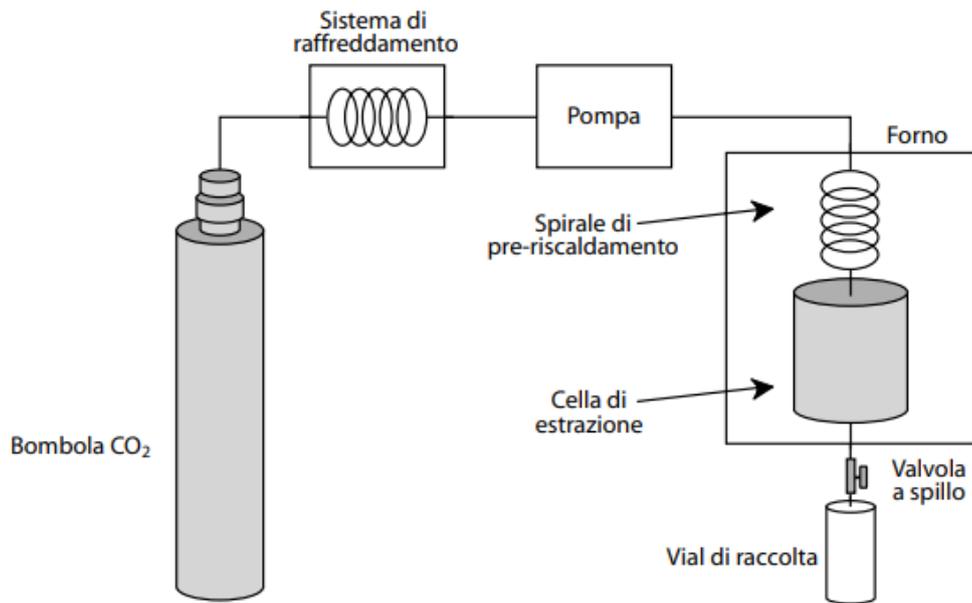


Fig. 3.2. Schema di un estrattore per SFE [1].

3.3.2 Pretrattamento della matrice da estrarre.

La matrice ideale per l'SFE è rappresentata da una polvere solida di elevata area superficiale e buona permeabilità (ad esempio tessuti vegetali essiccati e macinati). Quanto più piccole sono le particelle, tanto maggiore è l'area superficiale del campione esposta al fluido supercritico e di conseguenza è minore il percorso che l'analita deve compiere per diffondere in superficie. Tuttavia, particelle troppo piccole possono però favorire il ri-adsorbimento degli analiti sulla superficie delle particelle stesse, in tal caso è necessario aumentare la velocità di flusso del fluido supercritico.

Al fine di ottenere una buona estrazione è necessario riempire completamente la cella di estrazione dove viene inserito il campione al fine di rimuovere i volumi morti che influiscono negativamente sull'efficienza di resa dell'estrazione.

Per quanto riguarda le matrici liquide, generalmente, non sono analizzate come tali ma vengono fatte adsorbire su un supporto poroso solido o su una polvere, mentre i campioni che presentano un elevato contenuto di acqua contenuto di acqua devono essere disidratati prima dell'estrazione. L'acqua presente nel campione da estrarre in piccole concentrazioni potrebbe migliorare l'estrazione perché agisce come modificante polare, viceversa quantità eccessive potrebbero impedire il contatto

dell'analita con il fluido supercritico, influenzando negativamente il processo di estrazione [5].

3.3.3 Ottimizzazione dell'estrazione

Il punto di forza dei fluidi supercritici è rappresentato dalla possibilità di modularne la densità (e quindi la capacità estraente e la selettività) mediante piccole variazioni di temperatura e pressione nell'intorno del punto critico.

Nell'ottimizzazione del processo di estrazione, i parametri più importanti sono rappresentati dalla pressione e dalla temperatura.

Un aumento della pressione, a temperatura costante influenza positivamente la solubilità dell'analita, e quindi l'efficienza dell'estrazione, in quanto aumenta la densità del fluido e di conseguenza la forza del solvente. Tuttavia, quando si trattano matrici complesse è sconveniente aumentare la pressione, e quindi la densità, poiché densità troppo elevate portano generalmente a selettività più basse [1].

Generalmente, per le estrazioni selettive si utilizza un valore di pressione che rientra nel campo di pressione di frazionamento per ottenere una maggiore selettività, mentre quando si tratta di processi di estrazione non selettivi, si utilizza il valore di pressione della massima solubilità, perché superando questo valore, non si ottiene alcun vantaggio estrattivo per l'analita considerato [6].

L'ottimizzazione della temperatura dipende dal tipo di analita da estrarre e dalla densità del fluido. Diversamente dalla pressione, l'aumento della temperatura non sempre determina un aumento delle rese estrattive, poiché provoca una diminuzione della densità del fluido supercritico che si traduce in una diminuzione del suo potere solvente e in una maggiore mobilità delle molecole che tendono a trasferirsi più facilmente dalla matrice al fluido supercritico. Ciò avviene principalmente per le molecole volatili, perché la loro mobilità aumenta [5].

Dunque, se la pressione è troppo bassa o la temperatura troppo alta, il potere solvente del fluido supercritico sarà molto basso, si comporterà più come un gas che come un liquido e la resa di estrazione sarà bassa. Di conseguenza, il parametro principale da ottimizzare è la pressione, a cui è strettamente collegata la densità del fluido, mentre la temperatura può essere considerato un parametro secondario da ottimizzare.

Oltre alle interazioni analita-fluido supercritico, occorre tener conto anche delle interazioni analita-matrice. Come già accenato, essendo di natura apolare, la CO₂ non riesce a estrarre adeguatamente gli analiti in grado di creare interazioni polari con la matrice; per l'SFE ciò rappresenta un limite che è possibile superare attraverso l'impiego di modificanti polari che possono essere aggiunti direttamente nella cella di estrazione, oppure progressivamente mediante apposite pompe (pompe di *make-up*). Tra i modificanti organici più utilizzati vi sono il metanolo e l'acetonitrile, puri o miscelati con acqua. Il punto di partenza per la scelta del modificante è orientarsi verso un composto che allo stato liquido mostri di essere un buon solvente per l'analita di interesse. L'effetto dei modificanti può anche essere correlato a un rigonfiamento della matrice (come se fossero dei veri e propri agenti imbibenti), che favorisce il successivo distacco dell'analita grazie alla maggiore penetrazione del solvente.

Una valida strategia è quella di utilizzare due modificanti in combinazione, ad esempio metanolo/acqua, così facendo si ottiene un effetto sinergico, l'acqua contribuisce a rigonfiare la matrice, il metanolo solubilizza le molecole dell'analita.

Tuttavia è importante sottolineare che l'aggiunta di elevate concentrazioni di modificanti organici potrebbero diminuire la selettività, con conseguente aumento di soluti co-estratti.

Infine, un altro parametro da considerare durante il processo di ottimizzazione dell'estrazione è il flusso. Quest'ultimo dipende da quattro diversi fattori: interazioni matrice-soluto, solubilità dell'analita, trasferimento di massa e dispersione longitudinale. Se il soluto non interagisce con la matrice, la diffusione dell'analita nel fluido supercritico dipende principalmente dal suo grado di solubilità.

La velocità di flusso, influenza fortemente l'efficienza di estrazione, infatti a flussi elevati si ottiene una resa maggiore perché è facilitato il trasferimento di massa dell'analita dalla matrice al fluido, evitando così il fenomeno di saturazione [5].

Ad esempio, l'uso di flussi troppo bassi della CO₂ provoca la dispersione longitudinale dell'analita con conseguente diminuzione della resa di estrazione. Si potrebbe ovviare a questo problema utilizzando contenitori di estrazione di piccole dimensioni e tubi stretti di collegamento, anche se queste caratteristiche dipendono dalle dimensioni del sistema utilizzato [7].

In conclusione è possibile affermare che la durata dell'estrazione dipende dall'ottimizzazione dei parametri precedentemente descritti (pressione, temperatura, quantità e tipo di modificatore, flusso e velocità di flusso), dalla natura della matrice in esame e dal pretrattamento effettuato (essiccazione, liofilizzazione, macinazione, trattamento con ripieno e disidratazione) [8].

3.4 Modalità estrattive in SFE

In SFE l'estrazione avviene generalmente in due fasi, una statica e una dinamica, e ognuna di esse avviene a flussi diversi e in tempi differenti.

Nella fase statica, il fluido supercritico e la matrice rimangono in contatto per un determinato lasso di tempo, il fluido penetra all'interno della matrice inducendo un iniziale rilascio di analiti dal campione. Questa prima fase è molto importante perché serve al fine di ottimizzare il contatto tra fluido supercritico e il campione, migliorando così l'efficienza della successiva estrazione dinamica.

Nella fase dinamica il fluido supercritico scorre costantemente attraverso il campione realizzando l'effettivo processo di estrazione dal momento che gli analiti si propagano verso la superficie della matrice e vengono solubilizzati nel fluido che li trasporta verso la colonna cromatografica (Figura 3.3).

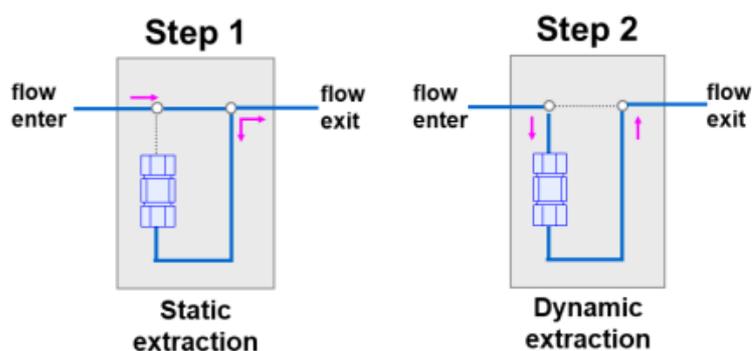


Fig. 3.3 Rappresentazione schematica delle fasi di estrazione. Fase 1 estrazione statica, fase 2 estrazione dinamica.

Durante la prima fase, non è necessario l'uso di flussi elevati, mentre è importante tener conto del tempo minimo richiesto al fine di ottenere il rigonfiamento della matrice che comporta un iniziale processo di desorbimento dell'analita.

Nella seconda e ultima fase, invece, è importante l'uso di flussi maggiori e il tempo di estrazione ottimale si ottiene quando la resa estrattiva non varia aumentando il tempo di estrazione.

3.5 Sistemi On-line

L' SFE può essere accoppiata on-line alla gascromatografia (GC), alla cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e alla cromatografia con fluidi supercritici (SFC). L'accoppiamento con quest'ultimo risulta il più compatibile e pertanto richiede l'uso di interfacce più semplici. L'interfaccia in un sistema cromatografico deve essere in grado di trattenere quantitativamente gli analiti e trasferirli in banda stretta in un sistema cromatografico. Ciò è possibile ottenerlo, intrappolando gli analiti su una superficie adsorbente raffreddata criogenicamente, e successivamente desorbendo gli analiti dalla trappola per trasferirli alla colonna cromatografica.

L'interfaccia può essere un piccolo pezzo di capillare in silice fusa (rivestito o meno di fase stazionaria) o una piccola colonna riempita con materiale inerte o adsorbente. Nei sistemi on-line la focalizzazione dell'analita può essere realizzata direttamente in testa alla colonna analitica (in SFC o HPLC) o nell'iniettore GC.

Nell'accoppiamento con una colonna capillare per SFC, l'interfaccia più utilizzata al fine di intrappolare gli analiti durante l'estrazione è rappresentata da un capillare non rivestito in silice fusa (circa 10 cm × 0,2 mm) raffreddato criogenicamente, direttamente connesso all'uscita del restrittore. Un'alternativa al capillare non rivestito è rappresentata da un capillare rivestito con fase stazionaria chimicamente legata, che permette di trattenere più efficacemente alcuni analiti. In questo caso l'effetto di autoraffreddamento determinato dall'espansione della CO₂ supercritica è sufficiente per ottenere recuperi quantitativi di analiti non volatili [9].

Nell'accoppiamento SFE-SFC con colonne impaccate invece l'intrappolamento degli analiti può essere realizzato in una piccola colonna separata o direttamente in testa alla colonna analitica. Il desorbimento dell'analita viene normalmente raggiunto

aumentando la temperatura della trappola (200 °C) o la percentuale di modificante nella fase mobile.

Le tecniche on-line, rispetto alle tecniche off-line, permettono di avere maggiore sensibilità, poiché viene trasferita alla colonna cromatografica l'intera frazione estratta dal campione. Inoltre, è richiesto un minor pretrattamento del campione e si riducono i tempi di analisi. L'unico svantaggio è rappresentato dal rischio di sovraccaricare la trappola nel caso di elevati contenuti di materiale co-estratto (grassi), di acqua o di elevate percentuali di modificante.

3.6 Applicazioni

La tecnica di estrazione con fluidi supercritici trova largo impiego in diversi settori delle industrie alimentare (estrazione di aromi, contaminanti, decaffeinizzazione del caffè ecc.), farmaceutica, tessile e del colore, nell'estrazione di additivi da polimeri e nel trattamento di biopolimeri.

La possibilità di modificare la densità del fluido supercritico (e quindi la sua forza solvente e la sua selettività), agendo semplicemente sulle condizioni di pressione e temperatura, permette di utilizzare un solo fluido per diverse applicazioni. L'SFE è particolarmente adatta all'estrazione di sostanze termolabili.

Negli ultimi anni, a livello industriale è diventata una delle tecniche elettive per trattare materie prime di interesse alimentare. Il vantaggio principale è che dopo l'estrazione, l'alimento trattato non incorpora alcun residuo di solvente, a differenza delle tecniche di estrazioni tradizionali con solventi organici, infatti, una volta riportata a temperatura e pressione ambiente la CO₂ evapora senza lasciare tracce. Per tale motivo, il processo di estrazione con fluidi supercritici è stato riconosciuto come processo sicuro (GRAS, *generally recognized as safe*) dalla *Food and Drug Administration*.

Oltre che a livello industriale, la SFE si è imposta come tecnica di preparazione del campione in molti laboratori, soprattutto nel settore analitico. Numerosi studi comparativi hanno dimostrato che l'affidabilità del metodo SFE è paragonabile a quella dei metodi "classici", riducendo inoltre i tempi di estrazione, soprattutto se si tiene conto che con i metodi classici ai tempi di estrazione devono essere sommati quelli per l'eliminazione del solvente, presente in quantità più elevate rispetto a quanto avviene impiegando fluidi supercritici [5,10,11].

L' SFE è inoltre, ampiamente utilizzata per l'estrazione e il dosaggio di diversi contaminanti presenti in tracce negli alimenti. In questo caso uno dei problemi maggiori è rappresentato dalle impurezze sempre presenti nei solventi di estrazione, ciò risulta particolarmente evidente quando sono coinvolti elevati volumi di solvente, che vengono poi concentrati prima della determinazione analitica finale.

Una delle applicazioni più importanti è l'analisi dei pesticidi in diverse matrici alimentari, questo tipo di applicazione sarà discussa più in dettaglio nel prossimo capitolo.

