



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

### PARTE 1:

### Metil/Etil Esteri e Cere

L'attuale legislazione comunitaria prevede criteri oggettivi volti alla classificazione delle varie tipologie di oli di oliva (vergini, lampanti, raffinati, ecc.).

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 Centro Analisi Biochimiche, ha condotto uno studio approfondito delle metodiche in uso, arrivando a proporre sul mercato una serie di soluzioni analitiche in grado di automatizzare integralmente le fasi di sample-prep, con conseguente risparmio in termini di tempo, solvente e materiali.

L'impiego di stazioni robotiche consente inoltre di limitare enormemente la possibilità di incorrere in errori casuali, oltre che tenere sotto controllo il processo inserendo un elevato numero di QCs all'interno di un batch; in tal modo viene garantita non soltanto una elevata produttività, ma anche un dato finale estremamente affidabile in termini di precisione e accuratezza.

**La stazione robotica, oggetto della presente nota applicativa, è in grado di automatizzare, in maniera integrale, il processo di preparazione del campione e la successiva analisi volta a determinare il contenuto di alchilesteri e cere.**



### Automazione del metodo

Il principio guida della soluzione consiste nell'eliminazione delle tecniche preparative off-line (LC, TLC, LLE), sostituendole con una separazione delle frazioni di interesse automatizzata via HPLC, come schematizzato in figura 1.

Nello specifico, l'accurata ottimizzazione dei parametri cromatografici consente di rendere estremamente ripetibili i tempi di eluizione delle varie classi (metil/etil esteri e cere, nella fattispecie). 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, in tab. I viene riportata la comparazione tra il metodo tradizionale (All. XX al regolamento CEE N. 2568/91) e quello implementato sulla piattaforma proposta.

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)	~ 50 ml
volume di solvente per un batch di 10 campioni	~ 3000 ml (oltre a 150 g di silice pre-condizionata)	~ 500 ml
tempo necessario per processare un singolo campione	~ 2 h	< 1 h
tempo necessario per processare un batch di 10 campioni	~ 12 h, di cui ~ 4 necessarie alla preparativa in batch	~ 8 h

Un ulteriore vantaggio del sistema è la possibilità di raccogliere selettivamente una delle due frazioni allo scopo di:

- uniformare il metodo a quanto previsto dall'allegato IV al regolamento CEE N.2568/91, con analoghi vantaggi in termini di tempi e consumi di solventi e silice (raccolta della sola frazione "cere").
- eliminare il problema relativo alla presenza di elevate concentrazioni di interferenti di matrice, che potrebbero impedire il corretto dosaggio degli esteri alchici (raccolta della sola frazione "alchilesteri").

Nel caso della sola analisi di alchilesteri, si ottiene un ulteriore riduzione dei tempi di analisi fino a meno di 30 minuti per il singolo campione (circa 6 ore per un batch da 10).

## Performance analitiche

Una volta evidenziati gli indubbi vantaggi legati all'automazione del processo di preparativa, è altrettanto importante verificare che il dato finale sia caratterizzato da un livello di affidabilità analitica pari o superiore a quello garantito dalla metodica tradizionale. A tal proposito 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. Diverse aliquote dello stesso campione, intervallate da bianchi di processo, sono state processate dalla piattaforma in maniera automatica e senza alcuna supervisione da parte dell'operatore. Il cromatogramma tipo (in blu), messo a confronto con quello riportato nel regolamento CEE (in nero), è riportato in figura 2.

