

# & ALIMENTI & BEVANDE

IGIENE • SICUREZZA • CONTROLLI

Anno XIX - Supplemento monotematico del n. **9** Novembre-Dicembre 2017

## INGREDIENTI ALIMENTARI: ETICHETTATURA, SICUREZZA E ANALISI



# Matrici alimentari

## Innovazione di tecniche strumentali chimico-fisiche

Fondamentali velocità, semplicità e sensibilità (ma non solo)

di *Manuela Giordano*

Ricercatore, Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA), Università degli Studi di Torino

***Nell'ambito del controllo qualità, della sicurezza e della tracciabilità alimentare, l'implementazione delle tecniche per le analisi strumentali chimico-fisiche ha visto recentemente soluzioni nuove o a configurazioni migliorate. Obiettivo: ottenere misurazioni sempre più sensibili, ad alta specificità e risoluzione***

L'innovazione delle tecniche per le analisi strumentali chimico-fisiche, da un lato, richiede sempre più velocità, semplicità ed automazione strumentale e, dall'altro, necessita di una più alta sensibilità, robustezza e specificità di analisi.

Quando si procede con un metodo analitico valido per qualsiasi tipologia di analisi, il flusso di lavoro è generalmente caratterizzato da step successivi a cascata tra loro, sia in termini di progettazione che di applicazione:

- campionamento;
- conservazione del campione;

- preparazione del campione;
- calibrazione sia strumentale che analitica;
- analisi (misura analitica);
- decisione sui segnali da utilizzare;
- processamento dei dati.

Focalizzandoci sullo step di analisi, le tecniche strumentali sono sempre soggette a nuove implementazioni, sapendo che la selezione della tecnica strumentale dipende dalle proprietà chimico-fisiche delle sostanze da ricercare e dalla loro concentrazione.

### **Metodi di separazione cromatografica e di rilevazione**

La cromatografia, sia gassosa che liquida, ha lo scopo di separare le specie chimiche. Il segnale strumentale viene fornito solo dal rivelatore (*detector*), in relazione ad una specifica proprietà chimico-fisica e della sua quantità, dal quale si genera il segnale analitico.

Una tecnica di separazione cromatografica, quindi, necessita sempre di un rivelatore, dove la scelta dell'unità cromatografica e di rilevazione dovrebbe essere progettata in modo congiunto.

## La cromatografia, sia gassosa sia liquida, ha lo scopo di separare le specie chimiche

Attualmente, mediante la cromatografia esistono due differenti tipi di approcci che si possono utilizzare per un controllo qualità. Il primo è analizzare un profilo cromatografico ben preciso (*target* dell'analisi), dove si ottiene una specifica informazione su particolari componenti chimiche; il secondo utilizza la strategia dell'*untarget* analisi (*fingerprinting*, carta di identità), dove si va alla ricerca di un'ampia complessità di metaboliti, anche sconosciuti, ricavati in modo non specifico, ma rilevati con un'alta sensibilità strumentale.

Quest'ultima modalità permette di paragonare "impronte digitali" di metaboliti che cambiano in risposta ad un qualsiasi processo esterno (tecnologico, genetico od ambientale), presentando informazioni non specifiche e subito non evidenti, che devono essere successivamente estratte con strumenti chemiometrici.

### Gascromatografia (GC)

In tali ambiti, la tecnica gascromatografica monodimensionale (1D) con eluizione tradizionale o *fast* è lo strumento fino ad oggi più utilizzato. La sua evoluzione è caratterizzata da una gas cromatografia bidimensionale 2D (GC×GC). Questa rappresenta un normale sviluppo delle separazioni convenzionali, portando ad un'aumentata capacità di separazione, caratterizzata da due colonne in sequenza, mediante l'ausilio di una combinazione di fasi stazionarie differenti (colonne a bassa polarità/alta polarità, moderata polarità/polari), al fine di incrementare la potenzialità del profilo di componenti volatili o semi-volatili risolti.



La cromatografia liquida ad alta prestazione è ormai sempre più automatizzata.