Riferimenti bibliografici

- [1] Moret S., Purcaro G., Conte L. S. (2014). *Il campione per l'analisi chimica*. Publisher Springer-Verlag Mailand.
- [2]. Clifford A. A, Williams J. R. (2000). *Introduction to Supercritical Fluids and Their Applications*. Publisher Humana Press.
- [3] Reverchon E., et al., De Marco, I., (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *Journal of Supercritical Fluids*. 38 146–166.
- [4] National Institute of Standards and Technology. (2008). "Phase change data for Carbon dioxide". Retrieved, 01, 21.
- [5] Pourmortazavi SM, Hajimirsadeghi S.S. (2007) Supercritical fluid extraction in plant essentials and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, 1163(1-2): 2-24.
- [6] Vági E., Simándi B., Vàsarhelyiné K. P., Daood H., Kéry A., Doleschall F., Nagy B. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products. *The Journal of Supercritical Fluids*, 40, 218.
- [7] Döker O., Salgin U., Yildiz N., Aydogmus M., Çalimli A. (2010) Extraction of sesame seed oil using supercritical CO₂ and mathematical modeling. *Journal of Food Engineering*, 97, 360.
- [8] Huanga Z., Shib X., Jiang W. (2012). Theoretical models for supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1250, 2.
- [9] Xie QL., Markides KE., Lee ML. (1989). Supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography with fraction collection for sensitive analytes. *Journal of Chromatographic Science*, 27(7): 365-370.

[10] Turner C., Sparr Eskilsson C., Björklund E. (2002). Collection in analytical-scale supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 947: 1-22

[11] Sun M., Temelli F. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 37: 397-408.

Capitolo 4. Determinazione di pesticidi chirali nei semi di canapa mediante un sistema on-line di estrazione e separazione cromatografica a fluidi supercritici.

4.1 Introduzione

I pesticidi sono sostanze tossiche, utilizzate principalmente in agricoltura al fine di distruggere insetti, parassiti, piante infestanti o altro che possa danneggiare le coltivazioni. In generale, i pesticidi presentano ampie differenze sia nella struttura molecolare che nelle caratteristiche chimiche, circa il 25% di quelli presenti in commercio, sono caratterizzati da uno o più centri chirali, quindi è possibile distinguere due o più forme enantiomeriche [1]. È noto che gli enantiomeri di una molecola chirale possono avere attività diverse e talvolta differente tossicità, anche la loro degradazione nell'ambiente può essere enantiospecifica. Ad esempio metalaxyl [methyl-N- (2 methoxyacetyl)-N (2,6-xylyl)-dlalaninate] and benalaxyl [methyl-N-phenylacetyl-N 2,6-xylyl alaninate] sono due fungicidi chirali, per entrambi, l'enantiomero R mostra un'attività molto più elevata e una degradazione più rapida nell'ambiente rispetto all'enantiomero S [2].

Sulla base di tali considerazioni, e tenendo conto dunque che gli enantiomeri dei pesticidi possono avere intensità d'azione completamente diversa [3] risulta necessario lo sviluppo di metodi analitici altamente sensibili e selettivi al fine di determinare la presenza dei singoli enantiomeri dei pesticidi chirali.

Secondo i dati presenti in letteratura la cromatografia liquida e la cromatografia a fluido supercritico sono le tecniche di elezione per questo tipo di analisi, in particolare se accoppiate alla spettrometria di massa [4].

La canapa (*Cannabis Sativa L.*) è una pianta erbacea appartenente alla famiglia delle *Cannabaceae*, come tutti i prodotti coltivati potrebbe potenzialmente contenere pesticidi e di conseguenza anche i suoi derivati. Negli ultimi anni è stata osservata un'enorme tendenza verso la produzione e la vendita di prodotti alimentari a base di canapa. In particolare i suoi semi sono considerati degli alimenti "funzionali" in quanto contengono tutti gli aminoacidi essenziali e sono caratterizzati dalla presenza di un elevato contenuto di vitamine, sali minerali e acidi grassi insaturi, quali ad esempio omega 6 e omega 3 [5-7].

Come riportato dall'Organizzazione delle Nazioni unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) la produzione mondiale di semi di canapa ha raggiunto le 76.730 tonnellate con la Cina come maggior produttore, seguita dalla Federazione Russa dal Cile e l'Ucraina [8].

Tuttavia l'opinione pubblica mantiene delle riserve sull'uso della *Cannabis* come ingrediente alimentare perché viene considerata principalmente un prodotto stupefacente, ma i cannabinoidi responsabili dell'effetto psicotropo, vengono sintetizzati, raccolti e immagati nelle infiorescenze della canapa, e di conseguenza sono assenti nei semi [9].

Parte del mio progetto di ricerca è stato dedicato sullo sviluppo di un metodo analitico, a basso impatto ambientale per la determinazione dei pesticidi chirali presenti nei semi di canapa mediante estrazione e successiva enantioseparazione con fluidi supercritici.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Standard e solventi

Per lo sviluppo della nuova metodica SFE-SFC-QqQMS sono stati acquistati tre pesticidi, metalaxil, benalaxyl e dimethenamid (Figura 4.1), sotto forma di miscele racemiche e come singoli enantiomeri, R-benalaxyl (Benalaxyl-M), S-dimethenamid (Dimethenamid-P) e R-metalaxyl (Metalaxyl-M) da Merck Life Science (Merck KGaA, Darmstadt, Germania).

Al fine di ottimizzare il nuovo metodo analitico, sono state preparate le soluzioni madri in metanolo di ciascun standard di pesticida alla concentrazione di 1 mg mL^{-1} , ogni soluzione madre è stata opportunamente conservata in delle *vials* scure a -20°C .

Il metanolo (MeOH) utilizzato per preparare le soluzioni madri e come co-solvente per la pompa di *make-up* è stato acquistato da Merck Life Science.

Successivamente sono state costruite le rette di calibrazione, aggiungendo ai campioni di semi di canapa concentrazioni note di pesticidi: 0,25, 0,50, 1, 5, 10, 25 e $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, tutte le concentrazioni utilizzate fanno riferimento ai valori dei livelli massimi dei residui di pesticidi (*Maximus Residue Limits MRL*) riportati nel Database dell'Unione Europea [10].

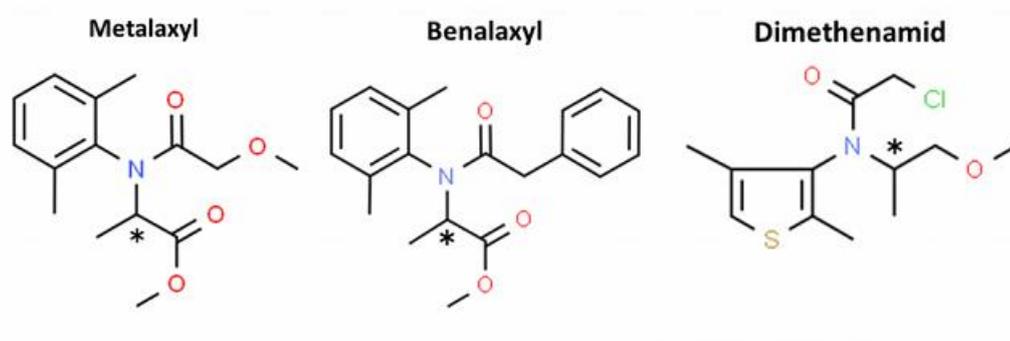


Figura 4.1 Strutture del metalaxil, benalaxyl e dimethenamid, con i centri chirali evidenziati.

4.2.2 Campioni e preparazione del campione

I campioni di semi di canapa oggetto di studio erano nove ed appartenevano a quattro diverse varietà di *Cannabis Sativa L.*, Tizsa, Carmagnola, Futura 75 (5 campioni) e Felina 32 (2 campioni).

I semi di canapa Tizsa e Carmagnola sono stati acquistati in un mercato locale, mentre le varietà Futura 75 (5 campioni) e Felina 32 (2 campioni) sono state fornite dal gruppo Canapar (Ragusa, Italia). Tutte e quattro le varietà sono presenti nella Banca Dati fornita dall'Unione Europea [11] e sono certificate per contenere meno dello 0,2% di delta-9-tetraidrocannabinolo, o semplicemente THC, (per peso secco delle foglie e parti fiorite della pianta), secondo il regolamento UE 1307/2013.

Futura 75 e Felina 32 sono le due varietà che provengono dalla Francia, mentre le Tizsa Carmagnola provengono rispettivamente dall'Ungheria e dall'Italia. La varietà Carmagnola è disponibile sul mercato dal 30 giugno, 2021.

Tutti i campioni di semi di canapa sono stati posti all'interno di un mortaio e sono stati macinati fino a ottenere una polvere omogenea prima dell'analisi SFE-SFC-QqQMS.

4.2.3 Strumentazione

Le analisi SFE-SFC-MS sono state effettuate su un sistema Shimadzu Nexera-UC (Shimadzu, Kyoto, Giappone), composto da un controller CBM-20A, un modulo SFE-30A per l'estrazione con fluidi supercritici, due pompe a flusso parallelo a doppio pistone LC-20ADXR, una pompa CO₂ LC-30ADSF, due regolatori di contropressione SFC-30A, un degaser DGU, un forno CTO-20AC dove alloggia la colonna cromatografica, un autocampionatore SIL-30AC, uno spettrometro di massa LCMS-8050 dotato di una sorgente di ionizzazione chimica a pressione atmosferica (ESI).

4.3 Analisi SFE-SFC-QqQMS

4.3.1 Ottimizzazione dell'estrazione

Al fine di ottenere la massima resa di estrazione per tutti i pesticidi chirali, sono stati valutati e studiati diversi parametri, le loro combinazioni sono riportate nella Tabella 4.1. Sono stati pesati trentacinque mg di ciascun campione in un recipiente da 200 μL e i valori di estrazione sono stati calcolati al livello di $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

L'estrazione di ciascun campione è stata effettuata a 40 °C, utilizzando CO₂ e MeOH come co-solvente, ad un flusso di $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ con il regolatore di contropressione (BPR) impostato a 100 bar. Il processo di estrazione statica min è stato eseguito nelle seguenti condizioni: 0-1 min 50% MeOH, 1,1 min 0% MeOH, 1,1-3 min 0% MeOH. Successivamente è stato effettuato un processo di estrazione dinamica con 0% di MeOH per 2 min. Ogni campione è stato analizzato per tre volte consecutivamente. Inoltre per evitare il fenomeno di *carry over*, ricorrente nei sistemi di estrazione, tutto il sistema è stato lavato per 5 minuti utilizzando il 100% di MeOH ad un flusso di $1,8 \text{ mL min}^{-1}$, poi è stato condizionato per 4 minuti utilizzando le condizioni iniziali.

Tabella 4.1 Variabili SFE utilizzate durante l'ottimizzazione di otto metodi diversi
(Valori % sono relativi al solvente B)

	Met_1	Met_2	Met_3	Met_4	Met_5	Met_6	Met_7	Met_8
Estr. statica step 1	3 min 0%	3 min 0%	1 min 50%	1 min 100%	1 min 50%	1 min 100%	1 min 100%	1 min 50%
Estr. statica step 2			2 min 0%	2 min 0%	2 min 0%	2 min 0%	2 min 0%	2 min 0%
Estr. dinamica	2 min 0%	2 min 0%	2 min 0%	2 min 0%	2 min 0%	2 min 0%	2 min 0%	2 min 0%
Quantità campione	100 mg	70 mg	70 mg	70 mg	100 mg	100 mg	35 mg	35 mg
Temperatura	50 °C	40 °C	40 °C	40 °C	50 °C	40 °C	50 °C	40 °C

4.3.2 Ottimizzazione separazione cromatografica

Per la separazione enantiomerica dei pesticidi chirali sono state testate due diverse colonne cromatografiche: una ChromegaChiral™ 250 mm × 4.6 mm ID × 10 µm d.p., con una fase stazionaria chirale composta da polisaccaride tris-(3,5-dimethylphenyl) carbamoyl amylose, e una colonna Astec cellulose-DMP 250 mm × 4.6 mm ID × 5 µm d.p, con una fase stazionaria chirale composta da silice porosa rivestita di DMPC (3,5-dimethylphenyl carbamate). Risultati più soddisfacenti sono stati ottenuti utilizzando la colonna polissacaridica.

La fase mobile era composta dalla CO₂ supercritica e dal MeOH (97:3 v/v) utilizzati in modalità isocratica, la velocità di flusso era di 1,8 mL min⁻¹, mentre la temperatura e il BPR sono stati impostati rispettivamente a 30 °C e 100 bar, il solvente utilizzato nella pompa di *make-up* era il MeOH alla velocità di flusso di 0,2 mL min⁻¹ (Tabella 4.2)

Sono stati applicati i seguenti parametri ESI: Temperatura dell'interfaccia 300 °C; Temperatura della DL 250 °C, Temperatura del Blocco Termico 200 °C; Flusso del gas di essiccazione (N₂) 10 mL min⁻¹; Flusso del gas di nebulizzazione: 1,5 (N₂) 1,5 mL min⁻¹. Per l'identificazione e la quantificazione è stata utilizzata la modalità di acquisizione Multiple reaction monitoring (MRM), con un tempo di evento di 0,05 s.

Tabella 4.2. Variabili SFC utilizzate durante l'ottimizzazione del metodo di separazione cromatografica (valori % sono relativi al solvente B)

Colonne cromatografiche	Cellulosic 250 mm, 4.6 mm, 5 μm <i>d.p.</i> Polysaccharide 250 mm, 4.6 mm, 10 μm <i>d.p.</i>
Fase mobile	CO ₂ , Metanolo
Flusso (mL min ⁻¹)	1,0 – 1,5 – 1,8 – 2,0
Modalità di separazione	Isocratic: 1%, 3%, 5%, 7% B
Flusso pompa di <i>make-up</i> (mL min ⁻¹)	Methanol: 0,1 – 0,2 – 0,5
Temperatura del forno (°C)	30, 40, 50
Pressione BPR (bar)	100 – 150 - 200
Temperatura BPR (°C)	50
Modalità di acquisizione MS (ESI)	SCAN (+)/(-); MRM (+)

4.1 Risultati e discussioni

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di sviluppare un nuovo metodo on-line SFE-SFC-QqQMS per l'identificazione e la quantificazione dei pesticidi chirali presenti nei semi di canapa. A tal proposito, sono stati selezionati nove campioni di semi di canapa, al fine di determinare il contenuto di metalaxyl, benalaxyl e dimethenamid presente. Questi tre pesticidi chirali, sono ampiamente utilizzati nell'Unione Europea e appartengono al gruppo dei 500 pesticidi consentiti dalla legge per il trattamento delle semi di canapa [10].

Metalaxyl, benalaxyl e dimethenamid sono tra i pochi standard disponibili in commerciali, sia come enantiomeri puri che come miscela racemica.

Al fine di sviluppare il nuovo metodo analitico, inizialmente sono stati ottimizzati i parametri SFC, testando due diverse fasi stazionarie chirali, diversi rapporti di CO₂ e MeOH, vari valori di flusso e differenti valori di temperatura, come riportato nella tabella 4.2.

