



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

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

Le stazioni robotiche sviluppate 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'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 alta produttività, ma anche un dato finale estremamente affidabile in termini di precisione e accuratezza.



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. 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, come schematizzato in 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 a fianco viene riportata la comparazione tra il metodo tradizionale (All. XX al regolamento CEE N. 2568/91) e quello implementato sulla piattaforma INANOIL. 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 (meno di 30 min per il singolo campione).

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).

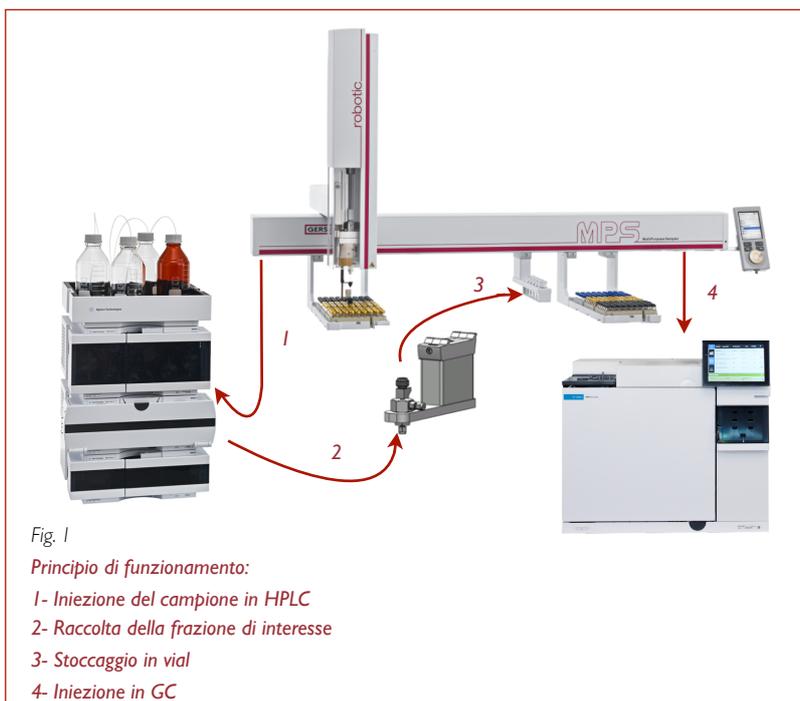
Il risultato del batch di validazione su una serie di 10 ripetute, evidenzia la assoluta affidabilità del dato in termini di accuratezza e precisione.

Validazione CERE

Media: 220,5	Dev. St.: 5.1
Valore di riferimento (RT62) Cere = 221.0 mg/Kg	
BIAS = 0.25 %	CV,% = 2.32%

Validazione Alchilesteri

Media: 35.4	Dev. St.: 0.5
Valore di riferimento (RT62) FAEE = 36.2 mg/Kg	
BIAS = 2.18%	CV,% = 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	Diluzione 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 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 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, come schematizzato in figura 2.

Nello specifico, l'accurata ottimizzazione dei parametri cromatografici consente di rendere estremamente ripetibili i tempi di eluizione delle varie classi (alcoli alifatici e steroli/dialcoli triterpenici, nella fattispecie).

La versatilità delle piattaforme MPS Robotic^{PRO} 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 I). Tale frazione viene posizionata sul campionatore e processata in automatico evitando completamente la procedura di separazione via TLC. Per rendere evidenza dell'incremento di produttività, con contestuale drastica riduzione di solvente e materiali di consumo necessari, la tabella accanto riporta la comparazione tra il metodo tradizionale (All. XIX al regolamento CEE N. 2568/91) e quello implementato sulla piattaforma INANOIL. La soluzione SRA, con una separazione HPLC condotta in meno di 5 minuti, automatizza l'intero processo fino alla iniezione in GC. La gestione automatica delle tempistiche analitiche permette inoltre un overlap delle corse GC e HPLC; di fatto, il tempo necessario all'analisi si riduce alla sola corsa 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 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

Media: 262.5	Dev. St.: 4.0
Valore di riferimento (RT62) Alcoli = 258.7 mg/Kg	
BIAS = 1.46%	CV _r % = 1.53%

Validazione Steroli e Dialcoli Triterpenici

Media: 1422	Dev. St.: 25
Valore di riferimento (RT62) Steroli = 1447 mg/Kg	
BIAS = 1.73%	CV _r % = 1.74%

Analisi completa steroli e alcoli	Metodo tradizionale	Automazione HPLC/GC
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 necessario per processare un singolo campione	~ 3 h	< 1,5 h
tempo necessario 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

Stigmastadieni: 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, come schematizzato in 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

Per rendere evidenza dell'incremento di produttività, con contestuale drastica riduzione di solvente e materiali di consumo necessari, in tabella 1 viene riportata la comparazione tra il metodo tradizionale (All. XVII al regolamento CEE N. 2568/91) e quello implementato sulla piattaforma INANOIL.

La soluzione SRA, con una separazione HPLC condotta in meno di 5 minuti, automatizza l'intero processo fino alla iniezione in GC. La gestione automatica delle tempistiche analitiche permette inoltre un overlap delle corse GC e HPLC; di fatto, il tempo necessario all'analisi si riduce alla sola corsa 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.



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

Analisi completa stigmastadieni	Metodo tradizionale	Automazione 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 pre-condizionata)	< 20 ml
volume di solvente per un batch di 10 campioni	> 4000 ml (oltre a 150 g di silice pre-condizionata)	~ 200 ml
tempo necessario per processare un singolo campione	~ 3 h	~ 1 h
tempo necessario 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

Validazione Stigma RT62

Media: 3.70	Dev. St.: 0.04
Valore di riferimento (RT62) Stigma = 3.70 mg/Kg	
BIAS = 1.66%	CV,% = 1.16%

Validazione Stigma cut-off

Media: 0.061	Dev. St.: 0.004
Valore di riferimento (RT62 dil 1/65) Stigma = 0.057 mg/Kg	
BIAS = 6.03%	CV,% = 6.48%