



INANOIL Solution

Caratterizzazione degli oli d'oliva ai sensi del regolamento CEE N.2568/91 e successive modifiche. Analisi con automazione esaustiva della preparazione del campione

Introduzione

L'attuale legislazione comunitaria prevede criteri oggettivi volti alla classificazione delle varie tipologie di oli di oliva (extra vergini, vergini, lampanti, raffinati). Tali criteri sono esplicitati dal regolamento CEE N. 2568/91, con riferimento all'ultima revisione del 20/10/2019.

Ascrivere ciascun olio alla corretta classe di appartenenza è di fondamentale importanza per:

- garantire la commercializzazione di oli di oliva rispondenti alle caratteristiche dichiarate in etichetta
- evitare potenziali sofisticazioni, anche di natura dolosa
- tutelare in ultima analisi la salute e gli interessi del consumatore finale.

Gli allegati II÷XX del regolamento definiscono le metodiche analitiche relative alla quantificazione dei parametri di interesse; molte di queste prevedono laboriose preparazioni del campione, grandi quantità di solventi e materiali di consumo, oltre che l'impiego per lungo tempo di operatori qualificati.

SRA Instruments, in collaborazione con il Centro Analisi Biochimiche Sas, sulla base delle metodiche in uso, propone una **serie di soluzioni analitiche basate su piattaforma GERSTEL, in grado di automatizzare integralmente le fasi di sample-prep, che ottimizzano tempi, risorse e materiali.**

Le stazioni robotiche sono in grado di automatizzare, in maniera integrale, il processo di preparazione del campione e le successive analisi volte a determinare, rispettivamente, il contenuto di:

- 1. alchilesteri e cere**
- 2. steroli, dialcoli triterpenici e alcoli alifatici**
- 3. stigmastadieni.**

L'automazione robotica minimizza l'errore umano e potenzia il controllo qualità (QC) su ogni batch. Il risultato è un incremento della produttività unito alla massima affidabilità del dato analitico.

Automazione del metodo

Il principio guida della soluzione consiste nell'eliminazione delle tecniche preparative offline (LC, TLC, LLE), sostituendole con una separazione delle frazioni di interesse automatizzata via HPLC. Nello specifico, l'accurata ottimizzazione dei parametri cromatografici consente di rendere estremamente ripetibili i tempi di eluizione delle varie classi.



Alchilesteri e cere: automazione integrale del processo di preparazione del campione e analisi

Le tecniche preparative off-line (LC, LLE), sono sostituite con una separazione delle frazioni di interesse automatizzata via HPLC, figura 1.

L'accurata ottimizzazione dei parametri cromatografici consente di rendere estremamente ripetibili i tempi di eluizione di metil/etil esteri e cere.

Il prelievo di tale frazione e la successiva iniezione in modalità LVI-COC-FID fornisce immediatamente il dato analitico, limitando l'intervento dell'operatore al semplice avvio della sequenza di analisi.

Efficacia dell'automazione

Per rendere evidenza dell'incremento di produttività, con contestuale drastica riduzione di solvente e materiali di consumo necessari, nella tabella di seguito viene riportata la comparazione tra il metodo tradizionale (All. XX al regolamento CEE N. 2568/91) e quello implementato sulla piattaforma INANOIL.

Un ulteriore vantaggio del sistema è la raccolta selettiva di una delle due frazioni, utile per:

- allineare il metodo all'Allegato IV (Reg. CEE 2568/91), ottimizzando tempi e consumi di solventi e silice grazie alla raccolta della sola frazione "cere"
- eliminare le interferenze di matrice che ostacolano il dosaggio degli alchilesteri, isolando selettivamente la frazione d'interesse.

Nel caso della sola analisi di alchilesteri, si ottiene un'ulteriore riduzione dei tempi di analisi (meno di 30 min per il singolo campione).

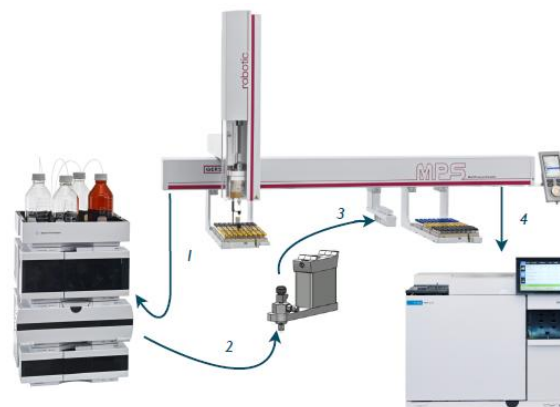


Fig. 1

Principio di funzionamento:

1. Iniezione del campione in HPLC
2. Raccolta della frazione di interesse
3. Stoccaggio in vial
4. Iniezione in GC

Performance analitiche

Sono state condotte una serie di verifiche sperimentali utilizzando come campione di controllo un olio vergine di riferimento, il cui tenore in alchilesteri e cere è certificato dal circuito interlaboratorio della Camera di Commercio di Bari – Azienda Speciale Samer Ring Test. N. 62 (RT62).

