



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 3:

Stigmastadieni

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 alta 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 stigmastadieni.



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; **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

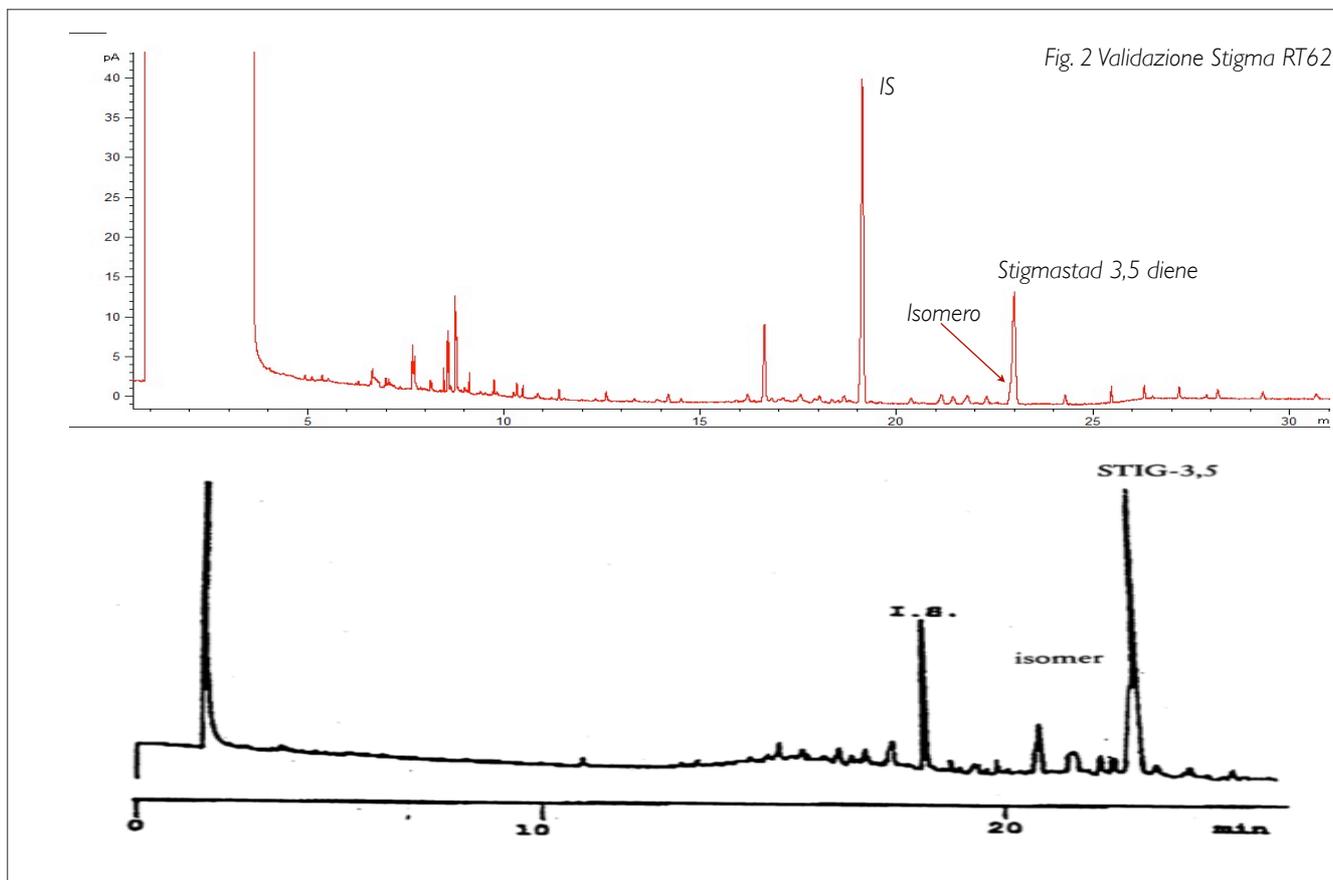
Per rendere evidenza dell'incremento di produttività, con contestuale drastica riduzione di solvente e materiali di consumo necessari, in tabella 1 viene riportata la comparazione tra il metodo tradizionale (All. XVII al regolamento CEE N. 2568/91) e quello implementato sulla piattaforma proposta.

Tabella 1

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

Performance analitiche

Una volta evidenziati gli indubbi vantaggi legati all'automazione del processo di preparativa, è 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, la cui concentrazione di stigmastadieni è certificata dal circuito interlaboratorio della Camera di Commercio di Roma – Azienda Speciale Samer Ring Test. N. 62 (RT62). Diverse aliquote dello stesso campione, intervallate da bianchi di processo, sono state processate dalla piattaforma analitica in maniera automatica e senza alcuna supervisione da parte dell'operatore. Il cromatogramma tipo (in rosso), messo a confronto con quello riportato nel regolamento CEE (in nero), è riportato in figura 2.



