

Trattandosi di un semplice strumento di documentazione, esso non impegna la responsabilità delle istituzioni

► **B****REGOLAMENTO (CEE) n. 2568/91 DELLA COMMISSIONE**

dell'11 luglio 1991

relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti

(GU L 248 del 5.9.1991, pag. 1)

Modificato da:

Gazzetta ufficiale

		n.	pag.	data
► <u>M1</u>	Regolamento (CEE) n. 3682/91 della Commissione del 17 dicembre 1991	L 349	36	18.12.1991
► <u>M2</u>	Regolamento (CEE) n. 1429/92 della Commissione del 26 maggio 1992	L 150	17	2.6.1992
► <u>M3</u>	Regolamento (CEE) n. 1683/92 della Commissione del 29 giugno 1992	L 176	27	30.6.1992
► <u>M4</u>	Regolamento (CEE) n. 1996/92 della Commissione del 15 luglio 1992	L 199	18	18.7.1992
► <u>M5</u>	Regolamento (CEE) n. 3288/92 della Commissione del 12 novembre 1992	L 327	28	13.11.1992
► <u>M6</u>	Regolamento (CEE) n. 183/93 della Commissione del 29 gennaio 1993	L 22	58	30.1.1993
► <u>M7</u>	modificato da: Regolamento (CEE) n. 826/93 della Commissione del 6 aprile 1993	L 87	6	7.4.1993
► <u>M8</u>	Regolamento (CEE) n. 620/93 della Commissione del 17 marzo 1993	L 66	29	18.3.1993
► <u>M9</u>	Regolamento (CE) n. 177/94 della Commissione del 28 gennaio 1994	L 24	33	29.1.1994
► <u>M10</u>	Regolamento (CE) n. 2632/94 della Commissione del 28 ottobre 1994	L 280	43	29.10.1994
► <u>M11</u>	Regolamento (CE) n. 656/95 della Commissione del 28 marzo 1995	L 69	1	29.3.1995
► <u>M12</u>	Regolamento (CE) n. 2527/95 della Commissione del 27 ottobre 1995	L 258	49	28.10.1995
► <u>M13</u>	Regolamento (CE) n. 2472/97 della Commissione dell'11 dicembre 1997	L 341	25	12.12.1997
► <u>M14</u>	Regolamento (CE) n. 282/98 della Commissione del 3 febbraio 1998	L 28	5	4.2.1998
► <u>M15</u>	Regolamento (CE) n. 2248/98 della Commissione del 19 ottobre 1998	L 282	55	20.10.1998
► <u>M16</u>	Regolamento (CE) n. 379/1999 della Commissione del 19 febbraio 1999	L 46	15	20.2.1999
► <u>M17</u>	Regolamento (CE) n. 455/2001 della Commissione del 6 marzo 2001	L 65	9	7.3.2001
► <u>M18</u>	Regolamento (CE) n. 2042/2001 della Commissione del 18 ottobre 2001	L 276	8	19.10.2001
► <u>M19</u>	Regolamento (CE) n. 796/2002 della Commissione del 6 maggio 2002	L 128	8	15.5.2002
► <u>M20</u>	Regolamento (CE) n. 1989/2003 della Commissione del 6 novembre 2003	L 295	57	13.11.2003
► <u>M21</u>	Regolamento (CE) n. 702/2007 della Commissione del 21 giugno 2007	L 161	11	22.6.2007

Rettificato da:

- **C1** Rettifica, GU L 289 del 19.10.1991, pag. 38 (91/2568)
- **C2** Rettifica, GU L 347 del 28.11.1992, pag. 69 (91/2568)
- **C3** Rettifica, GU L 176 del 20.7.1993, pag. 26 (93/183)



**REGOLAMENTO (CEE) n. 2568/91 DELLA COMMISSIONE
dell'11 luglio 1991**

**relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa
d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti**

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

visto il regolamento n. 136/66/CEE del Consiglio, del 22 settembre 1966, relativo all'attuazione di un'organizzazione comune dei mercati nel settore dei grassi ⁽¹⁾, modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 3577/90 ⁽²⁾, in particolare l'articolo 35 bis,

considerando che l'allegato del regolamento n. 136/66/CEE prevede le denominazioni e le definizioni degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva commercializzati nei singoli Stati membri, nonché negli scambi intracomunitari e con i paesi terzi;

considerando che per poter distinguere i vari tipi di olio è opportuno definire le caratteristiche fisico-chimiche di ciascuno di essi, nonché le caratteristiche organolettiche degli oli vergini, per garantire la purezza e la qualità dei prodotti in parola, salve le altre disposizioni vigenti in materia;

considerando che è opportuno stabilire in modo uniforme in tutta la Comunità la presenza delle caratteristiche dei vari tipi di olio; che a tal fine occorre stabilire i metodi comunitari di analisi chimica e di valutazione organolettica; che occorre tuttavia autorizzare, durante un periodo transitorio, il ricorso ad altri metodi di analisi applicati negli Stati membri pur prevedendo che, in caso di divergenza dei risultati, saranno determinanti quelli ottenuti in base al metodo comune;

considerando che la definizione delle caratteristiche fisico-chimiche degli oli d'oliva e dei metodi di analisi comporta l'adattamento delle note complementari del capitolo 15 della nomenclatura combinata;

considerando che il metodo di valutazione delle caratteristiche organolettiche degli oli vergini implica la costituzione di comitati di assaggiatori selezionati ed esperti e che è pertanto opportuno prevedere il termine necessario per la realizzazione di siffatta struttura; che, tenuto conto delle difficoltà che taluni Stati membri dovranno affrontare per la costituzione dei comitati di assaggio, è opportuno autorizzare il ricorso ai comitati esistenti negli altri Stati membri;

considerando che per garantire il corretto funzionamento del sistema dei prelievi applicabili all'importazione di sanse di oliva, è opportuno prescrivere un metodo unico per determinare il tenore in olio di questi prodotti;

considerando che per non recare pregiudizio agli scambi è opportuno prevedere un periodo limitato per lo smaltimento dell'olio condizionato prima dell'entrata in vigore del presente regolamento;

considerando che è opportuno abrogare il regolamento (CEE) n. 1058/77 della Commissione ⁽³⁾, modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 1858/88 ⁽⁴⁾;

considerando che il comitato di gestione per i grani non ha emesso alcun parere nel termine fissato dal suo presidente,

⁽¹⁾ GU n. 172 del 30. 9. 1966, pag. 3025/66.

⁽²⁾ GU n. L 353 del 17. 12. 1990, pag. 23.

⁽³⁾ GU n. L 128 del 24. 5. 1977, pag. 6.

⁽⁴⁾ GU n. L 166 dell'1. 7. 1988, pag. 10.

▼B

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

▼M20*Articolo 1*

1. Sono considerati oli di oliva vergini ai sensi del punto 1, lettere a) e b), dell'allegato del regolamento n. 136/66/CEE gli oli le cui caratteristiche sono conformi a quelle indicate rispettivamente nei punti 1 e 2 dell'allegato I del presente regolamento.
2. È considerato olio di oliva lampante ai sensi del punto 1, lettera c), dell'allegato del regolamento n. 136/66/CEE, l'olio le cui caratteristiche sono conformi a quelle indicate nell'allegato I, punto 3, del presente regolamento.
3. È considerato olio di oliva raffinato ai sensi del punto 2 dell'allegato del regolamento n. 136/66/CEE, l'olio le cui caratteristiche sono conformi a quelle indicate nell'allegato I, punto 4, del presente regolamento.
4. È considerato olio di oliva composto di oli di oliva raffinati e di oli di oliva vergini ai sensi del punto 3 dell'allegato del regolamento n. 136/66/CEE, l'olio le cui caratteristiche sono conformi a quelle indicate nell'allegato I, punto 5, del presente regolamento.
5. È considerato olio di sansa di oliva greggio ai sensi del punto 4 dell'allegato del regolamento n. 136/66/CEE, l'olio le cui caratteristiche sono conformi a quelle indicate nell'allegato I, punto 6, del presente regolamento.
6. È considerato olio di sansa di oliva raffinato ai sensi del punto 5 dell'allegato del regolamento n. 136/66/CEE, l'olio le cui caratteristiche sono conformi a quelle indicate nell'allegato I, punto 7, del presente regolamento.
7. È considerato olio di sansa di oliva ai sensi del punto 6 dell'allegato del regolamento n. 136/66/CEE, l'olio le cui caratteristiche sono conformi a quelle indicate nell'allegato I, punto 8, del presente regolamento.

▼B*Articolo 2*

1. Le caratteristiche degli oli contemplati nell'allegato I sono determinate in base ai seguenti metodi di analisi:
 - per la determinazione degli acidi grassi liberi, espressi in percentuale di acido oleico, il metodo di cui all'allegato II,
 - per la determinazione dell'indice di perossido, il metodo di cui all'allegato III,

▼M19

- per la determinazione del tenore di cere, il metodo di cui all'allegato IV,

▼B

- per la determinazione del contenuto di steroli, il metodo di cui all'allegato V,
- per la determinazione dell'eritrodiole + uvaolo, il metodo di cui all'allegato VI,

▼M21

- per la determinazione della percentuale di 2-gliceril monopalmitato, il metodo di cui all'allegato VII,

▼M20

▼ B

- per l'analisi spettrofotometrica, il metodo di cui all'allegato IX,
- per la determinazione della composizione di acidi grassi, il metodo di cui all'allegato X «A» e X «B»,
- per la determinazione dei solventi alogenati volatili, il metodo di cui all'allegato XI,
- per la valutazione delle caratteristiche organolettiche degli oli d'oliva vergini, il metodo di cui all'allegato XII, applicato conformemente al paragrafo 2,

▼ M20**▼ M11**

- per la determinazione degli stigmastadieni, il metodo figurante nell'allegato XVII,

▼ M13

- per la determinazione della composizione dei trigliceridi con ECN42, il metodo figurante nell'allegato XVIII,

▼ M19

- per la determinazione del tenore in alcoli alifatici, il metodo di cui all'allegato XIX.

2. La verifica delle caratteristiche organolettiche degli oli di oliva vergini da parte delle autorità nazionali o dei loro rappresentanti è compiuta da panel di assaggiatori riconosciuti dagli Stati membri.

Le caratteristiche organolettiche di un olio d'oliva vergine, di cui al primo comma, si considerano conformi alla categoria di olio di oliva dichiarata qualora il panel di assaggiatori riconosciuto dallo Stato membro ne confermi la classificazione.

Qualora il panel non confermi la dichiarazione della categoria di olio di oliva, sotto il profilo delle sue caratteristiche organolettiche, a richiesta dell'interessato le autorità nazionali o i loro rappresentanti incaricano altri panel riconosciuti di effettuare due controanalisi, di cui almeno una deve essere effettuata da un panel riconosciuto dallo Stato membro di produzione dell'olio. Le caratteristiche in questione sono considerate conformi a quelle dichiarate se le due controanalisi ne confermano la classificazione. Nel caso contrario il costo delle controanalisi, e fatte salve le sanzioni comminate, sono a carico dell'interessato.

▼ M17

3. Per quanto riguarda la verifica delle caratteristiche degli oli da parte delle autorità nazionali o di loro rappresentanti, prevista al paragrafo 1, il prelievo dei campioni si effettua secondo le norme internazionali EN ISO 661 e EN ISO 5555 relative alla preparazione dei campioni per le prove e al campionamento. Tuttavia, in deroga al punto 6.8 della norma EN ISO 5555, per le partite costituite dai summenzionati oli, in imballaggi immediati di contenuto inferiore o uguale a 100 litri, il prelievo del campione si effettua conformemente all'allegato I bis del presente regolamento.

▼ M19

Fatte salve le disposizioni della norma EN ISO 5555 e del capitolo 6 della norma EN ISO 661, i campioni prelevati sono messi immediatamente al riparo dalla luce e da fonti di calore elevato e sono inviati al laboratorio per le analisi entro al più tardi:

- il decimo giorno lavorativo successivo a quello del prelievo nei mesi da ottobre a maggio, e
- il quinto giorno lavorativo successivo a quello del prelievo nei mesi da giugno a settembre.

▼ M17

4. ► **M20** Ai fini della verifica prevista al paragrafo 3, le analisi di cui agli allegati II, III, IX, X e XII nonché, eventualmente, le controa-

▼ M17

nalisi previste dalle normative nazionali, sono effettuate anteriormente alla data di durata minima. Qualora il prelievo del campione abbia luogo oltre quattro mesi prima di tale data, le summenzionate analisi sono effettuate entro e non oltre il quarto mese successivo alla data del prelievo. Nessun termine si applica per le altre analisi previste dal suddetto regolamento. ◀

Salvo qualora il campione sia stato prelevato meno di un mese prima della data di durata minima, nel caso in cui i risultati delle analisi non corrispondano alle caratteristiche della categoria di olio d'oliva o di olio di sansa di oliva dichiarata, l'interessato ne viene informato al più tardi un mese prima dello scadere del termine di cui al primo comma.

▼ M19

5. Quando le caratteristiche degli oli d'oliva sono determinate secondo i metodi di cui al paragrafo 1, i risultati delle analisi sono direttamente confrontati con i limiti fissati dal presente regolamento.

▼ M20*Articolo 2 bis*

La verifica, da parte delle autorità nazionali o di loro rappresentanti, della conformità dei campioni degli oli di oliva e degli oli di sansa di oliva alla categoria dichiarata può essere effettuata:

- a) mediante le analisi di cui all'allegato I, effettuate in qualunque ordine; oppure
- b) secondo l'ordine previsto all'allegato I ter relativo allo schema decisionale, fino all'adozione di una delle decisioni contemplate dallo schema stesso.

▼ M19**▼ M5***Articolo ► M19 3 ◀*

Qualora si constati che le caratteristiche organolettiche di un olio sono diverse da quelle proprie alla sua denominazione, lo Stato membro interessato applica sanzioni pecuniarie amministrative, la cui entità è stabilita in base alla gravità dell'irregolarità accertata, ferme restando altre sanzioni eventuali.

Ai fini della valutazione dell'irregolarità si tiene conto, in particolare, dell'evoluzione naturale delle caratteristiche di un olio che sia stato conservato in condizioni normali.

All'inizio di ogni semestre gli Stati membri informano la Commissione in merito al numero e alla natura delle irregolarità constatate, nonché in merito alle sanzioni irrogate nel semestre precedente.

*Articolo 4***▼ M19**

1. Ai fini della valutazione e del controllo delle caratteristiche organolettiche da parte delle autorità nazionali o dei loro rappresentanti, gli Stati membri possono procedere al riconoscimento di panel di assaggiatori.

Le condizioni del riconoscimento sono stabilite dallo Stato membro in particolare in modo da:

- rispondere alle condizioni di cui all'allegato XII, punto 4,
- garantire che la formazione del capo del panel si compia presso un organismo riconosciuto e alle condizioni a tal fine stabilite dallo Stato membro,

▼M19

— subordinare la validità del riconoscimento ai risultati ottenuti nell'ambito di un sistema di controllo annuale istituito dallo Stato membro.

Ogni Stato membro comunica alla Commissione l'elenco dei panel riconosciuti e le misure adottate conformemente al presente paragrafo.

▼M5

2. Lo Stato membro che incontri difficoltà per la costituzione di un comitato di assaggio sul proprio territorio può ricorrere ad un comitato di assaggio riconosciuto da un altro Stato membro.

3. Ogni Stato membro compila l'elenco dei comitati di assaggio istituiti da associazioni professionali o interprofessionali in conformità del paragrafo 1 e controlla il rispetto di dette norme.

▼M19**▼B***Articolo 6*

1. Il tenore in olio delle sanse e degli altri residui dell'estrazione dell'olio (codice NC 2306 90 11 e 2306 90 19) è determinato conformemente al metodo che figura nell'allegato XV.

2. Il tenore in olio di cui al paragrafo 1 è espresso in percentuale del suo peso rispetto a quello della sostanza secca.

▼M20*Articolo 7*

Si applicano le disposizioni comunitarie relative alla presenza di contaminanti.

Per quanto riguarda il tenore di solventi alogenati, i limiti per tutte le categorie di oli di oliva sono i seguenti:

- tenore massimo di ciascun solvente alogenato rilevato: 0,1 mg/kg
- tenore massimo della somma dei solventi alogenati rilevati: 0,2 mg/kg.

▼B*Articolo 8*

1. Ogni Stato membro comunica alla Commissione le misure adottate per l'applicazione del presente regolamento.

2. Ogni Stato membro comunica alla Commissione, alla fine di ogni semestre, un riassunto dei dati analitici delle determinazioni effettuati nel corso del semestre precedente.

Detti risultati sono esaminati dal comitato di gestione dei grassi secondo la procedura prevista all'articolo 39 del regolamento n. 136/66/CEE.

Articolo 9

Il regolamento (CEE) n. 1058/77 è abrogato.

Articolo 10

1. Il presente regolamento entra in vigore il terzo giorno successivo a quello della pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*.

▼ B

Tuttavia, il metodo che figura nell'allegato XII viene applicato a decorrere dal ►**M1** 1° novembre 1992 ◀, salvo per quanto riguarda le operazioni legate all'intervento.

▼ M5

Questo metodo non si applica all'olio d'oliva vergine condizionato anteriormente al 1° novembre 1992.

▼ B

2. Il presente regolamento non si applica agli oli d'oliva e agli oli di sansa d'oliva condizionati anteriormente all'entrata in vigore del presente regolamento e commercializzati fino al 31 ottobre 1992.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

▼B*ALLEGATI***Sommario**

Allegato I:	Caratteristiche degli oli di oliva
Allegato I bis:	Campionatura delle partite di olio d'oliva o di olio di sansa d'oliva in imballaggi immediati di contenuto non superiore a 100 litri
Allegato I <i>ter</i> :	Schema decisionale
Allegato II:	► M21 Determinazione degli acidi grassi liberi, metodo a freddo ◀
Allegato III:	Determinazione del numero di perossidi
Allegato IV:	► M6 Determinazione del contenuto di cere mediante gascromatografia con colonna capillare ◀
Allegato V:	Determinazione della composizione e del contenuto di steroli mediante gascromatografia con colonna capillare
Allegato VI:	Determinazione dell'eritrodiole e dell'uvaolo
Allegato VII:	► M21 Determinazione della percentuale di 2-gliceril monopalmitato ◀
Allegato VIII:	Determinazione del contenuto di trilinoleina
Allegato IX:	Analisi spettrofotometrica nell'ultravioletto
Allegato X «A»:	Analisi gascromatografica degli esteri metilici degli acidi grassi
Allegato X «B»:	Preparazione degli esteri metilici di acidi grassi in conformità all'allegato VI — punti I e II del regolamento (CEE) n. 72/77 della Commissione oppure in alternativa il metodo seguente
Allegato XI:	Determinazione del tenore dei solventi alogenati
Allegato XII:	Valutazione organolettica dell'olio di oliva vergine
Allegato XIII:	► M6 Neutralizzazione e decolorazione dell'olio d'oliva in laboratorio ◀
Allegato XIV:	Note complementari 2, 3 e 4 del capitolo 15 della Nomenclatura combinata
Allegato XV:	Metodo di determinazione del tenore in olio d'oliva delle sanse
Allegato XVI:	Determinazione del numero di iodio
Allegato XVII:	Metodo di determinazione degli stigmastadieni negli oli vegetali
Allegato XVIII:	Metodo di determinazione della composizione dei trigliceridi con ECN42
Allegato XIX:	Metodo per la determinazione del tenore in alcoli alifatici

ALLEGATO I

CARATTERISTICHE DEGLI OLI DI OLIVA

Categoria	Acidità (%) (*)	Numero dei perossidi mcq O ₂ /kg (*)	Cere mg/kg (**)	2-gliceril monopalmitato (%)	Stigmastadiene mg/kg ⁽¹⁾	Differenza ECN42 HPLC e ECN42 (calcolo teorico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Valutazione organolettica mediana del frutto (Md) (*)	Valutazione organolettica mediana del fruttato (Mf) (*)
1. Olio extra vergine di oliva	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 % ≤ 1,0 se % acido palmitico totale > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Olio di oliva vergine	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 % ≤ 1,0 se % acido palmitico totale > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Olio di oliva lampante	> 2,0	—	≤ 300 ⁽³⁾	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 % ≤ 1,1 se % acido palmitico totale > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 2,5 ⁽²⁾	—
4. Olio di oliva raffinato	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 % ≤ 1,1 se % acido palmitico totale > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Olio di oliva composto di oli di oliva raffinati e di oli di oliva vergini	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 % ≤ 1,0 se % acido palmitico totale > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Olio di sansa di oliva greggio	—	—	> 350 ⁽⁴⁾	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Olio di sansa di oliva raffinato	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Olio di sansa di oliva	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

⁽¹⁾ Somma degli isomeri che potrebbero (o meno) essere separati mediante colonna capillare.

⁽²⁾ O quando la mediana del difetto è inferiore o uguale a 2,5 e la mediana del fruttato è uguale a 0.

⁽³⁾ Gli oli con un tenore di cera compreso tra 300 mg/kg e 350 mg/kg sono considerati olio di oliva lampante se gli alcoli alifatici totali sono pari o inferiori a 350 mg/kg o se la percentuale di eritrodiole e uvaolo è pari o inferiore a 3,5.

⁽⁴⁾ Gli oli con un tenore di cera compreso tra 300 mg/kg e 350 mg/kg sono considerati olio di sansa di oliva greggio se gli alcoli alifatici totali sono superiori a 350 mg/kg e se la percentuale di eritrodiole e uvaolo è superiore a 3,5.

▼ M21

Categoria	Composizione acidica ⁽¹⁾					Somma degli isomeri trans-oleici (%)	Somma degli isomeri trans-oleici + trans-linolenici (%)	Composizione in steroli						Steroli totali (mg/kg)	Eritrodiolo e uvaolo (%) ^(**)
	Miristico (%)	Lino lenico (%)	Arachidico (%)	Eicosenoico (%)	Behenico (%)	Lignoceroico (%)		Cholesterol (%)	Brassicasterolo (%)	Campesterolo (%)	Stigmasterolo (%)	Betasitosterolo (%) ⁽²⁾	Delta-7-stigmasterolo (%)		
1. Olio extra vergine di oliva	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Olio di oliva vergine	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Olio di oliva lampante	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾
4. Olio di oliva raffinato	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Olio di oliva composto di oli di oliva raffinati e di oli di oliva vergini	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Olio di sansa di oliva greggio	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾
7. Olio di sansa di oliva raffinato	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Olio di sansa di oliva	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Tenore di altri acidi grassi (%): palmitico: 7,5-20,0; palmitoleico: 0,3-3,5; eptadecanoico: ≤ 0,3; eptadecanoico: ≤ 0,3; stearico: 0,5-5,0; oleico: 55,0-83,0; linoleico: 3,5-21,0

⁽²⁾ Somma di: delta-5-23-stigmastadienolo + closterolo + beta-sitosterolo + sitosterolo + delta-5-avenasterolo + delta-5-24-stigmastadienolo.