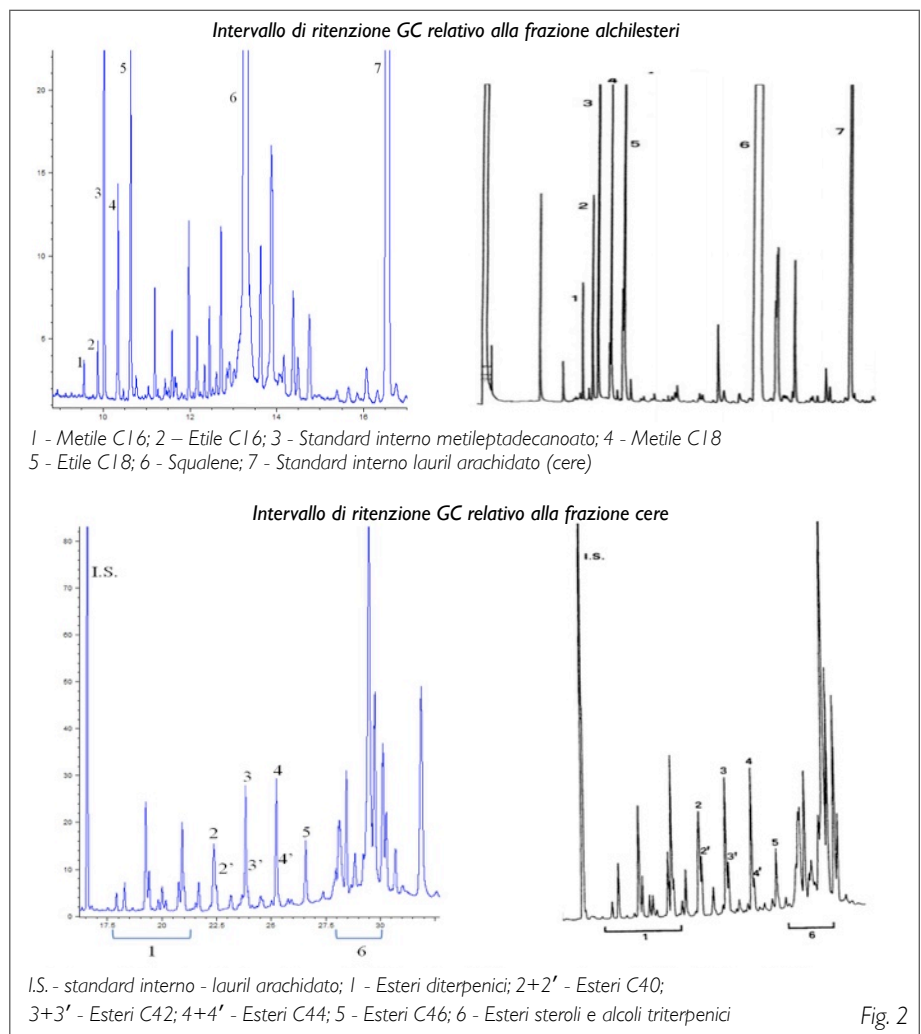


Fig. 2

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

Validazione CERE			
#	mg/kg (sommatoria)		
1	225.80	media <b>220.46</b>	dev. St. <b>5.10</b>
2	216.94		
3	215.20	Valore di riferimento (QC interlab) Cere = 221.027	
4	215.54		
5	227.31	bias% <b>0.26%</b>	CV <sub>r</sub> % <b>2.31%</b>
6	215.14		
7	224.17		
8	224.67		
9	215.78		
10	224.05		

Validazione Alchilesteri			
#	mg/kg FAEE (sommatoria)		
1	36.56	media <b>35.43</b>	dev. St. <b>0.52</b>
2	35.65		
3	36.04	Valore di riferimento (QC interlab) FAEE = 36.253	
4	35.50		
5	35.00	bias% <b>2.28%</b>	CV <sub>r</sub> % <b>1.47%</b>
6	35.18		
7	35.07		
8	35.05		
9	35.16		
10	35.06		

Un ulteriore punto di forza del sistema è la sua affidabilità sul lungo periodo.

In figura 3 è riportato l'overlay di due analisi di controllo, condotte sul riferimento utilizzato per la validazione del sistema, ottenute a due mesi di distanza. Tra le analisi sono state condotte più di 1000 corse cromatografiche (campioni reali, QCs, bianchi).