Una volta definite le migliori condizioni SFC, sono state analizzate le soluzioni standard di R-benalaxyl, S-dimethenamid e R-metalaxyl per assegnare l'identità di ogni singolo enantiomero. Come è possibile osservare nella figura 4.2 A, sia per il benalaxyl che per il metalaxil l'S-enantiomero S è il primo ad eluire; viceversa, per il dimethenamid, l'R-enantiomero è il primo eluente. Successivamente, mediante analisi SFC-Qqq MS sono state analizzate le miscele racemiche, confermando il rapporto 50:50 dei singoli enantiomeri in tutte e tre le miscele in esame.

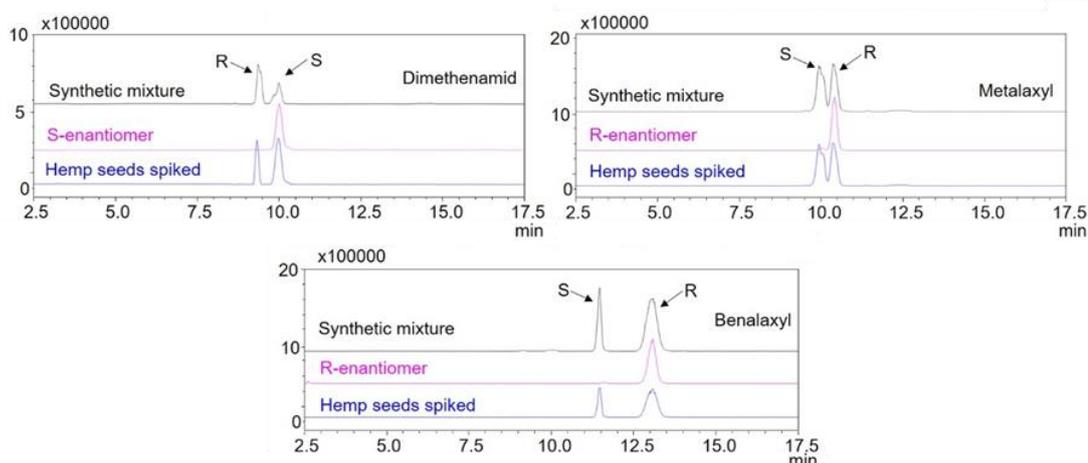


Figura 4.2 Cromatogrammi enantioselettivi del dimethenamid, metalaxyl e benalaxyl rispettivamente, miscela standard sintetiche (superiore), enantiomeri singoli (medio), e semi di canapa (inferiore)

Inoltre, sono stati sviluppati otto diversi metodi di estrazione combinando differenti tempi di estrazione, quantità di campione, temperature e quantità di co-solvente. Le rese estrattive ottenute da ciascun metodo di estrazione sono riportate nella figura 4.3. In tutti i metodi, il tempo di estrazione statica era di 3 minuti mentre il passo dinamico era di 2 minuti. L'efficienza di estrazione è stata calcolata confrontando l'area dell'analisi SFC, con quella SFE-SFC, al livello di $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

La miglior resa estrattiva è stata ottenuta utilizzando 35 mg di campione, ad una temperatura di $40 \text{ }^\circ\text{C}$, con 3 min di estrazione statica utilizzando il 50% di metanolo, e successivamente 2 minuti di estrazione dinamica con 0% di metanolo.

L'impiego di una minor quantità di campione ha prodotto risultati migliori, ciò è probabilmente dovuto ad un maggior volume di solvente presente all'interno del vessel di estrazione. Considerando che il volume del vessel è di 200 μL , l'uso di 100 mg di campione lo riempie quasi completamente, al contrario, 35 mg permettono l'introduzione di circa 100 μL all'interno del vessel.

La quantità di campione è un parametro importante, tenendo conto del possibile sovraccarico del sistema, che è un problema comune durante lo sviluppo di un metodo SFE-SFC [12,13].

L'influenza della temperatura può essere considerata irrilevante dati i risultati ottenuti molto simili tra loro, mentre gioca un ruolo chiave la quantità di MeOH impiegata. L'uso del 100% di MeOH durante l'estrazione statica ha influenzato negativamente la forma del picco, creando inoltre deviazioni nei risultati delle rese estrazione, mentre l'uso del 50% di MeOH durante questa prima fase di estrazione ha permesso di ottenere una resa quantitativa compresa tra il 50% e il 60% dei tre pesticidi in esame. La scelta di utilizzare 0% MeOH durante la fase di estrazione dinamica con era strettamente legata alla necessità di focalizzare gli analiti in testa alla colonna chirale.

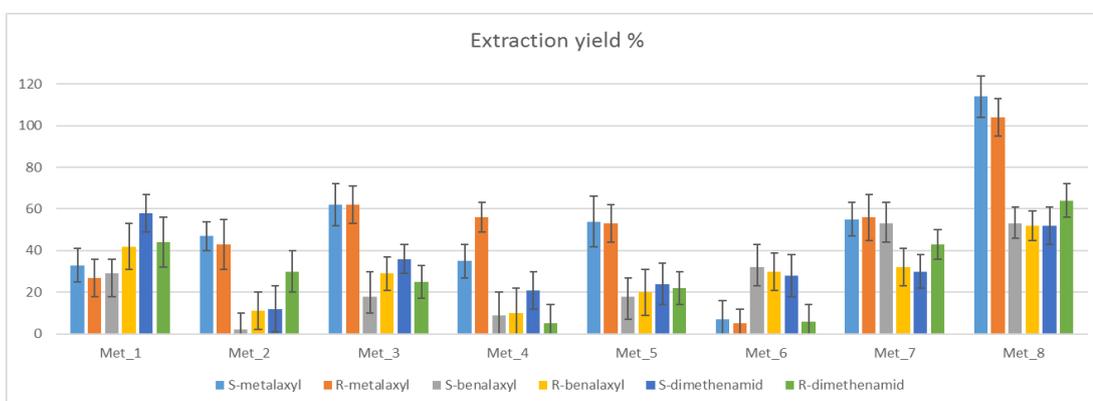


Figura 4.3 Confronto della *recovery* degli otto metodi di estrazione utilizzati.

Sono state costruite delle rette di calibrazione in matrice, aggiungendo una concentrazione nota (0,25, 0,50, 1, 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) di pesticidi in campioni di semi di canapa, e sono state effettuate cinque analisi consecutive per ciascun punto. Le concentrazioni utilizzate fanno riferimento ai livelli massimi di residui dei

pesticidi riportati nel Database dell'Unione Europea [10]. Sono stati ottenuti buoni coefficienti di regressione lineare (R^2) compresi tra 0,9856 e 0,9973; mentre i coefficienti di variazione erano compresi tra l'1 e il 3% (al livello di $10 \mu\text{g L}^{-1}$).

La linearità è stata calcolata utilizzando soluzioni in matrice per ciascun campione e valutata mediante il *Fitting test di Mandel* ($F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$) nell'intervallo compreso tra $0.25 - 50 \mu\text{g kg}^{-1}$ per tutti i composti ad eccezione del benalaxyl, la cui linearità è stata calcolata nell'intervallo tra $1.00 - 50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Per quanto riguarda le cifre di merito, sono stati ottenuti risultati soddisfacenti, i valori dei limiti di determinazione (LoD) erano compresi $0,04-0,41 \mu\text{g L}^{-1}$, mentre i valori dei limiti di quantificazione (LoQ) erano compresi nell'intervallo tra $0,12$ e $1,38 \mu\text{g L}^{-1}$. Per i due enantiomeri sono stati ottenuti valori leggermente differenti di LoD e LoQ, ciò è dovuto alla diversa interazione di ciascun enantiomero con la fase stazionaria, come è possibile osservare nella figura 4.2, quelli maggiormente ritenuti generano picchi cromatografici non ottimali.

I dati relativi alle figure di merito sono riportati nella Tabella 4.3.

Tabella 4.3 Limiti di rilevazione e quantificazione (espressi in $\mu\text{g L}^{-1}$), ripetibilità (espressa come CV%), equazioni di regressione e coefficiente di correlazione (R^2) valori per ogni pesticida chirale.

	S-Metalaxyl	R-Metalaxyl	S-Benalaxyl	R-Benalaxyl	S-Dimethenamid	R-Dimethenamid
LoD	0.04	0.04	0.41	0.35	0.03	0.04
LoQ	0.12	0.15	1.38	1.17	0.11	0.12
CV%	1	1	3	2	1	1
R^2	0.9953	0.9937	0.9926	0.9856	0.9890	0.9973

La quantificazione dei pesticidi presenti nei campioni in esame è stata effettuata utilizzando le curve di calibrazione costruite su matrice, le analisi quantitative sono state effettuate utilizzando l'approccio di estrazione multipla sullo stesso campione di semi di canapa.

Tutti i campioni di canapa sono stati estratti tre volte consecutivamente, la quarta analisi estrattiva non ha prodotto risultati significativi per nessun campione, la somma delle aree in ogni singola analisi è stato utilizzato per ottenere i dati quantitativi.

Utilizzando tale approccio, è possibile calcolare la resa di estrazione ed eseguire successivamente l'analisi quantitativa in una sola analisi.

Nella Tabella 4.4 sono riportati i risultati quantitativi dei pesticidi chirali determinati nei nove campioni di semi di canapa analizzati. Solo nel campione 3 è stata rilevata la presenza di pesticidi al di sopra del LoQ, con valori di 27,6 e 12,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ rispettivamente per R- e S-benlaxyl. Tuttavia considerando che la loro somma è pari a 40,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, tale valore è al di sotto del limite di residui di pesticida riportato nel Database dell'Unione Europea per il benlaxyl (50 $\mu\text{g L}^{-1}$), quindi questo campione può essere considerato sicuro per la salute umana. Il cromatogramma MRM del campione 3 è riportato nella figura 4.3.

Tutti gli altri campioni sono stati caratterizzati da una concentrazione di metalaxil, di benlaxyl dimethenamid e inferiore ai valori LoQ o LoD.

Dati i risultati quantitativi rilevati per ciascun campione, tutti i semi di canapa analizzati possono essere definiti sicuri sia per la salute dell'uomo che per l'ambiente.

Sample (Variety)	Origin	Metalaxyl		Benlaxyl		Dimethenamid	
		S	R	S	R	S	R
1 (Futura 75)	Caltagirone (Catania, Sicily)	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOD	≤ LOD
2 (Futura 75)	Licodia Eubea (Catania, Sicily)	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOD	≤ LOD
3 (Futura 75)	Ramacca (Catania, Sicily)	≤ LOQ	≤ LOQ	27.6 ± 0.4	12.8 ± 0.6	≤ LOD	≤ LOD
4 (Futura 75)	Mineo (Catania, Sicily)	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ
5 (Tizsa)	Pancalieri (Turin, Piedmont)	≤ LOD	≤ LOD	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOD	≤ LOD
6 (Felina 32)	Licodia Eubea (Catania, Sicily)	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOD	≤ LOD
7 (Felina 32)	Licodia Eubea (Catania, Sicily)	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOD	≤ LOD
8 (Carmagnola)	Pancalieri (Turin, Piedmont)	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOD	≤ LOD
9 (Futura 75)	Catania (Sicily)	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ	≤ LOQ
MRL		10 $\mu\text{g L}^{-1}$		50 $\mu\text{g L}^{-1}$		10 $\mu\text{g L}^{-1}$	

Tabella 4.4 Contenuto ($\mu\text{g L}^{-1}$ deviazione standard) di enantiomeri benlaxyl, metalaxil e dimethenamid nei campioni di semi di canapa analizzati.

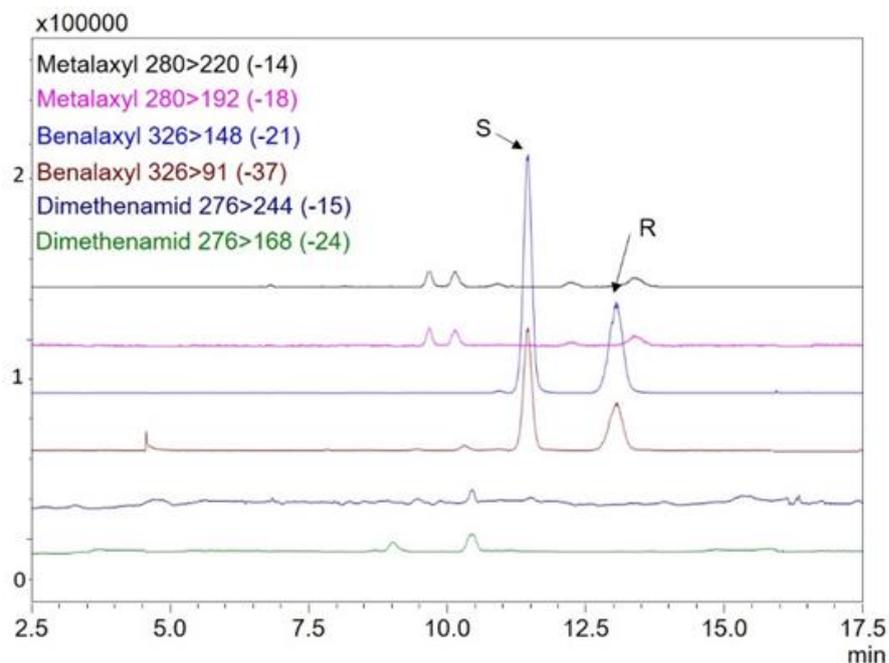


Figura 4.3 Cromatogramma MRM del campione 3.

5.1 Conclusioni

Il sistema SFE-SFC-QqQMS utilizzato si è rivelato uno strumento analitico potente per un eventuale screening rapido dei pesticidi chirali nei semi di canapa. La natura on-line del sistema oltre a ridurre il rischio di perdita e contaminazione dei campioni, aumenta al stesso tempo la precisione analitica.

Il tempo di ciascuna analisi, considerando sia l'estrazione che l'eluizione di tutti i composti è di 15 minuti, l'uso del triplo quadrupolo come spettrometro di massa ha consentito un'elevata specificità e valori di LoQ al di sotto dei valori di MRL riportati nel Database fornito dall'Unione Europea per i pesticidi chirali analizzati.

Riferimenti bibliografici

- [1] Garrison, A. W. (2006). Probing the enantioselectivity of chiral pesticides. *Environmental Science & Technology*, 40 (1), 16–23.
- [2] Pérez-Fernández V., García, M.A., & Marina, M. L. (2011). Chiral separation of metalaxyl and benalaxyl fungicides by electrokinetic chromatography and determination of enantiomeric impurities. *Journal of Chromatography A*, 1218(30), 4877–4885.
- [3] Wong, C. S. (2006). Environmental fate processes and biochemical transformations of chiral emerging organic pollutants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(3), 544–558.
- [4] Blascke Carrao D. B., Perovani I. S., de Albuquerque N. C. P., & de Oliveira, A. R. M. (2020). Enantioseparation of pesticides: A critical review. *Trends in Analytical Chemistry*, 122, 115719.
- [5] Yu L. L., Zhou K. K., & Parry J. (2005). Antioxidant properties of cold-pressed black caraway, carrot, cranberry, and hemp seed oils. *Food Chemistry*, 91(4), 723–729.
- [6] Frassinetti, S., Moccia, E., Caltavuturo, L., Gabriele, M., Longo, V., Bellani, L., Giorgetti, L. (2018). Nutraceutical potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds and sprouts. *Food Chemistry*, 262, 56–66.
- [7] Micalizzi, G., Vento, F., Alibrando, F., Donnarumma, D., Dugo, P., & Mondello, L. (2021). *Cannabis Sativa L.*: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. *Journal of Chromatography A*, 1637, 461864. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461864-
- [8] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/data/QC> (accessed on 22 February 2021).