⁽³⁾ Gli oli con un tenore di cera compreso tra 300 mg/kg e 350 mg/kg sono considerati olio di oliva lampante se gli alcoli alifatici totali sono pari o inferiori a 350 mg/kg o se la percentuale di eritrodiolo e uvaolo è pari o inferiore a 3,5.

⁽⁴⁾ Gli oli con un tenore di cera compreso tra 300 mg/kg e 350 mg/kg sono considerati olio di sansa di oliva greggio se gli alcoli alifatici totali sono superiori a 350 mg/kg e se la percentuale di eritrodiolo e uvaolo è superiore a 3,5.

Note:

a) I risultati delle analisi devono essere espressi con un numero di decimali uguale a quello previsto per ogni caratteristica.

b) L'ultima cifra deve essere aumentata di una unità se la cifra successiva è superiore a 4.

c) È sufficiente che una sola caratteristica non sia conforme ai valori indicati perché l'olio venga cambiato di categoria o dichiarato non conforme riguardo la sua purezza.

d) Le caratteristiche contrassegnate con un asterisco (*) e riguardanti la qualità dell'olio implicano che:

— per l'olio di oliva lampante, i corrispondenti valori limite possono non essere rispettati simultaneamente,

— per gli oli di oliva vergini, l'inosservanza di almeno uno di questi valori limite comporta il cambiamento di categoria, pur rimanendo classificati in una delle categorie degli oli di oliva vergini.

d) Le caratteristiche contrassegnate con due asterischi (**) implicano che per tutti gli oli di sansa di oliva i corrispondenti valori limite possono non essere rispettati simultaneamente.

▼ M20*ALLEGATO I bis***Campionatura delle partite di olio di oliva o di olio di sansa di oliva consegnate in imballaggi immediati di contenuto non superiore a 100 litri**

Il presente metodo di campionatura si applica alle consegne di olio di oliva o di olio di sansa di oliva non superiori a 125 000 litri, condizionate in imballaggi immediati di contenuto non superiore a 100 litri.

Qualora la consegna sia costituita da più di 125 000 litri, essa viene suddivisa in partite di quantità approssimativamente pari o inferiore a 125 000 litri. Qualora la consegna sia costituita da meno di 125 000 litri, essa costituisce una partita. In tali casi il metodo si applica a ciascuna partita.

Il numero minimo di prelievi elementari è fissato in funzione della dimensione della partita, conformemente alla tabella riportata al punto 1.

L'entità del prelievo elementare è determinata in funzione della capacità degli imballaggi immediati, secondo la tabella riportata al punto 2.1.

Le definizioni di consegna, prelievo elementare (incremento) e campione di laboratorio sono quelle della norma EN ISO 5555.

Si intende per «partita» un insieme di unità di vendita prodotte, fabbricate e condizionate in circostanze tali che l'olio contenuto in ciascuna di queste unità di vendita è considerato omogeneo per tutte le caratteristiche analitiche.

1. NUMERO DI PRELIEVI ELEMENTARI

Il numero minimo di prelievi elementari è fissato in funzione della dimensione della partita, conformemente alla tabella seguente:

Partita (litri) inferiore a	Numero minimo di prelievi elementari
7 500	2
25 000	3
75 000	4
125 000	5

Gli imballaggi immediati facenti parte dello stesso prelievo elementare devono essere scelti tra imballaggi contigui della partita.

In caso di dubbio, lo Stato membro aumenta il numero di prelievi elementari da effettuare.

2. CONTENUTO DEL PRELIEVO ELEMENTARE**2.1 Il prelievo elementare è costituito:**

In caso di imballaggi immediati aventi una capacità:	Il prelievo elementare riguarda l'olio di:
a) Superiore o uguale a 5 litri	a) 3 imballaggi immediati
b) Superiore o uguale a 3 litri ma inferiore a 5 litri	b) 3 imballaggi immediati
c) Superiore o uguale a 2 litri ma inferiore a 3 litri	c) 3 imballaggi immediati
d) Superiore o uguale a 1 litro ma inferiore a 2 litri	d) 6 imballaggi immediati

▼ **M20**

In caso di imballaggi immediati aventi una capacità:	Il prelievo elementare riguarda l'olio di:
e) Superiore o uguale a 0,75 litri ma inferiore a 1 litro	e) 6 imballaggi immediati
f) Inferiore a 0,75 litri	f) 3 volte l'olio del numero minimo di imballaggi la cui capacità totale supera 1,5 litri

2.2 I prelievi elementari devono essere mantenuti negli imballaggi immediati fino al momento delle analisi. In seguito, l'olio dei prelievi elementari è suddiviso eventualmente in tre campioni di laboratorio allo scopo di effettuare:

- a) le analisi di cui agli allegati II, III, IX e X;
- b) l'analisi di cui all'allegato XII;
- c) le altre analisi.

2.3 Gli imballaggi che costituiscono un prelievo elementare sono suddivisi secondo le procedure di controllo previste dalle legislazioni nazionali.

3. ANALISI E RISULTATI

- a) Ciascuno dei prelievi elementari di cui al punto 1 è suddiviso in campioni di laboratorio, conformemente al punto 2.5 della norma EN ISO 5555, e sottoposto alle analisi seguenti:

- determinazione degli acidi grassi liberi, di cui all'articolo 2, paragrafo 1, primo trattino,
- determinazione dell'indice di perossidi, di cui all'articolo 2, paragrafo 1, secondo trattino,
- analisi spettrofotometrica, di cui all'articolo 2, paragrafo 1, ottavo trattino,
- composizione di acidi grassi, di cui all'articolo 2, paragrafo 1, nono trattino.

- b) Qualora, per almeno uno dei prelievi elementari sulla stessa partita, uno dei risultati delle analisi di cui alla lettera a) non sia conforme alle caratteristiche della categoria di olio dichiarata, l'intera partita in questione è dichiarata non conforme.

Qualora, per ciascuno dei prelievi elementari sulla stessa partita, i risultati delle analisi di cui alla lettera a) non siano tutti omogenei, tenuto conto delle caratteristiche di ripetibilità dei metodi utilizzati, l'insieme della partita è dichiarata non omogenea e ciascun prelievo elementare deve essere sottoposto alle altre analisi richieste. In caso contrario, uno solo dei prelievi elementari su detta partita è sottoposto alle altre analisi richieste.

- c) Qualora uno dei risultati delle analisi di cui alla lettera b), secondo comma, non sia conforme alle caratteristiche della categoria di olio dichiarata, l'intera partita è dichiarata non conforme.

Qualora tutti i risultati delle analisi di cui alla lettera b), secondo comma, siano conformi alle caratteristiche della categoria di olio dichiarata, l'intera partita è dichiarata conforme.

▼M20*ALLEGATO I ter***SCHEMA DECISIONALE PER LA VERIFICA DELLA CONFORMITÀ
DI UN CAMPIONE DI OLIO DI OLIVA ALLA CATEGORIA
DICHIARATA**

L'analisi della conformità di un olio di oliva o di un olio di sansa di oliva alla categoria dichiarata può essere effettuata:

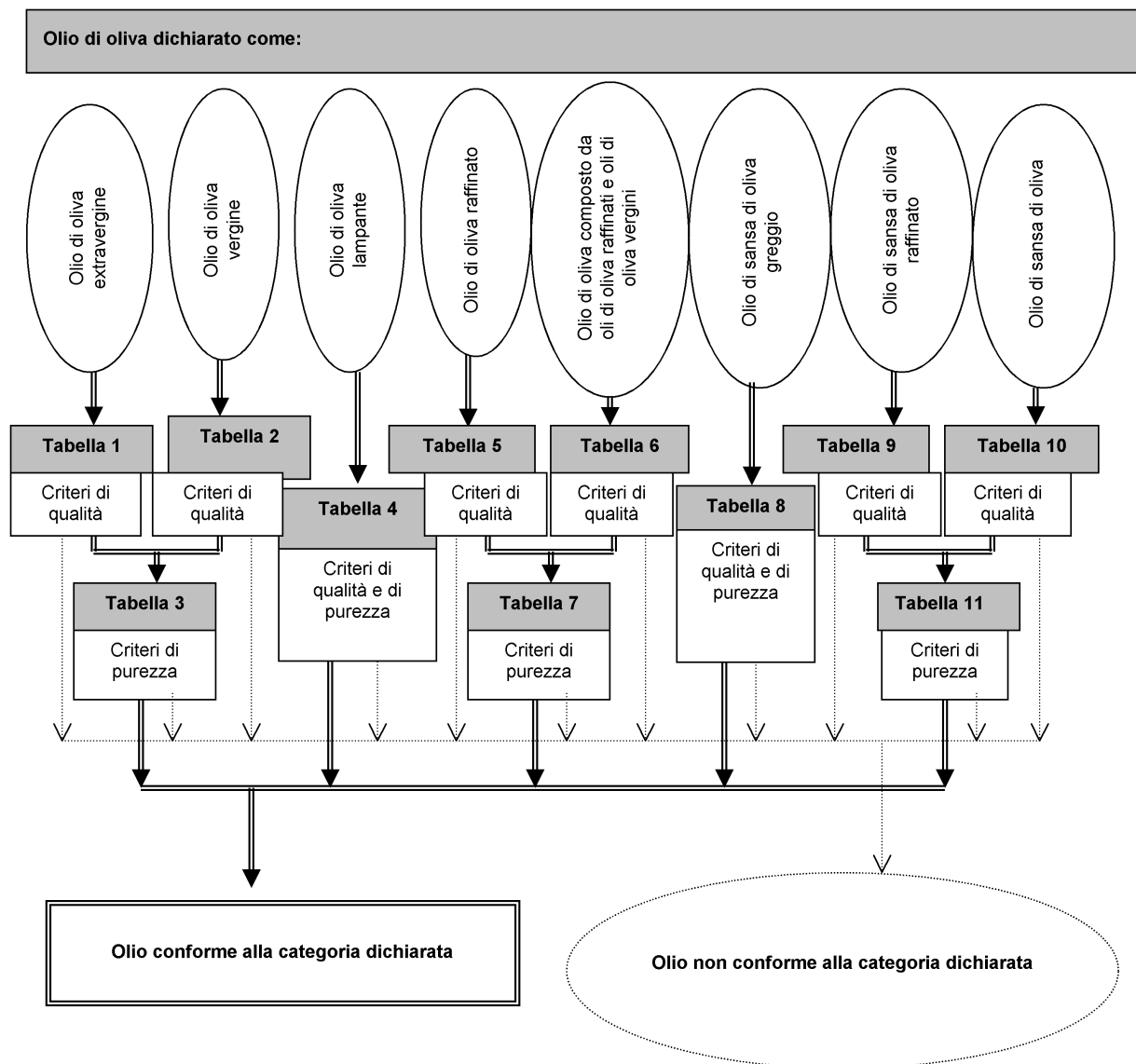
- a) mediante le analisi previste per la verifica del rispetto delle caratteristiche di cui all'allegato I, effettuate in qualunque ordine; oppure
- b) mediante le analisi previste dallo schema decisionale, effettuate secondo l'ordine ivi indicato, fino all'adozione di una delle decisioni contemplate dallo schema stesso.

Le analisi relative ai contaminanti e ai solventi alogenati, necessarie per verificare la conformità alle norme dell'Unione europea, devono essere effettuate separatamente.

Lo schema decisionale si applica a tutte le categorie di olio di oliva o di olio di sansa di oliva. Esso è costituito da tabelle, numerate da 1 a 11, che devono essere seguite nell'ordine indicato nella tabella generale in funzione della categoria di olio dichiarata.

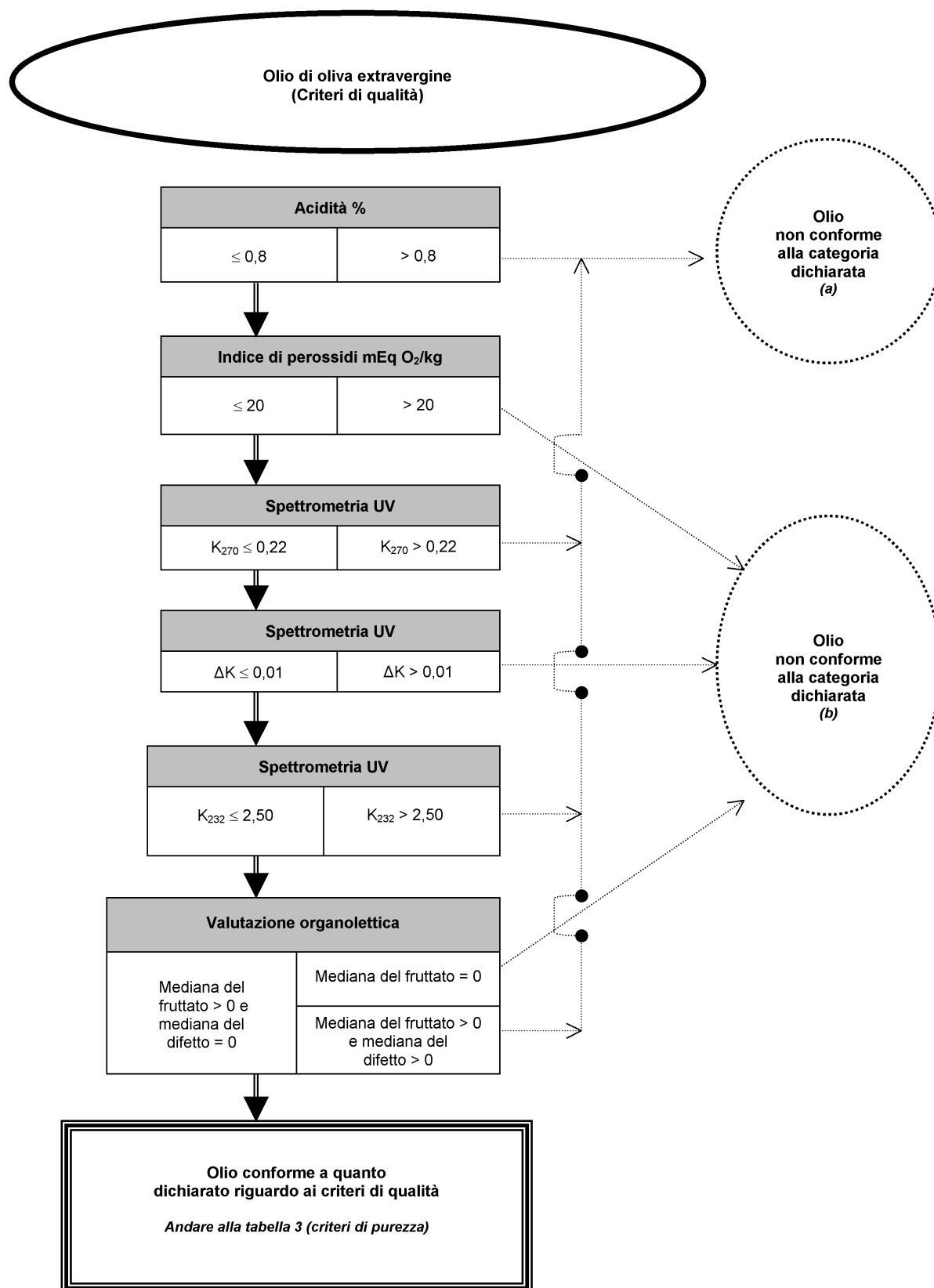
Legenda per l'interpretazione della tabella generale e delle tabelle da 1 a 11:

- La linea doppia (=) indica il percorso da seguire in caso di conformità (esito positivo) alle condizioni previste nel caso precedente. La linea punteggiata (...) indica, viceversa, il percorso da seguire in caso di non conformità.
- I titoli delle caselle che figurano nelle tabelle da 1 a 11 si riferiscono alle analisi previste dal presente regolamento, secondo le corrispondenze di cui all'appendice 1 del presente allegato.
- Le lettere che figurano nei cerchi relativi alla decisione negativa nelle tabelle da 1 a 11 rinviano ad informazioni indicative riportate nell'appendice 2 del presente allegato e non implicano di per sé l'obbligo di effettuare ulteriori analisi o la certezza delle presunzioni menzionate.

