



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 2:

Steroli e alcoli

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.

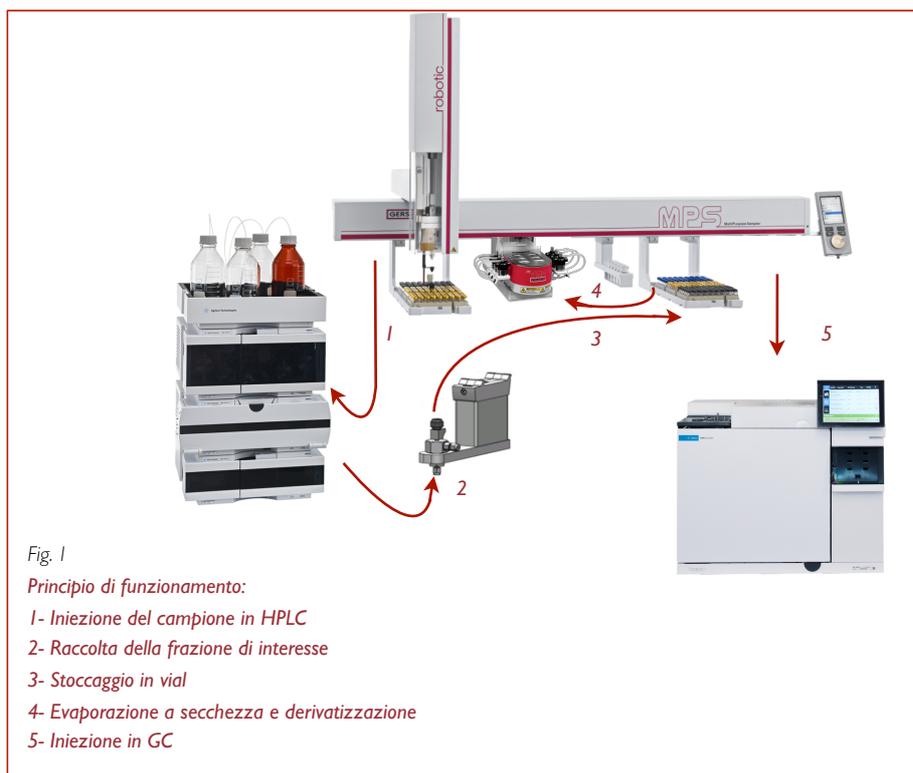
Gli allegati II-XX del regolamento definiscono le metodiche analitiche relative alla quantificazione dei parametri di interesse; molte di queste prevedono laboriose preparazioni del campione, grandi quantità di solventi e materiali di consumo, oltre che l'impiego per lungo tempo di operatori qualificati.



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 steroli, dialcoli triterpenici e alcoli alifatici.



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 (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).