### Cromatografia liquida (LC)

La cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) è ormai sempre più automatizzata. La principale implementazione consiste, inoltre, nella messa a punto di nuove fasi stazionarie con nanoparticelle regolari, non porose, di dimensioni anche al di sotto dei 2  $\mu\text{m}$ , che hanno permesso di mettere a punto cromatografi ad ultra alta prestazione (UHPLC) di nuova generazione. L'implementazione di nuove fasi stazionarie ha così aumentato l'efficienza in termini di piatti teorici e della velocità d'analisi. In sostituzione al rilevatore evaporativo a luce diffusa (ELSD), il sistema di rilevazione ad aerosol caricato elettrostaticamente (CAD) è utilizzabile dopo un'analisi cromatografica liquida. Applicato, ad oggi, soprattutto nel campo dei lipidi alimentari, il CAD fornisce risposte riguardo a molecole non volatili e semi-volatili caratterizzate dall'assenza di gruppi cromofori o che non sono ionizzabili in fase gassosa. Il nuovo rilevatore lavora a temperatura ambiente, basandosi sul principio dell'effetto corona, dove il solvente viene nebulizzato in presenza di un flusso d'azoto.

Sono stati messi a punto, inoltre, innovativi sistemi fotometrici automatizzati adatti ad

analisi simultanee di diversi parametri chimici (acidi, zuccheri, solfiti eccetera) per mezzo di misure colorimetriche, enzimatiche ed elettrochimiche basate sui metodi di riferimento internazionali.

### Tecniche a spettrometria di massa (MS)

Gli strumenti di gascromatografia accoppiati alla spettrometria di massa a singolo quadrupolo (GC-qMS), utili per un controllo qualità anche di screening, sono stati innovati sul mercato mediante configurazioni con evoluti iniettori adatti ad una facile manutenzione e soprattutto ad elevatissimi risparmi del gas di trasporto durante l'iniezione rispetto alle configurazioni tradizionali, con modularità grazie anche alla possibilità di iniezione diretta (analisi *untarget*), e con nuove sorgenti più stabili e meno "sporcabili" per migliorare il segnale.

L'implementazione mediante la tecnica di frammentazione è la piattaforma spettrometrica con tripli quadrupoli in tandem (QqQMS), adatta ad aumentare sensibilità e selettività del segnale, eliminando l'interferenza di composti coeluiti e/o della matrice. Tali geometrie permettono di quantificare in modo robusto gli analiti che si vogliono cercare in matrici complesse e di abbattere la tecnica separativa e/o della tecnica di preparazione del campione a monte, oltre ad aumentare il rapporto segnale-rumore simile ad uno spettrometro di massa a tempo di volo (TOF).

Nell'ambito della tracciabilità alimentare, si fa uso della spettrometria di massa dei rapporti isotopici (IR/MS). Nuovi analizzatori elementari (EA), anche utilizzati per la determinazione di azoto e contenuto proteico mediante il metodo Dumas, vengono ormai accoppiati alla spettrometria di massa isotopi-

pica (EA-IR/MS). Un esempio di utilizzo di tale tecnica per la ricerca di frodi nel settore vitivinicolo è il metodo ufficiale (Oeno 353/2009: OIV-MA-AS2-12) dell'Oiv (*Office International de la Vigne et du Vin*) riguardo alla determinazione del rapporto isotopico  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  dell'acqua.

### Gli spettrometri di massa a settore magnetico e ad alta risoluzione hanno avuto un forte aumento di utilizzo nel campo della ricerca per il riconoscimento di molecole sconosciute

Il controllo qualità negli alimenti di elementi in tracce e delle specie associate può avvalersi della spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) in abbinamento alla cromatografia liquida, gassosa o ionica oppure per iniezione diretta mediante digestione del campione. Tecniche più evolute ad alta speciazione, ad esempio per la ricerca di nanomateriali da imballaggio, sono rappresentate da ICP tandem (ICP-MS/MS) oppure strumenti a tripli quadrupoli in sequenza, favorendo l'eliminazione delle interferenze poliatomiche soprattutto per campioni più complessi che agiscono da filtro fisico.