▼ **M20****Tabella generale**

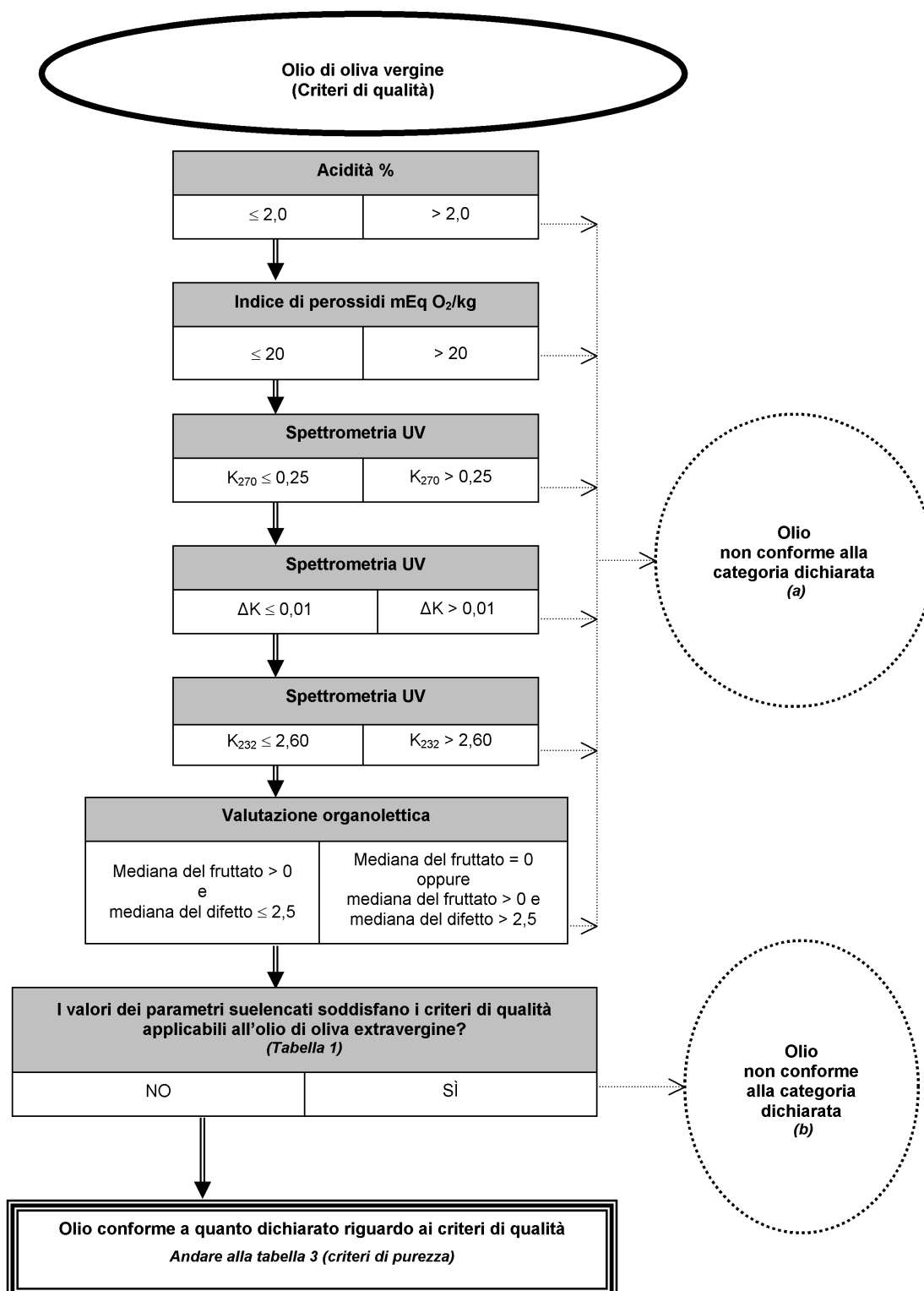
▼ **M20**

Tabella 1



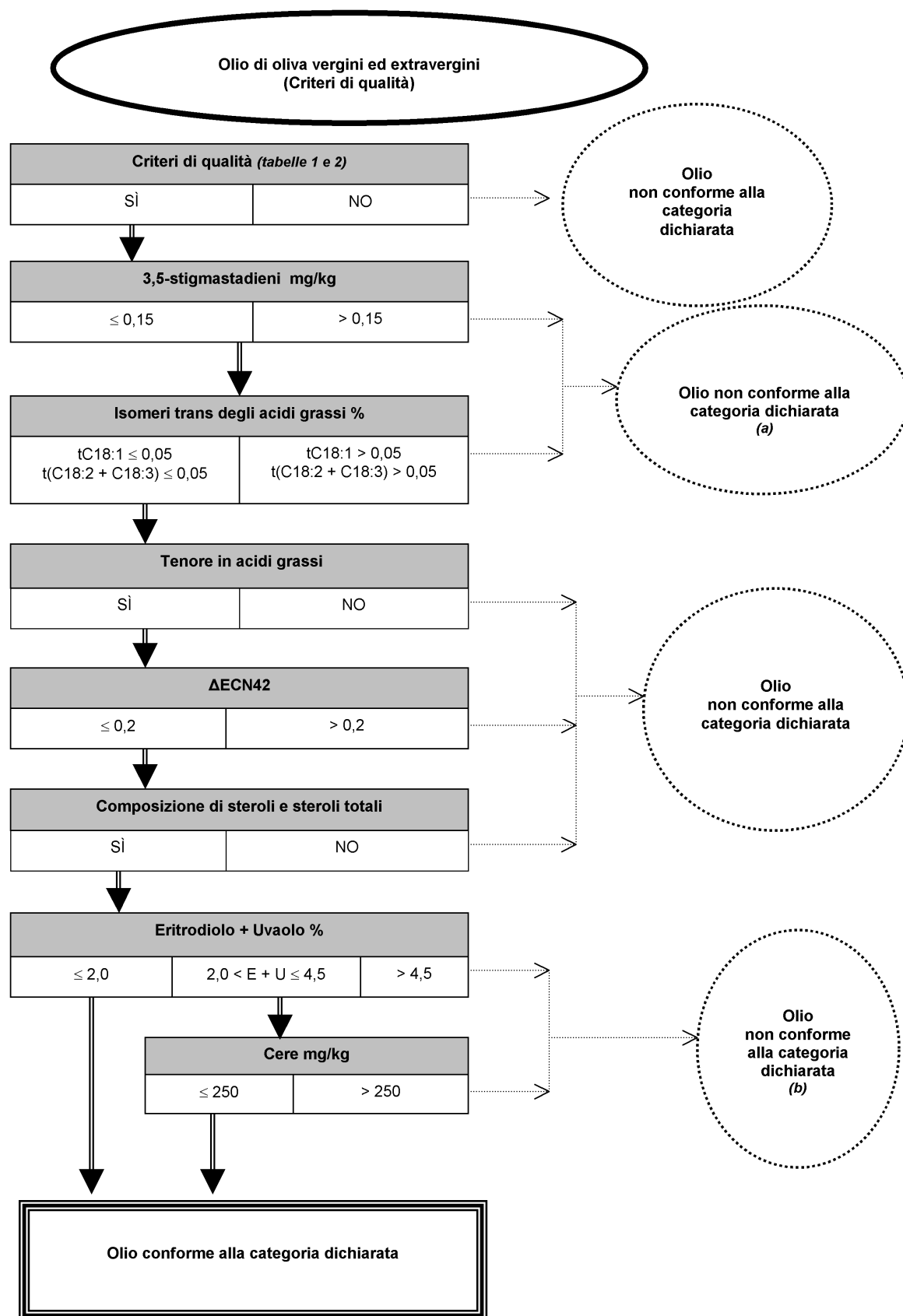
▼ **M20**

Tabella 2



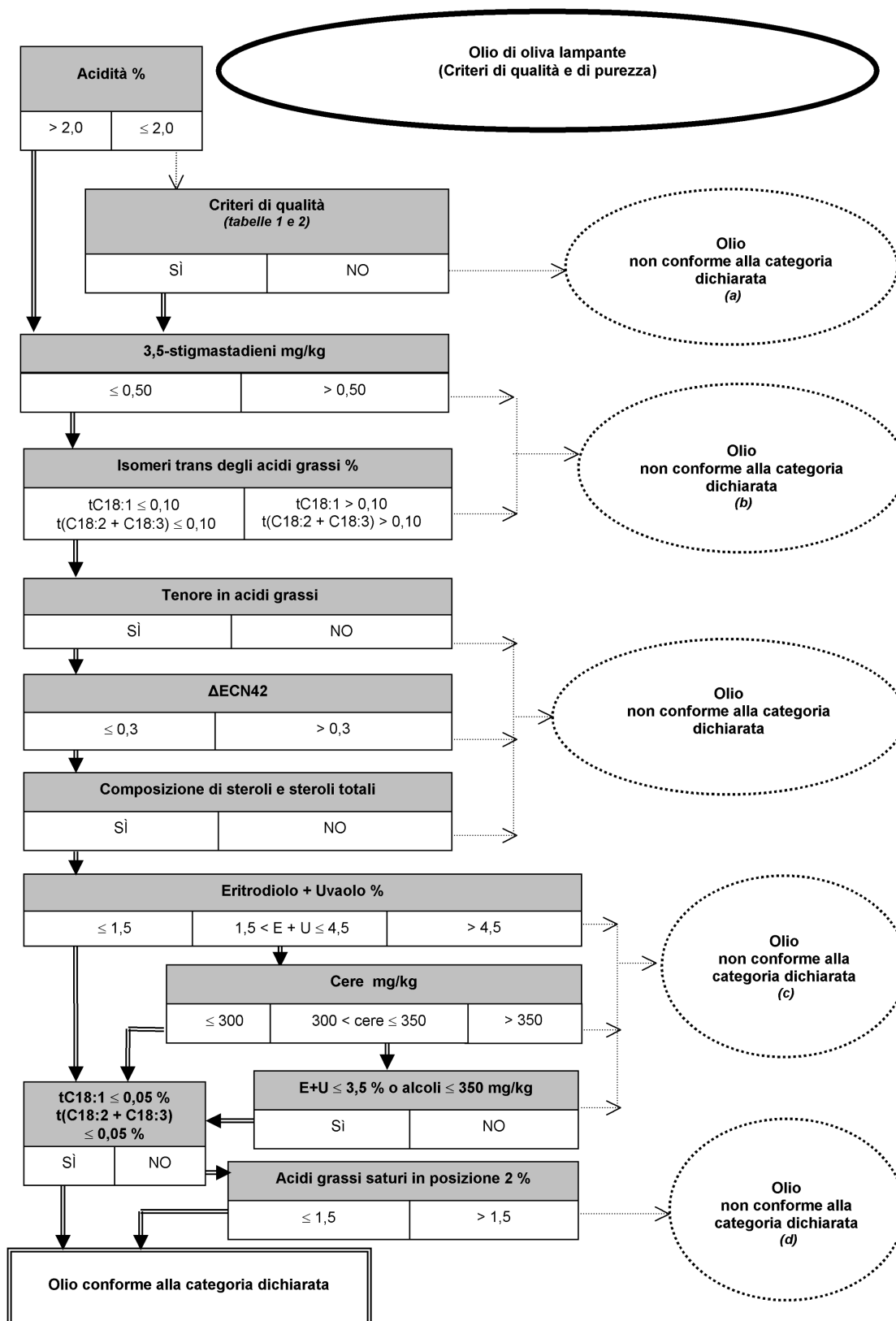
▼ **M20**

Tabella 3



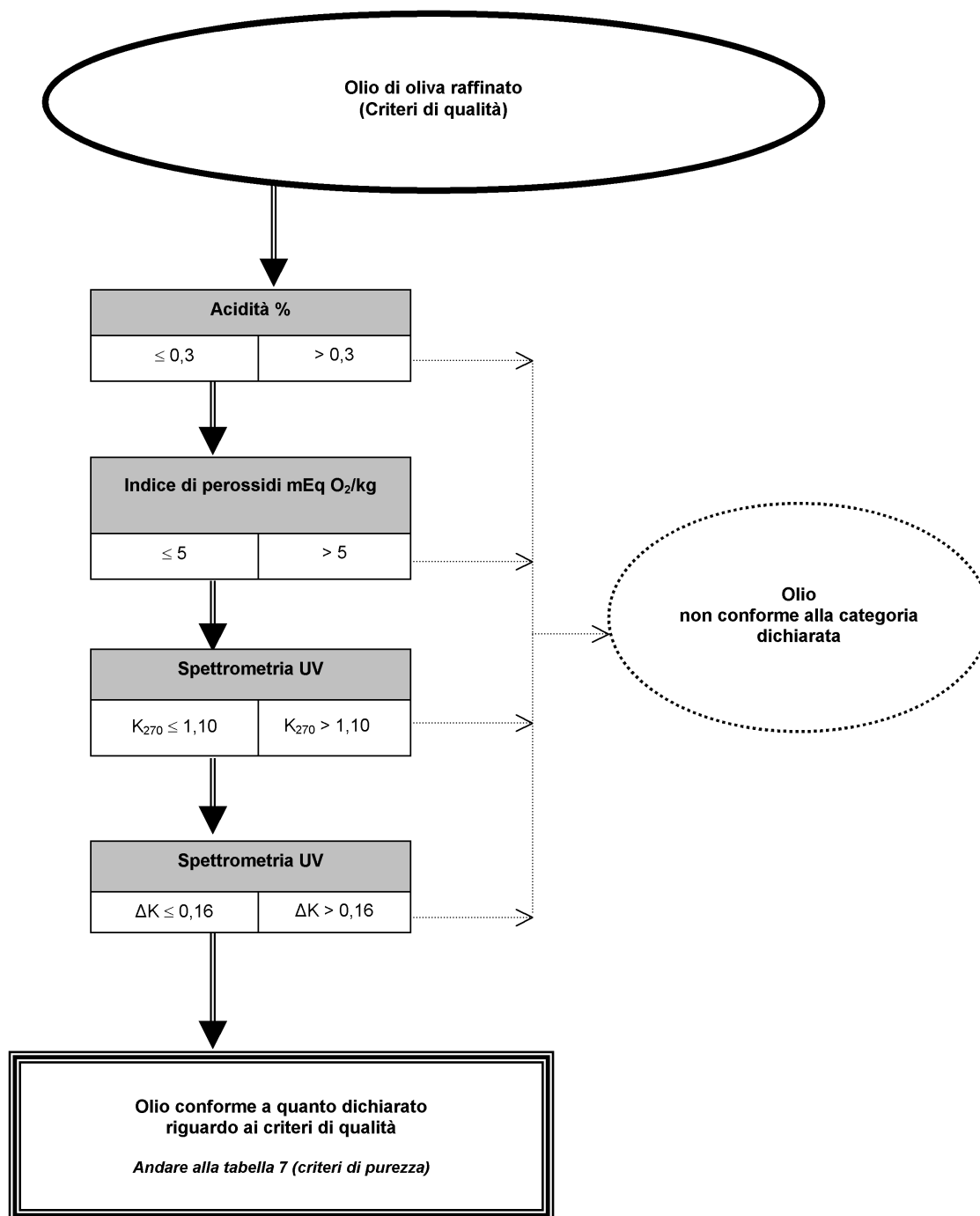
▼ **M20**

Tabella 4



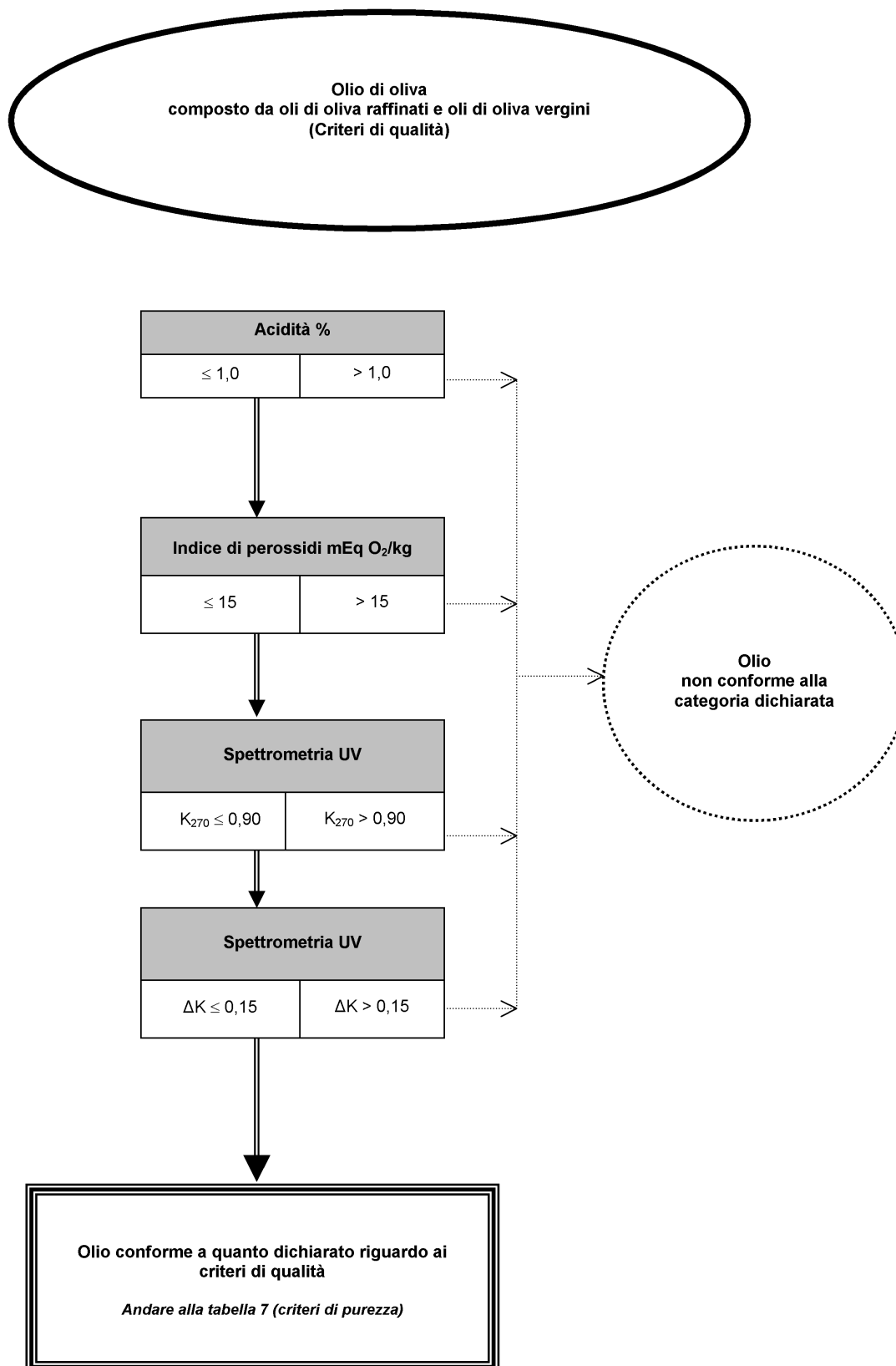
▼ **M20**

Tabella 5



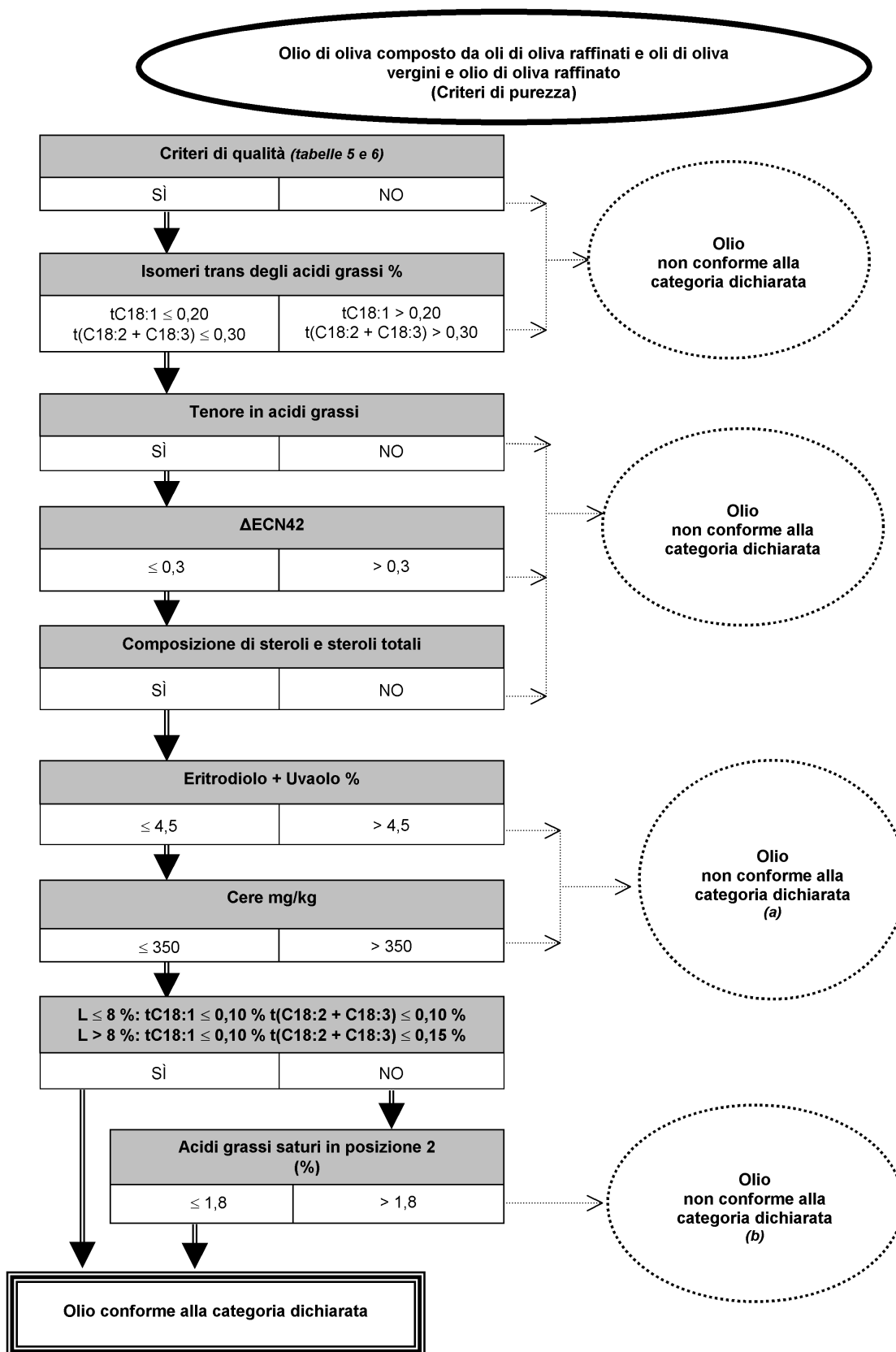
▼ **M20**

Tabella 6



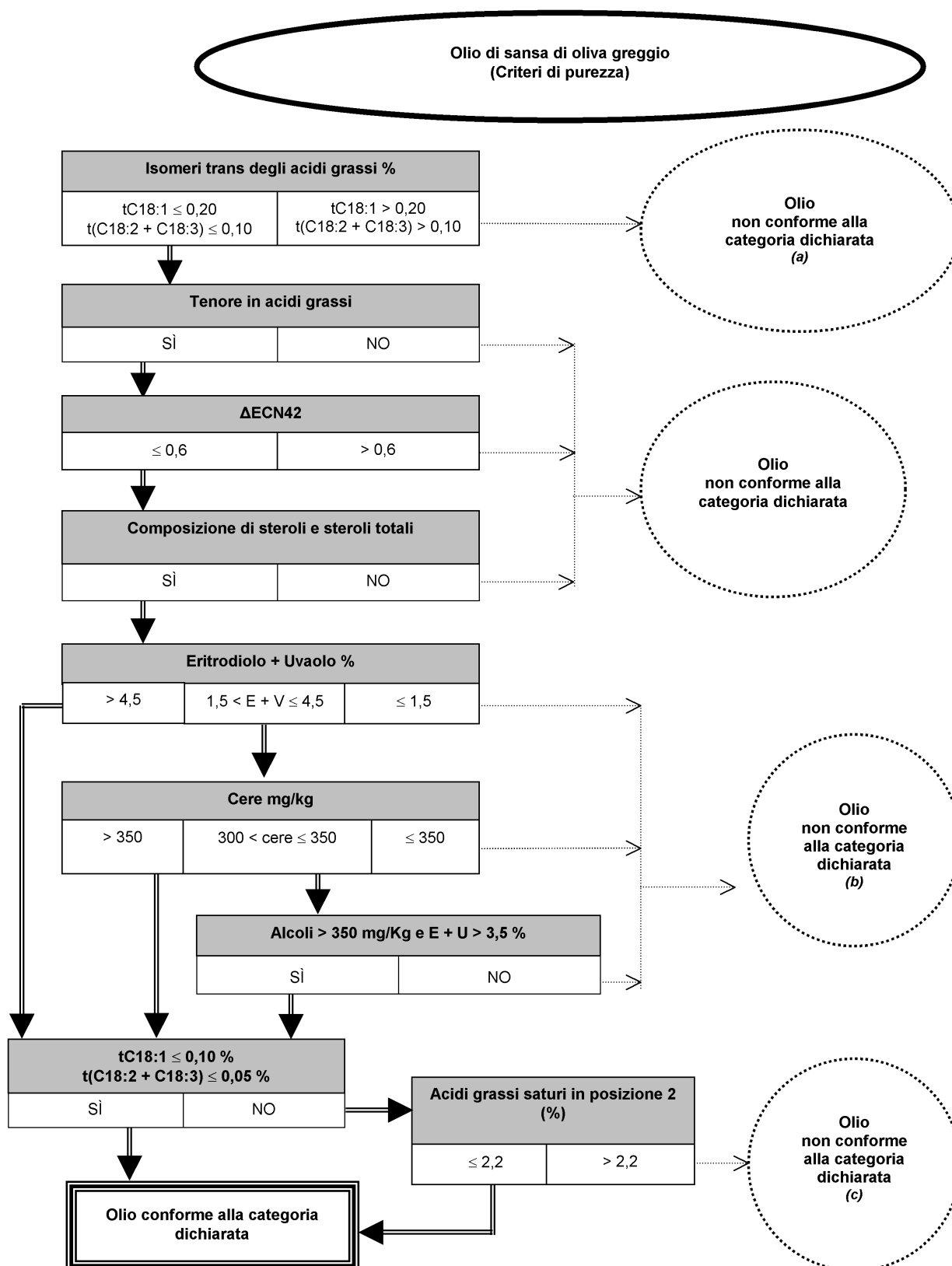
▼ **M20**

Tabella 7



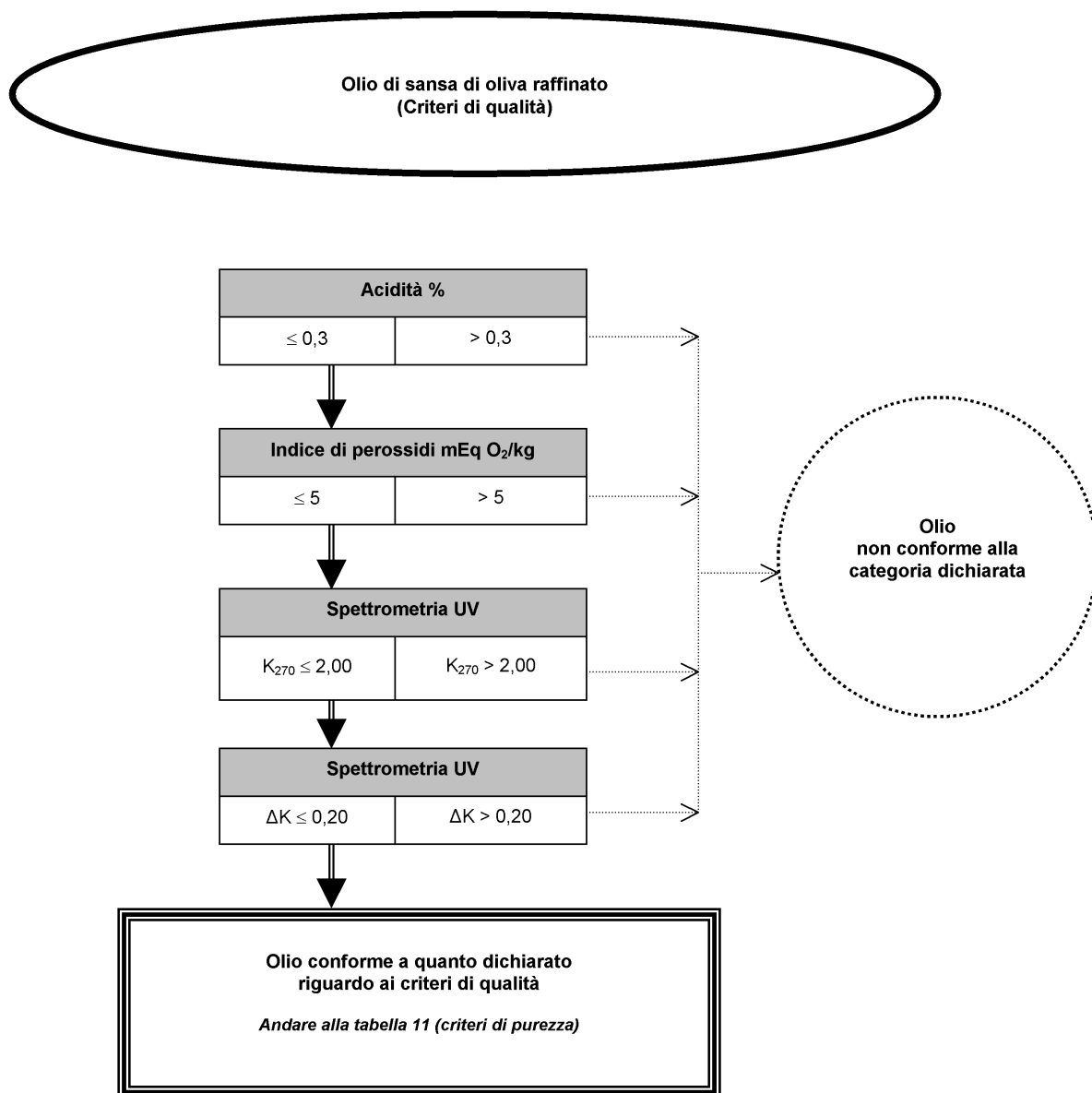
▼ **M20**

Tabella 8



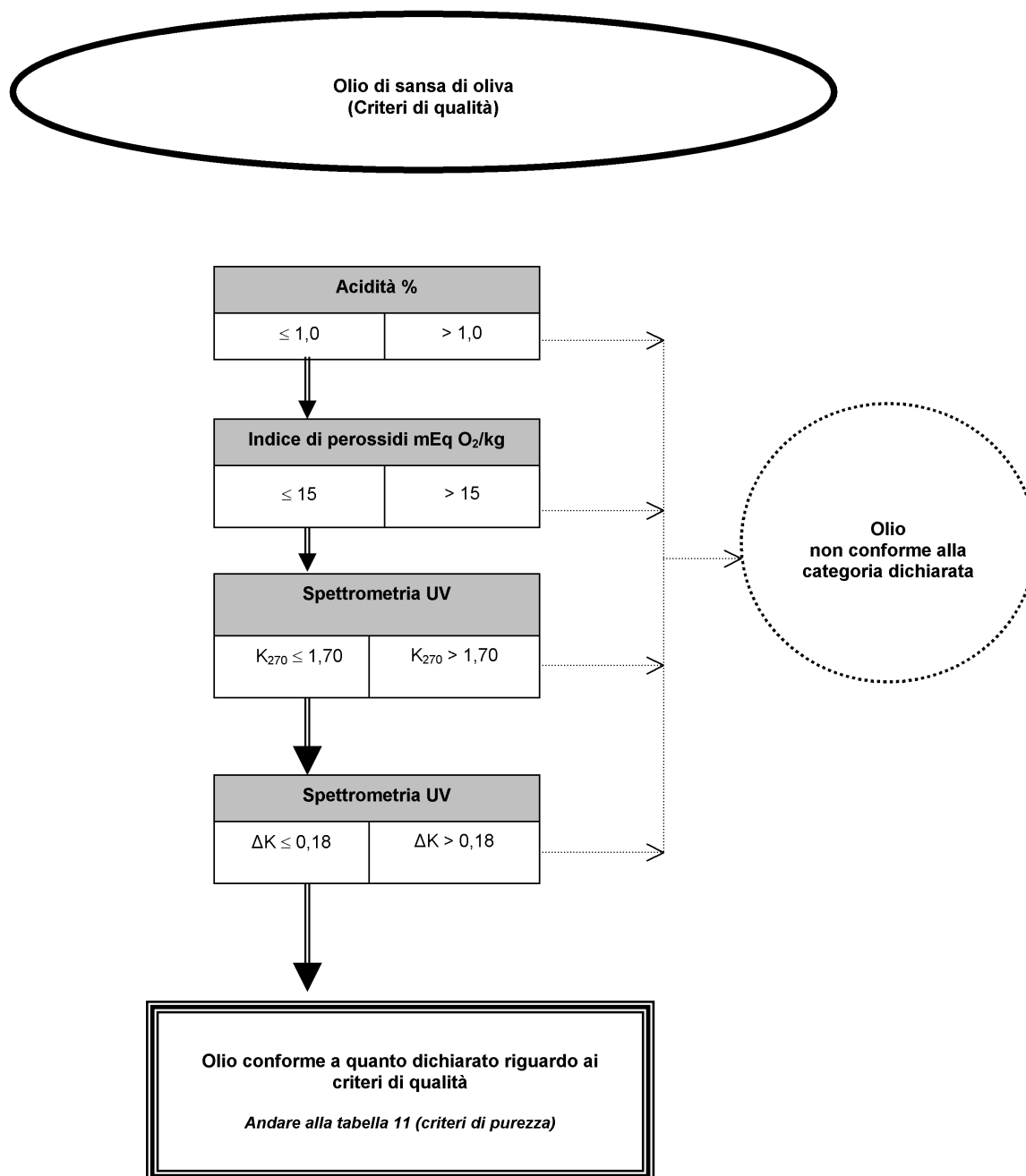
▼ **M20**

Tabella 9



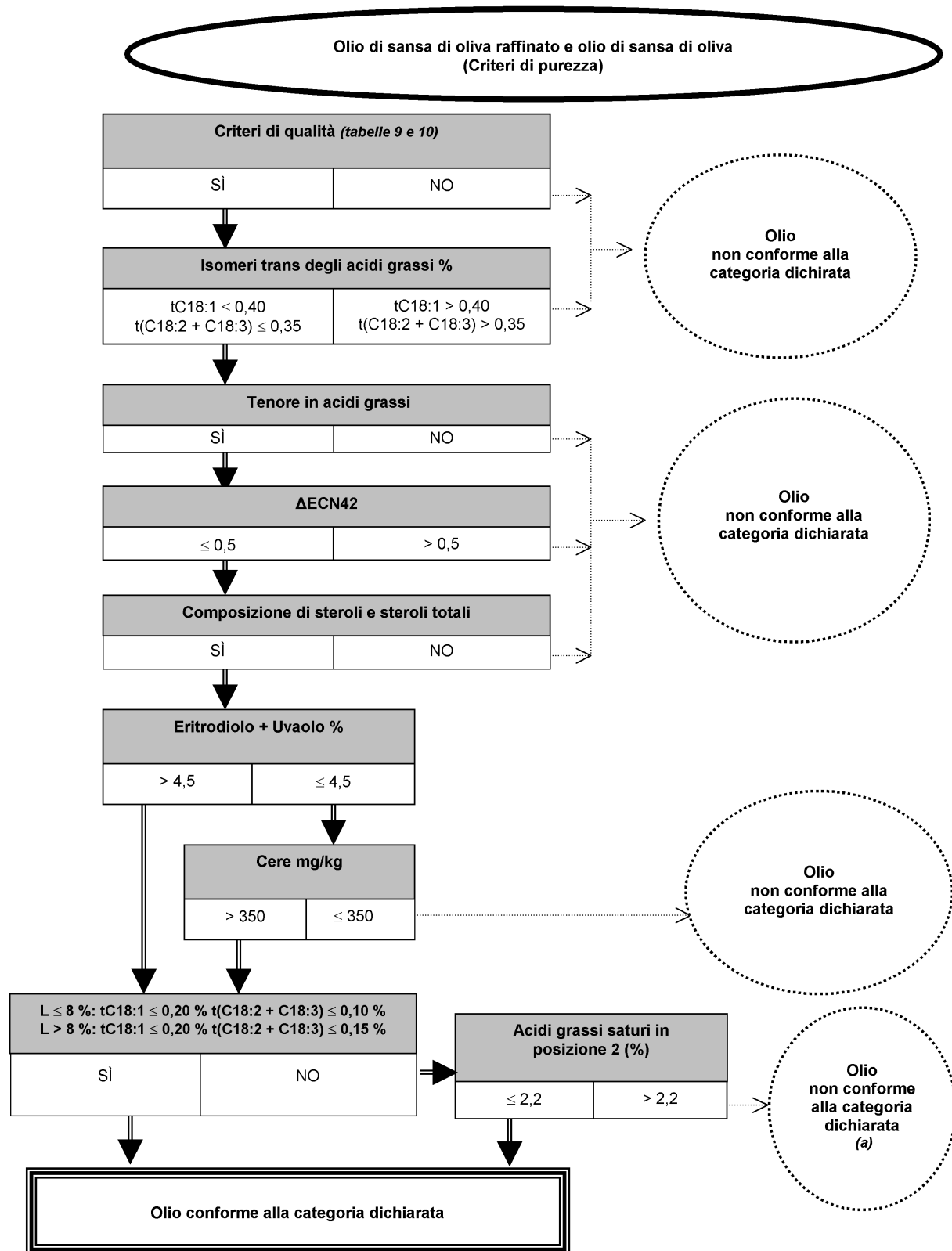
▼ **M20**

Tabella 10



▼ **M20**

Tabella 11



▼ M20*Appendice I***Corrispondenza tra gli allegati del presente regolamento e le analisi previste nello schema decisionale****▼ M21**

— Acidità	Allegato II	Determinazione degli acidi grassi liberi, metodo a freddo
-----------	-------------	---

▼ M20

— Indice di perossidi	Allegato III	Determinazione dell'indice di perossido
— Spettrofotometria a raggi ultravioletti	Allegato IX	Analisi spettrofotometrica
— Valutazione organolettica	Allegato XII	Valutazione organolettica dell'olio di oliva vergine
— Stigmasta-3,5-diene:	Allegato XVII	Metodo di determinazione degli stigmastadieni negli oli vegetali
— Isomeri trans degli acidi grassi	Allegato X a e	Analisi mediante cromatografia in fase gassosa degli esteri metilici di acidi grassi.
	Allegato X b	Preparazione degli esteri metilici di acidi grassi
— Composizione di acidi grassi	Allegato X a e	Analisi mediante cromatografia in fase gassosa degli esteri metilici di acidi grassi
	Allegato X b	Preparazione degli esteri metilici di acidi grassi
— ΔECN42	Allegato XVIII	Determinazione della composizione dei trigliceridi con ECN42 (differenza tra composizione reale e composizione teorica)
— Composizione di steroli e steroli totali	Allegato V	Determinazione della composizione e del contenuto di steroli mediante cromatografia in fase gassosa con colonna capillare
— Eritrodiolo e uvaolo	Allegato VI	Determinazione del tenore di eritrodiolo e di uvaolo
— Cere	Allegato IV	Determinazione del tenore di cere mediante cromatografia in fase gassosa con colonna capillare
— Alcoli alifatici	Allegato XIX	Determinazione del contenuto di alcoli alifatici mediante cromatografia in fase gassosa con colonna capillare

▼ M21

— Acidi grassi saturi in posizione 2	Allegato VII	Determinazione della percentuale di 2-gliceril monopalmitato
--------------------------------------	--------------	--

▼ M20*Appendice 2***Tabella 1**

- a) Cfr. olio di oliva vergine o lampante (criteri di qualità *tabella 2*, o criteri di qualità e di purezza *tabella 4*)
- b) Cfr. olio di oliva lampante (criteri di qualità e di purezza *tabella 4*)

Tabella 2

- a) Cfr. olio di oliva lampante (criteri di qualità e di purezza *tabella 4*)
- b) Cfr. olio di oliva extravergine (criteri di qualità *tabella 1*)

Tabella 3

- a) Presenza di olio raffinato (di oliva o altri)
- b) Presenza di olio di sansa di oliva

Tabella 4

- a) Cfr. olio di oliva extravergine e olio di oliva vergine (criteri di qualità *tabella 1* e *tabella 2*)
- b) Presenza di olio raffinato (di oliva o altri)
- c) Presenza di olio di sansa di oliva
- d) Presenza di oli esterificati

Tabella 7

- a) Presenza di olio di sansa di oliva
- b) Presenza di oli esterificati

Tabella 8

- a) Presenza di olio raffinato (di oliva o altri)
- b) Cfr. olio di oliva lampante (criteri di qualità e di purezza *tabella 4*)
- c) Presenza di oli esterificati

Tabella 11

- a) Presenza di oli esterificati

▼B*ALLEGATO II***▼M21****DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI LIBERI, METODO A FREDDO****▼B****1. OGGETTO**

Determinazione degli acidi grassi liberi negli oli d'oliva. Il tenore in acidi grassi liberi viene espresso mediante l'acidità calcolata in modo convenzionale.

1.1. Principio

Dissoluzione di una aliquota della sostanza da analizzare in una miscela di solventi, poi titolazione degli acidi grassi liberi presenti mediante una soluzione etanolica di idrossido di potassio.

1.2. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere di qualità analitica riconosciuta; l'acqua impiegata dev'essere acqua distillata o di purezza equivalente.

1.2.1. Etere dietilico — etanolo al 95 % (V/V), miscela 1 - 1 in volume.

Nota: l'etere etilico è molto infiammabile e può formare perossidi esplosivi. Esso deve pertanto essere usato con precauzioni particolari.

Neutralizzare esattamente al momento dell'impiego con la soluzione di idrossido di potassio (1.2.2) in presenza di 0,3 ml della soluzione di fenoltaleina (1.2.3) per 100 ml di miscela.

Nota: se non è possibile usare l'etere etilico, si può ricorrere a una miscela di solventi costituita da etanolo e da toluene. Se necessario, l'etanolo può essere sostituito dal 2-propanolo.

1.2.2. Idrossido di potassio, soluzione etanolica titolata $c(\text{KOH})$ all'incirca 0,1 mol oppure, se necessario, $c(\text{C2 KOH})$ 0,5 mol circa.

La concentrazione esatta della soluzione etanolica di idrossido di potassio deve essere nota e verificata immediatamente prima dell'uso. Impiegare una soluzione preparata almeno 5 giorni prima dell'uso e decantata in un flacone di vetro bruno chiuso con un tappo di gomma. La soluzione deve essere incolore o giallo pallida.

Nota: una soluzione incolore stabile di idrossido di potassio può essere preparata come segue. Portare e mantenere per un'ora all'ebollizione a ricadere 1 000 ml di etanolo con 8 g di idrossido di potassio e 0,5 g di trucioli di alluminio. Distillare immediatamente. Sciogliere nel distillato il quantitativo necessario di idrossido di potassio. Lasciar riposare per parecchi giorni e decantare il liquido chiaro sopranatante del precipitato di carbonato di potassio.