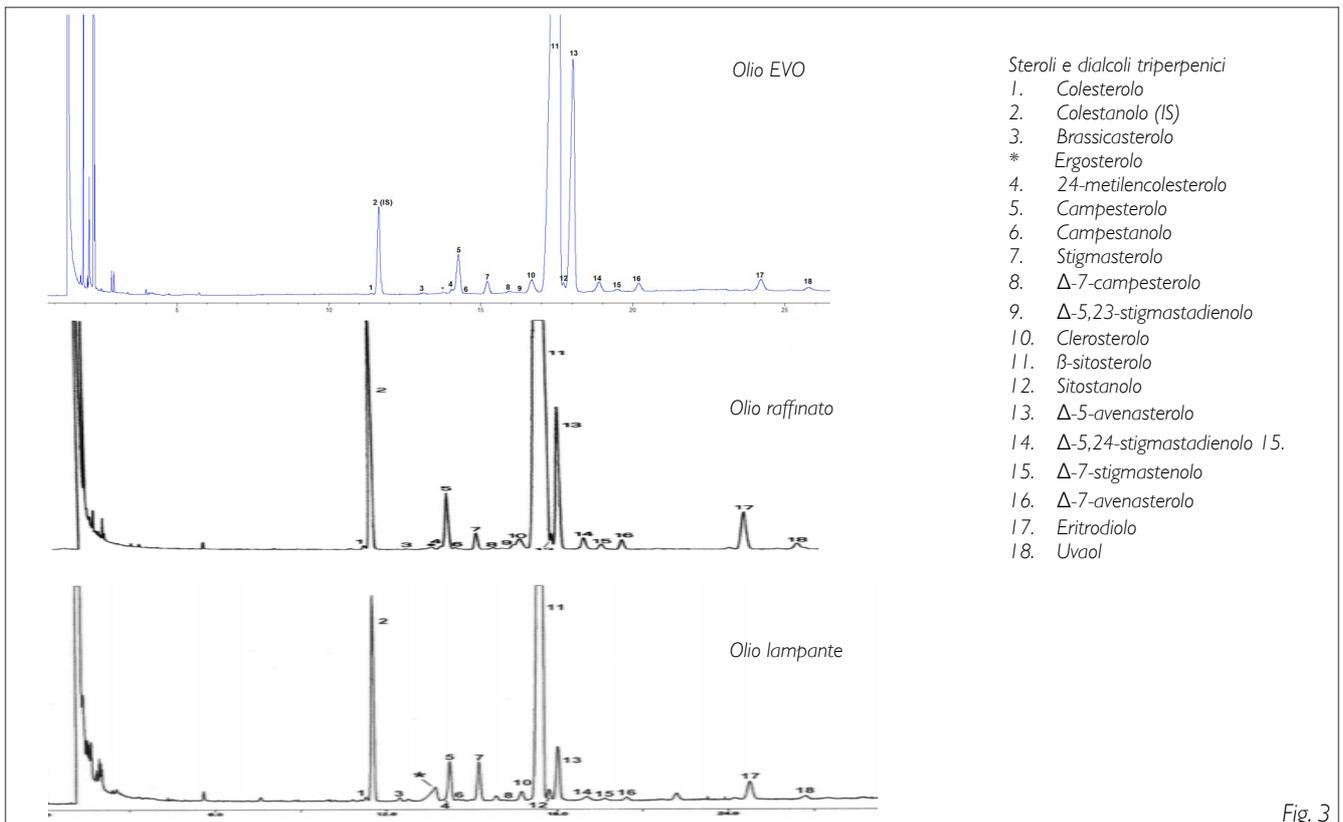
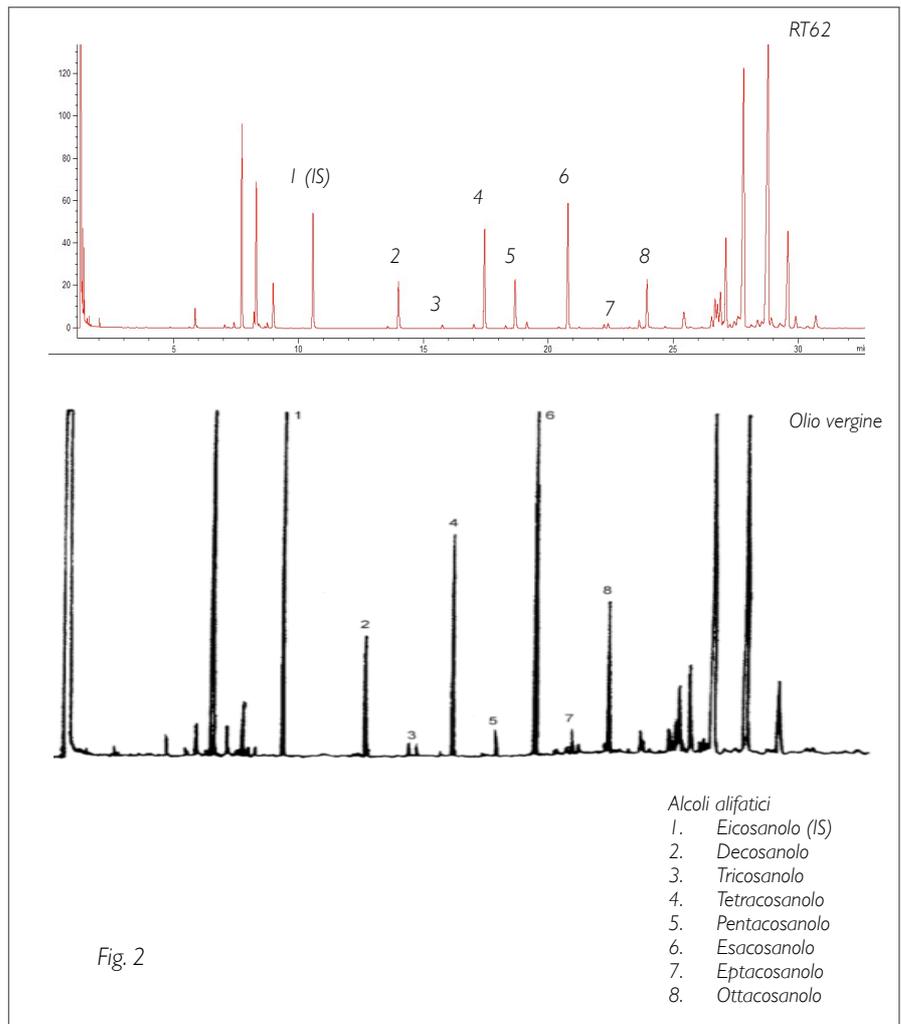
Tale frazione viene posizionata sul campionatore e processata in automatico evitando completamente la procedura di separazione via TLC. Per rendere evidenza dell'incremento di produttività, con contestuale drastica riduzione di solvente e materiali di consumo necessari, in tabella I viene riportata la comparazione tra il metodo tradizionale (All. XIX al regolamento CEE N. 2568/91) e quello implementato sulla piattaforma proposta.