Il risultato del batch di validazione su una serie di 10 ripetute, evidenzia la assoluta affidabilità del dato in termini di accuratezza e precisione.

Validazione cere	
Average 3.70	St.: Dev.: 5.1
Valore di riferimento (RT62) cere = 221.0 mg/Kg	
BIAS = 0.25 %	CV _r % = 2.32%

Validazione Alchilesteri	
Average 3.70	St.: Dev.: 0.5
Valore di riferimento (RT62) FAEE = 36.2 mg/Kg	
BIAS = 2.18%	CV _r % = 1.51%

Analisi completa alchilesteri & cere	Metodo tradizionale	Automazione HPLC/GC
Preparativa a carico dell'operatore	Preparazione colonna per LC Caricamento e eluizione campione Evaporazione a secchezza Ripresa con solvente	Diluizione del campione iniziale
Volume di solvente per campione	~ 300 ml (oltre a 15 g di silice pre-condizionata)	~ 20 ml
Volume di solvente per un batch di 10 campioni	~ 3000 ml (oltre a 150 g di silice pre-condizionata)	~ 200 ml
Tempo per processare un singolo campione	~ 2 h	<1 h
Tempo per processare un batch di 10 campioni	~ 12 h, di cui ~ 4 necessarie alla preparativa in batch	~ 8 h di cui ~ 30 minuti necessari alla preparativa in batch

Steroli e alcoli: automazione integrale del processo di preparazione del campione e analisi

Le tecniche preparative off-line (LC, TLC, LLE), sono sostituite con una separazione delle frazioni di interesse automatizzata via HPLC, figura 2.

L'accurata ottimizzazione dei parametri cromatografici consente di rendere estremamente ripetibili i tempi di eluizione delle varie classi (alcoli alifatici e steroli/dialcoli triterpenici).

La versatilità delle piattaforme MPS RoboticPRO consente inoltre di estendere l'automazione del workflow includendo i necessari passaggi di evaporazione a secchezza e ripresa con derivatizzante. La successiva iniezione in modalità SSL-FID fornisce immediatamente il dato analitico, limitando l'intervento dell'operatore al semplice avvio della sequenza di analisi.

Efficacia dell'automazione

L'automazione della sample-prep inizia dalla frazione insaponificabile preparata in accordo con la metodica ufficiale (cfr Allegato XIX Parte 1). Tale frazione viene posizionata sul campionatore e processata in automatico evitando la procedura di separazione via TLC. La tabella seguente confronta il metodo tradizionale (All. XIX Reg. CEE 2568/91) con quello della piattaforma INANOIL, evidenziando l'aumento di produttività e la drastica riduzione di solventi e consumabili.

La soluzione SRA automatizza l'intero processo fino all'iniezione, con una separazione HPLC in meno di 5 minuti. Grazie alla sovrapposizione (overlap) delle corse HPLC e GC, i tempi morti vengono azzerati: la durata totale dell'analisi coincide, di fatto, con la sola corsa GC.

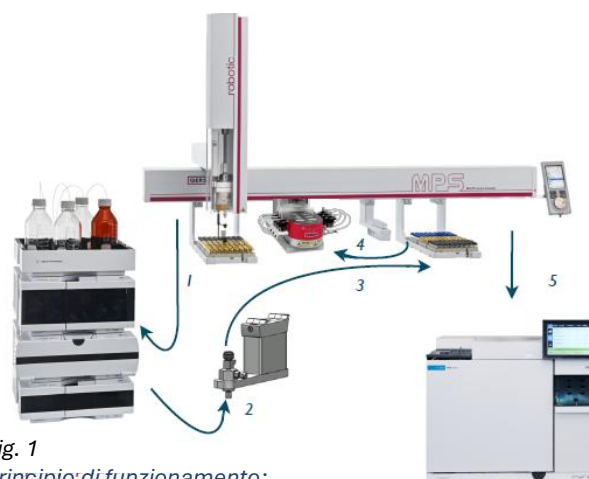


Fig. 1

Principio di funzionamento:

1. Iniezione del campione in HPLC
2. Raccolta della frazione di interesse
3. Stoccaggio in vial
4. Evaporazione a secchezza e derivatizzazione
5. Iniezione in GC

Analytical performance

Sono state condotte una serie di verifiche sperimentali utilizzando come campione di controllo un olio vergine di riferimento, il cui tenore in alcoli alifatici, steroli e dialcoli triterpenici è certificato dal circuito interlaboratorio della Camera di Commercio di Roma – Azienda Speciale Samer Ring Test. N. 62 (RT62). Il risultato del batch di validazione su una serie di 10 ripetute, evidenzia la assoluta affidabilità del dato in termini di accuratezza e precisione.

