



Preparazione e analisi automatizzata del campione mediante gascromatografia e spettrometria di massa tandem (GC-MS/MS) per la determinazione di esteri di 3/2 monocloropropandiolo (MCPD) ed esteri di glicidolo in oli commestibili

Introduzione

Gli oli commestibili sono spesso sottoposti a processi di raffinazione volti a modificarne le proprietà organolettiche. Tali trattamenti, in particolare la deodorizzazione ad alta temperatura, possono generare dei sottoprodotti di lavorazione caratterizzati dall'essere potenzialmente dannosi per la salute. Tra questi, gli esteri del glicidolo (GEs) e il mono cloro propandiolo (2-MCPD, 3-MCPD), le cui concentrazioni massime accettabili sono normate per legge.



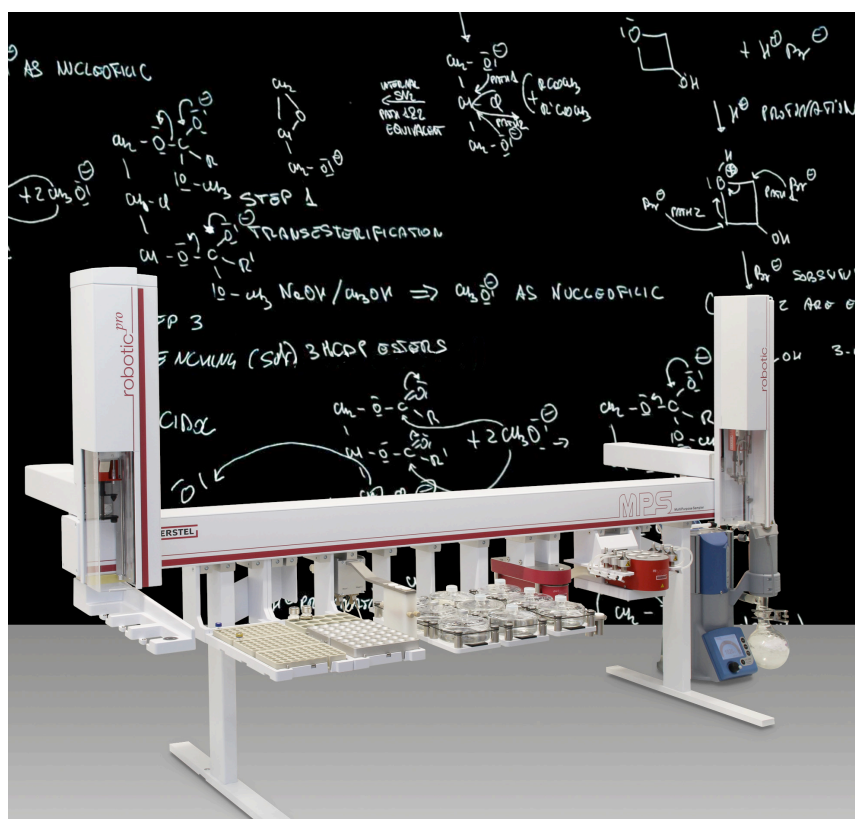
Di recente, l'Autorità europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha raccomandato un'assunzione giornaliera totale (TDI) per 3-MCPD di 0,8 µg/kg. Il glicidolo è stato classificato come cancerogeno genotossico dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC), per questo motivo l'assunzione di glicidolo dovrebbe essere la più bassa possibile.

In particolare, la modifica 1322/20 del regolamento CE 1881/06 stabilisce valori accettabilità per 3-MCPD (libero e esterificato) e GEs per le matrici "Oli e grassi vegetali, oli di pesce e oli di altri organismi marini" variabili tra 500 e 1000 µg/kg in relazione alla destinazione d'uso. I limiti sulle "formule per lattanti" sono ancora più restrittivi: tra 6,0 e 125 µg/kg.