La soluzione può essere preparata altresì senza distillazione, come segue. A 1 000 ml di etanolo aggiungere 4 ml di butilato di alluminio e lasciar riposare la miscela per qualche giorno. Decantare il liquido sopranatante e sciogliervi il quantitativo necessario di idrossido di potassio. Questa soluzione è pronta per l'uso.

1.2.3. Fenoltaleina, soluzione di 10 g/l in etanolo al 95-96 % (V/V) o blu alcalino (nel caso di sostanze grasse fortemente colorate), soluzione di 20 g/l nell'etanolo al 95-96 % (V/V).**1.3. Apparecchiatura**

Materiale corrente da laboratorio, in particolare:

1.3.1. Bilancia analitica.**1.3.2. Beuta, avente una capacità di 250 ml.****1.3.3. Buretta, avente una capacità di 10 ml, graduata in 0,05 ml.****1.4. Modo di operare****1.4.1. Preparazione del campione da analizzare.**

▼B

La determinazione si effettua sul campione filtrato, se la somma umidità + impurezze è inferiore all'1 %, sul campione tal quale.

1.4.2. Sostanza da analizzare

Prelevare un'aliquota della sostanza da analizzare, a seconda del numero di acidità presunto, secondo le indicazioni della seguente tabella.

Numero di acidità presunto	Massa della sostanza da analizzare (in g)	Precisione della pesata della sostanza da analizzare (in g)
< 1	20	0,05
1 a 4	10	0,02
4 a 15	2,5	0,01
15 a 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Pesare la sostanza da analizzare nella beuta (1.3.2).

1.4.3. Determinazione

Sciogliere l'aliquota di sostanza da analizzare (1.4.2) in 50—150 ml della miscela etere etilico/etanolo (1.2.1) precedentemente neutralizzata.

Titolare, agitando, con la soluzione di idrossido di potassio di 0,1 mol/l (1.2.2) (►C2 vedi nota 2 ◄) fino a viraggio dell'indicatore (colorazione rosa della fenolftaleina persistente per almeno 10 s).

Nota 1: La soluzione etanolica titolata di idrossido di potassio (1.2.2) può essere sostituita con una soluzione acquosa di idrossido di potassio o di sodio se il volume d'acqua introdotto non comporta una separazione di fasi.

Nota 2: Se il quantitativo necessario di soluzione di idrossido di potassio di 0,1 mol/l supera i 10 ml, usare una soluzione di 0,5 mol/l.

Nota 3: Se la soluzione diventa torbida durante la titolazione, aggiungere un quantitativo sufficiente della miscela di solventi (1.2.1) per ottenere una soluzione chiara.

1.5. Espressione dell'acidità come % di acido oleico.

L'acidità espressa come percentuale in massa, è pari a:

$$V \times c \times \frac{M}{1000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

dove:

V = è il volume, in millilitri, della soluzione titolata di idrossido di potassio usata;

c = è la concentrazione esatta, in moli per litro, della soluzione titolata di idrossido di potassio usata;

M = è il peso molare, in grammi per mole, dell'acido adottato per l'espressione del risultato (acido oleico = 282);

m = è il peso, in grammi, della sostanza da analizzare.

Prendere come risultato la media aritmetica ►M6 di due determinazioni ◄.



ALLEGATO III

DETERMINAZIONE DEL NUMERO DI PEROSSIDI

1. OGGETTO

Si tratta di un metodo per la determinazione del numero di perossidi in oli e grassi.

2. CAMPO D'APPLICAZIONE

Oli e grassi animali e vegetali.

3. DEFINIZIONE

Il numero di perossidi è il quantitativo delle sostanze presenti nel campione, espresse in milliequivalenti di ossigeno attivo per kg, che ossidano lo ioduro di potassio nelle condizioni che vengono descritte.

4. PRINCIPIO

Trattamento della sostanza in esame, sciolta in acido acetico e cloroformio, con una soluzione di ioduro di potassio. Titolazione dello iodio liberato con soluzione di tiosolfato di sodio standardizzata.

5. APPARECCHIATURA

Tutta l'apparecchiatura usata dev'essere esente da sostanze riducenti od ossidanti.

Nota: Non ungere le superfici smerigliate.

5.1. Ditale di vetro da 3 ml.

5.2. ►C2 Palloni a collo e tappo smerigliato ◄, aventi una capacità di circa 250 ml, previamente asciugati e riempiti di gas puro, secco inerte (azoto o, di preferenza, anidride carbonica).

5.3. Buretta da 25 o 50 ml, graduata in 0,1 ml.

6. REAGENTI

6.1. Cloroformio, di qualità per reagente analitico, liberato dall'ossigeno facendovi gorgogliare una corrente di gas inerte puro e secco.

6.2. Acido acetico glaciale, di qualità per analisi, liberato dall'ossigeno facendovi gorgogliare una corrente di gas puro e secco.

6.3. Ioduro di potassio, soluzione acquosa satura, di recente preparazione, esente da iodio e da iodati.

6.4. Tiosolfato di sodio, 0,01 o 0,02 N, soluzione acquosa accuratamente standardizzata immediatamente prima dell'uso.

6.5. Soluzione di amido, dispersione acquosa di 10 g/l, di recente preparazione da amido naturale solubile.

7. CAMPIONE

Prelevare il campione e conservarlo al riparo dalla luce, tenendolo al fresco e mettendolo in contenitori di vetro completamente riempiti, sigillati ermeticamente con tappi a smeriglio o di sughero.

8. PROCEDIMENTO

La prova dev'essere effettuata alla luce del giorno diffusa oppure alla luce artificiale. Pesare in un ditale di vetro (5.1) oppure, in mancanza, in un pallone (5.2) con l'approssimazione di 0,001 g, una massa del campione conformemente alla seguente tabella e al numero di perossidi previsto:

Numero di perossidi previsto (meq)	Peso della sostanza da analizzare (in g)
0 — 12	5,0 — 2,0
12 — 20	2,0 — 1,2
20 — 30	1,2 — 0,8

▼B

Numero di perossidi previsto (meq)	Peso della sostanza da analizzare (in g)
30 — 50	0,8 — 0,5
50 — 90	0,5 — 0,3

Stappare un pallone (5.2) ed introdurre il ditale di vetro contenente la sostanza da analizzare. Aggiungere 10 ml di cloroformio (6.1). Sciogliere la sostanza da analizzare rapidamente, agitando. Aggiungere 15 ml di acido acetico (6.2), quindi 1 ml di soluzione di ioduro di potassio (6.3). Ritappare rapidamente, agitare per 1 minuto e lasciar riposare per 5 minuti esatti al riparo dalla luce, ad una temperatura compresa tra 15 e 25 °C.