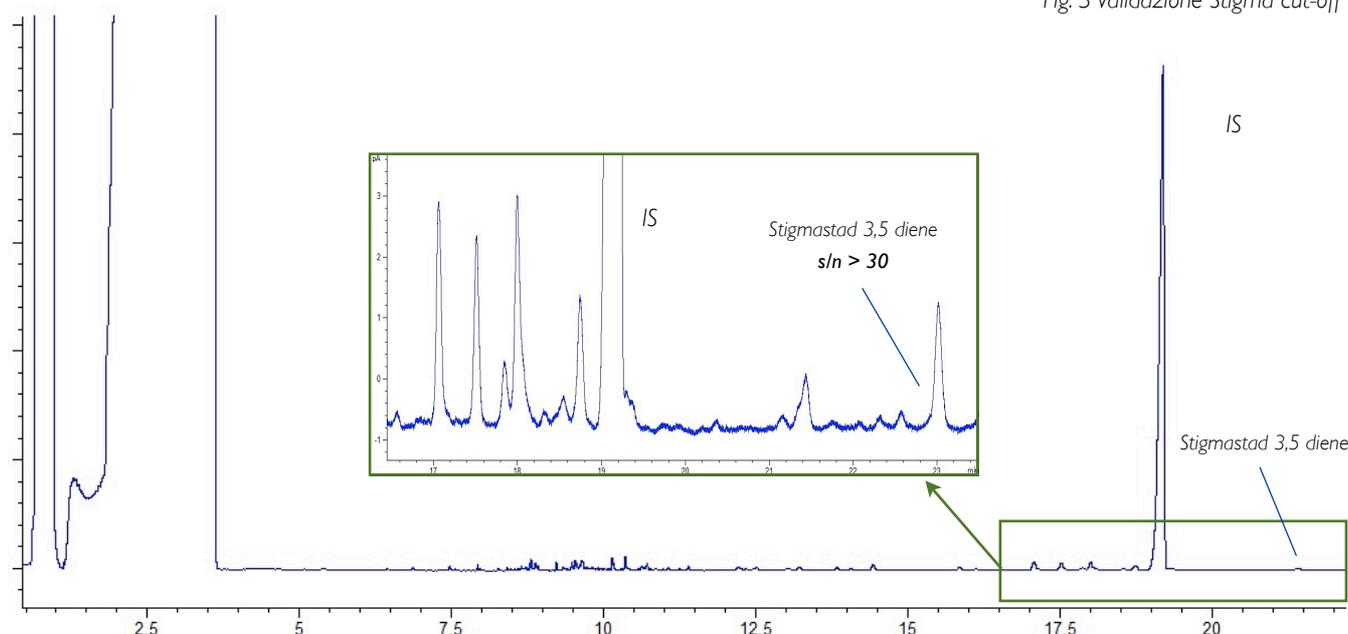
Il risultato del batch di validazione su una serie di 10 ripetute, riportato di seguito, evidenzia la assoluta affidabilità del dato in termini di accuratezza e precisione, come evidenziato nella tabella "Validazione Stigma RT62" in fig. 3.

Al fine di validare ulteriormente il metodo al valore di cut-off di 50 ppm, è stato diluito 1/65 il riferimento RT62 con olio EVO, ottenendo una concentrazione appena superiore al limite previsto di 0.05 mg/kg; i relativi valori sono riportati nella tabella "Validazione Stigma cut-off":

Validazione Stigma RT62			
#	mg/kg stigma		
1	3.68	media 3.70	dev. St. 0.04
2	3.78		
3	3.82	Valore di riferimento (RT62) stigma = 3.70	
4	3.78		
5	3.77	bias% 1.66%	CV _r % 1.16%
6	3.81		
7	3.78		
8	3.75		
9	3.78		
10	3.70		

Validazione Stigma cut-off			
#	mg/kg stigma		
1	0.061	media 0.061	dev. St. 0.004
2	0.068		
3	0.064	Valore di riferimento (RT62 dil 1/65) stigma = 0.057	
4	0.059		
5	0.061	bias% 6.03%	CV _r % 6.48%
6	0.055		
7	0.063		
8	0.064		
9	0.057		
10	0.059		

Grazie all'elevata efficienza della separazione HPLC, il tracciato GC finale evidenzia, al valore di cut-off, un rapporto s/n superiore a 30 per l'analita di interesse.

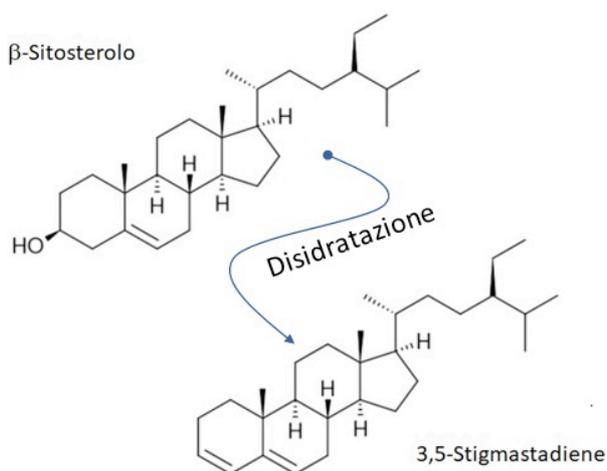


Di fondamentale importanza è l'aspetto legato all'assenza della saponificazione: oltre a ridurre enormemente i tempi di preparativa, ciò consente una ulteriore riduzione dei costi di analisi; costi già abbattuti dal risparmio di oltre il 90% del solvente necessario per gli step successivi, sostituiti integralmente dalla separazione HPLC.

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 drasticamente, eliminando quasi completamente l'intervento dell'operatore. Inoltre, il fatto stesso di lavorare in maniera automatica limita enormemente 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:

analizzatori della serie INANOIL:

- caratterizzazione degli oli d'oliva ai sensi del regolamento CEE N.2568/91: analisi con automazione esaustiva della preparazione del campione:
 - ♦ Parte 1: Metil/etil esteri e cere
 - ♦ Parte 2: Steroli e alcoli
- analisi MOSH/MOAH in accordo con il metodo DIN EN 16995:2017-08, comprensiva 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)-13. <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 studio/validazione sistemi analoghi in grado di automatizzare:

- l'analisi di ulteriori parametri inclusi nel regolamento CEE N.2568/91
- la saponificazione on-line dell'olio di oliva
- la determinazione 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)