I metodi di riferimento sviluppati dall'American Oil Chemists' Society [1] (Cd 29a-13, Cd 29b-13 e Cd 29c-13) si basano sulla transesterificazione esaustiva con conseguente sviluppo delle forme libere, purificazione della frazione saponificata, concentrazione a secchezza e analisi GC-MS (o GC-MS/MS) dei derivatizzati fenilboronici.

Indipendentemente dal metodo utilizzato, l'intero processo di preparazione del campione risulta essere particolarmente laborioso e richiede, oltre ad un rigido controllo delle tempistiche, l'impiego di personale qualificato.

Nella presente nota applicativa è proposta una piattaforma integralmente automatizzata in grado di eseguire tutti i passaggi previsti dai tre metodi AOCS. I dati di validazione fanno riferimento in particolare ai test eseguiti sui metodi "b" e "c", testati su matrice olio EVO e olio di girasole opportunamente fortificati.



Preparatore/iniettore robotico Gerstel MPS Robotic^{PRO}

Materiali e metodi

La procedura automatizzata sviluppata è basata sui metodi ufficiali AOCS per la determinazione di 2/3 MCPD e esteri glicidilici (AOCS Cd 29b-13 e AOCS Cd 29c-13).

- Il metodo AOCS Cd 29c-13 prevede una transesterificazione aggressiva in ambiente alcalino con doppio saggio; il GEs viene convertito in 3-MCPD nel saggio A e determinato poi per differenza
- Anche il metodo Cd 29b-13 procede attraverso una transesterificazione basica, ma caratterizzata da una cinetica molto più lenta. In questo caso, il GEs totale viene determinato direttamente per conversione in 3-monobromo propandiolo (3-MBPD).

Entrambi i metodi utilizzano due aliquote da 100 mg di campione, le cui pesate iniziali restano l'unica operazione a carico dell'operatore. Tutte le fasi successive, inclusa l'iniezione in GC, sono automatizzate dal preparatore.

Strumentazione

L'intera preparativa è stata condotta utilizzando il campionatore multifunzione GERSTEL MultiPurpose Sampler (MPS robotic, DualHead), completo di modulo di agitazione QuickMix e modulo evaporativo ^mVAP.

Le analisi sono state eseguite con un sistema GC Agilent Intuvo 9000 abbinato a spettrometro di massa a triplo quadrupolo Agilent modello 7010 B, con sorgente HES, in modalità MRM.



Sopra: Visione d'insieme del preparatore/ iniettore robotico Gerstel MPS Robotic^{PRO} abbinato al sistema analitico Agilent GC/MS-MS Intuvo 9000 / QQQ 7010B.

A destra: ^mVAP - L'evaporatore è dotato di opportuno modulo di ricondensazione del solvente; il livello di vuoto applicato e la temperatura di evaporazione sono gestiti via software.



In alto: quickMIX - La frequenza di oscillazione fino a 4000 Hz assicura un completo e veloce contatto tra le fasi, con conseguente massimizzazione dell'efficienza estrattiva.



Materiali

Standard e standard deuterati: 3-cloro-1,2-propandiolo e 2-cloro-1,3-propandiolo, glicidil stearato, rac 1,2-bis-palmitoil-3-cloropropandiolo, 1,3-dipalmitoil-2-cloropropandiolo, 3-cloro-1,2-propandiolo-D5, 2-cloro-1,3-propandiolo-D5, rac 1,2-bis-palmitoil-3-cloropropandiolo-D5, 1,3-dipalmitoil-2-cloropropandiolo-D5, glicidil oleato-D5;

Solventi: metanolo, toluene, MTBE, acetato di etile, acetone, isoesano, etere dietilico, isoottano;

Sali: metossido di sodio, cloruro di sodio, solfato di sodio anidro;

Quencher: acido solforico;

Derivatizzante: acido fenilboronico;

Matrice per validazione: olio EVO certificato esente da contaminazioni;

Campioni reali: olio EVO, olio di semi di girasole.