Gli spettrometri di massa a settore magnetico e ad alta risoluzione (HR-MS), applicati soprattutto per la ricerca di contaminanti come le diossine e dei nuovi inquinanti organici persistenti (POP) con tecnologia ad analizzatore a tempo di volo o Orbitrap, generalmente abbinati alla cromatografia liquida, hanno avuto un forte aumento di utilizzo nel campo della ricerca soprattutto *untarget* per il riconoscimento di molecole sconosciute. Un'innovazione tecnologica per l'analisi di specie ioniche, organiche ed inorganiche è

l'interfacciamento della cromatografia ionica (IC) con la spettrometria di massa (IC-MS) mediante analizzatori a singolo quadrupolo, a tre singoli quadrupoli in tandem e ad alta risoluzione (IC-HR/MS), permettendo di analizzare o solo sistemi anionici o cationici o entrambi.

## Tecniche spettroscopiche

L'industria alimentare, nell'ultimo decennio, richiede anche tecniche efficienti e non distruttive in aggiunta alle metodiche ufficiali classiche, che possono presentare lunghe e standardizzate tecniche di preparazione del campione che richiedono personale specializzato e risultano inadatte ad essere utilizzate on line durante il processamento alimentare. Le tecniche spettroscopiche nel vicino infrarosso (NIR), medio infrarosso (MIR) e lontano infrarosso (FIR) permettono di determinare differenti proprietà chimico-fisiche, senza quasi pretrattamento del campione. La tecnica NIR (780-2500 nm) è utile per analisi quantitative di miscele complesse, dove le molecole ricercate forniscono risposte vibrazionali di specifici legami chimici (C-H, N-H, S-H, O-H).

### Analisi di immagini iperspettrali (HSI)

Nel settore agroalimentare sta prendendo piede un'evoluzione ed abbinamento del NIR con l'analisi dell'immagine nell'intervallo visibile-NIR (400-1000 nm) o solo NIR (1000-1700 nm), tecnica ottica di non contatto, applicabile on line, su campioni sia solidi che liquidi di differenti prodotti alimentari e di packaging. Risulterebbe adatta ad ispezionare qualitativamente la composizione del valore nutritivo, indici chimici (umidità, proteine, acidità, indice di perossidi, pH eccetera) e parametri chimico-fisici legati a difettosità e alla classificazione (colore, tenerezza, costituenti

chimici specifici, microstrutture del prodotto). Il vantaggio è l'unione della tecnica spettroscopica con l'analisi convenzionale dell'immagine (*imaging*), che consente di fornire una sorta di fotografia chimica in tre dimensioni (3D) del campione, non visibile ad occhio nudo, dove ogni pixel è associabile ad uno spettro completo. Successivamente si deve utilizzare un'analisi multivariata per processare i dati spettrali, consci che ci sono ancora limiti di sensibilità rispetto alle metodiche strumentali tradizionali.

### Immagine chimica mediante spettroscopia Raman (RCI)

La spettroscopia Raman consente di rilevare segnali di bassa frequenza, sia vibrazionali che rotazionali, di legami covalenti e viene usata per ottenere un'impronta di quelle molecole (anche adulteranti e contaminanti) che possono essere identificate e localizzate, basandosi sulla dispersione inelastica o Raman



L'unione della spettroscopia Raman con l'analisi dell'immagine digitale è una nuova tecnica per analizzare la distribuzione spaziale di parametri di qualità e la composizione chimica in materiali alimentari (nella foto, uno spettrometro Raman).

scattering della luce laser monocromatica.

L'unione della spettroscopia Raman con l'analisi dell'immagine digitale è una nuova tecnica per analizzare la distribuzione spaziale di parametri di qualità e la composizione chimica in materiali alimentari.

Le limitazioni di risposta debole del segnale e di interferenza del fenomeno della fluorescenza sono attenuate dalla configurazione a "spettroscopia Raman amplificata da superfici", che permette di ottenere informazioni e dettagli spaziali di distribuzione e rilevare molecole *target* in tracce.