Aggiungere circa 75 ml di acqua distillata. Titolare lo iodio liberato con una soluzione di tiosolfato di sodio (6.4) (soluzione 0,002 N per valori previsti inferiori a 12 e soluzione 0,01 N per valori previsti superiori a 12) agitando vigorosamente, usando la soluzione di amido (6.5) come indicatore.

Eseguire due determinazioni sullo stesso campione di sostanza.

Eseguire contemporaneamente una prova in bianco. Se il risultato del bianco supera 0,05 ml di soluzione 0,01 N di tiosolfato di sodio (6.4), sostituire i reagenti impuri.

9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il numero di perossidi (P.V.), espresso in milliequivalenti di ossigeno attivo per kg, viene dato dalla formula:

$$P.V. = \frac{V \times T}{m} \times 1000$$

dove:

V = è il numero di ml della soluzione standardizzata di tiosolfato di sodio (6.4) usata per la prova, corretto in modo da tener conto della prova in bianco.

T = è la normalità esatta della soluzione di tiosolfato di sodio (6.4) usata.

m = è il peso in g della sostanza da analizzare.

Considerare come risultato la media aritmetica delle due determinazioni eseguite.

▼ **M21***ALLEGATO IV***DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI CERE MEDIANTE
GASCROMATOGRAFIA CON COLONNA CAPILLARE****1. OGGETTO**

Il metodo descrive un procedimento per la determinazione del contenuto di cere negli oli d'oliva. Le cere sono separate in funzione del numero di atomi di carbonio. Il metodo può essere impiegato in particolare per differenziare l'olio d'oliva di pressione da quello di estrazione (olio di sansa).

2. PRINCIPIO

La sostanza grassa, addizionata di opportuno standard interno, viene frazionata mediante cromatografia su colonna di gel di silice idratato; la frazione eluita per prima nelle condizioni di prova (avente polarità inferiore a quella dei trigliceridi) viene recuperata e quindi analizzata direttamente mediante gascromatografia in colonna capillare.

3. APPARECCHIATURA**3.1. Beuta da 25 ml.****3.2. Colonna in vetro per gascromatografia con diametro interno 15,0 mm e altezza 30-40 cm, provvista di rubinetto.****3.3. Gascromatografo idoneo per il funzionamento con colonna capillare, dotato di sistema di introduzione diretta in colonna costituito da:****3.3.1. Camera termostatica per le colonne a temperatura programmabile.****3.3.2. Iniettore a freddo per introduzione diretta in colonna.****3.3.3. Rivelatore a ionizzazione di fiamma e convertitore-amplificatore.****3.3.4. Registratore-integratore idoneo per il funzionamento con il convertitore-amplificatore (3.3.3), con tempo di risposta non superiore a 1 secondo e con velocità della carta variabile. *(Possono essere utilizzati anche sistemi informatici che consentono l'acquisizione di dati di gascromatografia mediante computer).*****3.3.5. Colonna capillare in vetro o silice fusa, lunga 8-12 m, diametro interno 0,25-0,32 mm, internamente ricoperta con liquido di ripartizione, di spessore uniforme compreso fra 0,10 e 0,30 µm. *(Si trovano in commercio due liquidi di ripartizione adatti all'uso, del tipo SE52 o SE54).*****3.4. Microsiringa per introduzione diretta in colonna da 10 µl con ago cementato.****3.5. Vibratore elettrico.****3.6. Evaporatore rotante.****3.7. Forno a muffola.****3.8. Bilancia analitica in grado di garantire una precisione di misura di + 0,1 mg.****3.9. Normale vetreria da laboratorio.****4. REAGENTI****4.1. Gel di silice di granulometria compresa tra 60 e 200 µm.**

Il gel di silice è posto in muffola a 500 °C per almeno 4 ore. Dopo raffreddamento è addizionato del 2 % di acqua rispetto alla quantità di gel di silice prelevata. Si agita bene allo scopo di omogeneizzare la massa. Si conserva al buio per almeno 12 ore prima dell'uso.

4.2. n-esano per cromatografia.**4.3. Etere etilico per cromatografia.****4.4. n-eptano per cromatografia.****4.5. Soluzione campione di lauril arachidato, allo 0,1 % (v/m) in esano (standard interno). *(Si può utilizzare anche palmitil palmitato o miristil stearato).***

▼ **M21**

- 4.5.1. *Sudan 1 (1-fenilazo-2-naftolo).*
- 4.6. Gas vettore: idrogeno o elio puro per gascromatografia.
- 4.7. Gas ausiliari:
- idrogeno puro per gascromatografia,
 - aria pura per gascromatografia.

5. **PROCEDIMENTO**5.1. **Preparazione della colonna cromatografica**

Mettere in sospensione 15 g di gel di silice (4.1) in n-esano (4.2) e introdurla in colonna (3.2). Dopo assestamento spontaneo, completare lo stesso con l'ausilio di un vibratore elettrico per rendere più omogeneo il letto cromatografico. Percolare 30 ml di n-esano allo scopo di allontanare le eventuali impurezze. Pesare esattamente, nella beuta da 25 ml (3.1), circa 500 mg di campione con la bilancia (3.8), aggiungere l'opportuna quantità di standard interno (4.5) in funzione del presunto contenuto di cere. Ad esempio aggiungere 0,1 mg di lauril arachidato nel caso di olio di oliva, e da 0,25 a 0,50 mg nel caso di olio di sansa. Immettere il campione così preparato nella colonna cromatografica con l'ausilio di due porzioni da 2 ml ciascuna di n-esano (4.2).

Lasciar fluire il solvente fino a 1 mm sopra l'assorbente, quindi percolare altri 70 ml di n-esano allo scopo di eliminare gli n-alcani naturalmente presenti. Iniziare quindi l'eluizione cromatografica raccogliendo 180 ml di miscela n-esano/etere etilico in rapporto 99:1, rispettando un flusso di circa 15 gocce ogni 10 secondi. L'eluizione del campione deve essere effettuata a una temperatura ambiente di $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4$.

NB: — La miscela n-esano/etere etilico (99:1) deve essere preparata ogni giorno.

- Per controllare visivamente la corretta eluizione delle cere, è possibile aggiungere al campione in soluzione 100 µl di sudan 1 all'1 % nella miscela di eluizione. Il colorante ha una ritenzione intermedia tra le cere e i trigliceridi, pertanto quando la colorazione raggiunge il fondo della colonna cromatografica bisogna sospendere l'eluizione, in quanto tutte le cere sono state eluite.

Essiccare la frazione così ottenuta mediante evaporatore rotante (3.6) fino ad eliminazione quasi completa del solvente. Eliminare gli ultimi 2 ml di solvente mediante un debole flusso di azoto; aggiungere quindi 2-4 ml di n-eptano.

5.2. **Analisi gascromatografica**5.2.1. *Operazioni preliminari*

Installare la colonna nel gascromatografo (3.3), collegando il terminale di ingresso al sistema «on column» e il terminale di uscita al rivelatore. Eseguire i controlli generali del complesso gascromatografico (tenuta dei circuiti dei gas, efficienza del rivelatore e del sistema di registrazione, ecc.).

Se la colonna è messa in uso per la prima volta è consigliabile procedere al suo condizionamento. Far fluire un leggero flusso di gas attraverso la colonna, quindi avviare il complesso gascromatografico. Riscaldare gradualmente fino a raggiungere, dopo circa 4 ore, la temperatura di $350\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mantenere tale temperatura per almeno 2 ore, quindi portare il complesso alle condizioni di funzionamento (regolazione del flusso dei gas, accensione della fiamma, collegamento con il registratore elettronico (3.3.4), regolazione della temperatura della camera per colonna, del rivelatore, ecc.) e registrare il segnale ad una sensibilità almeno due volte superiore a quella prevista per l'esecuzione dell'analisi. Il tracciato della linea di base deve risultare lineare, esente da picchi di qualsiasi natura, e non deve presentare deriva.

Una deriva rettilinea negativa indica imperfetta tenuta delle connessioni della colonna, una deriva positiva indica un insufficiente condizionamento della colonna.

5.2.2. *Scelta delle condizioni operative*

Le condizioni operative di massima sono le seguenti:

- temperatura della colonna:

▼ **M21**

	20 °C/ min		5 °C/ min		20 °C/ min	
inizio a 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10')

- temperatura del rivelatore: 350 °C,
- quantità di sostanza iniettata: 1 µl della soluzione (2-4 ml) di n-eptano,
- gas vettore: elio o idrogeno alla velocità lineare ottimale per il gas prescelto (cfr. appendice),
- sensibilità strumentale: idonea a soddisfare le sottostanti condizioni.

Tali condizioni possono essere variate in funzione delle caratteristiche della colonna e del gascromatografo in modo da avere una separazione di tutte le cere, una risoluzione soddisfacente dei picchi (cfr. figura) e una ritenzione dello standard interno C₃₂ di 18 ± 3 minuti. Il picco delle cere più rappresentativo deve avere un'altezza superiore al 60 % del fondo scala.

I parametri di integrazione dei picchi devono essere impostati in modo da ottenere una corretta valutazione delle aree dei picchi che vengono presi in considerazione.

NB: Vista l'elevata temperatura finale, è ammessa una deriva positiva che non deve superare il 10 % del fondo scala.

5.3. Esecuzione dell'analisi

Prelevare 1 µl di soluzione con la microsiringa da 10 µl; estrarre lo stantuffo della siringa in modo che l'ago resti vuoto. Introdurre l'ago attraverso il dispositivo di iniezione e, dopo 1-2 secondi, iniettare rapidamente; estrarre quindi lentamente l'ago dopo circa 5 secondi.

Effettuare la registrazione fino a completa eluizione delle cere.

La linea di base deve rispondere sempre ai requisiti richiesti.

5.4. Identificazione dei picchi

L'identificazione dei singoli picchi viene effettuata in base ai tempi di ritenzione e in confronto a miscele di cere a tempi di ritenzione noti, analizzate nelle medesime condizioni.

Nella figura è riportato un cromatogramma delle cere di un olio di oliva vergine.

5.5. Valutazione quantitativa

Procedere al calcolo delle aree dei picchi dello standard interno e degli esteri alifatici da C₄₀ a C₄₆ per mezzo dell'integratore.

Calcolare il contenuto di cere in ogni singolo estere, in mg/kg di sostanza grassa, secondo la formula seguente:

$$\text{estere, mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

in cui:

A_x = area del picco del singolo estere, in millimetri quadrati

A_s = area del picco dello standard interno, in millimetri quadrati

m_s = massa di standard interno aggiunta, in milligrammi

m = massa di campione prelevato per la determinazione, in grammi.

6. ESPRESSIONE DI RISULTATI

Riportare la somma dei contenuti delle singole cere da C₄₀ a C₄₆ in mg/kg di sostanza grassa (ppm).

NB: I componenti da quantificare si riferiscono ai picchi a numero di carbonio pari compresi tra gli esteri C₄₀ e C₄₆, secondo l'esempio di cromatogramma delle cere dell'olio di oliva riportato nella figura

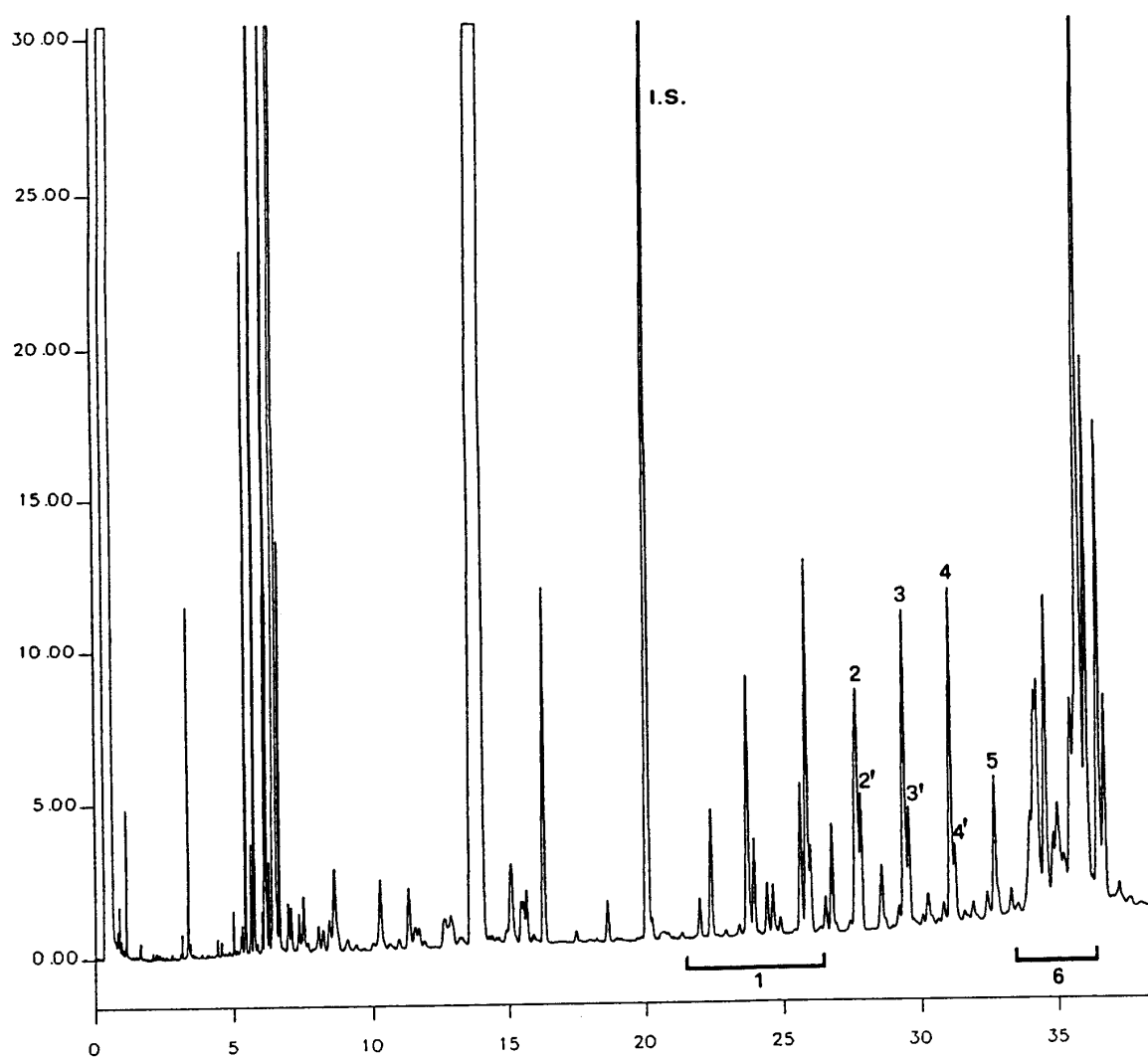
▼ M21

seguito. Se l'estere C_{46} risulta sdoppiato, si consiglia, ai fini della sua identificazione, di analizzare la frazione cerosa di un olio di sansa dove il picco C_{46} risulta facilmente individuabile in quanto nettamente maggioritario.

I risultati si esprimono con due cifre decimali.

▼ M21

Figura

Cromatogramma delle cere di un olio d'oliva ⁽¹⁾

Legenda:

- I.S. = Lauril arachidato
- 1. = Esteri diterpenici
- 2 + 2' = Esteri C₄₀
- 3 + 3' = Esteri C₄₂
- 4 + 4' = Esteri C₄₄
- 5. = Esteri C₄₆
- 6. = Esteri steroli e alcoli triterpenici.

⁽¹⁾ Dopo l'eluizione degli esteri degli steroli, il tracciato cromatografico non deve presentare picchi significativi (trigliceridi).

▼ M21*Appendice***Determinazione della velocità lineare del gas**

Iniettare nel gascromatografo, regolato alle normali condizioni operative, da 1 a 3 μl di metano (o propano). Cronometrare il tempo che il gas impiega a percorrere la colonna, dal momento dell'iniezione al momento dell'uscita del picco (t_M).

La velocità lineare in cm/s è data da L/t_M in cui L è la lunghezza della colonna in centimetri e t_M è il tempo cronometrato in secondi.



ALLEGATO V

**DETERMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE E DEL CONTENUTO DI
STEROLI MEDIANTE GASCROMATOGRAFIA CON COLONNA
CAPILLARE**

1. OGGETTO

Il metodo descrive un procedimento per la determinazione del contenuto di steroli, singoli e totali, delle sostanze grasse.

2. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza grassa, addizionata di α -colestano quale standard interno, è saponificata con idrossido di potassio in soluzione etanolica, quindi l'insaponificabile viene estratto con etere etilico.

Dall'insaponificabile estratto è separata la frazione sterolica mediante cromatografia su placca di gel di silice basica; gli steroli recuperati dal gel di silice vengono trasformati in trimetilsilileteri ed analizzati mediante gascromatografia in colonna capillare.

3. APPARECCHIATURA

3.1. Matracchio da 250 ml, munito di refrigerante a ricadere con giunti a smeriglio.

3.2. Imbuti separatori da 500 ml.

3.3. Matracci da 250 ml.

3.4. Attrezzatura completa per analisi cromatografica su strato sottile, per lastre di vetro 20 × 20 cm.

3.5. Lampada a luce ultravioletta, con lunghezza d'onda 366 o 254 nm.

3.6. Microsiringhe da 100 µl e 500 µl.

3.7. Imbuto cilindrico filtrante a setto poroso G 3 (porosità 15-40 µm) di diametro circa 2 cm e altezza circa 5 cm, con attacco idoneo per filtrazione sotto vuoto e giunto smerigliato maschio 12/21.

3.8. Beuta per vuoto da 50 ml con giunto femmina smerigliato 12/21 adattabile all'imbuto filtrante (3.7.).

3.9. Provetta da 10 ml a fondo conico con tappo a tenuta.

3.10. Gascromatografo idoneo per il funzionamento con colonna capillare, dotato di sistema di splittaggio, costituito da:

3.10.1. Camera termostatica per le colonne, idonea a mantenere la temperatura desiderata con la precisione di ± 1 °C.

3.10.2. Complesso di vaporizzazione termoregolabile con elemento vaporizzante in vetro persilanizzato.

3.10.3. Rivelatore a ionizzazione di fiamma e convertitore-amplificatore.

3.10.4. Registratore-integratore idoneo per il funzionamento con il convertitore-amplificatore (3.10.3.), con tempo di risposta non superiore a 1 secondo e con velocità della carta variabile.

3.11. Colonna capillare in vetro o silice fusa, lunga 20 + 30 m, diametro interno 0,25 + 0,32 mm, internamente ricoperta con liquido SE-52 o SE-54 o equivalenti, con spessore uniforme compreso fra 0,10 e 0,30 µm.

3.12. Microsiringa per gascromatografia da 10 µl con ago cementato.

4. REAGENTI

4.1. Potassio idrossido, soluzione etanolica circa 2 N: si sciolgono, sotto raffreddamento, 130 g di idrossido di potassio (titolo minimo 85 %) in 200 ml di acqua distillata, quindi si porta ad 1 litro con etanolo. La soluzione si conserva in bottiglie di vetro scuro ben tappate.

4.2. Etere etilico, puro per analisi.

4.3. Sodio solfato anidro, puro per analisi.

▼B

- 4.4. Lastre di vetro stratificate con gel di silice, senza indicatore di fluorescenza, spessore 0,25 mm (sono reperibili in commercio già pronte per l'uso).
- 4.5. Potassio idrossido, soluzione etanolica 0,2 N: si sciolgono 13 g di idrossido di potassio in 20 ml di acqua distillata e si porta a 1 litro con etanolo.
- 4.6. Benzene, per cromatografia (vedi 5.2.2).
- 4.7. Acetone, per cromatografia (vedi 5.2.2).
- 4.8. Esano, per cromatografia (vedi 5.2.2).
- 4.9. Etere etilico, per cromatografia.
- 4.10. Cloroformio, puro per analisi.
- 4.11. Soluzione di riferimento per la cromatografia su placca: colesterolo o fitosteroli, soluzione al ►**M6** 2 % ◀ in cloroformio.
- 4.12. 2,7-Diclorofluoresceina, soluzione etanolica allo 0,2 %. Si rende leggermente basica aggiungendo qualche goccia di soluzione alcolica 2 N di idrossido di potassio.
- 4.13. Piridina anidra, per cromatografia.
- 4.14. Esametildisilazano.
- 4.15. Trimetilclorosilano.
- 4.16. Soluzioni campione di trimetilsilileteri degli steroli: si preparano al momento dell'impiego partendo da steroli puri o da miscele di steroli ottenute da oli che li contengono.
- 4.17. α -coletanololo, soluzione allo 0,2 % (m/V) in cloroformio (standard interno).
- 4.18. Gas vettore: idrogeno o elio, puri per gascromatografia.
- 4.19. Gas ausiliari:
 - idrogeno, puro per gascromatografia
 - aria, pura per gascromatografia.

5. PROCEDIMENTO

- 5.1. Preparazione dell'insaponificabile.
 - 5.1.1. Nel matraccio da 250 ml si introduce, impiegando la microsiringa da 500 μ l, un volume di soluzione di α -coletanololo allo 0,2 % in cloroformio (4.17.) che contenga una quantità di α -coletanololo corrispondente a circa il 10 % del contenuto di steroli nell'aliquota di campione da prelevare per la determinazione. Ad esempio per 5 g di campione si aggiungano 500 μ l della soluzione di α -coletanololo allo 0,2 % se trattasi di un olio di oliva e 1 500 μ l se trattasi di ►**M6** ————— ◀ olio di sansa di oliva.

Si evapora in corrente di azoto fino a secchezza, quindi nello stesso matraccio si pesano esattamente 5 g di campione secco e filtrato.