Condizioni analitiche

Iniettore: MMI Agilent (60 °C; 300 °C/min; 280 °C; 10min);

Colonna: DB-17-MS (30 mx 0,25 mm, 0,25 µm);

Carrier: He @ 1,2 mL/min;

Forno: 60°C (1 min); 20°C/min; 160°C (0 min); 10°C/min; 220°C (0 min); 25°C/min; 320 °C (4min).

Confronto tra preparativa automatica e manuale

Al fine di valutare lo scostamento dei valori ottenuti con le preparative automatizzate rispetto a quelli derivanti dall'applicazione tout-court del metodo ufficiale, è stata analizzata con i due approcci una serie di campioni opportunamente fortificati.

I parametri di validazione sono stati verificati seguendo i seguenti criteri:

- Accuratezza: Bias < 20%
- Sensibilità: LOD definito secondo la procedura EPA 40 CFR 136, App B, rev. 1.11 (Method Detection Limit - MDL); LOQ verificato in accordo ai requisiti EFSA [2]
- Precisione, recupero e linearità: valutazione su tre livelli di concentrazione (10, 100, 1000 µg/kg).

Metodo	Analita	Range (ng/g)	R ²
AOCS Cd 29b-13	3-MCPD	100 - 1000	0,99938
	2-MCPD		0,9999
	3-MBPD		0,99997
AOCS Cd 29b-13	3-MCPD	10 - 100	0,9996
	2-MCPD		0,99886
	3-MBPD		0,99895
AOCS Cd 29c-13	3-MCPD	100 - 1000	0,99914
	2-MCPD		0,99888
	GLY		0,99995
AOCS Cd 29c-13	3-MCPD	10 - 100	0,99990
	2-MCPD		0,99952
	GLY		0,99848

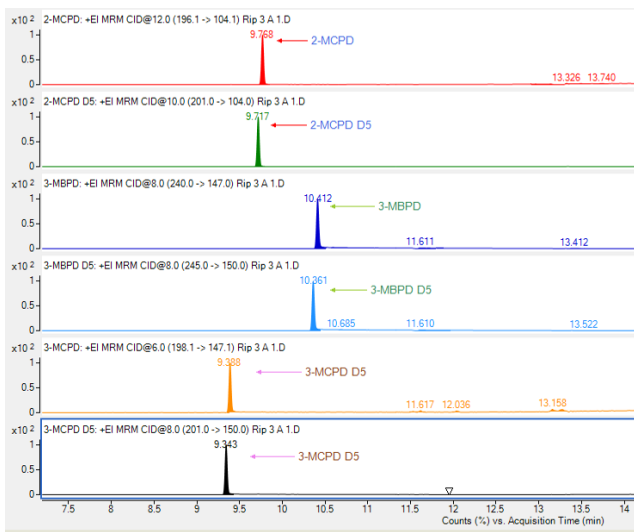
Linearità su due livelli di calibrazione

Metodo	Analita	Concentrazione (ng/g)	Precisione (CV%)	Recupero % (su 5 ripetizioni)	Accuratezza (BIAS)
AOCS Cd 29b-13	3-MCPD	10	8.3	101	3.1
	2-MCPD	10	6.0	99	5.2
	3-MBPD	10	8.9	105	6.9
	3-MCPD	100	1.7	115	4.3
	2-MCPD	100	7.1	86	6.0
	3-MBPD	100	5.8	101	3.1
	3-MCPD	1000	5.7	115	2.2
	2-MCPD	1000	4.0	103	1.3
	3-MBPD	1000	10	106	4.9
AOCS Cd 29c-13	3-MCPD	10	10	95	6.1
	2-MCPD	10	11	99	5.0
	GLY	10	15	70	15
	3-MCPD	100	12	112	5.9
	2-MCPD	100	5.1	114	3.2
	GLY	100	23	50	24
	3-MCPD	1000	5.2	113	16
	2-MCPD	1000	10	109	5.4
	GLY	1000	13	81	5.9

Dati di validazione: sensibilità, precisione, recupero, accuratezza

Performance analitiche

Il metodo GC-MS/MS, unico per tutte le metodiche testate, è stato ottimizzato per quantificare i nativi bromurati e clorurati, unitamente ai relativi marcati utilizzati come standard interni, in una corsa cromatografica di 14 minuti.