### Risonanza magnetica nucleare (NMR)

Accanto alla spettroscopia di risonanza magnetica nucleare convenzionale ad alta risoluzione utilizzata per lo più nel campo della ricerca, la tecnica di risonanza magnetica nucleare NMR a bassa risoluzione pulsata con nuovi strumenti portatili (unilaterali) è una tecnica a geometria aperta per studiare in contemporanea le proprietà dinamiche della materia.

Essa fornisce informazioni sull'organizzazione molecolare e sulla struttura di fase (cambiamenti strutturali, fenomeni di legame o associazioni molecolari).

Una recente evoluzione dell'NMR è rappresentata da strumenti mobili e compatti a geometria aperta (NMR-MOUSE) che permettono di misurare comportamenti di rilassamento e coefficienti di auto-diffusione molecolare, utili, per esempio, a rilevare eventuali adulterazioni (come indicato nel metodo ISO 8292-2:2008 per quanto riguarda gli oli).

### L'unione della spettroscopia Raman e dell'NMR può rapidamente ed accuratamente valutare eventuali adulterazioni di alimenti

L'unione della spettroscopia Raman e dell'NMR può rapidamente ed accuratamente valutare eventuali adulterazioni di alimenti. L'innovazione necessita di sforzi nel far confluire sempre più i risultati di due o più tecniche strumentali e il processamento dei dati. Ad esempio, ampi profili *untarget* (*fingerprinting*) ottenuti con sistemi convenzionali GC-MS e <sup>1</sup>H-NMR, seguiti da analisi multivariate dei dati, come l'analisi delle componenti principali (PCA), permettono di esaminare possibili raggruppamenti di campioni e di ridurre la dimensionalità dei dati, costruendo dei modelli predittivi di controllo qualità.

### Tecniche a sensori

#### Naso elettronico (E-NOSE)

Accanto ai metodi di controllo sopra specificati, i sensori a naso elettronico commerciali, anche portatili, sono in continuo sviluppo per il tipo ed il numero di sensori (ad oggi, almeno nove differenti tipologie), capaci di emettere uno specifico profilo odoroso in risposta all'interazione con il pool di molecole volatili in equilibrio con il campione. Questa flessibilità di configurazione e versatilità, in un contesto di ricerca di difetti organolettici, contaminazione microbiologica e fungina, richiede una buona conoscenza di eventuali vantaggi e svantaggi del tipo di sensore da scegliere in funzione di ciò che si vuole cercare. Sforzi tecnologici vengono attualmente rivolti a risolvere criticità nella riproducibilità di studi a lungo-termine.

### Conclusioni

L'innovazione strumentale è principalmente rivolta ad ottenere segnali sempre più sensibili, specifici, veloci ed automatizzabili, dove

tutte le fasi precedenti e successive all'analisi hanno pari importanza rispetto alla tecnica strumentale.

**Si auspicano soluzioni strumentali a più basso costo, energeticamente efficienti, implementabili con aggiornamenti di hardware e software**

La tendenza è sempre più l'unione dei risultati di due o più tecniche di analisi in abbinamento a metodi statistici al fine di rendere scientificamente più attendibile ogni tipo di controllo sia

a supporto delle analisi ufficiali che in un contesto di ricerca e sviluppo.

Si auspicano soluzioni strumentali a più basso costo, energeticamente efficienti, implementabili con eventuali aggiornamenti di hardware e di software.

*Questa rassegna vuole essere un mero, anche se non esaustivo, elenco dell'evoluzione di alcune tecniche strumentali applicate all'ampia variabilità delle matrici alimentari, tenendo presente che ogni tecnica di preparazione del campione che non è stata trattata si avvale della stessa importanza dello step di analisi.*



Si tende sempre più ad unire i risultati di due o più tecniche di analisi, abbinandoli a metodi statistici, rendendo così scientificamente più attendibile ogni tipo di controllo.