In caso di oli ►**M6** ————— ◀ contenenti quantità notevoli di colesterolo può essere presente un picco avente tempo di ritenzione identico al coletanololo. In tali casi occorre analizzare la frazione sterolica in doppio con e senza standard interno ►**M6** oppure utilizzare betulinolo al posto del colesterolo ◀.
 - 5.1.2. Si aggiungono 50 ml di soluzione etanolica di idrossido di potassio 2 N, si applica il refrigerante a ricadere e si scalda a leggera ebollizione su bagnomaria sotto continua energica agitazione, fino a saponificazione avvenuta (la soluzione diviene limpida). Si continua il riscaldamento ancora per 20 minuti, quindi si aggiungono 50 ml di acqua distillata facendoli scendere dall'alto del refrigerante, si stacca il refrigerante e si raffredda il matraccio a circa 30 °C.
 - 5.1.3. Si travasa il contenuto del matraccio quantitativamente, in un imbuto separatore da 500 ml, aiutandosi con acqua distillata, a più riprese, impiegandone complessivamente circa 50 ml. Si aggiungono circa 80 ml di etere etilico, si agita energicamente per circa 30 secondi e si lascia stratificare (nota 1).

▼B

Si separa la fase acquosa sottostante raccogliendola in un secondo imbuto separatore. Sulla fase acquosa si effettuano ancora due estrazioni, con le stesse modalità, impiegando ogni volta 60-70 ml di etere etilico.

Nota 1 — Eventuali emulsioni possono essere eliminate aggiungendo, mediante spruzzetta, piccole quantità di alcool etilico o metilico.

- 5.1.4. Si riuniscono gli estratti eteri in un unico imbuto separatore e si lavano con acqua distillata (50 ml per volta) fino a reazione neutra delle acque di lavaggio.

Eliminata l'acqua di lavaggio, si essicca con solfato di sodio anidro e si filtra, su solfato sodico anidro, in un matraccio da 250 ml previamente pesato, lavando imbuto e filtro con piccole quantità di etere etilico.

- 5.1.5. Si distilla l'etere fino a pochi ml, quindi si porta a secco sotto leggero vuoto o in corrente di azoto, si completa l'essiccamento in stufa a 100 °C per un quarto d'ora circa e, dopo raffreddamento in essiccatore, si pesa.

- 5.2. Separazione della frazione sterolica.

- 5.2.1. Preparazione delle lastre basiche: si immergono le lastre al gel di silice (4.4.), completamente, nella soluzione etanolica 0,2 N di idrossido di potassio (4.5.) per 10 secondi, si lasciano quindi asciugare sotto cappa per 2 ore ed infine si pongono in stufa a 100 °C per 1 ora.

Si tolgono dalla stufa e si conservano in essiccatore a cloruro di calcio fino al momento dell'impiego (le placche così trattate devono essere impiegate entro 15 giorni).

Nota 2 Impiegando per la separazione della frazione sterolica delle lastre di gel di silice basiche si elimina la necessità del trattamento dell'insaponificabile con allumina. In tal modo vengono trattenuti sulla linea di caricamento tutti i composti di natura acida (acidi grassi ed altro) ottenendosi così la banda degli steroli nettamente separata dalle bande degli alcoli alifatici e triterpenici.

- 5.2.2. Nella camera di sviluppo delle lastre si introduce una miscela benzene-acetone 95:5 (V/V) fino all'altezza di circa 1 cm. In alternativa può essere usata una miscela esano-etere etilico 65:35 (V/V). Si chiude la camera con l'apposito coperchio e si lascia così per almeno mezz'ora in modo che si stabilisca l'equilibrio liquido-vapore. Sulle superfici interne della camera possono essere fissate delle strisce di carta da filtro che peschino nell'eluente: questo accorgimento permette di ridurre di circa 1/3 il tempo di sviluppo e di ottenere una più uniforme e regolare eluizione dei componenti.

Nota 3: Al fine di ottenere condizioni di eluizione perfettamente riproducibili la miscela di sviluppo deve essere sostituita ad ogni prova.

- 5.2.3. Si prepara una soluzione al 5 % circa di insaponificabile (5.1.5.) in cloroformio e, con la microsiringa da 100 µl si depositano su una placca cromatografica (5.2.1.) a 2 cm circa da una estremità, 0,3 ml di detta soluzione, in striscia il più possibile sottile ed uniforme. In allineamento con la linea di caricamento, ad un'estremità della lastra si depositano 2-3 µl della soluzione di riferimento degli steroli (4.11.), allo scopo di identificare, a sviluppo ultimato, la banda degli steroli.

- 5.2.4. Si pone la placca nella camera di sviluppo preparata come detto in 5.2.2. La temperatura ambiente dovrà essere mantenuta fra 15 e 20 °C. Si chiude subito la camera col coperchio e si lascia eluire fino a che il fronte del solvente sia arrivato a circa 1 cm dal bordo superiore della placca. Si rimuove quindi la placca dalla camera di sviluppo e si evapora il solvente in corrente di aria calda oppure lasciando la placca per un pò di tempo sotto cappa.

- 5.2.5. Si spruzza la placca debolmente ed uniformemente con la soluzione di 2,7-diclorofluoresceina. Osservando la lastra alla luce ultravioletta si individua la banda degli steroli per allineamento con la macchia ottenuta con la soluzione di riferimento; si delimitano con una matita nera i limiti della banda lungo i margini di fluorescenza.

- 5.2.6. Con una spatola metallica si raschia il gel di silice compreso nell'area delimitata. Il materiale asportato, finemente sminuzzato, viene introdotto nell'imbuto filtrante (3.7.); si aggiungono 10 ml di cloroformio caldo, si mescola accuratamente con la spatola metallica e si filtra aiutandosi con

▼B

il vuoto, raccogliendo il filtrato nella beuta (3.8.) collegata all'imbuto filtrante.

Si lava il residuo nell'imbuto per tre volte con etere etilico (circa 10 ml per volta) raccogliendo sempre il filtrato nella stessa beuta adattata all'imbuto. Si evapora il filtrato fino ad un volume di circa 4-5 ml, si trasferisce la soluzione residua nella provetta da 10 ml (3.9.) previamente pesata, si porta a secco con blando riscaldamento in leggera corrente di azoto, si riprende con qualche goccia di acetone, si riporta ancora a secco, si pone 10 minuti circa in stufa a 105 °C indi si lascia raffreddare in essiccatore e si pesa.

Il residuo contenuto nella provetta è costituito dalla frazione sterolica.

5.3. Preparazione dei trimetilsilileteri.

- 5.3.1. Nella provetta contenente la frazione sterolica si aggiunge il reattivo per la sililazione, costituito da una miscela di piridina-esametildisilazano-trimetilclorosilano 9:3:1 (V/V/V) (nota 4) in ragione di 50 µl per ogni milligrammo di steroli, evitando ogni assorbimento di umidità (nota 5).

Nota 4 — Esistono in commercio soluzioni già pronte per l'uso; sono inoltre disponibili altri reagenti silanizzanti, quali ad esempio il bis-trimetiltrifluorolacetammide + 1 % trimetilclorosilano da diluire con uno stesso volume di piridina anidra.

- 5.3.2. Si tappa la provetta, si agita cautamente (senza capovolgere) fino a completa solubilizzazione degli steroli. Si lascia a sé per almeno 15 minuti a temperatura ambiente, quindi si centrifuga per alcuni minuti: la soluzione limpida è pronta per l'analisi gascromatografica.

Nota 5 — L'eventuale formazione di una leggera opalescenza è normale e non è causa di alcun disturbo. La formazione di un flocculato bianco o la comparsa di una colorazione rosa sono indizio della presenza di umidità o di alterazione del reattivo. In questo caso la prova dovrà essere ripetuta.

5.4. Analisi gascromatografica.

5.4.1. Operazioni preliminari, condizionamento della colonna.

- 5.4.1.1. Si installa nel gascromatografo la colonna, collegando il terminale di ingresso all'evaporatore connesso col sistema di splittaggio e il terminale di uscita al rivelatore.

Si eseguono i controlli generali del complesso gascromatografico (tenuta dei circuiti dei gas, efficienza del rivelatore, efficienza del sistema di splittaggio e del sistema di registrazione, ecc.).

- 5.4.1.2. Se la colonna è messa in uso per la prima volta è consigliabile procedere al suo condizionamento. Si fa fluire un leggero flusso di gas attraverso la colonna stessa, quindi si accende il complesso gascromatografico e si inizia un riscaldamento graduale fino a raggiungere una temperatura di almeno 20 °C superiore a quella di esercizio (nota 6). Si mantiene tale temperatura per almeno 2 ore, quindi si porta il complesso alle condizioni di funzionamento (regolazione del flusso dei gas e dello splittaggio, accensione della fiamma, collegamento con il registratore elettronico, regolazione della temperatura della camera per la colonna, del rivelatore e dell'iniettore, ecc.) e si registra il segnale ad una sensibilità almeno 2 volte superiore a quella prevista per l'esecuzione dell'analisi. Il tracciato della linea di base deve risultare lineare, esente da picchi di qualsiasi natura, e non deve presentare deriva.

Una deriva rettilinea negativa indica imperfetta tenuta delle connessioni della colonna, una deriva positiva indica un insufficiente condizionamento della colonna.

Nota 6 — La temperatura di condizionamento deve in ogni caso essere inferiore di almeno 20 °C alla temperatura massima prevista per il liquido di ripartizione impiegato.

5.4.2. Scelta delle condizioni operative.

- 5.4.2.1. Condizioni operative di massima sono le seguenti:

- temperatura della colonna: 260 °C ± 5 °C
- temperatura dell'evaporatore: 280 °C
- temperatura del rivelatore: 290 °C

▼B

- velocità lineare del gas di trasporto: elio 20 + 35 cm/s, idrogeno 30 + 50 cm/s
- rapporto di splittaggio: da 1:50 a 1:100
- sensibilità strumentale: da 4 a 16 volte l'attenuazione minima
- sensibilità di registrazione: 1 + 2 mV f.s.
- velocità della carta: 30 + 60 cm/ora
- quantità di sostanza iniettata: 0,5 + 1 µl di soluzione di TMSE.

Tali condizioni possono essere modificate in funzione delle caratteristiche della colonna e del gascromatografo in modo da ottenere cromatogrammi che soddisfino le condizioni seguenti:

- il tempo di ritenzione del β-sitosterolo deve essere 20 ± 5 minuti
- il picco del campesterolo deve essere: per l'olio di oliva (contenuto medio 3 %) 15 ± 5 % del fondo scala, per l'olio di soia (contenuto medio 20 %) 80 ± 10 % del fondo scala
- si deve avere separazione di tutti gli steroli presenti; è necessario che i picchi oltre che separati siano anche completamente risolti cioè che il tracciato del picco raggiunga la linea di base prima dell'uscita del picco successivo. È tuttavia tollerata anche una risoluzione incompleta a condizione però che sia quantificabile secondo la perpendicolare il picco a TRR 1,02.

5.4.3. Esecuzione dell'analisi.

5.4.3.1. Con la microsiringa da 10 µl si preleva 1 µl di esano, si aspirano 0,5 µl di aria e successivamente 0,5 + 1 µl della soluzione del campione; si alza ancora lo stantuffo della siringa in modo che l'ago sia vuoto. Si introduce l'ago attraverso la membrana del complesso di iniezione e dopo 1-2 secondi si inietta rapidamente e si estrae quindi lentamente l'ago dopo circa 5 secondi.

5.4.3.2. Si effettua la registrazione fino a completa eluizione dei TMSE degli steroli presenti.

La linea di base deve essere sempre corrispondente ai requisiti richiesti (5.4.1.2.).

5.4.4. Identificazione dei picchi.

L'identificazione dei singoli picchi viene effettuata in base ai tempi di ritenzione e per paragone con miscele di TMSE degli steroli, analizzate nelle medesime condizioni.

Gli steroli vengono eluiti secondo il seguente ordine: colesterolo, brassicasterolo, 24-metilcolesterolo, campesterolo, campestanolo, stigmasterolo, Δ⁷-campesterolo, Δ^{5,23}-stigmastadienolo, clerosterolo, β-sitosterolo, sitostanololo, Δ⁵ — -avenasterolo, Δ^{5,24}-stigmastadienolo, Δ⁷-stigmastanololo, Δ⁷-avenasterolo.

Nella Tabella I sono riportati i tempi di ritenzione relativi al sitosterolo per le colonne SE 52 e SE 54.

Le figure 1 e 2 illustrano cromatogrammi tipici di alcuni oli.

5.4.5. Valutazione quantitativa.

5.4.5.1. Si procede al calcolo con l'integratore, delle aree dei picchi dell'α-colestanolo e degli steroli. Non vengono considerati i picchi di eventuali componenti non compresi fra quelli elencati nella Tabella I. Il coefficiente di risposta dell'α-colestanolo si deve intendere unitario.

5.4.5.2. Si calcola il contenuto di ogni singolo sterolo, in mg/100 g di sostanza grassa, come segue:

$$\text{sterolo } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 100}{A_s \cdot m}$$

in cui:

A_x = area del picco dello sterolo x ► **M6** ————— ◀;

▼B

A_s = area del picco dell' α -colestano **M6** ————— ◀;

m_s = massa di α -colestano aggiunta, in milligrammi;

m = massa del campione prelevato per la determinazione, in grammi.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

6.1 Si riportano i contenuti dei singoli steroli, in mg/100 g di sostanza grassa e, come steroli totali, la loro somma.

6.2 Si calcola il contenuto percentuale di ogni singolo sterolo dal rapporto fra l'area del picco corrispondente e la sommatoria delle aree dei picchi degli steroli.

$$\% \text{ dello sterolo } x = \frac{A_x}{\sum A} \cdot 100$$

in cui:

A_x = Area del picco x ,

$\sum A$ = Sommatoria delle aree di tutti i picchi.



APPENDICE

Determinazione della velocità lineare dei gas

Nel gascromatografo, regolato alle normali condizioni operative, si iniettano 1 + 3 µl di metano (o propano) e si cronometra il tempo che il gas impiega a percorrere la colonna, dal momento dell'iniezione al momento dell'uscita del picco (t_M).

La velocità lineare in cm/s è data da L/t_M in cui L è la lunghezza della colonna in centimetri e t_M è il tempo cronometato in secondi.

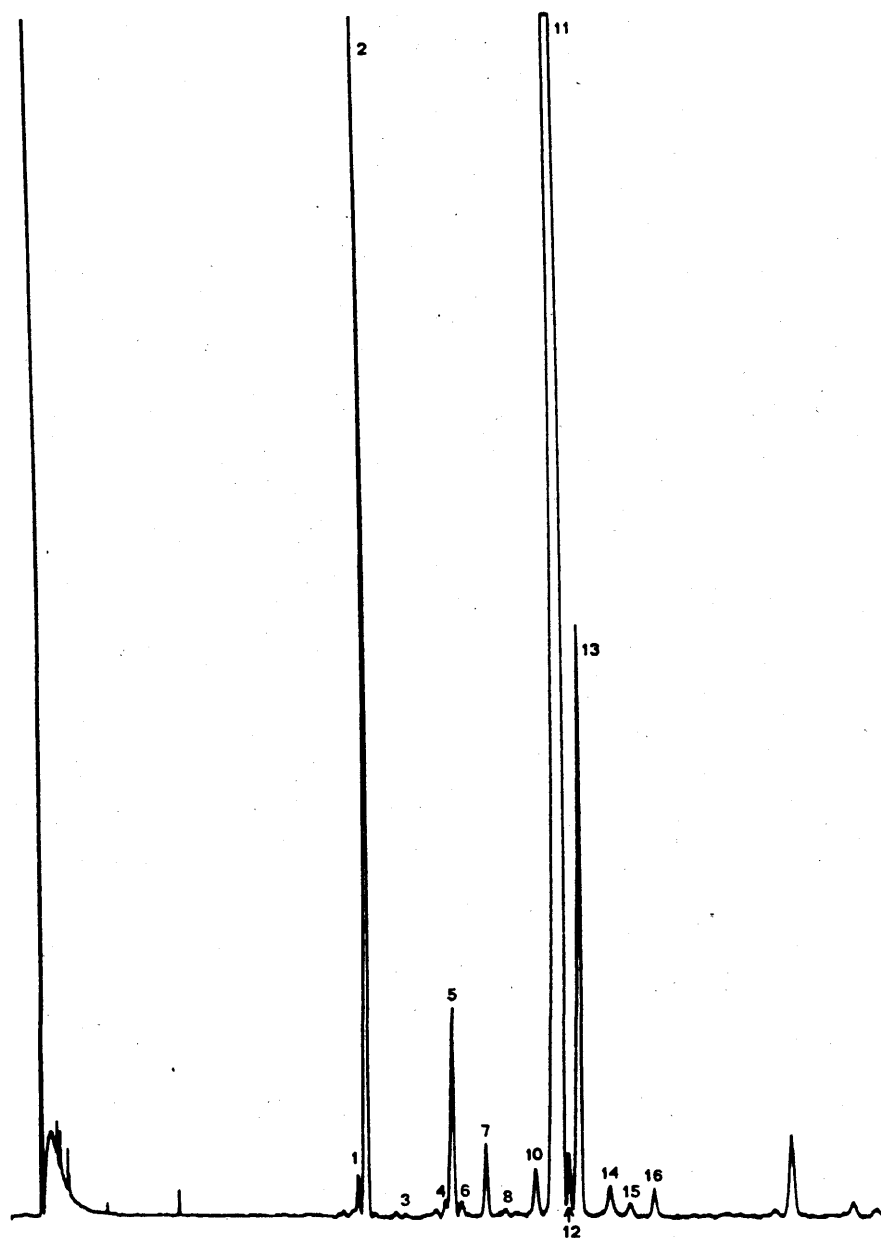
Tabella I

Tempi di ritenzione relativi degli steroli

Picco	Identificazione		Tempo di ritenzione relativo	
			Colonna SE 54	Colonna SE 52
1	colesterolo	Δ -5-colesten-3 β -olo	0,67	0,63
2	colestano	5 α -colestan-3 β -olo	0,68	0,64
3	brassicasterolo	[24S]-24-metil- Δ -5,22-colestadien-3 β -olo	0,73	0,71
4	24-metilencolesterolo	24-metilen- Δ -5,24-colestadien-3 β -olo	0,82	0,80
5	campesterolo	[24R]-24-metil- Δ -5-colesten-3 β -olo	0,83	0,81
6	campestanolo	[24R]-24-metil-colestan-3 β -olo	0,85	0,82
7	stigmasterolo	[24S]-24-etil- Δ -5,22-colestadien-3 β -olo	0,88	0,87
8	Δ -7-campesterolo	[24R]-24-metil- Δ -7-colesten-3 β -olo	0,93	0,92
9	Δ -5,23-stigmastadienolo	[24R,S]-24-etil- Δ -5,23-colestadien-3 β -olo	0,95	0,95
10	clerosterolo	[24S]-24-etil- Δ -5,25-colestadien-3 β -olo	0,96	0,96
11	β -sitosterolo	[24R]-24-etil- Δ -5-colesten-3 β -olo	1,00	1,00
12	sitostano	24-etil-colestan-3 β -olo	1,02	1,02
13	Δ -5-avenasterolo	[24Z]-24-etiliden-5-colesten-3 β -olo	1,03	1,03
14	Δ -5,24-stigmastadienolo	[24R,S]-24-etil- Δ -5,24-colestadien-3 β -olo	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastenolo	[24R,S]-24-etil- Δ -7-colesten-3 β -olo	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasterolo	[24Z]-24-etiliden- Δ -7-colesten-3 β -olo	1,16	1,16

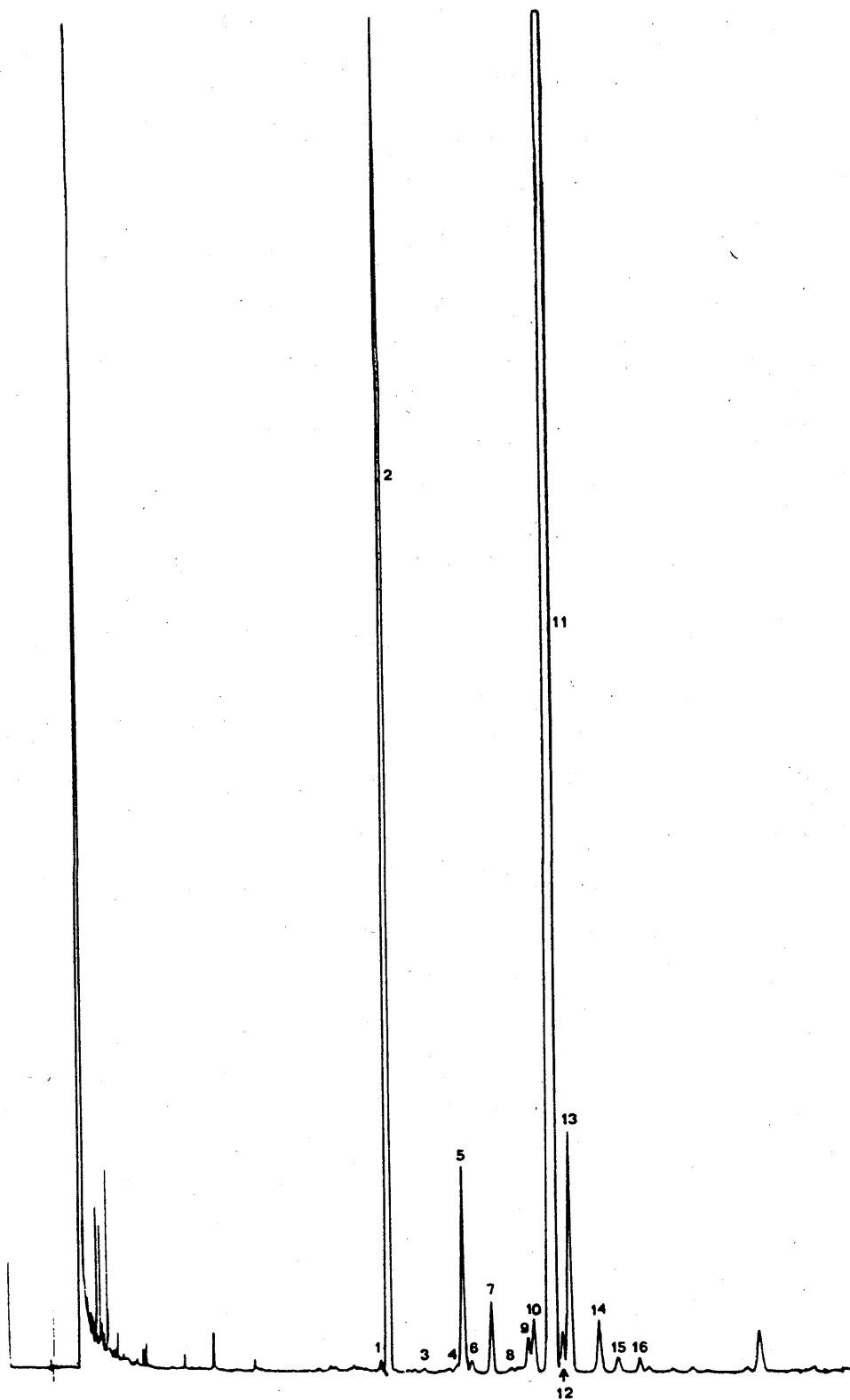
▼B

Figura 1

Gascromatogramma della frazione sterolica di un olio di oliva grezzo

▼B

Figura 2

Gascromatogramma della frazione sterolica di un olio di oliva raffinato



ALLEGATO VI

DETERMINAZIONE DELL'ERITRODIOLIO E DELL'UVAOLO

PREMESSA

L'eritrodiolo (convenzionalmente inteso come l'insieme dei dioli eritrodiolo ed uvaolo) è un costituente dell'insaponificabile, caratteristico di alcune specie di sostanze grasse. La sua concentrazione risulta notevolmente più elevata negli oli di oliva di estrazione rispetto ad altri oli che lo contengono (oli di oliva di pressione, oli di vinaccioli) e pertanto la sua determinazione può servire per accertare la presenza di olio di oliva di estrazione.