L'utilizzo della spettrometria di massa tandem permette di raggiungere livelli di sensibilità ben al di sotto dei requisiti di legge, con un LOQ di 10 µg/kg.

La valutazione della linearità sui due intervalli di calibrazione evidenzia ottime performance, con valori dei coefficienti di correlazione sempre superiori a 0.998.

La completa automazione consente inoltre di ridurre al minimo gli errori casuali, ottenendo di conseguenza una elevata precisione, con valori di RSD% sempre al di sotto del 20%.

Il recupero è sempre stato compreso tra l'81 e il 115%, ad eccezione del glicidolo nel metodo AOCS Cd 29c-13 a livello basso e medio.

Riferimenti

- [1] <https://www.fediol.eu/data/18SAF147%20FEDIOL%20overview%20of%20analytical%20methods%20for%203-MCPDE%20GE%20determination%20-%2022%20March%202019.pdf>
- [2] Z. Zelinková, B. Svejková, J. Velišek, M. Doležal, Fatty acid esters of 3-chloro- propane-1,2-diol in edible oils, *Food Addit. Contam.* 23 (Issue 12) (2006).
- [3] *J Chromatogr A*. 2021 Aug 2;1650:462253. doi: 10.1016/j.chroma.2021.462253. Epub 2021 May 14.

Il valori di BIAS, comunque del tutto soddisfacenti, mostrano come il metodo "b" sia tendenzialmente più affidabile del "c", verosimilmente a causa della quantificazione diretta del GEs come 3-MBP.

Analisi di campioni reali

Una volta terminato il processo di validazione, sono stati analizzati dieci campioni di olio Extravergine forniti dall'Associazione interregionale Italiana Produttori Olivicoli (AIPO), e dieci campioni di olio di semi di girasole reperiti sul mercato.

Poichè, per definizione, l'olio EVO non prevede alcun processo di raffinazione, esso non rientra nell'elenco delle matrici da sottoporre a verifica ai sensi del regolamento 1322/2020: non vi è alcun limite massimo di accettabilità poichè, di fatto, gli analiti in oggetto non possono essere presenti all'interno della matrice. La loro presenza, anche a livello dei più restrittivi limiti tabellari, evidenzerebbe una edulcorazione dell'olio stesso.

In tutti i campioni analizzati sono stati effettivamente ottenuti risultati inferiori al LOD.

L'analisi degli oli di girasole ha invece restituito valori di concentrazione importanti, anche se sempre inferiori al limite di accettabilità di 500 µg/kg.

Conclusioni

L'automazione delle intere procedure di sample-prep previste dai metodi AOCS Cd 29b-13 e Cd 29c-13 (così come quella relativa al Cd 29a-13 e alla metodica "Zwagerman-Overman" - <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800395>), consente un'analisi rapida, precisa e accurata del campione in regime di routine; è inoltre importante sottolineare la possibilità di liberare il personale da laboriosi processi preparativi, riducendo inoltre il consumo di solventi e limitando sensibilmente l'utilizzo di vetreria.

Soluzione strumentale SRA Instruments testata presso il laboratorio DTO (Authorized Partner Laboratory). [3]



SRA Instruments S.p.A
20063 Cernusco S/N (MI)
Tel +39 02 9214 3258
www.srainstruments.com
info@srainstruments.com

SRA Instruments SAS
69280 Marcy l'Etoile Lyon
Tel +33 04 7844 2947
www.srainstruments.com
info@sra-instruments.com