- [9] Onofri, C., de Meijer, E. P. M., & Mandolino, G. (2015). Sequence heterogeneity of cannabidiolic- and tetrahydrocannabinolic acid-synthase in *Cannabis sativa* L. and its relationship with chemical phenotype. *Phytochemistry*, 116, 57–68.
- [10] Commission, E. (2008). No, Regulation 149/2008 of 29 January 2008 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council by establishing Annexes II, III and IV setting maximum residue levels for products covered by Annex I thereto. *OJ L*, 58 (1.3).
- [11] European Commission EU Plant Variety Database (v.3.2). Available online:https://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_databases/search/public/index.cfm?event=SearchVariety&ctl_type=A&species_id=240&variety_name=&listed_in=0&show_current=on&show_deleted= (accessed on 22 February 2021).
- [12] Liang, Y., Liu, J., Zhong, Q., Shen, L., Yao, J., Huang, T., & Zhou, Ting (2018). Determination of major aromatic constituents in vanilla using an on-line supercritical fluid extraction coupled with supercritical fluid chromatography. *Journal of Separation Science*, 41(7), 1600–1609.
- [13] Matsubara, A., Harada, K., Hirata, K., Fukusaki, E., & Bamba, T. (2012). High-accuracy analysis system for the redox status of coenzyme Q10 by online supercritical fluid extraction–supercritical fluid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1250, 76–79.

Capitolo 5. Cromatografia a fluidi supercritici accoppiata alla spettrometria di massa per la determinazione dei composti eterociclici ossigenati presenti negli oli essenziali agli agrumi e nei profumi aromatizzati agli agrumi

5.1 Introduzione

I composti eterociclici ossigenati (CEO) sono metaboliti secondari presenti principalmente nella frazione non volatile degli oli essenziali di agrumi spremuti a freddo [1]. Questi composti giocano un ruolo fondamentale nella caratterizzazione degli oli essenziali, infatti la composizione sia qualitativa che quantitativa della frazione non volatile è caratteristica di ciascun olio [2].

Sotto la denominazione di CEO sono incluse le cumarine (C), furocumarine (FC) e polimetossiflavoni (PMF). Questi composti possiedono numerose proprietà benefiche per la salute umana [3,4], tuttavia, è ormai noto che l'ingestione di elevate quantità di cumarine o l'interazione delle furocumarine con i raggi UVA potrebbe essere tossica per la salute umana [5,6]. A causa della loro fototossicità, i livelli di furocumarine sono costantemente monitorati da opinioni e regolamenti emessi dall'Associazione internazionale delle fragranze (IFRA) e dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare. Riguardo ai cosmetici, il Parlamento Europeo (CE) 1223/2009, include le furocumarine nell'elenco delle sostanze vietate, ad eccezione di quelle presenti nelle essenze naturali utilizzate. Invece nei prodotti abbronzanti e nelle protezioni solari, le furocumarine devono essere inferiori a 1 mg L^{-1} (EC 1223/2009) [7,8].

Nel 2020 l'IFRA, riconoscendo la dermatite allergica da contatto causata dalla cumarina ha limitato l'uso della stessa nei prodotti cosmetici finiti.

La cumarina è ampiamente utilizzata per fissare l'aroma nei cosmetici, secondo quanto riportato nell'emendamento 49, il suo contenuto nei prodotti senza risciacquo non deve superare lo 0,0024% nelle formulazioni in creme per bambini, rientrare nel *range* compreso tra 0,035 a 0,38% per le creme e lozioni usati dagli adulti, ed essere inferiore all' 1,5% nelle fragranze [9].

Per questi motivi, lo studio dei composti eterociclici ossigenati è diventato di grande interesse principalmente per il settore cosmetico ma anche per quello alimentare e farmaceutico. Le tecniche analitiche principalmente utilizzate per l'analisi di questi composti prevedono l'impiego della cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata alla spettrometria di massa [10]. L'utilizzo di questo tipo di rivelatore permette di avere informazioni sulla struttura delle molecole e sul loro peso molecolare, ciò è molto utile per confermare l'identificazione di composti noti e determinare composti incogniti.

Un approccio analitico innovativo è rappresentata dalla cromatografia a fluidi supercritici (SFC). Quest'ultima rappresenta una valida alternativa alla tradizionale cromatografia liquida e offre il vantaggio di ridurre il consumo di solventi organici con conseguente riduzione dell'impatto ambientale [11].

Parte del mio progetto di ricerca è stato dedicato allo sviluppo di un metodo analitico rapido e a basso impatto ambientale, utilizzando l'SFC accoppiata a un rivelatore di massa a triplo quadrupolo al fine di determinare ventotto CEO presenti in tredici campioni di oli essenziali spremuti a freddo e in trenta profumi commerciali aromatizzati agli agrumi.

Il nuovo metodo è stato ottimizzato partendo dallo screening di diverse colonne cromatografiche, al fine di ottenere una buona separazione alla linea di base di tutti i 28 CEO in esame. L'acquisizione MRM ha garantito un'elevata selettività per la corretta valutazione quali-quantitativa di ciascun profilo cromatografico. Inoltre è stato applicato il *Green Analytical Procedure Index* (GAPI), un nuovo strumento utile a valutare il carattere *green* di un'intera metodologia analitica, dalla raccolta del campione fino alla determinazione finale.

5.2 Materiali e campioni

5.2.1 Standard e solventi

Al fine di ottimizzare il nuovo metodo analitico sono stati acquistati gli standard di 9 cumarine, 15 furocumarine e 4 polimetossiflavoni.

In particolare, gli standard di Biacangelicolo, Psoralene, 8-geranilossipsoralene, Bergaptene, Cnidilina, Fellopterina ed Epossiauraptene sono stati acquistati da Herboreal Ltd. (Herboreal Ltd., Edimburgo); mentre Auraptene, Citroptene, Bergamottina, Cnidicina, Cumarina, Epossibergamottina, Isoimperatorina, Isopimpinellina, Ossipedeucianina, Ossipedeucianina idrata, Nobiletina, Erniarina, Isomeranzina, Meranzina, Meranzina idrata, 5-geranilossi-7-metossicumarina, Nobiletina, Sinensetina, Tangeretina, Tetra-O-metilscutellareina, 5-O-demetilnobiletinae 8-metossipsoralen sono stati acquistati da Merck Life Science (Merck Life Science, Germania), così come anche il metanolo (MeOH) e la CO₂

utilizzati per la fase mobile e l'etanolo utilizzato per preparare le soluzioni madri e diluire gli oli essenziali e i profumi prima dell'analisi.

Sono stati analizzati tredici campioni di oli essenziali di agrumi: due di limone (uno ottenuto a gennaio 2021 e uno a febbraio 2021) due di bergamotto (provenienti da due fornitori diversi), tre mandarini (rosso, verde e giallo) uno di arancia dolce, lime clementine, arancia amara, pompelmo e tacle.

Tutti i campioni sono stati forniti dall'azienda "Simone Gatto srl" (San Perniceto, Messina) tranne un campione di bergamotto acquistato in un negozio locale.

Successivamente sono stati analizzati trenta profumi commerciali aromatizzati agli agrumi (maschili e femminili), elencati nella tabella 5.1 Tutti i trenta campioni sono stati acquistati in un negozio locale.

Tabella 5.1 Elenco dei trenta profumi (maschili e femminili) aromatizzati agli agrumi analizzati

N°	Genere	Descrizione note di testo
1	Femminile	Ribes, bergamotto, vaniglia, mandarino
2	Femminile	Limone, mandarino, melograno
3	Femminile	Bergamotto, muschio, iris
4	Maschile	Cannella, sandalo, ginepro
5	Femminile	Jasmine, vaniglia, pompelmo
6	Maschile	Prugna, mela, bergamotto
7	Maschile	Bergamotto, salvia, pepe rosa
8	Maschile	Iris, cardamomo, lavanda, vaniglia
9	Femminile	Bergamotto, pompelmo, ananas
10	Femminile	Jasmine, gardenia, vaglia
11	Femminile	Pompelmo, iris, gelsomino
12	Femminile	Rosa bianca, muschi, pompelmo
13	Maschile	Mandarino bergamotto, limone
14	Maschile	Alloro, patchouli, ambra
15	Maschile	Limone, bergamotto, ananas
16	Femminile	Muschio, patchouli, ambra
17	Femminile	Rosa, iris, muschio
18	Femminile	Menta, lavanda, mandarino
19	Femminile	Anice, bergamotto, arancia
20	Femminile	Pompelmo, pepe rosa, ambra
21	Maschile	Arancia, gelsomino, patchouli
22	Maschile	Lime, pepe nero, vaniglia
23	Maschile	Bergamotto, lime, pepe rosa
24	Femminile	Muschio, gelsomino, magnolia
25	Femminile	Rosa bianca, ribes nero, muschi
26	Femminile	Pompelmo, arancia rossa, limone
27	Maschile	Mandarino, bergamotto e arancia rossa
28	Femminile	Bergamotto, lavanda, ginger
29	Maschile	Menta, rosa, cannella
30	Maschile	Limone, bergamotto, ananas

5.2.2 Preparazione del Campione

I tredici oli essenziali sono stati analizzati senza alcun pretrattamento. Prima dell'analisi, ogni olio è stato diluito 1:1000 (v/v) e 1:20000 (v/v) con etanolo. Successivamente ogni campione è stato analizzato per tre volte di seguito.

Anche i trenta profumi sono stati iniettati tal quali, senza alcun pretrattamento. Ogni fragranza è stata analizzata tre volte.

5.2.3 Strumentazione

Le analisi SFC-QqQ-MS sono state eseguite utilizzando un sistema Shimadzu Nexera-UC (Shimadzu, Kyoto, Giappone), costituito da un modulo di comunicazione CBM-20A, due pompe a doppio pistone LC-20ADXR, una pompa per la CO₂ LC-30ADSF, un regolatore di contropressione SFC-30A, un degaser DGU-20A5R, un forno CTO-20AC, all'interno del quale è posta la colonnacromatografica, auto-campionatore SIL-30AC e uno spettrometro di massa triplo quadrupolo LCMS-8050 dotato di una sorgente di ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI). L'acquisizione dei dati è stata eseguita da LCMS *solution* Ver. 5.80 software (Shimadzu).

5.2.4 Ottimizzazione delle transizioni MRM

Per lo sviluppo del nuovo metodo, sono state ottimizzate le transizioni MRM per i 28 CEO in esame. Dieci milligrammi di ogni standard sono stati accuratamente pesati e poi diluiti con etanolo in un matraccio da 10 mL, ottenendo soluzioni madre con una concentrazione finale di 1000 mg L⁻¹.

A partire da ciascuna soluzione madre, sono state preparate 4 diverse miscele di standard alla concentrazione di 10 mg L⁻¹, al fine di evitare la presenza di target con lo stesso peso molecolare nella stessa miscela e influenzare negativamente il processo di ottimizzazione.

Le transizioni MRM e i relativi parametri (Q, *quantifer ion*; q', *qualifer ion*; q'', *qualifer ion*; CE, *Collision energy*; Q1 *pre-bias*, Q3 *pre-bias*) sono stati ottimizzati per tutti i composti utilizzando la procedura automatica *from precursor ion search* (Lab Solutions ver. 5.80), mediante l'iniezione diretta di 2 µL delle miscele standard da 10 mg L⁻¹. Nella Tabella 5.2 sono riportati tutti i parametri ottimizzati per i 28 CEO.

TABELLA 5.2 Parametri MS per i 28 composti eterociclici dell'ossigeno: $[M+H]^+$, quantificatore MRM (Q), qualificatore (q') e secondo qualificatore (q'') ioni (energia di collisione (CE) in V). Tempi di ritenzione, limiti di rilevazione e quantificazione (espressi in $mg L^{-1}$), intervalli di linearità (espressi in $mg L^{-1}$), equazioni di regressione lineare, coefficienti di correlazione (R^2), ripetibilità intra-giornaliera e inter-giornaliera (espressa in CV%) e valori di accuratezza (R'%) per ciascun composto analizzato.

C, cumarine; FC, furocoumarine; PMF, polimetossiflavoni.

N.	COMPOSTI (nome IUPAC)	Classe	Rt	Transizioni MRM				Equazione della retta	R^2	Range di Linearità	Ripetibilità		LoD	LoQ	R'% Limone distillato
				$[M+H]^+$	Q (CE)	q' (CE)	q'' (CE)				intra- day	inter- day			
1	Coumarina (<i>chromen-2-one</i>)	C	1.11	147	91 (-24)	103 (-19)	65 (-34)	$y = 171845x$	0.9958	0.05-1	0.8	1.8	0.0100	0.0334	85.0
2	Isomeranzina (<i>7-methoxy-8-(3-methyl-2-oxobutyl)chromen-2-one</i>)	C	1.55	261	189 (-16)	130 (-30)	103 (-38)	$y = 1276828x$	0.9986	0.01-1	0.8	5.5	0.0011	0.0036	80.0
3	Ernrinarina (<i>7-methoxychromen-2-one</i>)	C	1.60	177	121 (-21)	78 (-39)	77 (-30)	$y = 3078335x$	0.9989	0.005-1	0.3	4.3	0.0008	0.0028	85.0
4	Ossipecedaniin (<i>4-[[[(2R)-3,3-dimethyloxiran-2-yl]methoxy]furo[3,2-g]chromen-7-one</i>)	FC	1.86	287	203 (-13)	269 (-9)	147 (-34)	$y = 1047130x$	0.9990	0.01-1	1.6	5.4	0.0016	0.0053	85.2
5	8-geranilossipsoralen (<i>9-[(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoxy]furo[3,2-g]chromen-7-one</i>)	FC	1.87	339	203 (-17)	138 (-11)	95 (-24)	$y = 96458x + 1664$	0.9998	0.5-10	1.2	4.1	0.0470	0.1536	83.3
6	Psoralen (<i>furo[3,2-g]chromen-7-one</i>)	FC	2.02	187	131 (-24)	115 (-22)	77 (-42)	$y = 1710384x$	0.9990	0.01-1	1.2	7.3	0.0008	0.0027	7.3
7	Auraptin (<i>7-[(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoxy]chromen-2-one</i>)	C	2.09	299	163 (-11)	106 (-39)	119 (-27)	$y = 11644343x - 6240$	0.9996	0.005-0.5	2.5	3.9	0.0006	0.0022	3.9
8	Meranzina (<i>8-[[[(2S)-3,3-dimethyloxiran-2-yl]methyl]-7-methoxychromen-2-one</i>)	C	2.12	261	189 (-16)	130 (-30)	77 (-53)	$y = 3819723x - 70241$	0.9979	0.003-3	0.4	1.3	0.0006	0.0021	112.4
9	8-metossipsoralen (<i>9-methoxyfuro[3,2-g]chromen-7-one</i>)	FC	2.31	217	202 (-20)	174 (-28)	89 (-53)	$y = 385230x$	0.9978	0.005-1	0.5	1.1	0.0007	0.0022	83.5
10	Epossiauraptene (<i>7-[(E)-5-(3,3-dimethyloxiran-2-yl)-3-methylpent-2-enoxy]chromen-2-one</i>)	C	2.45	315	163 (-17)	135 (-12)	153 (-8)	$y = 987690x$	0.9972	0.005-1	1.8	4.4	0.0009	0.0032	116.9
11	Cnidicina (<i>4,9-bis(3-methylbut-2-enoxy)furo[3,2-g]chromen-7-one</i>)	FC	2.53	355	173 (-36)	219 (-20)	287 (-9)	$y = 427864x$	0.9957	0.05-2	1.5	7.1	0.0032	0.0103	118.6