1. OGGETTO

Il metodo descrive il procedimento per la determinazione dell'eritrodiolo nelle sostanze grasse.

2. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza grassa viene saponificata con idrossido di potassio in soluzione etanolica, quindi si estrae l'insaponificabile con etere etilico e lo si purifica per passaggio su colonna di allumina.

Si procede al frazionamento dell'insaponificabile mediante cromatografia su strato sottile su placca di gel di silice e si isolano la *banda* della frazione sterolica e quella dell'eritrodiolo.

Gli steroli e l'eritrodiolo, recuperati dalla placca vengono trasformati in trimetilsilileteri, la miscela è quindi analizzata mediante gascromatografia.

Il risultato è espresso in percento di eritrodiolo rispetto all'insieme eritrodiolo + steroli.

3. APPARECCHIATURA

- 3.1. Apparecchiature prescritte nel metodo all'allegato V (Determinazione del contenuto degli steroli).

4. REAGENTI

- 4.1. Reagenti prescritti nel metodo all'allegato V (determinazione del contenuto degli steroli).
- 4.2. Soluzione di riferimento di eritrodiolo, allo 0,5 % in cloroformio.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Preparazione dell'insaponificabile.

Si procede come descritto al paragrafo 5.1.2. del metodo all'allegato V.

5.2. Separazione dell'eritrodiolo e degli steroli.

5.2.1. Vedi paragrafo 5.2.1. del metodo all'allegato V.

5.2.2. Vedi paragrafo 5.2.2. del metodo all'allegato V.

5.2.3. Si prepara una soluzione al 5 % in cloroformio dell'insaponificabile.

Con la microsiringa da 0,1 ml, si depositano su una placca cromatografica, a circa 1,5 cm dal bordo inferiore, 0,3 ml di detta soluzione, in striscia il più possibile sottile ed uniforme. Ad una estremità della placca si depositano, come riferimento, alcuni microlitri delle soluzioni di colesterolo e di eritrodiolo.

5.2.4. Si pone la placca nella camera di sviluppo preparata come detto al paragrafo 5.2.1. La temperatura ambiente deve essere di circa 20 °C. Si chiude subito col coperchio e si eluisce fino a che il fronte del solvente sia arrivato a circa 1 cm dal bordo superiore della placca. Si rimuove la placca dalla camera di sviluppo e si evapora il solvente in corrente di aria calda.

5.2.5. Si spruzza la placca uniformemente con la soluzione alcolica di 2',7' - diclorofluoresceina. Esaminando la placca alla luce ultravioletta si individuano le bande degli steroli e dell'eritrodiolo in base all'allineamento con i riferimenti, e si delimitano con una punta leggermente al di fuori dei margini di fluorescenza.

▼B

5.2.6. Con una spatola metallica si raschia il gel di silice compreso nelle aree delimitate. Il materiale asportato dalla placca viene riunito in bevuta da 50 ml; si aggiungono 15 ml di cloroformio caldo, si agita bene e si filtra sull'imbuto a setto poroso trasferendo il gel di silice sul filtro stesso. Si lava per tre volte con porzioni di 10 ml di cloroformio caldo per volta, raccogliendo il filtrato in palloncino da 100 ml. Si evapora fino ad un volume di 4-5 ml, si trasferisce in provetta da centrifuga a fondo conico da 10 ml previamente tarata, si porta a secco con blando riscaldamento in corrente di azoto e si pesa.

5.3. **Preparazione dei trimetilsilileteri.**

Si procede come descritto al paragrafo 5.3 del metodo all'allegato V.

5.4. **Analisi gascromatografica.**

Si procede come descritto al paragrafo 5.4 del suddetto metodo. Le condizioni operative dell'analisi gascromatografica devono essere tali che, oltre a soddisfare i requisiti richiesti per l'analisi degli steroli, portino anche alla separazione dei TMSE dell'eritrodiolo e dell'uvaolo.

Iniettato il campione si lascia svolgere la carta fino a che siano stati eluiti gli steroli presenti, l'eritrodiolo e l'uvaolo; si identificano quindi i picchi (l'eritrodiolo e l'uvaolo hanno tempi di ritenzione relativi, rispetto al β -sitosterolo, di circa 1,45 e 1,55 rispettivamente) e se ne calcolano le aree come detto per gli steroli.

6. **ESPRESSIONE DEI RISULTATI**

$$\text{Eritrodiolo, \%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{steroli}}} \cdot 100$$

in cui:

A_1 = area del picco dell'eritrodiolo ► **M6** ————— ◀,

A_2 = area del picco dell'uvaolo ► **M6** ————— ◀,

$\sum A_{\text{steroli}}$ = somma delle aree degli steroli presenti
► **M6** ————— ◀.

Il risultato si esprime con una cifra decimale.

▼M21*ALLEGATO VII***DETERMINAZIONE DELLA PERCENTUALE DI 2 GLICERIL MONOPALMITATO****1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE**

Il metodo descrive il procedimento analitico per la determinazione della percentuale di acido palmitico in posizione 2 nei trigliceridi mediante valutazione del 2-gliceril monopalmitato.

Esso si applica agli oli vegetali liquidi a temperatura ambiente (20 °C).

2. PRINCIPIO

Una volta preparato, il campione di olio è sottoposto all'azione della lipasi pancreatica: un'idrolisi parziale e specifica nelle posizioni 1 e 3 della molecola di trigliceride determina la comparsa dei monogliceridi in posizione 2. La percentuale di 2-gliceril monopalmitato nella frazione monogliceridica è determinata, previa sililazione, mediante gascromatografia in colonna capillare.

3. APPARECCHIATURA E MATERIALE

3.1. Beuta da 25 ml.

3.2. Beakers da 100, 250 e 300 ml.

3.3. Colonna di vetro per cromatografia, con diametro interno 21-23 mm e lunghezza 400 mm, provvista di disco di vetro sinterizzato e di rubinetto.

3.4. Provette tarate da 10, 50, 100 e 200 ml.

3.5. Matracci da 100 e 250 ml.

3.6. Evaporatore rotante.

3.7. Provette da centrifuga a fondo conico da 10 ml con tappo smerigliato.

3.8. Centrifuga per provette da 10 e 100 ml.

3.9. Termostato in grado di mantenere una temperatura di 40 °C + 0,5 °C.

3.10. Pipette tarate da 1 e 2 ml.

3.11. Siringa ipodermica da 1 ml.

3.12. Microsiringa da 100 µl.

3.13. Imbuto da 1 000 ml.

3.14. Gascromatografo idoneo per il funzionamento con colonna capillare, dotato di dispositivo di iniezione «on column» a freddo per l'introduzione diretta del campione nella colonna e di stufa in grado di mantenere la temperatura desiderata con l'approssimazione di 1 °C.

3.15. Iniettore a freddo «on column» per introduzione diretta in colonna.

3.16. Rivelatore a ionizzazione di fiamma ed elettrometro.

3.17. Registratore-integratore adatto all'elettrometro, con tempo di risposta non superiore a 1 secondo e con velocità della carta variabile.

3.18. Colonna capillare in vetro o silice fusa, lunga 8-12 m, diametro interno 0,25-0,32 mm, ricoperta di metilpolisilossano o di fenilmetilpolisilossano al 5 %, di spessore compreso fra 0,10 e 0,30 µm, resistente a una temperatura di 370 °C.

3.19. Microsiringa da 10 µl con ago cementato lungo almeno 7,5 cm, per iniezione diretta in colonna.

4. REAGENTI

4.1. Gel di silice di granulometria compresa tra 0,063 e 0,200 mm (70/280 mesh), preparato nel modo seguente: mettere il gel di silice in una capsula di porcellana, essiccare nella stufa a 160 °C per 4 ore, quindi lasciar raffreddare a temperatura ambiente in essiccatore. Aggiungere un volume d'acqua equivalente al 5 % del peso del gel di silice, procedendo come segue: in una beuta da 500 ml pesare 152 g di gel di silice e aggiungere 8 g di acqua distillata, tappare e agitare delicatamente per

▼ **M21**

ottenere una ripartizione uniforme dell'acqua. Lasciare a riposo per almeno 12 ore prima dell'uso.

- 4.2. n-esano per cromatografia.
- 4.3. Isopropanolo.
- 4.4. Isopropanolo in soluzione acquosa 1:1 (v/v).
- 4.5. Lipasi pancreatica avente un'attività compresa tra 2,0 e 10 unità di lipasi per mg (*esistono in commercio lipasi pancreatiche con attività compresa tra 2 e 10 unità per mg di enzima*).
- 4.6. Soluzione tampone di tris-idrossimetilamminometano: soluzione acquosa 1 M portata a pH 8 (controllare con il potenziometro) mediante aggiunta di acido cloridrico concentrato (1:1 v/v).
- 4.7. Colato di sodio (qualità enzimatica), soluzione acquosa allo 0,1 % (la soluzione deve essere utilizzata entro i 15 giorni successivi alla preparazione).
- 4.8. Cloruro di calcio, soluzione acquosa al 22 %.
- 4.9. Etere etilico per cromatografia.
- 4.10. Solvente di sviluppo: miscela n-esano/etere etilico (87/13) (v/v).
- 4.11. Idrossido di sodio, soluzione al 12 % in peso.
- 4.12. Fenolfaleina, soluzione etanolica all'1 %.
- 4.13. Gas vettore: idrogeno o elio per gascromatografia.
- 4.14. Gas ausiliari: idrogeno (minimo 99 %), esente da umidità e sostanze organiche, e aria per gascromatografia della stessa purezza.
- 4.15. Reagente di silanizzazione: miscela di piridina-esametildisilazano-trimetilclorosilano 9/3/1 (v/v/v) (Esistono in commercio soluzioni pronte per l'uso. Possono essere utilizzati anche altri reagenti silanizzanti, quali ad esempio il bis-trimetiltrifluorolacetammide + 1 % trimetilclorosilano da diluire con uno stesso volume di piridina anidra).
- 4.16. Campioni di riferimento: monogliceridi puri o miscele di monogliceridi a composizione percentuale nota, simile a quella del campione.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Preparazione del campione

- 5.1.1. Gli oli la cui acidità libera è inferiore al 3 % non devono essere neutralizzati prima della cromatografia su colonna di gel di silice. Gli oli la cui acidità libera è superiore al 3 % devono essere sottoposti a neutralizzazione secondo il procedimento descritto al punto 5.1.1.1.

- 5.1.1.1. Versare nell'imbuto da 1 000 ml (3.13) 50 g di olio e 200 ml di n-esano. Aggiungere 100 ml di isopropanolo e una quantità di soluzione di idrossido di sodio al 12 % (4.11) corrispondente all'acidità libera dell'olio maggiorata del 5 %. Agitare energicamente per un minuto. Aggiungere 100 ml di acqua distillata, agitare nuovamente e lasciare a riposo.

A decantazione avvenuta, eliminare lo strato inferiore contenente i saponi. Eliminare eventuali strati intermedi (mucillagine e sostanze insolubili). Lavare la soluzione esanica dell'olio neutralizzato con porzioni consecutive di 50-60 ml della soluzione di isopropanolo/acqua 1:1 (v/v) (4.4), fino alla scomparsa della colorazione rosea dovuta alla fenolfaleina.

Eliminare la maggior parte dell'esano mediante distillazione sotto vuoto (utilizzando per esempio l'evaporatore rotante) e travasare l'olio in un matraccio da 100 ml (3.5). Essiccare l'olio sotto vuoto fino ad eliminazione completa del solvente.

Ultimata questa operazione, l'acidità dell'olio deve risultare inferiore allo 0,5 %.

- 5.1.2. Introdurre nella beuta da 25 ml (3.1) 1,0 g di olio preparato nel modo sopra indicato e scioglierlo in 10 ml di solvente di sviluppo (4.10). Lasciare a riposo la soluzione per almeno 15 minuti prima di procedere alla cromatografia su colonna di gel di silice.

▼ **M21**

Se la soluzione è torbida, centrifugarla per garantire condizioni ottimali per la cromatografia. (Si possono utilizzare cartucce di gel di silice SPE da 500 mg pronte per l'uso).

5.1.3. *Preparazione della colonna cromatografica*

Versare nella colonna (3.3) circa 30 ml di solvente di sviluppo (4.10); introdurre un batuffolo di cotone nella parte inferiore della colonna con l'ausilio di una bacchetta di vetro; comprimere per far uscire l'aria.

Preparare in un beaker una sospensione di 25 g di gel di silice (4.1) in circa 80 ml di solvente di sviluppo e versarla nella colonna attraverso un imbuto.

Verificare che tutto il gel di silice sia stato immerso nella colonna; lavare con solvente di sviluppo (4.8), aprire il rubinetto e lasciar fluire il liquido fino a circa 2 mm sopra il livello superiore del gel di silice.

5.1.4. *Cromatografia su colonna*

Nella beuta da 25 ml (3.1.) pesare esattamente 1,0 g di campione preparato secondo il procedimento descritto al punto 5.1.

Sciogliere il campione in 10 ml di solvente di sviluppo (4.10). Versare la soluzione nella colonna cromatografica preparata nel modo indicato al punto 5.1.3. Evitare di agitare la superficie della colonna.

Aprire il rubinetto e lasciar fluire la soluzione campione fino al livello del gel di silice. Sviluppare con 150 ml di solvente di sviluppo. Regolare il flusso a 2 ml/min (in modo che i 150 ml passino attraverso la colonna in 60-70 minuti circa).

Recuperare l'eluato in un matraccio da 250 ml previamente tarato. Far evaporare il solvente sotto vuoto ed eliminarne le ultime tracce con una corrente di azoto.

Pesare il matraccio e calcolare l'estratto raccolto.

[Se si utilizzano cartucce di silice SPE pronte per l'uso, procedere come segue: introdurre 1 ml di soluzione (5.1.2) nelle cartucce previamente preparate con 3 ml di n-esano.

Una volta percolata la soluzione, sviluppare con 4 ml di n-esano/etere etilico 9:1 (v/v).

Recuperare l'eluato in una provetta da 10 ml e sottoporlo a evaporazione in corrente di azoto fino a essiccazione completa.

Sottoporre il residuo secco all'azione della lipasi pancreatica (5.2). È essenziale che la composizione in acidi grassi sia verificata prima e dopo passaggio su cartuccia SPE].

5.2. **Idrolisi con lipasi pancreatica**

5.2.1. Pesare nella provetta della centrifuga 0,1 g di olio preparato nel modo descritto al punto 5.1. Aggiungere 2 ml di soluzione tampone (4.6), 0,5 ml della soluzione di colato di sodio (4.7) e 0,2 ml della soluzione di cloruro di calcio, agitando bene dopo ogni aggiunta. Chiudere la provetta con il tappo smerigliato e inserirla nel termostato a $40 \pm 0,5$ °C.

5.2.2. Aggiungere 20 mg di lipasi, agitare accuratamente (evitando di bagnare il tappo), mettere la provetta nel termostato per esattamente 2 minuti, quindi ritirla, agitare vigorosamente per esattamente 1 minuto e lasciar raffreddare.

5.2.3. Aggiungere 1 ml di etere etilico,appare e agitare vigorosamente, quindi centrifugare e travasare la soluzione in una provetta pulita e asciutta con la microsiringa.

5.3. **Preparazione dei derivati silanizzati e della gascromatografia**

5.3.1. Introdurre con la microsiringa 100 µl di soluzione (5.2.3) in una provetta da 10 ml a fondo conico.

5.3.2. Eliminare il solvente con una leggera corrente di azoto, aggiungere 200 µl di reagente di silanizzazione (4.15),appare la provetta e lasciare a riposo per 20 minuti.

5.3.3. Dopo 20 minuti, aggiungere da 1 a 5 ml di n-esano (in funzione delle condizioni cromatografiche): la soluzione così ottenuta è pronta per la gascromatografia.

▼ M21**5.4. Gascromatografia**

Le condizioni operative sono le seguenti:

- temperatura dell'iniettore (iniettore «on column») inferiore alla temperatura di ebollizione del solvente (68 °C),
- temperatura del rivelatore: 350 °C,
- temperatura della colonna: temperatura della stufa programmata a 60 °C per 1 minuto, quindi incrementata di 15 °C al minuto fino a 180 °C, poi di 5 °C al minuto fino a 340 °C e mantenuta a 340 °C per 13 minuti,
- gas vettore: idrogeno o elio regolato alla velocità lineare adeguata per ottenere la risoluzione rappresentata nella figura 1; il tempo di ritenzione del trigliceride C₅₄ deve essere di 40 + 5 minuti (cfr. figura 2). (Le condizioni operative sopra indicate sono proposte a titolo indicativo. L'operatore provvederà ad ottimizzarle per ottenere la risoluzione desiderata. Il picco corrispondente al 2-gliceril monopalmitato deve avere un'altezza minima pari al 10 % della scala del registratore.),
- quantità di sostanza iniettata: 0,5-1 µl della soluzione (5 ml) di n-esano (5.3.3).

5.4.1. Identificazione dei picchi

I singoli monogliceridi sono identificati in base ai tempi di ritenzione, in confronto a quelli ottenuti con miscele standard di monogliceridi analizzate nelle medesime condizioni.

5.4.2. Valutazione quantitativa

L'area dei picchi è calcolata mediante un integratore elettronico.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La percentuale di 2-gliceril monopalmitato è calcolata in base al rapporto tra l'area del picco corrispondente e la somma delle aree dei picchi di tutti i monogliceridi (cfr. figura 2), applicando la seguente formula:

$$\text{gliceril monopalmitato (\%)} = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

in cui:

A_x = area del picco corrispondente al gliceril monopalmitato

ΣA = somma delle aree di tutti i picchi dei monogliceridi.

Il risultato si esprime con una cifra decimale.

7. RAPPORTO DI ANALISI

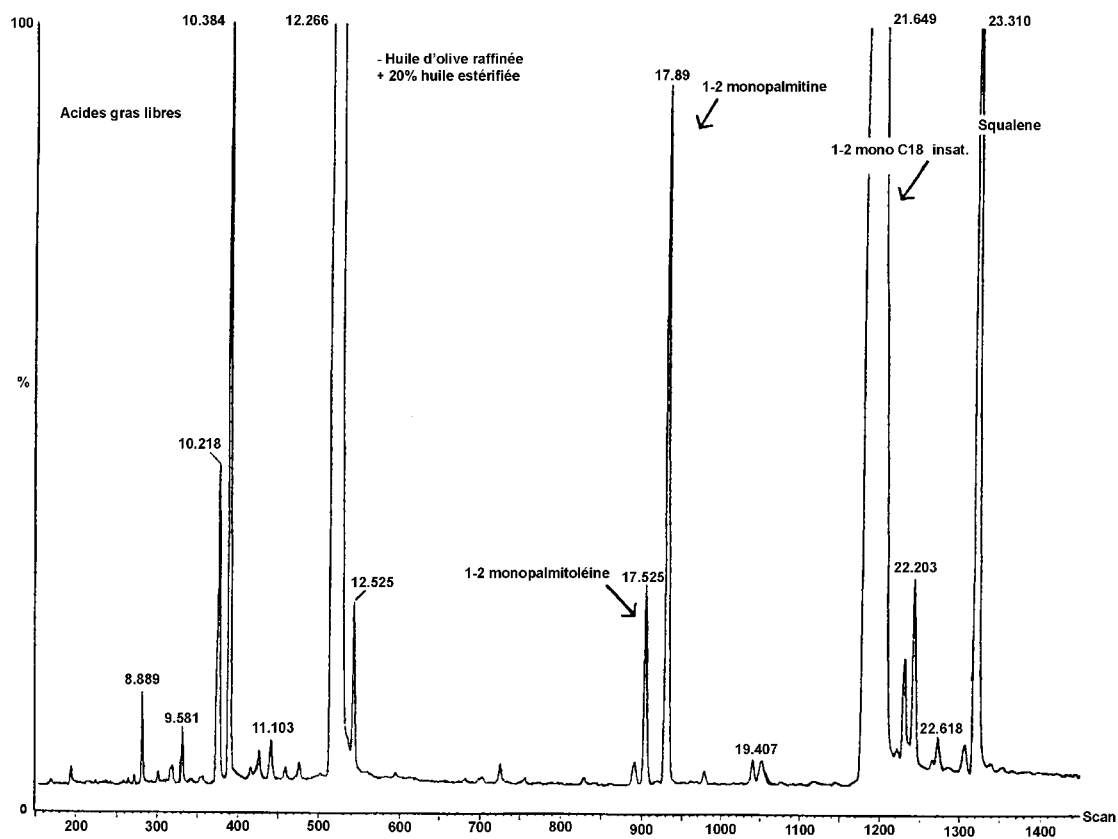
Il rapporto di analisi deve recare:

- il riferimento al metodo descritto,
- ogni indicazione utile per la completa identificazione del campione,
- il risultato dell'analisi,
- ogni deviazione dal metodo indicato, sia essa dovuta ad una decisione delle parti interessate o a qualsiasi altro motivo,
- gli estremi per l'identificazione del laboratorio, la data dell'analisi e la firma dei responsabili.