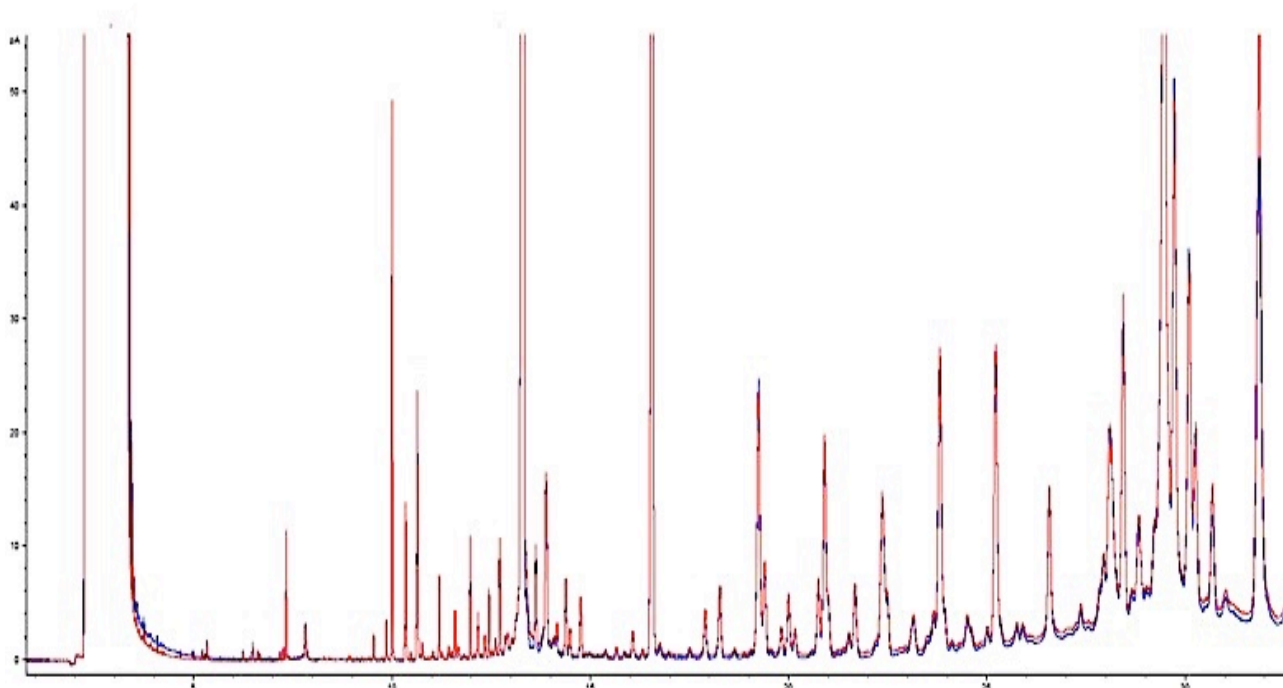


Figura 3

## Conclusioni

La soluzione proposta consente di automatizzare integralmente la procedura di sample prep, con conseguente abbattimento dei costi per campione in termini di minor consumo di solvente e materiali accessori.

I tempi di analisi sono ridotti in misura importante, eliminando quasi completamente l'intervento dell'operatore. Inoltre, il fatto stesso di lavorare in maniera automatica abbassa drasticamente l'incidenza di errori casuali, garantendo precisione, accuratezza e robustezza delle misure sul lungo periodo.

La stazione preparativa proposta fa parte di un più ampio parco soluzioni, messe a punto da SRA Instruments in collaborazione con Gerstel GmbH e Centro Analisi Biochimiche Sas, volte ad automatizzare applicazioni specifiche quali:

- Analisi MOSH/MOAH in accordo con il metodo DIN EN 16995:2017-08, comprensive di purificazione AIOX ed epossidazione. <https://www.srainstruments.it/s/mosh-moah-gerstel-sample-prep-solution>
- Determinazione di 2&3 MCPD e GE secondo le metodiche ufficiali AOCS Cd 29(a&b&c)-I3. <https://www.srainstruments.it/s/determinazione-di-3-monocloro-propandiolo-3-mcpd-e-di-glicidil-esteri-degli-acidi-grassi-in-matrici-alimentari/>

Sono inoltre in fase di validazione:

- Automazioni per l'analisi delle frazioni alcolica e sterolica e degli stigmastadieni (allegati XIX e XVII al CEE N.2568/91 e successive modifiche)
- Stazioni automatizzate per l'analisi di altri parametri inclusi nel regolamento CEE N.2568/91 e successive modifiche
- Saponificazione dell'olio di oliva
- Analisi di Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) ai sensi del regolamento ce 1881/2006 e successive modifiche.



*Per gentile concessione del Dott. Carmine Ventre,  
Centro Analisi biochimiche Sas - Rizziconi (RC)*