

# FATTY ACID ETHYL ESTERS IN VIRGIN OLIVE OILS: IN-HOUSE VALIDATION OF A REVISED METHOD

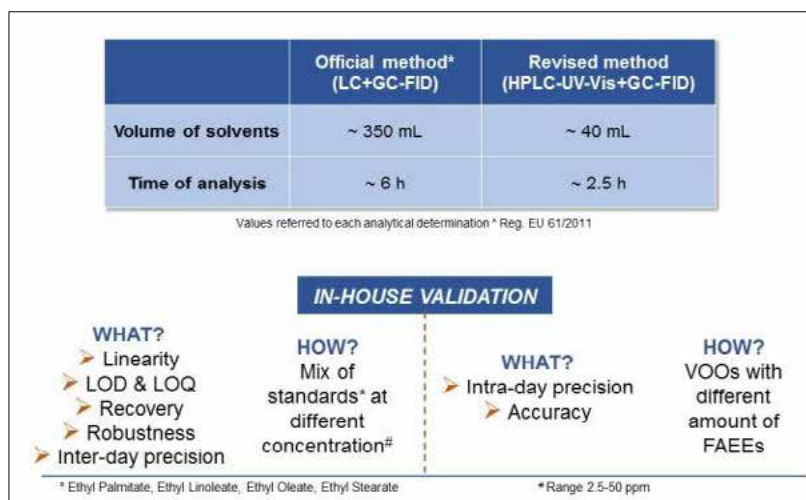
Rosa PALAGANO<sup>a</sup>, Enrico VALLI<sup>a</sup>, Matilde TURA<sup>a</sup>, Chiara CEVOLLI<sup>a</sup>, María del Carmen PEREZ-CAMINO<sup>b</sup>, Wenceslao MOREDA<sup>b</sup>, Alessandra BENDINI<sup>a,✉</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Bologna, Italy; <sup>b</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Campus Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain

✉Corresponding author. Piazza Gabriele Goidanich, 47521 Cesena (FC), Italy. Phone: +390547338121  
E-mail address: alessandra.bendini@unibo.it

## INTRODUCTION

As well known, the content in fatty acid ethyl esters (FAEEs) represents a direct quality parameter to define the quality grade of virgin olive oil (VOOs) (limit set at  $\leq 35$  mg/kg oil for extra virgin olive oil category for EU regulation), and it is also considered an indirect parameter to detect fraudulent mixtures of EVOO with lower quality oils such as soft deodorized olive oils [1]. In this work, the official method has been revised to propose an alternative off-line procedure based on HPLC-GC-FID, more suitable in terms of time of analysis, volume of solvents and level of complexity. Specifically, the analytical protocol proposed HPLC for collecting FAEEs from VOOs instead of the traditional liquid chromatography of the official method. Moreover, a programmed temperature vaporizer (PTV) injector was tested as an alternative to the on-column one because PTV is considered a more versatile option as the temperature control is time-programmed and the injection mode (split/splitless) can be optimized. The performance of the alternative method was evaluated, checking the results in terms of several parameters regarding in-house validation protocol [2]. For this control, specific kinds of samples as refined olive oil spiked with five concentrations of a pure standard of analytes of interest and real VOOs characterized by different contents of FAEEs (low, medium, high) were analyzed applying in parallel the two methods (alternative vs official) (see the Figure).



**Figure** - Scheme of the parameters checked for the in-house validation of the alternative procedure to the official method and advantages in terms of time of analysis and volume of solvents needed.

## RESULTS

The main advantages of this revised protocol may be summarized as:

i) significant reduction in time and solvents needed (reduction of more than 50% and 80% for time and solvents, respectively compared to the official procedure);

- ii) simplification of the separation step of FAEEs fraction avoiding the manual packing of the glass column for the liquid chromatography;
- iii) satisfactory performance in terms of in-house validation results: linearity showed linear response between 2.5 and 50 mg/L; percentages of standard deviation related to intra-day and inter-day precision were lower than 15%; LOD and LOQ were lower than 1 and 1.5 mg/kg, respectively; in the case of the concentration of FAEEs closer to the legal limit, the recoveries of each analyte were higher than 94%;
- iv) no significant differences were evidenced for analytes of interest when the alternative procedure off-line HPLC-GC-FID with PTV injector was applied to actual samples with low, medium and high content of FAEEs with respect to the official method.

#### BIBLIOGRAPHY

- [1] M.C.Pérez-Camino, A. Cert, A. Romero-Segura, R. Cert-Trujillo, W. Moreda. Alkyl esters of fatty acids a useful tool to detect soft deodorized olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6740–6744 (2008).
- [2] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Mussho. Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* 165, 216-224 (2007).

*This abstract is based on the published article R. Palagano, E. Valli, M. Tura, C. Cevoli, M. Perez-Camino, W. Moreda, A. Bendini, T. Gallina Toschi. Fatty Acid Ethyl Esters in Virgin Olive Oils: In-House Validation of a Revised Method. *Foods* 9, 924 (2020).*

## ESTERI ETILICI DI ACIDI GRASSI IN OLI VERGINI DI OLIVA: VALIDAZIONE INTERNA DI UN METODO REVISIONATO

Rosa PALAGANO<sup>a</sup>, Enrico VALLI<sup>a</sup>, Matilde TURA<sup>a</sup>, Chiara CEVOLLI<sup>a</sup>, María del Carmen PEREZ-CAMINO<sup>b</sup>,  
Wenceslao MOREDA<sup>b</sup>, Alessandra BENDINI<sup>a,✉</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Bologna, Italy; <sup>b</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Campus Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain

✉Corresponding Author. Piazza Gabriele Goidanich, 47521 Cesena (FC), Italy. Phone: +390547338121  
E-mail address: alessandra.bendini@unibo.it

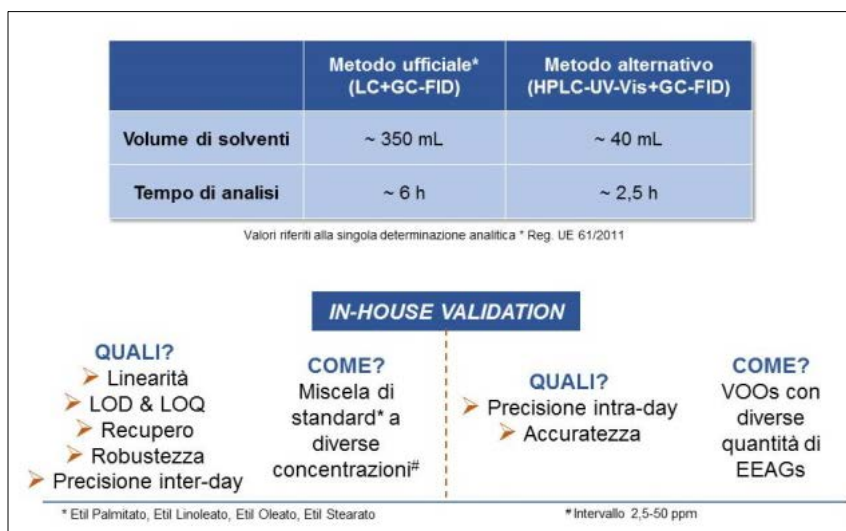
#### INTRODUZIONE

Come ben noto, il contenuto in etil esteri degli acidi grassi (EEAGs) è considerato un parametro diretto di qualità da applicarsi per definire l'appartenenza di oli vergini di oliva (VOOs) ad una specifica categoria (limite fissato a  $\leq 35$  mg/kg per la categoria extra vergine di oliva per la legislazione UE) ed è anche ritenuto un parametro indiretto utile per mettere in luce possibili miscele fraudolente tra un olio extra vergine di oliva ed un olio soft deodorato [1]. In questo lavoro è stato proposto un approccio analitico alternativo al metodo ufficiale con lo scopo di offrire una procedura non in linea HPLC-GC-FID migliorativa in termini di tempo di analisi, volume di solventi e livello di complessità. Più nello specifico, è stato impiegato l'HPLC per collezionare i EEAGs dagli oli vergini di oliva (VOOs) al posto della tradizionale cromatografia liquida su colonna. Inoltre, è stato testato anche un iniettore di vaporizzazione a temperatura programmata (PTV) come possibile alternativa a quello on-column poichè il PTV è considerato più versatile consentendo il controllo programmato e l'ottimizzazione della modalità di iniezione (split/splitless). Le prestazioni del metodo alternativo sono state valutate controllando i risultati ottenuti per differenti parametri che caratterizzano il protocollo di validazione interna [2]. A tale scopo, sono state analizzate tipologie specifiche di campioni quali olio di oliva raffinato aggiunto di cinque concentrazioni diverse di standard puri degli analiti di interesse e campioni reali VOOs caratterizzati da concentrazioni diverse di EEAGs (basso, medio ed alto contenuto di EEAGs) ed applicando in parallelo i due metodi (alternativo vs ufficiale) (vedere la Figura).

#### RISULTATI

I principali vantaggi di questo protocollo possono essere riassunti nei seguenti punti: i) significativa riduzione del tempo di analisi e della quantità di solventi necessari (decremento di più del 50% ed 80% per tempo e solventi, rispettivamente, per il metodo alternativo rispetto al metodo ufficiale); ii) semplificazione della fase di separazione della frazione di EEAGs che permette di evitare l'impaccamento ma-

nuale della colonna in vetro per la cromatografia liquida iii); soddisfacente prestazione per quanto concerne i parametri testati per la validazione interna: la linearità mostrava risposte lineari nell'intervallo di concentrazioni tra 2,5 e 50 mg/L; la precisione testata nello stesso giorno e tra giorni diversi evidenziava percentuali di variazione inferiore al 15%; i valori di LOD e LOQ erano più bassi di 1 e 1,5 mg/kg, rispettivamente; in caso di contenuto di EEAGs vicino al limite di legge, i recuperi dei singoli analiti risultavano più alti del 94% iv) l'applicazione del metodo alternativo non in linea HPLC-GC-FID con iniettore PTV ai campioni a basso, medio ed alto contenuto in EEAGs non ha evidenziato differenze significative degli analiti rispetto a quando analizzati con il metodo ufficiale.



**Figura** - Schema dei parametri controllati per la validazione in-house della procedura alternativa al metodo ufficiale e vantaggi in termini di tempo di analisi e volume di solventi richiesti.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] M.C.Pérez-Camino, A. Cert, A. Romero-Segura, R. Cert-Trujillo, W. Moreda. Alkyl esters of fatty acids a useful tool to detect soft deodorized olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6740–6744 (2008).
- [2] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Mussho. Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* 165, 216-224 (2007).

*Questo abstract è basato sull'articolo pubblicato R. Palagano, E. Valli, M. Tura, C. Cevoli, M. Perez-Camino, W. Moreda, A. Bendini, T. Gallina Toschi. Fatty Acid Ethyl Esters in Virgin Olive Oils: In-House Validation of a Revised Method. Foods 9, 924 (2020).*