12	Fellopterina (4-methoxy-9-(3-methylbut-2-enoxy)furo[3,2-g]chromen-7-one)	FC	2.54	301	233 (-11)	218 (-26)	270 (-8)	y = 559099x	0.9981	0.01-1	1.4	4.8	0.0021	0.0071	101.8
13	Biacangelicolo (9-[[[(2R)-3,3-dimethyloxiran-2-yl]methoxy]-4-methoxyfuro[3,2-g]chromen-7-one)	FC	2.56	317	231 (-17)	233 (-11)	175 (-31)	y = 1833113x	0.9988	0.001-1	0.7	1.4	0.0014	0.0046	102.9
14	Citroptene (5,7-dimethoxychromen-2-one)	C	3.09	207	192 (-19)	121 (-25)	164 (-23)	y = 2777629x + 24252	0.9992	0.01-1	0.5	1.7	0.0030	0.0101	83.0
15	Cnidilina (9-methoxy-4-(3-methylbut-2-enoxy)furo[3,2-g]chromen-7-one)	FC	3.10	301	233 (-13)	173 (-29)	218 (-26)	y = 3306623x	0.9992	0.005-1	2.4	3.8	0.0008	0.0025	101.4
16	Isopimpinellina (4,9-dimethoxyfuro[3,2-g]chromen-7-one)	FC	3.15	247	217 (-24)	232 (-17)	189 (-33)	y = 9416081x	0.9959	0.005-1	0.3	3.6	0.0006	0.0019	97.3
17	Meranzina idrata (8-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyl)-7-methoxychromen-2-one)	C	3.54	279	149 (-14)	57 (-13)	121 (-34)	y = 138486x - 89816	0.9904	0.05-2	1.2	3.9	0.0065	0.0217	116.3
18	Bergaptene (4-methoxyfuro[3,2-g]chromen-7-one)	FC	3.80	217	202 (-19)	174 (-29)	89 (-48)	y = 8041288x	0.9992	0.01-1	2.3	7.3	0.0004	0.0014	80.0
19	Isoimperatorin (4-(3-methylbut-2-enoxy)furo[3,2-g]chromen-7-one)	FC	3.84	271	203 (-13)	147 (-29)	131 (-29)	y = 14029536x	0.9990	0.01-1	2.1	6.5	0.0004	0.0014	98.0
20	Ossipeucedanina idrata (4-[(2R)-2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy]furo[3,2-g]chromen-7-one)	FC	3.99	305	203 (-19)	147 (-35)	91 (-49)	y = 12101478x	0.9994	0.005-1	2.6	7.4	0.0004	0.0014	87.0
21	5-geranilossi-7-metossi-coumarina (5-[(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoxy]-7-methoxychromen-2-one)	C	4.01	329	193 (-16)	137 (-37)	148 (-29)	y = 19121802x + 225363	0.9987	0.01-1	0.7	2.6	0.0007	0.0023	112.7
22	Bergamottina (4-[(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoxy]furo[3,2-g]chromen-7-one)	FC	4.08	339	203 (-13)	147 (-37)	131 (-35)	y = 14106080x + 173296	0.9988	0.01-1	0.3	2.7	0.0018	0.0059	87.1
23	Epossibergamottina (4-[(E)-5-(3,3-dimethyloxiran-2-yl)-3-methylpent-2-enoxy]furo[3,2-g]chromen-7-one)	FC	4.46	355	203 (-16)	153 (-8)	135 (-14)	y = 3292483x	0.9974	0.01-1	1.7	3.8	0.0009	0.0032	111.6
24	Biacangelicina (9-[(2R)-2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy]-4-methoxyfuro[3,2-g]chromen-7-one)	FC	4.48	335	317 (-8)	175 (-33)	233 (-13)	y = 1467060x	0.9993	0.01-1	1.5	7.6	0.0014	0.0047	80.0
25	Tangeretina (5,6,7,8-tetramethoxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one)	PMF	4.84	373	343 (-27)	358 (-20)	325 (-26)	y = 5474298x	0.9981	0.005-1	0.4	1.4	0.0004	0.0015	104.1
26	Nobiletina (2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5,6,7,8-tetramethoxychromen-4-one)	PMF	5.08	403	373 (-29)	388 (-21)	355 (-28)	y = 2666689x	0.9952	0.005-2	1.7	5.6	0.0008	0.0027	107.5
27	Tetra-O-metilscutellarein (5,6,7-trimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one)	PMF	7.43	343	282 (-25)	313 (-26)	298 (-25)	y = 1777940x	0.9985	0.005-1	2.3	5.9	0.0009	0.0032	107.1
28	Sinensetina (2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5,6,7-trimethoxychromen-4-one)	PMF	7.53	373	343 (-29)	312 (-25)	329 (-28)	y = 796118x	0.9971	0.001-1	0.3	2.2	0.0013	0.0046	112.4

5.2.5 Screening delle colonne cromatografiche

Come precedente mente accennato nell'introduzione, il metodo SFC è stato ottimizzato partendo dallo screening di sette diverse fasi stazionarie.

Le colonne selezionate erano impaccate con diverse fasi stazionarie: ottadecilsilica (C18); 5-idrossile (OH5); fenil-esile; cianoesil (ES-CN); silica (HILIC); silica 60 Å (Si 60); colonna amminica (LC-NH₂) e due differenti colonne dimetilpentafluorofeniletil (F5). Tutte le colonne erano impaccate con particelle della stessa dimensione 2,7 µm), tranne le colonne Si 60 (4 µm) e LC-NH₂ (3 µm), avevano tutte lo stesso diametro interno (2,1 mm) tranne LC-NH₂ (3 mm) e una delle due colonne F5 (4,6 mm). Inoltre, tutte le colonne avevano la stessa lunghezza (150 mm) tranne la Si 60 (250 mm).

La fase mobile scelta per valutare l'efficienza delle colonne era composta da CO₂ (solvente A) e MeOH (co-solvente); la temperatura del forno era impostata a 40 °C; tutte le colonne sono state testate ad un flusso di 1 mL min⁻¹ tranne la colonna F5 (150 4,6 mm, 2,7 µm) testata a 2 mL min⁻¹. Gli standard sono stati analizzati in diverse modalità di gradiente lineare (0-60% B; 0-30% B; 0-10% B, in 10 min).

La colonna cromatografica che ha fornito la miglior separazioni di tutti gli standard è stata sottoposta alla valutazione di ulteriori parametri. In particolare, sono stati testati due diversi co-solventi, MeOH e 2-propanolo; inoltre sono stati valutati due valori differenti di contropressione: 120 e 150 bar e tre diversi flussi della pompa di *make-up*: 0,8, 1,0 e 1,5 mL min⁻¹.

5.2.6 Metodo SFC-QqQ-MS ottimizzato

La separazione cromatografica degli CEO è stata effettuata utilizzando una colonna Ascentis Express F5 (150 2,1 mm, 2,7 µm), usando CO₂ (solvente A) e MeOH (solvente B) come fase mobile, in modalità gradiente: 0 a 10 min aumentando dal 2 minuti al 10% il solvente B. Il flusso era di 1,0 mL min⁻¹, e anche la pompa di *make-up* lavorava ad un flusso di 1,0 mL min⁻¹. Il volume di iniezione era di 2 µL.

Il forno e il BPR erano impostati ad una temperatura di 40 ° C e 120 bar, rispettivamente.

Le analisi sono state effettuate con i seguenti parametri di massa: temperatura dell'interfaccia 350 °C; temperatura DL 250 °C; temperatura del blocco termico 200 °C; flusso del gas di nebulizzazione (N₂) 3 mL min⁻¹; flusso del gas di essiccazione (N₂) 5 mL min⁻¹; tempo di acquisizione per ciascun evento 0.024 s.

Gli analiti target in esame C, FC e PMF sono stati rilevati in modalità di acquisizione Monitoraggio di Reazioni Multiple (MRM).

5.2.7 Ottimizzazione del metodo

Al fine di costruire le rette di calibrazione per ciascun CEO, è stata preparata una miscela di tutti gli standard alla concentrazione di 10 mg L⁻¹ e utilizzata per ottenere le seguenti diluizioni: 3, 2, 1, 0,5 e 0,1 mg L⁻¹; altre diluizioni 0,05, 0,01, 0,005, 0,003 e 0,001 mg L⁻¹ sono state invece preparati utilizzando la miscela di standard alla concentrazione 0,1 mg L⁻¹. Per ciascuna concentrazione sono state effettuate cinque analisi consecutive.

E' stato selezionato un olio essenziale di limone distillato come matrice "bianca" per costruire le rette di calibrazione. L'olio essenziale distillato è stato analizzato per confermare l'assenza totale di C, FC e PMF.

Per calcolare il limite di determinazione (LoD) e di quantificazione (LoQ), la precisione e la ripetibilità intra-, e inter-giornaliera, all'olio essenziale di limone distillato è stata aggiunta una concentrazione di 0,01 mg L⁻¹ del mix di standard. L'accuratezza è stata valutata analizzando la matrice "bianca" addizionata con gli standard a concentrazione nota, la differenza tra le concentrazioni calcolate e quelle reali è stata espressa come la media di cinque misure moltiplicate per 100 e divise per la concentrazione reale (0,1 mg L⁻¹). La ripetibilità è stata valutata per tutti i composti come CV% delle aree dei picchi di cinque analisi eseguite nello stesso giorno e dopo una settimana, per la ripetibilità intra- e inter-day rispettivamente.

5.3. Risultati e discussioni

5.3.1 Ottimizzazione transizioni MRM

Le transizioni MRM di ogni standard, sono state ottimizzate automaticamente dal sistema SFC-Qqq-MS mediante iniezione diretta di quattro miscele standard, al fine di evitare la presenza di composti con lo stesso peso molecolare nella stessa miscela. Tre transizioni MRM sono state ottimizzate per ogni composto (Tabella 5.2).

Un punto chiave del metodo SFC-Qqq-MS è rappresentato dall'ottimizzazione della terza transizione. Infatti, per alcuni composti isomeri come la meranzina e l'isomeranzina, che hanno le prime due transizioni uguali, ciò che ne ha permesso la corretta identificazione è stata la terza transizione che differisce per i due isomeri.

Per altre molecole, quali ad esempio bergamottina/8-geranyloxypsoralen, cnidilina/fellopterin e tangeretina/sinensetina che hanno in comune solo la prima transizione, esse possono essere correttamente identificate utilizzando la seconda transizione. Invece per quanto riguarda il bergaptene e l'8-metossipsoralene, questi due psoraleni hanno in comune tutte e tre le transizioni, ciò che ha permesso di discriminarli è il loro tempo di ritenzione, 3.80 e 2.31 rispettivamente.

5.3.2 Validazione del metodo

Come già riportato nel paragrafo precedente, in questo lavoro, sono state testate sette diverse fasi stazionarie, ognuna di esse ha prodotto risultati differenti. In particolare, con le fasi stazionarie C18, LC-NH₂ ed ES-CN sono stati ottenuti i risultati peggiori poiché i ventotto CEO coeludevano nei primi tre minuti di analisi.

Separazioni cromatografiche migliori sono state osservate utilizzando le fasi stazionarie OH5, Si, e Si 60, tuttavia, non tutti i composti erano separati alla linea di base, alcuni di essi coeludevano.

Tra tutte le colonne HPLC testate, la fase stazionaria F5 ha permesso la miglior separazione alla linea di base di 9 C, 15 FC e 4 PMF. Questi dati sono perfettamente in accordo con uno studio precedente pubblicato, sulla separazione delle furocumarine mediante l'uso della cromatografia a fluidi supercritici con una colonna F5 [13].

La figura 5.2 riporta un cromatogramma SFC-Qqq-MS di tutti gli standard analizzati ottenuto con la colonna F5 (150 cm 2,1 mm, 2,7 µm).

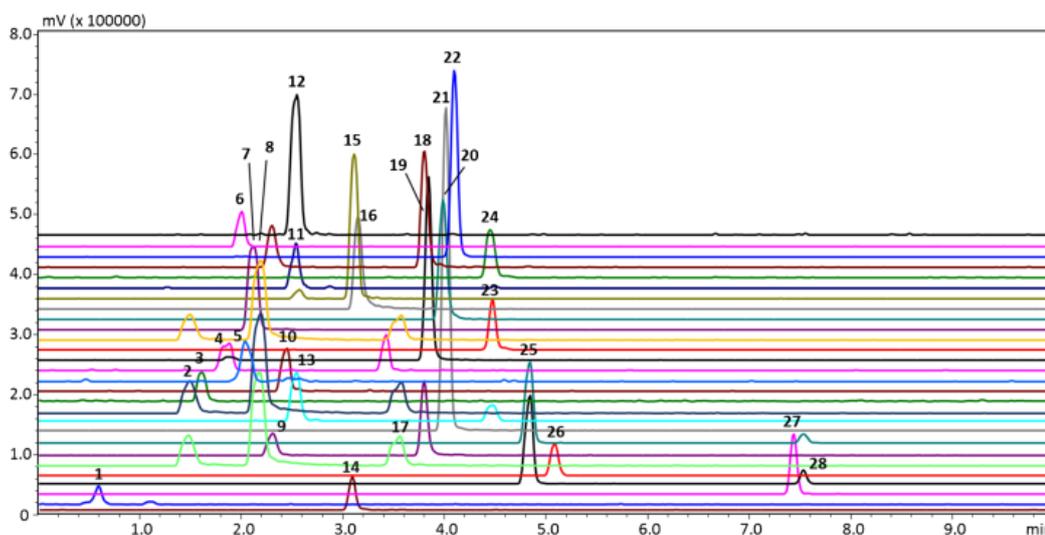


Figura 5.1 Cromatogramma SFC-QqQ-MS (MRM) di ventotto standard di CEO.

Inoltre sono state testate due diverse colonne cromatografiche F5, con differente diametro interno (2,1 mm e di 4,6 mm). E' stata scelta la colonna F5 con diametro interno minore, poiché utilizzando quella con diametro interno di 4,6 mm era necessario aumentare il flusso di MeOH da 1 a 2 mL min⁻¹, e ciò va in contrasto con il vantaggio principale di questo metodo analitico, cioè l'uso limitato di solventi organici.

La separazione di tutti i composti è stata ottenuta in meno di 8 minuti, utilizzando una fase stazionaria F5 e una fase mobile composta da CO₂ e MeOH. In SFC, è quasi sempre necessario l'uso di un *modifier*, per aumentare la forza solvente della fase mobile e per migliorare l'eluizione degli analiti polari. Tra i due modifier testati (MeOH e 2-propanolo) migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando il metanolo, poiché l'uso del 2-propanolo non ha permesso la separazione di tutti i composti.