Validazione alcoli alifatici	
Average: 3.70	St.: Dev.: 4.0
Reference value (as per R T62) alcohols = 258.7 mg/Kg	
BIAS = 1.46%	CV _r % = 1.53%

Validazione steroli e dialcoli triterpenici	
Average 3.70	St.: Dev.: 25
Reference value (as per R T62) Sterols = 1447 mg/Kg	
BIAS = 1.73%	CV _r % = 1.74%

Complete analysis of sterols and alcohols	Traditional method	HPLC/GC automation
Preparativa a carico dell'operatore	Separazione TLC della frazione insaponificabile Evaporazione a secchezza Ripresa con derivatizzante	Posizionamento della frazione insaponificabile sull'autocampionatore
Volume di solvente per campione	> 1000 ml, in relazione alle dimensioni della camera di sviluppo, lastra TLC	~ 15 ml
Volume di solvente per un batch di 10 campioni	~ 3000 ml, 10 lastre TLC	~ 150 ml
Tempo per processare un singolo campione	~ 3 h	<1,5 h
Tempo per processare un batch di 10 campioni	~ 10 h, di cui ~ 4 necessarie alla preparativa in batch	7 h, di cui ~ 30 minuti necessari alla preparativa in batch

Stigmastadienes: full automation of the sample preparation and analysis process

Le tecniche preparative off-line (LC, LLE) sono sostituite con una separazione delle frazioni di interesse automatizzata via HPLC, figura 3.

Tale approccio analitico consente inoltre di eliminare lo step di saponificazione.

Nello specifico, l'accurata ottimizzazione dei parametri cromatografici consente di rendere estremamente ripetibili i tempi di eluizione della frazione contenente gli stigmastadieni, eliminando l'interferenza costituita dallo squalene.

Il prelievo di tale frazione e la successiva iniezione in modalità MMI-FID fornisce immediatamente il dato analitico, limitando l'intervento dell'operatore al semplice avvio della sequenza di analisi.

Efficacia dell'automazione

La Tabella 1 confronta il metodo tradizionale (All. XVII Reg. CEE 2568/91) con quello della piattaforma INANOIL, evidenziando l'incremento di produttività e la netta riduzione di solventi e consumabili.

La soluzione SRA automatizza l'intero processo fino all'iniezione, con una separazione HPLC in meno di 5 minuti. Grazie alla sovrapposizione (overlap) delle corse HPLC e GC, i tempi morti vengono azzerati: la durata totale dell'analisi coincide, di fatto, con la sola corsa GC.

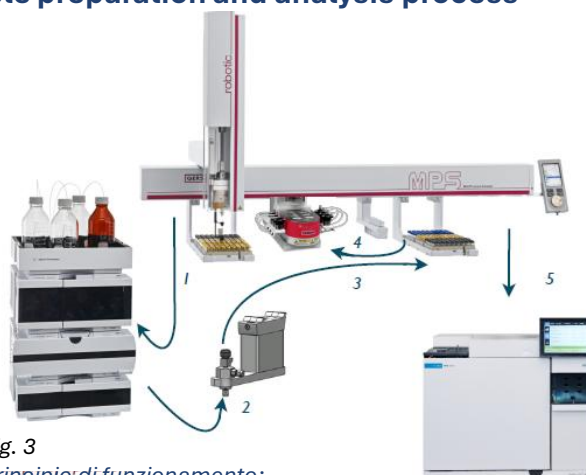


Fig. 3

Principio di funzionamento:

1. Iniezione del campione in HPLC
2. Raccolta della frazione di interesse
3. Stoccaggio in vial
4. Evaporazione a secchezza e ripresa con solvente
5. Iniezione in GC

Performance analitiche

Sono state condotte una serie di verifiche sperimentali utilizzando come campione di controllo un olio vergine di riferimento, la cui concentrazione di stigmastadieni è certificata dal circuito interlaboratorio della Camera di Commercio di Roma – Azienda Speciale Samer Ring Test. N. 62 (RT62). Il risultato del batch di validazione su una serie di 10 ripetute, evidenzia la assoluta affidabilità del dato in termini di accuratezza e precisione.

Validazione Stigma RT62	
Average: 3.70	St.: Dev.: 0.04
Valore di riferimento (R T62) Stigma = 3.70 mg/Kg	
BIAS = 1.66%	CV _r % = 1.16%

Validazione Stigma cut-off	
Average 3.70	St.: Dev.: 0.004
Valore di riferimento (RT62 dil 1/65) Stigma = 0.057 mg/Kg	
BIAS = 6.03%	CV _r % = 6.48%

Analisi completa stigmastadieni		HAutomazione HPLC/GC
Preparativa a carico dell'operatore	Saponificazione Preparazione colonna per LC Caricamento e eluizione campione Evaporazione a secchezza Ripresa con solvente	Diluizione del campione iniziale
Volume di solvente per campione	> 400 ml (oltre a 15 g di silice preconditionata)	<20 ml
Volume di solvente per un batch di 10 campioni	> 4000 ml (oltre a 150 g di silice pre-condizionata)	~ 200 ml
Tempo per processare un singolo campione	~ 3 h	<1 h
Tempo per processare un batch di 10 campioni	~ 15 h, di cui ~ 10 necessarie alla preparativa in batch	< 10 h di cui ~ 30 minuti necessari alla preparativa in batch

www.srainstruments.com