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

È importante precisare che anche l'allegato XIX (parte 2-6) riporta in effetti una procedura alternativa, basata su separazione via HPLC, per ottenere le due frazioni di interesse. Tale metodica, tuttavia, oltre a prevedere una corsa HPLC di circa mezz'ora, richiede un intervento manuale per la raccolta delle frazioni e la loro successiva evaporazione a secchezza e ripresa con derivatizzante. La piattaforma proposta, con una separazione HPLC condotta in meno di 5 minuti, automatizza invece 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

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 campioni 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). 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. I cromatogrammi tipo (in rosso per alcoli alifatici, in blu per steroli e dialcoli triterpenici), messi a confronto con quelli riportati nel regolamento CEE (in nero), sono riportati nelle figure 2 e 3.



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 Alcoli Alifatici	
#	mg/kg (sommatoria)
1	258.5
2	265.5
3	267.0
4	263.2
5	262.4
6	259.0
7	261.9
8	256.1
9	269.3
10	262.0

media 262.5	dev. St. 4.0
Valore di riferimento (RT62) Alcoli = 258.7	
bias% 1.46%	CV _r % 1.53%

Validazione Steroli e Dialcoli Triterpenici	
#	mg/kg steroli totali
1	1464
2	1383
3	1419
4	1398
5	1408
6	1428
7	1409
8	1439
9	1453
10	1420

media 1422	dev. St. 25
Valore di riferimento (RT62) Steroli = 1447	
bias% 1.73%	CV _r % 1.74%

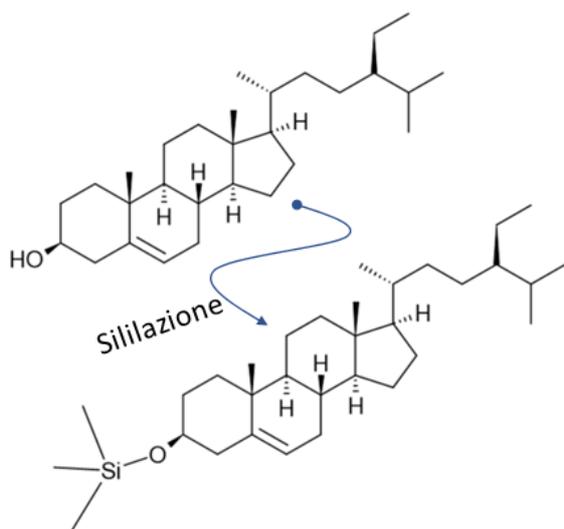
Anche la quantificazione dei singoli analiti, in particolare per la frazione sterolica, restituisce ottimi risultati per tutti gli analiti, inclusi gli steroli presenti a più bassa concentrazione (brassicasterolo, Δ -7-stigmasterolo):

#	Colesterolo	Brassicasterolo	Campesterolo	Stigmasterolo	Δ -7-stigmasterolo	Eritrodioolo Uvaol	β -sitosterolo (totale)
1	0.125	0.047	4.22	1.69	0.610	5.76	92.7
2	0.139	0.045	4.21	1.76	0.537	5.40	92.7
3	0.125	0.047	4.18	1.76	0.596	5.75	92.7
4	0.138	0.044	4.15	1.77	0.566	5.42	92.8
5	0.139	0.045	4.14	1.75	0.570	5.44	92.7
6	0.128	0.056	4.20	1.75	0.585	5.86	92.7
7	0.121	0.053	4.17	1.76	0.579	5.52	92.7
8	0.131	0.057	4.24	1.86	0.553	5.96	92.6
9	0.118	0.044	3.91	1.76	0.597	5.42	93.0
10	0.125	0.047	4.20	1.71	0.573	5.75	92.7
RT62	0.136	0.045	3.95	1.81	0.552	5.368	92.5
Avg	0.129	0.048	4.16	1.76	0.577	5.628	92.7
CV _r %	5.98%	10.27%	2.25%	2.47%	3.76%	3.72%	0.11%
BIAS%	5.10%	7.67%	5.31%	3.02%	4.45%	4.83%	0.28%

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 3: Stigmastadieni
- 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)