Sono state costruite rette di calibrazione in modalità di acquisizione MRM, aggiungendo una quantità nota di standard ad un olio essenziali di limone distillato, secondo le linee guida EURACHEM [14].

Tutti i parametri di validazione del metodo (tabella 5.2) sono risultati soddisfacenti, sono stati ottenuti valori del coefficiente di regressione lineare compresi nell'intervallo tra 0,9952-0,9996; valori di LoQ compresi tra 0,0014 e 0,1536 mg L⁻¹ e valori di LoD compresi tra 0,0004 e 0,0470 mg L⁻¹, che potrebbero consentire la quantificazione di

CEO anche quando sono contenuti in tracce nei prodotti finiti (come ad esempio gli alimenti e i cosmetici).

La ripetibilità intra-day e inter-day è stata riportata come coefficiente di variazione percentuale (CV%) considerando le aree dei picchi ottenuti analizzando cinque volte l'olio essenziale di limone distillato addizionato con gli standard alla concentrazione di 0.1 mL l⁻¹, eseguiti nello stesso giorno e dopo una settimana.

Tutti i valori ottenuti erano compresi in uno *shift* massimo dell'8%, confermando così la robustezza del metodo analitico ottimizzato.

Infine, i valori ottenuti calcolando l'R% sono compresi in un intervallo che va dall'80,0 e 118,6%, ciò garantisce una corretta valutazione quantitativa.

Il metodo SFC-QqQ-MS sviluppato ha permesso di effettuare le analisi in minor tempo rispetto ad altre metodiche presenti in letteratura per la determinazione delle stesse molecole [15-16], un altro interessante vantaggio è la possibilità di quantificare la cumarina, non inclusa nel precedente metodo HPLC-MS/MS sviluppato e ottimizzato da Arigò e collaboratori [16]. Sebbene la cumarina non è contenuta negli oli essenziali di agrumi spremuti a freddo, è naturalmente presente nella cannella, e di conseguenza in molti alimenti [17] ed è molto utilizzata anche nelle industrie cosmetiche per fissare l'aroma, pertanto la sua determinazione risulta particolarmente importante sia per le industrie alimentari che cosmetiche.

5.3.3 Green Analytical Procedure Index

Nel 2008, Płotka-Wasyłka ha pubblicato un articolo sul *Green Analytical Procedure Index* (GAPI), definendolo come "il nuovo strumento per valutare il carattere *green* di un'intera metodologia analitica, dalla raccolta del campione alla determinazione finale" [18]. Si basa sull'attribuzione di un colore (rosso, giallo, verde) rappresentativo di tre livelli di valutazione, fino al completamento riempimento di un pittogramma composto da cinque pentagrammi.

La valutazione si basa su criteri specifici, che considerano diversi aspetti dell'approccio analitico, a partire dalla procedura di campionamento ed estrazione fino alla quantità di solvente utilizzato e il suo smaltimento.

Fondamentalmente, GAPI è un nuovo protocollo per valutare il carattere *green* di un metodo analitico rispetto ad altri. Grazie a tutti i criteri del GAPI presi in

considerazione, il metodo SFC-Qqq-MS è risultato più *green* dei metodi nano-LC-EI-MS [19] e HPLC-MS/MS [16] presi in considerazione.

Il pittogramma ottenuto è mostrato in Fig. 5.2. La differenza più marcata è quella del pentagramma di estrazione del metodo nano-LC-EI-MS, che manca in altri. Tuttavia La necessità di una fase di estrazione, insieme a tempi piuttosto lunghi e la conseguente energia richiesta, rende questo approccio meno *green* rispetto agli altri due.

Il metodo SFC-Qqq-MS supera quello HPLC-MS/MS grazie alla bassa quantità di rifiuti generati, confermandosi il metodo più ecologico tra quelli confrontati in questo studio.

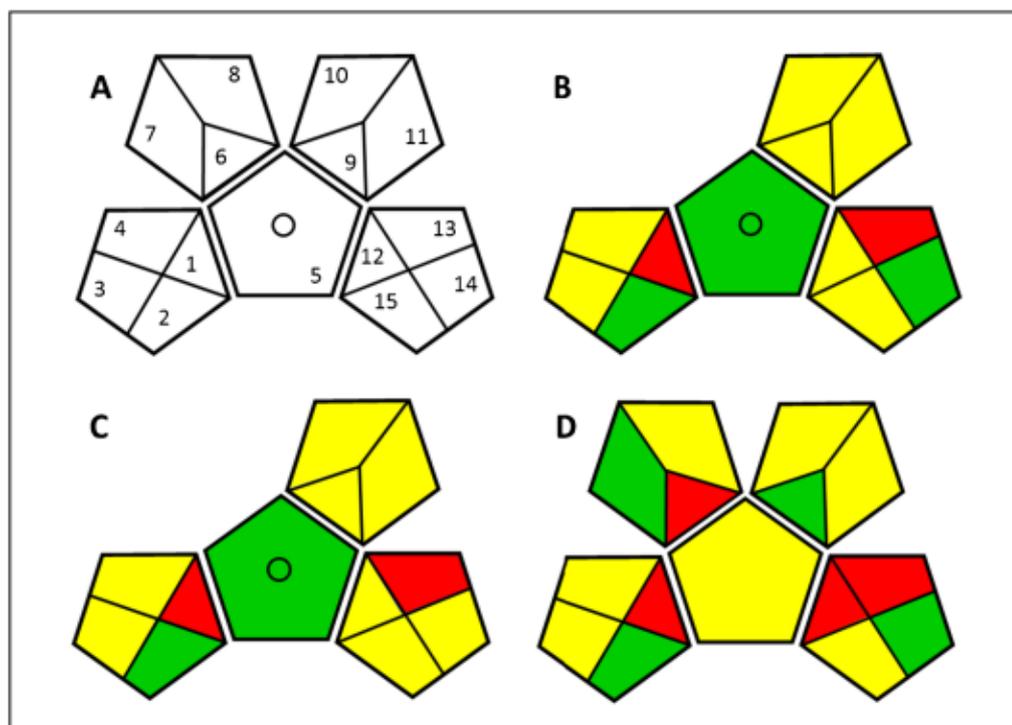


Figura 5.2 Pittogrammi del GAPI. Valutazione GAPI, del profilo *green* per il metodo SFC-Qqq-MS (B), HPLC-MS/MS (C), e nanoLC-EI-MS (D).

I numeri nel pittogramma A si riferiscono alla preparazione del campione (1.raccolta; 2.conservazione; 3.trasporto; 4.stoccaggio; 5.tipo di metodo; 6.scala di estrazione; 7.solvente/reagenti utilizzati; 8 trattamenti supplementari), ai reagenti e solventi utilizzati (9.quantità; 10.pericolo per la salute; 11.pericolo per la sicurezza) e agli strumenti ((12.energia; 13.rischio professionale; 14.rifiuti; 15.trattamento dei rifiuti).

Colore verde: 1-8 nessuna preparazione del campione/metodi privi di solventi; 9-11 uso di solvente/reagente inferiore a 10 mL (<10 g); 12-15 uso di 0,1 kWh per campione e produzione di rifiuti inferiore a 1 mL (<1 g). Colore giallo: 1-8 trattamenti e procedure semplici; 9-11 uso di solvente/ reagente circa 10-100 mL (10-100 g); 12-15 utilizzo di 1,5 kWh per campione e produzione di rifiuti inferiore a 1-10 mL (1-10 g). Colore rosso: 1-8 macro estrazione e procedure in linea; 9-11 uso di solvente/ reagente su 100 mL (100 g); uso da 12 a 15 più di 1,5 kWh per campione e emissione di vapori nell'atmosfera.

5.2.3 Analisi degli oli essenziali

Tredici campioni di oli essenziali di agrumi spremuti a freddo sono stati analizzati con il nuovo metodo SFC-Qqq-MS ottimizzato. In figura 5.3 sono i cromatogrammi MRM di un olio essenziale di Lime (A), limone (B) e bergamotto (C).

I risultati quantitativi sono riportati nelle tabelle 5.3 e 5.4, tutti i risultati ottenuti sono in accordo con i dati presenti in letteratura [1].

Dalle tabelle si evince che l'olio essenziale di lime è il più ricco di CEO, mentre l'olio essenziale di clementina presenta la concentrazione più bassa.

Bergamottina, 5-geraniolossi-7-metossi-cumarina, e citropten sono i CEO più rappresentativi per gli oli essenziali di lime, limone e bergamotto. L'auraptene e l'epossiauraptene sono contenuti solo nell'olio essenziale di pompelmo, mentre la tangeretina è il PMF più abbondante negli oli essenziali di mandarino, clementina e tacle. Dai risultati ottenuti si evince che gli oli essenziali di lime e limone contenevano solo C e FC, mentre i campioni di mandarino, clementina, tacle e arancia dolce erano caratterizzati dalla presenza di PMF.

L'applicazione della nuova metodica analitica ottimizzata ha permesso la corretta identificazione e quantificazione dei CEO presenti negli oli essenziali di agrumi spremuti a freddo, permettendo di utilizzare basse concentrazioni di solventi organici, riducendo così l'impatto ambientale. Inoltre, grazie al ridotto tempo di analisi, il metodo potrebbe essere preso in considerazione per il controllo qualità di C, FC, e PMF negli oli essenziali di agrumi spremuti a freddo, permettendo così di evidenziare eventuali adulterazioni.

Figura 5.3 Cromatogrammi SFC-QqQ-MS di un campione di oli essenziali di Lime (A), Bergamotto (B) e arancia dolce (C).

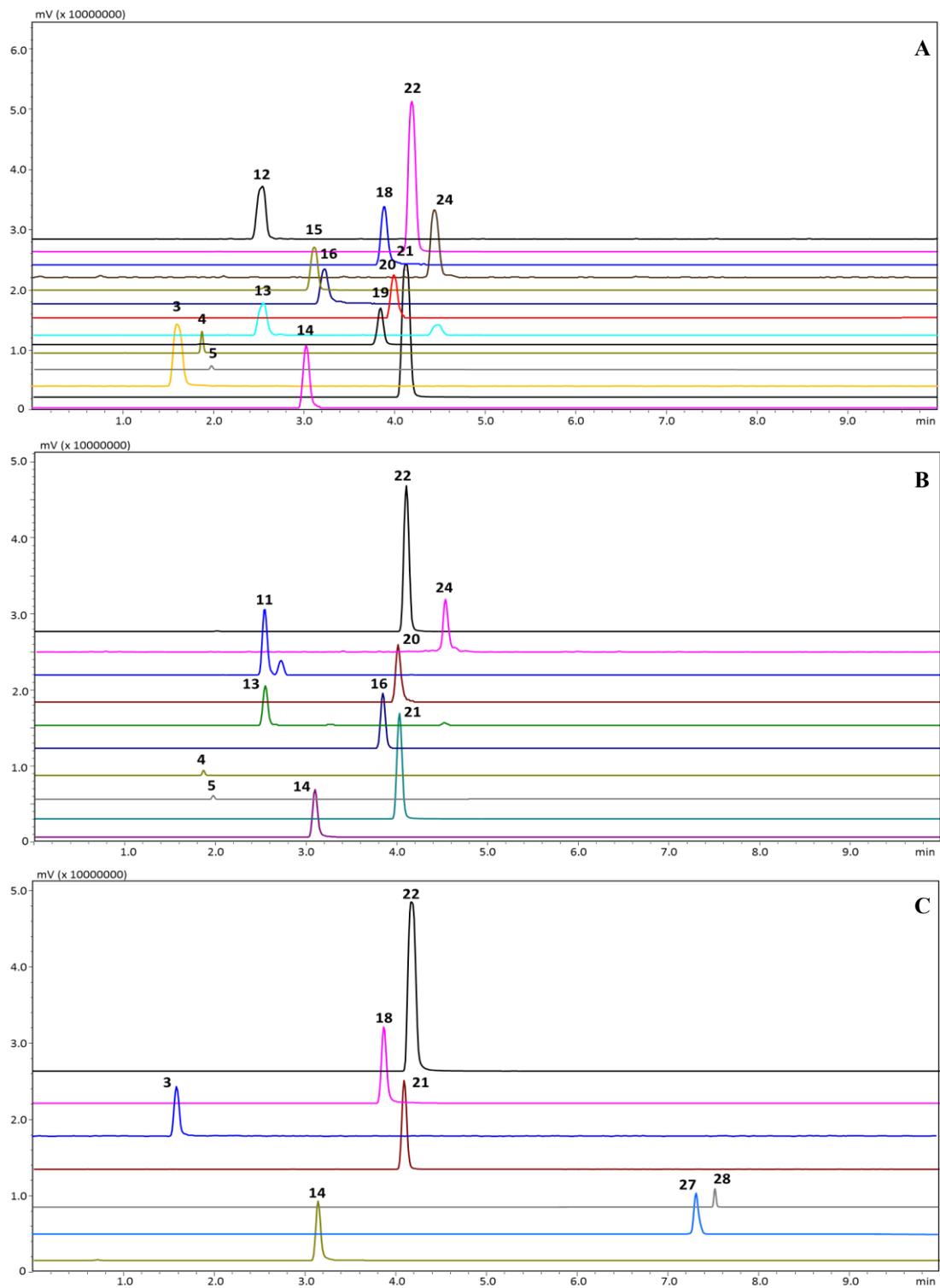


Tabella 5.3 Risultati quantitativi (mg L⁻¹ ± deviazione standard) dei CEO contenuti nei campioni di oli essenziali di agrumi

Composto	Limone_1	Limone_2	Lime	Bergamotto_1	Bergamotto_2	Pompelmo	Arancia amara
Bergamottina	6367 ± 85.7	8232 ± 129.4	29501 ± 321.6	20552 ± 382.6	21751 ± 573.1	1514 ± 6.8	83 ± 0.3
Bergaptene	-	-	2793 ± 6.9	3248 ± 17.2	3721 ± 216.2	-	-
Biacangelicina	11 ± 0.8	87 ± 2.9	33 ± 0.2	-	-	-	-
Biacangelicolo	1705 ± 8.7	952 ± 20.7	2 ± 0.1	-	-	-	-
Cnidicina	107 ± 3.6	80 ± 5.2	-	-	-	-	-
Cnidilina	-	-	204 ± 11.2	-	-	-	-
Epossibergamottina	-	-	-	-	-	5646 ± 70.9	1365 ± 12.8
Imperatorin	+	+	+	-	-	-	-
Isoimperatorin	140 ± 0.9	130 ± 1.6	145 ± 8.9	-	-	-	-
Isopimpinellina	-	-	2549 ± 48.9	-	-	-	-
Ossipecuedanina	145 ± 0.8	81 ± 1.9	3 ± 0.2	-	-	-	-
Ossipecuedanina idrata	17 ± 1.6	172 ± 0.8	689 ± 12.5	-	-	-	-
Fellopterin	250 ± 1.9	193 ± 9.4	-	-	-	-	-
8-geranilossipsoralen	2155 ± 8.8	1565 ± 2.6	1236 ± 10.2	-	-	-	-
Epossibergamottin idrata	-	-	-	-	-	+	+
Tot C	10897 ± 112.8	11492 ± 174.5	34733 ± 420.7	23800 ± 554.8	25472 ± 789.3	5646 ± 70.9	1365 ± 12.8
Auraptene	-	-	-	-	-	8273 ± 1.9	-
Citroptene	1625 ± 50.6	1343 ± 10.7	6132 ± 36.7	3148 ± 50.8	1907 ± 31.5	-	-
Epossiauraptene	-	-	-	-	-	1782 ± 44.3	-
Erniarina	-	-	1935 ± 4.6	22 ± 0.2	203 ± 1.8	-	-
Isomerazina	-	-	-	-	-	71 ± 26.5	356 ± 5.9
Meranzina	-	-	-	-	-	918 ± 30.2	1612 ± 4.6
Meranzina idrata	-	-	-	-	-	228 ± 7.2	254 ± 6.8
Ostolo	-	-	-	-	-	+	+
5-geranilossi-7-metossicumarina	2598 ± 29.8	2421 ± 12.1	32892 ± 321.5	1846 ± 14.2	1229 ± 8.6	-	-
5-isopenteniloxssi-7-metossicumarina	+	+	+	-	-	-	-
Tot FC	4223 ± 80.4	3764 ± 22.8	34820 ± 362.8	3356 ± 65.2	3339 ± 41.9	11272 ± 110.1	2222 ± 17.3
Eptametossiflavone	-	-	-	-	-	+	+
Nobiletina	-	-	-	-	-	1314 ± 7.9	501 ± 14.8
Sinensetina	-	-	-	240 ± 0.8	510 ± 24.1	-	-
Tangeretina	-	-	-	-	-	225 ± 0.6	944 ± 58.3
Tetra-O-metillscutellarein	-	-	-	23 ± 3.6	25 ± 4.5	-	-
Tot PMF	-	-	-	263 ± 4.4	535 ± 28.6	1539 ± 8.5	1445 ± 73.1
TOT	15120 ± 193.2	15256 ± 197.3	69553 ± 783.5	27419 ± 624.4	29346 ± 868.8	18457 ± 189.5	5032 ± 103.2

+ OHC presenti nei campioni ma non quantificati, *limone_1 e Limone_2 corrispondono a campioni raccolti rispettivamente a gennaio febbraio.

Tabella 5.4 Risultati quantitativi (mg L⁻¹ ± deviazione standard) dei PMF contenuti nei campioni di oli essenziali di agrumi

Composti	Arancia dolce	Mandarino rosso	Mandarino giallo	Mandarino verde	Clementine	Tacle
Nobiletina	1722 ± 8.9	1533 ± 15.1	3672 ± 5.8	3250 ± 5.2	537 ± 2.7	546 ± 32.8
Tetra-O-metillscutellarein	514 ± 6.9	84 ± 0.1	91 ± 6.1	204 ± 10.3	198 ± 9.6	361 ± 8.7
Sinensetina	413 ± 20.9	54 ± 3.5	124 ± 0.8	237 ± 5.9	62 ± 3.6	143 ± 6.9
Tangeretina	935 ± 40.2	2477 ± 13.2	4466 ± 0.6	5903 ± 1.8	670 ± 1.8	890 ± 23.2
5-demethyl-tangeretin	-	+	+	+	-	-
5-demethyl-nobiletin	-	+	+	+	-	-
Eptametossiflavone	+	+	+	+	+	-
Exametossiflavone	+	+	+	+	+	-
Isosinensetina	-	+	+	+	-	-
Tot.	3584 ± 76.9	4148 ± 31.9	8353 ± 13.4	9594 ± 23.2	1467 ± 17.7	1940 ± 71.6

+ PMF presente nei campioni ma non quantificato.

5.2.4 Analisi dei profumi

La nuova metodica SFC-Qq-MS ottimizzata è stata sfruttata anche per la determinazione degli CEO in trenta profumi aromatizzati agli agrumi.

L' approccio SFC grazie ai bassi valori di LoQ (nell'intervallo tra 0,0015 e 0,1536 mg L⁻¹), ha permesso di quantificare i CEO anche quando erano presenti in tracce nei profumi.

Tutte le fragranze sono state analizzate senza alcun pretrattamento del campione, eliminando così eventuali errori commessi durante la preparazione del campione (perdita e contaminazione del campione) e aumentando la precisione analitica.

Nelle Tabelle 5.5 - 5.7 sono riportati i risultati quantitativi (mg L⁻¹ ± la deviazione standard) di C, FC e PMF rilevati nei trenta campioni analizzati.

Come si evince dalle tabelle, nella maggior parte dei campioni analizzati i CEO erano contenuti in concentrazione che rientrano nei limiti di rilevazione e/o quantificazione. Considerando i risultati ottenuti, i PMF sono la classe di composti più abbondanti sia nelle fragranze femminili che in quelle maschili. La concentrazione totale di PMF variava da LoQ a 19.05 mg L⁻¹, mentre, come riportato nelle tabelle 5.5 e 5.6, la concentrazione totale di furocoumarine e cumarine non superava rispettivamente 5,49 e 5,37 mg L⁻¹. Tra tutte le FC, bergamottina e bergaptene sono stati rilevati nella maggior parte dei campioni analizzati, mentre cnidilina, ossipeucedanina e biacangelicolo sono stati quantificati in un solo campione, infine cnidicina, psoralen e 8-geranilossipsoralene sono stati rivelati solo in due campioni.

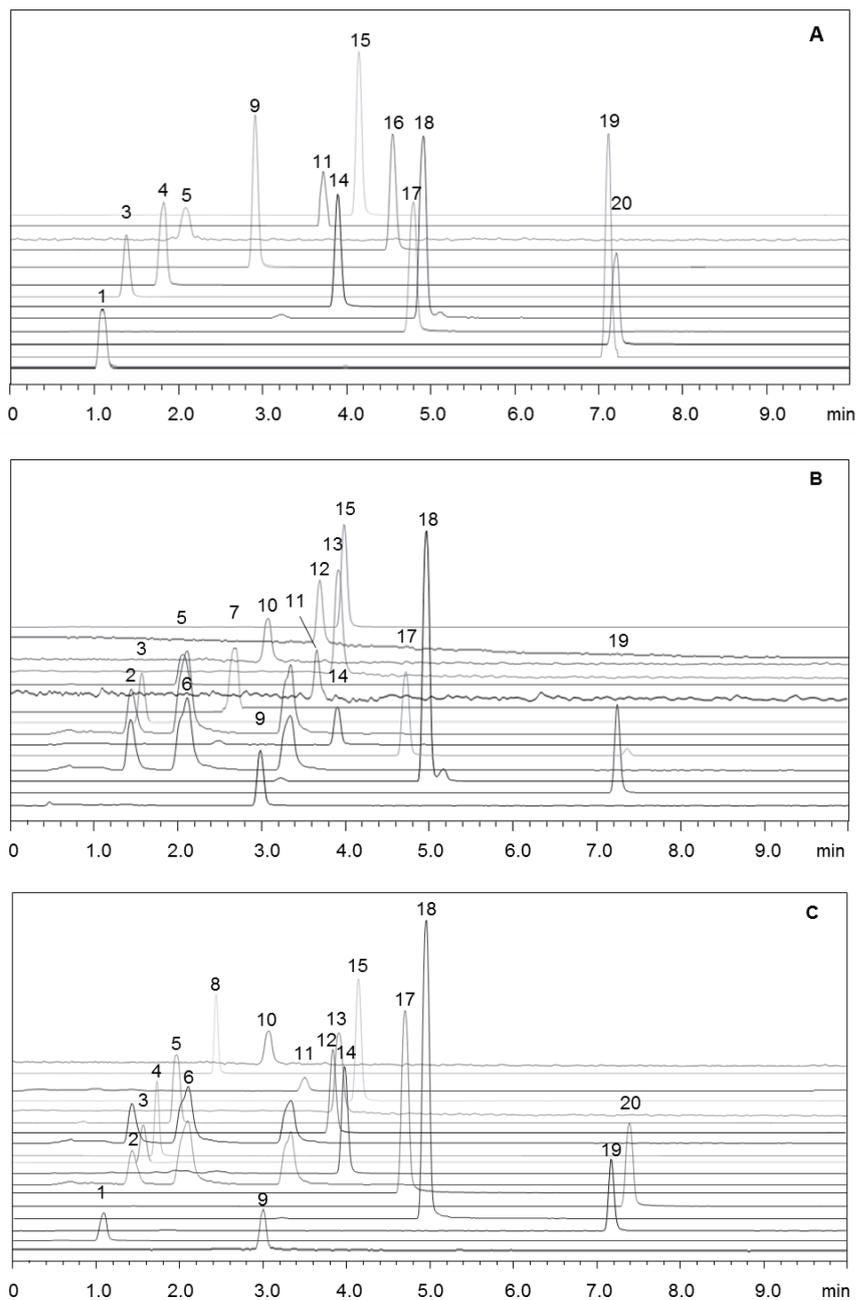
E' interessante notare che la cumarina e il citropten sono stati quantificati nella maggior parte delle fragranze analizzate, mentre epossiauraptene era presente in un solo campione. Per quanto riguarda il contenuto di PMF, la nobiletina e la tangeretina erano le molecole più abbondanti tra le classi CEO.

Osservando le Tabelle con i risultati quantitativi, si può notare che alcuni profumi, nello specifico i campioni 8, 16, 17, 24, 25 e 29 non contengono nessuna delle classi dei CEO in esame, questi dati sono perfettamente in accordo con la corrispondente descrizione di questi profumi, infatti, nessuno di essi contiene ingredienti relativi agli agrumi.

La presenza simultanea di tutte le classi di CEO nelle fragranze idroalcoliche analizzate è stata rilevata in tre campioni, 13, 26 e 27. Questo risultato potrebbe

suggerire l'uso di una miscela di oli essenziali di agrumi pressati a freddo o di un unico olio essenziale di agrumi che contiene tutte e le tre classi di CEO, ad esempio l'olio essenziale di bergamotto o di arancia amara. La figura 5.4 riporta i cromatogrammi SFC-QqMS dei campioni 13, 26 e 27.

Figura 5.4 Cromatogrammi SFC-Qq-MS dei campioni 13 (A), 26 (B), 27 (C)



Analizzando nello specifico la composizione dei tre campioni riportati nella Figura 5.4, l'eossiauraptene, presente nel campione 26, suggerisce la presenza dell'olio essenziale di pompelmo, mentre i campioni 13 e 27 hanno mostrato la presenza dell'8-geranilossipsoralene, una furocumarina presente nell'olio essenziale di lime e limone pressato a freddo [1]. Attraverso queste associazioni è quindi possibile ipotizzare quale tipo di olio sia stato utilizzato come ingrediente per la formulazione delle varie fragranze analizzate. Tutte le associazioni degli oli essenziali ipotizzate, sono in accordo con la corrispondente descrizione dei profumi.

Dai risultati quantitativi ottenuti si evince che tutti i profumi analizzati presentano livelli di bergaptene inferiore allo 0,000087%, valore che rientra nei limiti imposti dall' IFRA [10]. Inoltre, per quanto riguarda il contenuto di cumarina presente in tutti i campioni di profumi, è stata quantificata in valori compresi tra lo 0,000003 e lo 0,00012%, questi dati sono inferiori al limite indicato dall' IFRA nell'emendamento 48 [20].

Complessivamente, considerando il contenuto di cumarine e furocumarine, si può affermare che tutte e trenta le fragranze commerciali analizzate in questo lavoro sono sicure per la salute umana.

Tabella 5.5 Identificazione e quantificazione delle furocumarine (mg L⁻¹ ± deviazione standard) nei profumi analizzati.

N°	Bergaptene	8-Metossi-psoralen	Ossipedeucianina	Ossipedeucianina	Cnidicina	Cnidilina	Fellopterina	Psoralene
1	0.23 ± 0.008	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	0.07 ± 0.004
2	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
3	0.02 ± 0.002	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
4	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
5	0.07 ± 0.022	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	0.08 ± 0.028
6	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
7	0.03 ± 0.001	<LoD	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
8	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD
9	0.02 ± 0.007	<LoD	<LoD	0.19 ± 0.024	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD
10	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
11	0.04 ± 0.007	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
12	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
13	0.13 ± 0.005	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
14	0.07 ± 0.017	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
15	0.11 ± 0.006	<LoD	0.13 ± 0.065	1.05 ± 0.029	0.18 ± 0.021	<LoD	0.29 ± 0.056	<LoD
16	<LoD	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
17	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
18	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
19	0.03 ± 0.004	<LoD	<LoD	0.09 ± 0.001	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
20	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
21	0.87 ± 0.017	0.51 ± 0.034	<LOD	<LoQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
22	<LoQ	<LOD	<LOD	<LoQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
23	0.41 ± 0.004	<LOD	<LOD	0.87 ± 0.217	0.77 ± 0.009	0.01 ± 0.002	0.23 ± 0.022	<LOD
24	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LoD	<LOD	<LOD	<LOD
25	<LOD	0.17 ± 0.001	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
26	0.34 ± 0.174	<LOD	<LOD	0.53 ± 0.013	<LoD	<LOD	<LOD	<LOD
27	0.26 ± 0.007	<LOD	<LOD	0.48 ± 0.128	<LOD	<LOD	0.54 ± 0.011	<LOD
28	<LOD	0.35 ± 0.116	<LOD	<LoQ	<LoD	<LOD	<LOD	<LOD
29	<LOD	<LOD	<LOD	<LoD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
30	0.16 ± 0.012	<LOD	<LOD	<LoQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Tabella 5.5 Continuazione.

N°	Bergamottina	Biacangelicin	Biacangelicolo	Epossibergamottina	Isoimperatorina	Isopimpinellina	8-Geranilossipsoralen	Totale
1	<LoQ	<LoD	<LoD	0.34 ± 0.025	<LoQ	<LoD	<LoD	0.64 ±0.037
2	<LoD	0.19 ± 0.119	<LoD	0.05 ± 0.011	<LoD	<LoD	<LoD	0.24 ± 0.13
3	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	0.02 ±0.002
4	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	-
5	<LoQ	<LoQ	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	0.15 ± 0.05
6	<LoQ	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	-
7	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	0.03 ±0.001
8	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	<LoD	-
9	0.55 ± 0.015	0.15 ± 0.092	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoQ	<LoD	0.91 ±0.138
10	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	-
11	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	0.04 ±0.007
12	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	-
13	1.09 ± 0.133	<LoD	<LoD	0.97 ± 0.019	<LoD	<LoQ	1.08 ± 0.095	3.27 ±0.252
14	<LoQ	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	0.07 ±0.017
15	1.18 ± 0.028	0.48 ± 0.058	1.03 ± 0.018	0.03 ± 0.014	0.18 ± 0.044	0.07 ± 0.001	<LoD	4.73 ±0.591
16	<LoD	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	-
17	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	-
18	<LoQ	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoQ	<LoD	-
19	1.06 ± 0.152	<LoD	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoD	<LoD	1.18 ±0.157
20	<LoD	0.12 ± 0.004	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	0.12 ±0.004
21	0.01 ± 0.001	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	1.39 ±0.052
22	<LoQ	< LOD	< LOD	<LoQ	< LOD	< LOD	< LOD	-
23	1.48 ± 0.188	0.77 ± 0.346	< LOD	0.13 ± 0.008	0.55 ± 0.015	0.27 ± 0.002	< LOD	5.49 ±0.813
24	< LOD	0.82 ± 0.061	< LOD	0.01 ± 0.001	< LOD	< LOD	< LOD	0.92 ±0.063
25	< LOD	< LOD	< LOD	<LoQ	< LOD	< LOD	< LOD	0.17 ±0.001
26	0.79 ± 0.024	<LoQ	< LOD	< LOD	0.06 ± 0.001	0.22 ± 0.014	< LOD	1.94 ±0.226
27	1.28 ± 0.988	< LOD	< LOD	<LoQ	0.24 ± 0.001	0.17 ± 0.003	1.35 ± 0.058	4.32 ±1.138
28	<LoQ	<LoQ	< LOD	<LoQ	< LOD	< LOD	< LOD	0.35 ±0.116
29	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	-
30	0.48 ± 0.001	0.27 ± 0.005	< LOD	<LoQ	< LOD	< LOD	< LOD	0.91 ±0.018

Tabella 5.6 Identificazione e quantificazione delle cumarine (mg L⁻¹ ± deviazione standard) nei profumi analizzati.

N°	Auraptene	Citroptene	Coumarina	Epossiauraptene	Herniarin	Isomeranzin	Meranzin	Meranzina idrata	5-Geraniossi-7-metossicoumarina	Totale
1	<LoD	<LoQ	0.98 ± 0.42	<LoD	0.08 ± 0.002	<LoD	0.04 ± 0.008	1.11 ± 0.019	<LoD	2.21 ± 0.071
2	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	-
3	<LoD	<LoQ	0.04 ± 0.007	<LoD	0.31 ± 0.009	<LoD	<LoD	1.61 ± 0.036	<LoQ	1.96 ± 0.052
4	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	0.018 ± 0.001	<LoD	<LoD	0.018 ± 0.001
5	<LoD	<LoD	1.26 ± 0.067	<LoD	<LoD	<LoD	0.12 ± 0.002	1.49 ± 0.03	<LoQ	2.87 ± 0.03
6	<LoD	0.09 ± 0.004	<LoD	<LoD	0.02 ± 0.003	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	0.11 ± 0.007
7	<LoD	0.02 ± 0.004	0.06 ± 0.004	<LoD	0.12 ± 0.009	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	0.20 ± 0.017
8	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	LoD	-
9	<LoD	0.36 ± 0.019	0.13 ± 0.009	<LoD	<LoD	<LoD	0.02 ± 0.004	<LoD	0.34 ± 0.007	0.85 ± 0.039
10	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	-
11	0.02 ± 0.008	0.05 ± 0.007	0.06 ± 0.066	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	0.13 ± 0.081
12	0.08 ± 0.004	<LoQ	0.93 ± 0.068	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	1.01 ± 0.072
13	0.05 ± 0.006	0.96 ± 0.069	0.03 ± 0.012	<LoD	0.09 ± 0.021	<LoD	<LoD	<LoD	1.72 ± 0.083	2.85 ± 0.191
14	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	-
15	0.02 ± 0.009	<LoQ	0.05 ± 0.004	<LoD	0.17 ± 0.007	<LoD	<LoD	-	1.11 ± 0.059	1.35 ± 0.079
16	<LoQ	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	-
17	<LoD	<LoQ	<LoD	>LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	-
18	<LoQ	<LoQ	0.04 ± 0.003	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	0.04 ± 0.003
19	<LoD	0.02 ± 0.004	0.04 ± 0.002	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	0.12 ± 0.023	0.18 ± 0.029
20	<LoQ	1.51 ± 0.159	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	1.51 ± 0.159
21	<LoD	<LoD	0.05 ± 0.002	<LoD	0.15 ± 0.003	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	0.20 ± 0.005
22	<LoD	<LoQ	0.05 ± 0.032	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	0.05 ± 0.032
23	0.02 ± 0.014	1.09 ± 0.034	0.53 ± 0.072	<LoD	0.07 ± 0.044	<LoD	<LoD	<LoD	1.31 ± 0.139	3.02 ± 0.303
24	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	-
25	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	-
26	0.01 ± 0.001	1.08 ± 0.038	<LoD	0.98 ± 0.059	0.28 ± 0.012	1.05 ± 0.027	1.88 ± 0.119	<LoD	0.09 ± 0.029	5.37 ± 0.285
27	0.09 ± 0.056	0.55 ± 0.009	0.07 ± 0.087	<LoD	0.55 ± 0.019	0.37 ± 0.006	0.18 ± 0.012	<LoD	1.17 ± 0.426	2.98 ± 0.615
28	<LoD	<LoD	0.04 ± 0.012	<LoD	0.28 ± 0.001	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	0.32 ± 0.001
29	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	-
30	<LoD	<LoD	1.03 ± 3.079	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	1.03 ± 3.079

Tabella 5.7 Identificazione e quantificazione dei polimetossiflavoni ($\text{mg L}^{-1} \pm$ deviazione standard) nei profumi analizzati.

N°	Nobiletina	Sinensetina	Tangeretina	Tetra-O-metillscutellarein	Totale
1	0.18 ± 0.288	0.68 ± 0.009	0.56 ± 0.065	0.07 ± 0.029	1.49 ± 0.391
2	0.67 ± 0.035	<LoQ	1.23 ± 0.125	<LoD	0.90 ± 0.160
3	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoD	-
4	0.87 ± 0.635	<LoD	<LoD	<LoQ	0.87 ± 0.635
5	0.19 ± 0.007	<LoQ	0.07 ± 0.001	<LoQ	0.26 ± 0.008
6	0.33 ± 0.044	0.57 ± 0.011	0.33 ± 0.031	0.18 ± 0.011	1.41 ± 0.097
7	<LoQ	<LoQ	<LoD	<LoQ	-
8	<LoD	<LoD	<LoQ	<LoQ	-
9	<LoD	<LoD	<LoQ	<LoD	-
10	0.133 ± 0.017	0.912 ± 0.046	<LoD	<LoQ	1.045 ± 0.046
11	3.48 ± 0.579	3.72 ± 0.076	5.57 ± 0.323	6.28 ± 0.185	19.05 ± 1.163
12	0.33 ± 0.054	0.77 ± 0.001	0.14 ± 0.011	0.13 ± 0.082	1.37 ± 0.148
13	6.26 ± 0.379	2.89 ± 0.180	4.87 ± 0.294	<LoD	14.02 ± 0.853
14	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	-
15	0.76 ± 0.006	<LoD	<LoQ	<LoD	0.76 ± 0.006
16	<LoQ	<LoD	<LoQ	<LoD	-
17	<LoQ	<LoD	<LoD	<LoD	-
18	1.79 ± 0.361	<LoD	1.19 ± 0.492	0.69 ± 0.031	3.67 ± 0.884
19	0.16 ± 0.025	<LoQ	<LoQ	0.74 ± 0.421	0.90 ± 0.446
20	<LoQ	<LoQ	<LoD	<LoD	-
21	0.16 ± 0.019	<LoQ	0.17 ± 0.012	<LoD	0.33 ± 0.031
22	<LoQ	<LoD	<LoQ	<LoD	-
23	0.43 ± 0.001	<LoQ	0.26 ± 0.082	<LoQ	0.69 ± 0.821
24	<LoQ	<LoD	<LOD	<LoD	-
25	<LoQ	<LoQ	<LOD	<LoD	-
26	9.01 ± 0.468	<LoD	3.17 ± 0.123	2.55 ± 0.668	14.73 ± 1.259
27	6.76 ± 0.147	1.67 ± 0.062	2.96 ± 0.144	2.31 ± 0.059	13.69 ± 0.412
28	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	-
29	<LoD	<LoD	<LoD	<LoQ	-
30	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	-

5.4 Conclusioni

Il nuovo metodo SFC-QqQ-MS sviluppato, ha dimostrato di essere un valido approccio analitico per analisi di ventotto CEO selezionati negli oli essenziali di agrumi pressati a freddo e in trenta profumi aromatizzati agli agrumi.

E' stata ottenuta una rapida separazione di tutti i composti, in meno di otto minuti, utilizzando basse concentrazioni di MeOH. Tutti i parametri di validazione sono risultati soddisfacenti, con bassi valori di LoQs, che potrebbero consentire la quantificazione di queste molecole anche quando sono presenti in tracce.

I profili quali-quantitativi ottenuti dei tredici oli essenziali analizzati risultano essere abbastanza coerenti con i dati presenti in letteratura, quindi è possibile affermare che il nuovo metodo è una valida strategia adatta per il controllo qualità degli CEO negli oli essenziali di agrumi.

Per quanto riguarda i trenta profumi aromatizzati agli agrumi analizzati, i risultati ottenuti sono conformi con i regolamenti forniti dall' IFRA e dal Parlamento Europeo, il nuovo metodo ha garantito la quantificazione di ogni furocoumarina e cumarina entro i limiti di concentrazione proposti.

La cumarina è stata trovata nella maggior parte dei campioni analizzati, perché è molto utilizzata nell'industria cosmetica per fissare gli aromi. I PMF sono stati quantificati nella maggior parte dei campioni suggerendo l'uso di oli essenziali di pompelmo spremuto a freddo, mandarino e arancia dolce come ingrediente principale. Nessuna delle fragranze analizzate ha mostrato un livello di concentrazione di furocoumarine superiore al limite stabilito dal regolamento dell'IFRA.

E' possibile concludere affermando che il nuovo metodo SFC-QqQ-MS sviluppato consente di ridurre il consumo di solventi e il tempo complessivo di analisi, mantenendo allo stesso tempo un elevato potere di separazione e buone capacità di identificazione e quantificazione attraverso l'uso di dati MS in tandem.

Riferimenti bibliografici

- [1] Russo M., Rigano F., Arigò A., Dugo P., Mondello L. (2021) Coumarins, psoralens and polymethoxyfavones in cold-pressed *Citrus* essential oils: a review. *Journal of Essential Oil Research*
- [2] Dugo, P., Mondello, L., Stagno d'Alcontres I., Cavazza A., and Dugo, G. (1997). Oxygen heterocyclic compounds of *Citrus* essential oils. *Perf. Flav.* 22 (1):25-30.
- [3] Hung WL., Suh JH., Wang Y. (2017). Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit. *Journal of Food and Drug Analysis*.
- [4] Lin N., Sato T., Takayama Y., Mimaki Y., Sashida Y., Yano M., Ito A. (2003) Novel antiinflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy favonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochemical Pharmacology*.
- [5] Scott BR., Pathak MA., Mohn GR. (1976). Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.
- [6] Serrano-Pérez JJ., Olasso-González G., Merchan M., Serrano-Andrés L. (2009). Singlet oxygen generation in PUVA therapy studied using electronic structure calculations. *Journal of Chemical Physics*.
- [7] European Parliament, Official Journal of the European Union, L 342 (2009) 59, 22.12.2009. Regulation (EC) No. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (recast). <https://eur-lex.europa.eu>. Accessed 07 Feb 2022.
- [8] European Parliament, Official Journal of the European Union, L 354 (2008) 34, 31.12.2008. Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Council Regulation (EEC) No. 1601/91, Regulations (EC) No. 2232/96 and (EC) No. 110/2008 and Directive 2000/13/EC. <https://eur-lex.europa.eu>. Accessed 07 Feb 2022.
- [9] International Fragrance Association (IFRA). IFRA Standard. 49th Amendment – Citrus Oils and Other Furocoumarins Containing Essential Oils. 2020. <http://www.ifraorg.org> (17 October 2022).

- [10] International Fragrance Association (IFRA). IFRA Standard. 49th Amendment – Citrus Oils and Other Furocoumarins Containing Essential Oils. 2020. <http://www.ifraorg.org> (17 October 2022).
- [11] Zoccali M., Donato P., Mondello L. (2019). Recent advances in the coupling of carbon dioxide-based extraction and separation techniques. *Trends in Analytical Chemistry*.
- [12] Magnusson B., Örnemark U., editors. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. 2014.12
- [13] Desmorteux C., Rothaupt M., Westb C., Lesellier E. (2009). Improved separation of furocoumarins of essential oils by supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*.
- [14] Magnusson B., Örnemark U., editors. (2014). The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. 2014.
- [15] Russo M., Bonaccorsi I., Costa R., Trozzi A., Dugo P., Mondello L. (2015). Reduced time HPLC analyses for fast quality control of citrus essential oils. *Journal of Essential Oil Research*.
- [16] Arigò A, Dugo P, Rigano F, Mondello L. (2021). Linear retention index approach applied to liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry to determine oxygen heterocyclic compounds at trace level in finished cosmetics. *Journal of Chromatography A*.
- [17] Loncar M., Jakovljevic M., Šubaric D., Pavlic M., Služek VB., Cindric I., Molnar M. (2020). Coumarins in food and methods of their determination. *Food*.
- [18] Potka-Wasyłka J. (2018). A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta*.
- [19] Rigano F., Russo M., Arigò A., Dugo P., Mondello L. (2020) Combining linear retention index and electron ionization mass spectrometry for a reliable identification in nano liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*.

Elenco Pubblicazioni:

- Touria Lechhab, Farida Salmoun, Wafaê Lechhab, Yassine Oulad El Majdoub, Marina Russo, Maria Rita Testa Camillo, Emanuela Trovato, Paola Dugo, Luigi Mondello e Francesco Cacciola. *Determination of bioactive compounds in extra virgin olive oils from 19 Moroccan areas using liquid chromatography coupled to mass spectrometry: a study over two successive years*. European Food Research and Technology, (2021).
- Mariosimone Zoccali, Marina Russo, Maria Rita Testa Camillo, Fabio Salafia, Peter Q. Tranchida, Paola Dugo e Luigi Mondello. *On-line coupling of supercritical fluid extraction with enantioselective supercritical fluid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry for the determination of chiral pesticides in hemp seeds: A proof-of-principle study*. Food Chemistry 373 (2022) 131418.
- Adriana Arigò, Marina Russo, Maria Rita Testa Camillo, Paola Dugo, Luigi Mondello e Mariosimone Zoccali. *Supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry of oxygen heterocyclic compounds in Citrus essential oils*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2022.
- Emanuela Trovato, Marina Russo, Lorenzo Cucinotta, Yassine Oulad El Majdoub, Maria Rita Testa Camillo, Gemma De Grazia, Adriana Arigò, Danilo Sciarrone, Luigi Mondello e Paola Dugo. *Quality Evaluation of Flavoured Extra-Virgin Olive Oils According to Their Chemical Composition*. Food Analytical Methods, 2023.
- Maria Rita Testa Camillo, Marina Russo, Alessandra Trozzi, Luigi Mondello e Paola Dugo. *Quantification of coumarins, furocoumarins and polymethoxyflavones in hydroalcoholic fragrances by supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Essential Oil Research, 2023.

- Marina Russo, Maria Rita Testa Camillo, Roberta La Tella; Francesca Rigano; Paola Donato; Luigi Mondello; Paola Dugo. Principles and applications of porous graphitic carbon stationary phase in liquid chromatography: an update. Journal of Chromatograph A, 2024.