▼ M21

Figura 1

Cromatogramma dei prodotti della reazione di silanizzazione ottenuti dall'azione della lipasi su un olio d'oliva raffinato addizionato del 20 % di olio esterificato (100 %).



Legenda: «acides gras libres» = acidi grassi liberi; «Huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée» = olio d'oliva raffinato + 20 % olio esterificato; «1-2 monopalmitoléine» = 1-2 monopalmitoleina; «1-2 mono C₁₈ insat.» = 1-2 mono C₁₈ insaturi

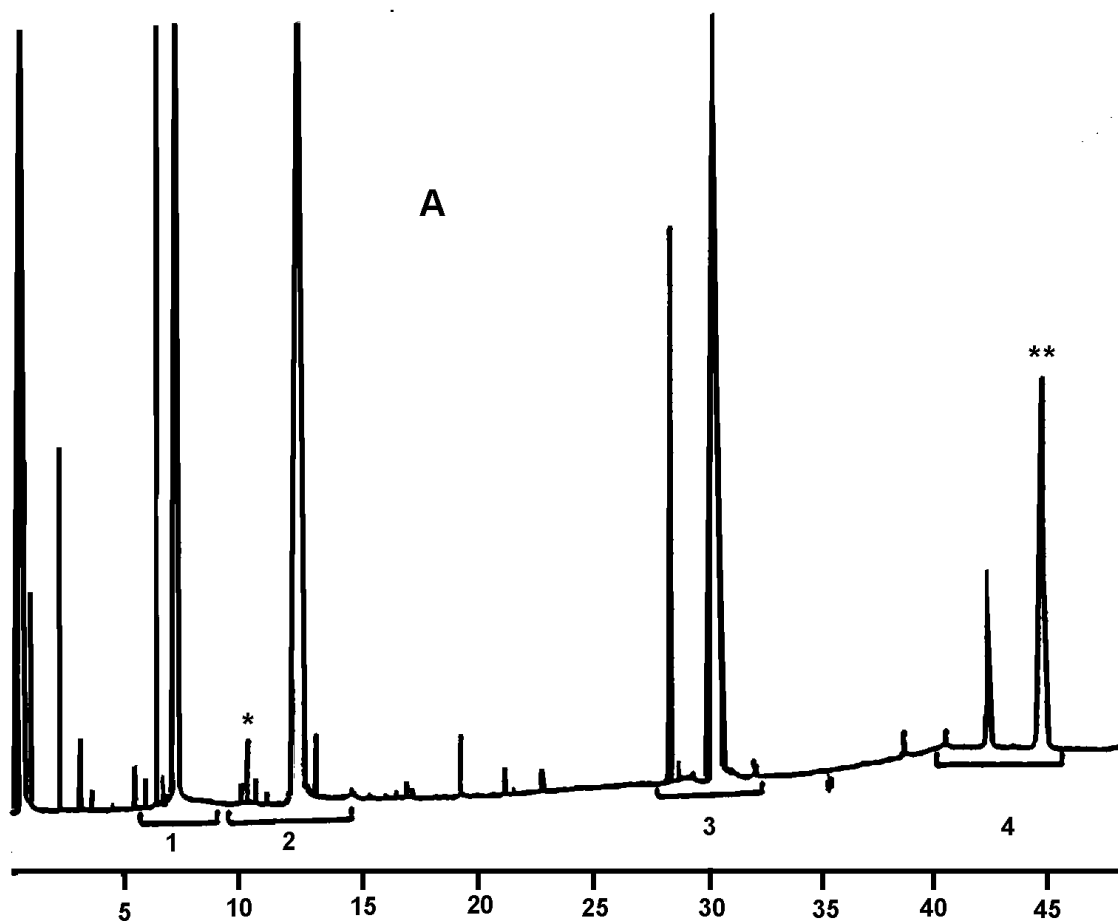
▼ **M21**

Figura 2

Cromatogramma di:

(A) olio d'oliva non esterificato dopo lipasi; dopo silanizzazione; in queste condizioni (colonna capillare 8-12 m), la frazione cerosa viene eluita contemporaneamente alla frazione di digliceride o poco dopo.

Dopo lipasi, il tenore di trigliceridi non dovrebbe superare il 15 %.



Legenda:

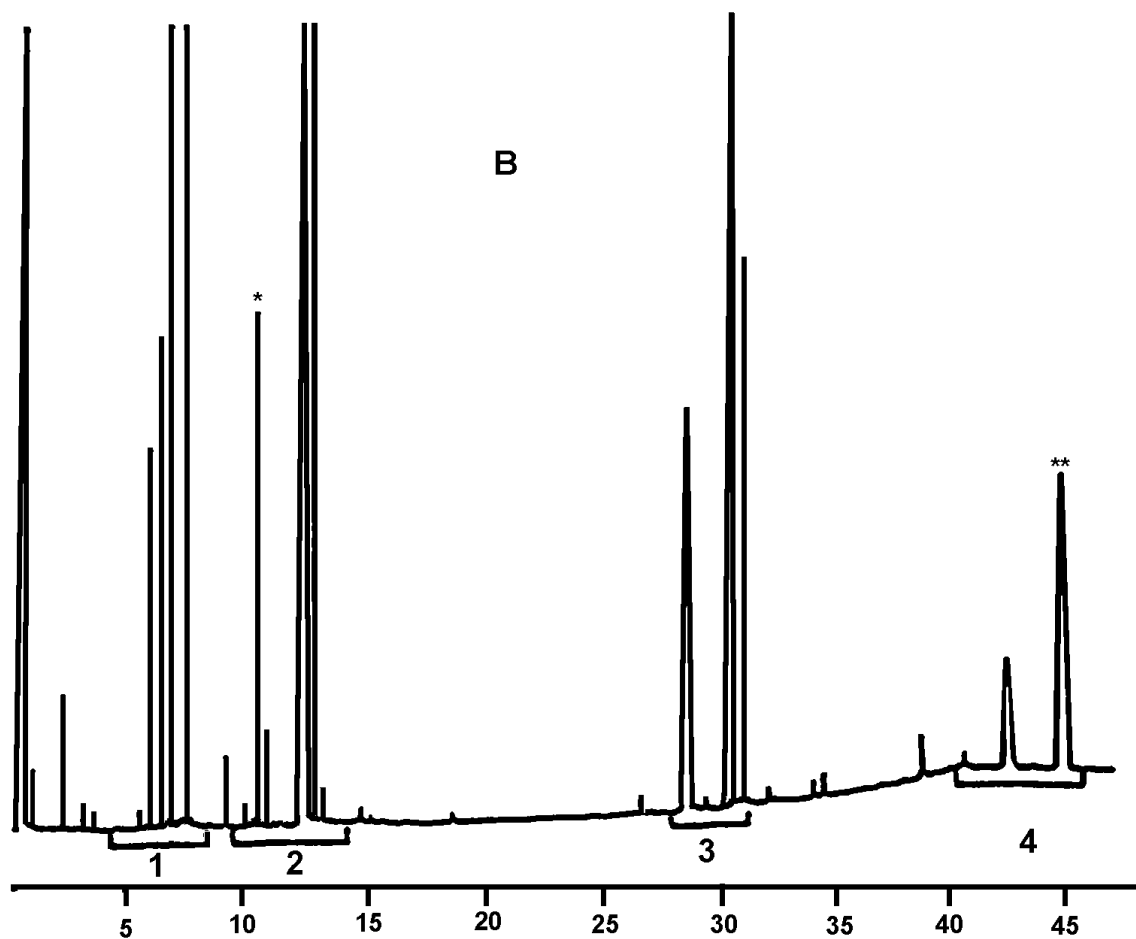
- 1 = Acidi grassi liberi
- 2 = Monogliceridi
- 3 = Digliceridi
- 4 = Trigliceridi
- * = 2-monopalmitina
- ** = Trigliceride C₅₄

▼ M21

Cromatogramma di:

(B) olio esterificato dopo lipasi; dopo silanizzazione; in queste condizioni (colonna capillare 8-12 m), la frazione cerosa viene eluita contemporaneamente alla frazione di digliceride o poco dopo.

Dopo lipasi, il tenore di trigliceridi non dovrebbe superare il 15 %.



Legenda:

- 1 = Acidi grassi liberi
- 2 = Monogliceridi
- 3 = Digliceridi
- 4 = Trigliceridi
- * = 2-monopalmitina
- ** = Trigliceride C₅₄

▼ M21

8. NOTE

Nota 1: PREPARAZIONE DELLA LIPASI

Esistono in commercio lipasi con attività soddisfacente. Si possono anche preparare in laboratorio con il seguente procedimento.

Raffreddare 5 kg di pancreas suino fresco a 0 °C. Rimuovere il grasso solido e il tessuto connettivo circostanti e tritare in un mescolatore in modo da ottenere un fluido pastoso. Agitare questa pasta per 4-6 ore con 2,5 l di acetone anidro e centrifugare. Estrarre il residuo altre tre volte con lo stesso volume di acetone, poi due volte con una miscela 1:1 (v/v) di acetone e di etere etilico e due volte con etere etilico.

Essiccare il residuo sotto vuoto per 48 ore in modo da ottenere una polvere stabile, da conservare in frigorifero al riparo dall'umidità.

Nota 2: CONTROLLO DELL'ATTIVITÀ LIPASICA

Preparare un'emulsione di olio d'oliva nel modo seguente:

Agitare per 10 minuti in un mescolatore una miscela di 165 ml di soluzione di gomma arabica a 100g/l, 15 g di ghiaccio tritato e 20 ml di un olio d'oliva neutralizzato.

In un beaker da 50 ml versare 10 ml di questa emulsione, quindi 0,3 ml di soluzione di colato di sodio a 0,2 g/ml e 20 ml di acqua distillata.

Mettere il beaker in un termostato regolato a 37 °C; introdurre gli elettrodi del pHmetro e l'agitatore ad elica.

Mediante una buretta aggiungere goccia a goccia una soluzione di idrossido di sodio 0,1 N fino ad ottenere un pH 8,3.

Aggiungere un volume di soluzione acquosa di polvere di lipasi (0,1 g/ml di lipasi). Non appena il pHmetro indica un pH 8,3, avviare il cronometro e aggiungere goccia a goccia la soluzione di idrossido di sodio in modo da mantenere il pH a 8,3. Annotare il volume di soluzione consumato ogni minuto.

Riportare i dati in un diagramma indicando le letture di tempo nelle ascisse e i millilitri di soluzione alcalina 0,1 N consumati per mantenere costante il pH nelle ordinate. Si deve ottenere un grafico lineare.

L'attività della lipasi, misurata in unità di lipasi per mg, è data dalla formula seguente:

$$A = \frac{V \times N \times 100}{m}$$

in cui:

A è l'attività in unità di lipasi/mg

V è il numero di ml di soluzione di idrossido di sodio 0,1 N/min, desunto dal diagramma

N è la normalità della soluzione di idrossido di sodio

m è la massa in mg della lipasi utilizzata per la prova.

L'unità di lipasi è definita come la quantità di enzima che libera 10 microequivalenti di acido al minuto.

▼ M20

▼B*ALLEGATO IX**ANALISI SPETTROFOTOMETRICA NELL'ULTRAVIOLETTO*

PREMESSA

L'esame spettrofotometrico nell'ultravioletto può fornire indicazioni sulla qualità di una sostanza grassa, sul suo stato di conservazione e sulle modificazioni indotte da processi tecnologici.

Gli assorbimenti alle lunghezze d'onda previste nel metodo sono dovuti alla presenza di sistemi dienici e trienici coniugati. I valori di tali assorbimenti sono espressi come estinzione specifica E 1 % 1 cm (estinzione di una soluzione della sostanza grassa all'1 % nel solvente prescritto, in spessore di 1 cm) convenzionalmente indicata con K , (detto anche coefficiente di estinzione).

1. OGGETTO

Il metodo descrive il procedimento per l'esecuzione dell'esame spettrofotometrico nell'ultravioletto delle sostanze grasse.

2. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza grassa in esame viene disciolta nel solvente richiesto, quindi si determina l'estinzione della soluzione alle lunghezze d'onda prescritte, in riferimento al solvente puro. Dalle letture spettrofotometriche si calcolano le estinzioni specifiche.

3. APPARECCHIATURA

3.1. Spettrofotometro per misure di estinzione nell'ultravioletto fra 220 e 360 nm, con possibilità di lettura per ogni unità nanometrica.

3.2. Vaschette di quarzo prismatiche, con coperchio, di percorso ottico da 1 cm. Le vaschette, riempite di acqua o altro solvente idoneo, non devono presentare fra di loro differenze superiori a 0,01 unità di estinzione.

3.3. Matracci tarati da 25 ml.

▼M6

3.4. Colonna per cromatografia con una parte superiore avente lunghezza di 270 mm e diametro di 35 mm e una parte inferiore avente lunghezza di 270 mm e diametro di 10 mm.

▼B

4. REAGENTI

4.1. Isoottano (2,2,4 trimetilpentano) spettrofotometricamente puro: deve avere, in riferimento all'acqua distillata, trasmittanza non inferiore al 60 % a 220 nm e non inferiore al 95 % a 250 nm;

oppure

— Cicloesano spettrofotometricamente puro: deve avere, in riferimento all'acqua distillata, trasmittanza non inferiore al 40 % a 220 nm e non inferiore al 95 % a 250 nm.

▼M6**▼B**

4.2. Allumina basica per cromatografia su colonna, preparata e controllata come descritto in Appendice I.

4.3. n-Esano, per cromatografia.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Il campione in esame deve essere perfettamente omogeneo ed esente da impurezze sospese. Gli oli liquidi a temperatura ambiente si filtrano su carta alla temperatura di circa 30 °C, i grassi concreti vengono omogeneizzati e filtrati a temperatura superiore di non oltre 10 °C alla temperatura di fusione.

5.2. Del campione così preparato si pesano esattamente circa 0,25 g in matraccio tarato da 25 ml, si porta a volume con il solvente prescritto e si omoge-

▼B

neizza. La soluzione risultante deve essere perfettamente limpida. Qualora si riscontrino opalescenza o torbidità si filtra rapidamente su carta.

- 5.3. Con la soluzione ottenuta si riempie una vaschetta e si misurano le estinzioni, usando come riferimento il solvente impiegato, alle lunghezze d'onda significative comprese fra 232 e 276 nm.

I valori di estinzione letti devono essere compresi nell'intervallo $0,1 \pm 0,8$; in caso contrario è necessario ripetere le misure operando con soluzioni opportunamente più concentrate o più diluite.

- 5.4. Qualora sia richiesta la determinazione dell'estinzione specifica dopo passaggio su allumina si procede nel seguente modo: nella colonna cromatografica si introducono 30 g di allumina basica in sospensione in esano; dopo assestamento dell'adsorbente si elimina l'eccesso di esano, sino ad 1 cm circa al disopra del livello superiore dell'allumina.

Si sciolgono 10 g di sostanza grassa, omogeneizzata e filtrata come descritto in 5.1., in 100 ml di esano e si versa tale soluzione in colonna. Si raccoglie l'eluato e si evapora totalmente il solvente sotto vuoto ad una temperatura inferiore ai 25 °C.

Sulla sostanza grassa così ottenuta si procede immediatamente come detto in 5.2.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- 6.1. Si riportano le estinzioni specifiche (coefficienti di estinzione) alle varie lunghezze d'onda calcolate come segue:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s}$$

in cui:

K_{λ} = estinzione specifica alla lunghezza d'onda λ ,

E_{λ} = estinzione misurata alla lunghezza d'onda λ ,

c = concentrazione della soluzione in g/100 ml,

s = spessore della vaschetta in cm.

I risultati si esprimono con due cifre decimali.

- 6.2. L'esame spettrofotometrico dell'olio di oliva secondo il metodo ufficiale dei Regolamenti della CEE prevede la determinazione dell'estinzione specifica, in soluzione in isoottano, alle lunghezze d'onda di 232 e 270 nm e la determinazione del ΔK inteso come:

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2}$$

in cui K_m è l'estinzione specifica alla lunghezza d'onda m , lunghezza d'onda di massimo assorbimento intorno a 270 nm.



ALLEGATO X A

ANALISI GASCROMATOGRAFICA DEGLI ESTERI METILICI DEGLI ACIDI GRASSI

1. OGGETTO

Il presente metodo dà un orientamento generale per l'applicazione della gascromatografia, con l'uso di colonne a riempimento o capillari, per determinare la composizione qualitativa e quantitativa di una miscela di esteri metilici degli acidi grassi ottenuta in conformità con il metodo specificato nell'allegato X B.

Il metodo non è applicabile agli acidi grassi polimerizzati.

2. REAGENTI

2.1. Gas vettore

Gas inerte (azoto, elio, argo, idrogeno, ecc.) completamente essiccato ed avente un tenore di ossigeno inferiore a 10 mg/kg.

Nota 1: L'idrogeno, che viene usato come gas vettore soltanto con colonne capillari, può raddoppiare la velocità dell'analisi, ma è pericoloso; sono disponibili dispositivi di sicurezza.

2.2. Gas ausiliari

2.2.1. Idrogeno (purezza $\geq 99,9$ %), esente da impurezze organiche.

2.2.2. Aria od ossigeno, esente da impurezze organiche.

2.3. Standard di riferimento

Miscela di esteri metilici di acidi grassi puri oppure esteri metilici di un grasso a composizione nota, di preferenza analogo a quello della sostanza grassa da analizzare.

Sarà necessario l'ossidazione degli acidi grassi poliinsaturi.

3. APPARECCHIATURA

Le istruzioni precisano che deve essere usata la consueta apparecchiatura per gascromatografia, facendo uso di colonne a riempimento e/o capillari nonché di un rivelatore a ionizzazione di fiamma. È consigliabile usare apparecchiatura in grado di garantire l'efficienza e la risoluzione specificate al punto 4.1.2.

3.1. Gascromatografo

Il gascromatografo deve comprendere i seguenti elementi.

3.1.1. Sistema ad iniezione

Usare un sistema ad iniezione:

- a) con colonne a riempimento, aventi lo spazio morto minore possibile (in questo caso il sistema di iniezione deve poter essere riscaldato a una temperatura di 20-50 °C superiore a quella della colonna) oppure
- b) con colonne capillari, nel qual caso il sistema di iniezione deve essere appositamente progettato. Esso può essere del tipo a separazione oppure del tipo non a separazione sull'iniettore della colonna.

Nota 2: In assenza di acidi grassi aventi meno di 16 atomi di carbonio, può essere usato un iniettore ad ago mobile.

3.1.2. Stufa

La stufa deve essere atta a scaldare la colonna ad almeno 260 °C e a mantenere la temperatura desiderata con l'approssimazione di 1 °C per la colonna a riempimento e con l'approssimazione di 0,1 °C per la colonna capillare.

Quest'ultimo requisito è particolarmente importante se si usa una provetta di silice fusa.

Il ricorso al riscaldamento programmato è raccomandato in tutti i casi e in particolare per gli acidi grassi aventi meno di 16 atomi di carbonio.

▼B**3.1.3. Colonna e riempimento**

3.1.3.1. Colonna costruita in materiale inerte alle sostanze da analizzare (cioè vetro o acciaio inossidabile) e avente le seguenti dimensioni:

a) lunghezza: 1-3 m. Se sono presenti acidi grassi a catena lunga (oltre C₂₀) dovrà essere usata una colonna relativamente corta. Se invece si analizzano acidi a 4-6 atomi di carbonio, si raccomanda di usare una colonna avente una lunghezza di 2 m.

b) diametro interno: da 2 a 4 mm.

Nota 3: Se sono presenti componenti poliinsaturi aventi più di tre legami doppi, essi potranno essere decomposti in una colonna di acciaio inossidabile.

Nota 4: Può essere usato un sistema di colonne a riempimento gemelle.

3.1.3.2. Riempimento, comprendente i seguenti elementi:

a) *supporto*: terra di diatomee lavata con acido e silanizzata, oppure altro idoneo supporto inerte con una gamma ristretta di granulometria (compresa tra 125 e 200 µm, con variazioni di ± 25 µm); la granulometria media è correlata al diametro interno e alla lunghezza della colonna;

b) *fase stazionaria*: tipo di poliestere di liquido polare (ad es. polisuccinato di dietilenglicole, polisuccinato di butandiolo, poliadipato di etilenglicole ecc.), cianosiliconi o qualsiasi altro liquido che consenta la separazione cromatografica richiesta (vedi clausola 5). La fase stazionaria deve essere compresa tra il 5 % (m/m) e il 20 % (m/m) del riempimento. Per alcune separazioni può essere usata una fase stazionaria non polare.

3.1.3.3. Condizionamento della colonna

Con la colonna staccata, dalla parte del rivelatore, scaldare gradualmente la stufa a 185 °C e far passare una corrente di gas inerte attraverso la colonna di recente preparata ad un flusso compreso tra 20 ml/min e 60 ml/min per almeno 16 h a questa temperatura e per ulteriori 2 h a 195 °C.

3.1.4. Colonna capillare

3.1.4.1. Tubo costituito di materiale inerte alle sostanze da analizzare (di solito vetro o silice fusa). Il diametro interno deve essere compreso tra 0,2 mm e 0,8 mm. La superficie interna deve essere sottoposta a un opportuno trattamento (ad es. preparazione della superficie, inattivazione) prima di essere ricoperto con la fase stazionaria. Nella maggior parte dei casi è sufficiente una lunghezza di 25 mm.

3.1.4.2. Fase stazionaria, di solito del tipo poliglicole [poli(etilenglicole) 20 000], poliestere (polisuccinato di butandiolo) oppure polisilossano polare (cianosiliconi). Sono adatte le colonne legate (cross-linked).

Nota 5: Vi è il rischio che i polisilossani polari creino difficoltà nell'identificazione e separazione dell'acido linolenico e degli acidi a C₂₀.

Le coperture devono essere sottili, ad esempio 0,1 µm-0,2 µm.

3.1.4.3. Montaggio e condizionamento della colonna

Osservare le normali precauzioni necessarie per il montaggio delle colonne capillari, ovvero sistemazione della colonna nella stufa (supporto), scelta e collegamento di giunti (a tenuta stagna), sistemazione delle estremità della colonna nell'iniettore e nel rivelatore (riduzione degli spazi morti). Sottoporre la colonna ad un flusso di gas vettore [ad es. 0,3 bar (30 kPa) per una colonna avente una lunghezza di 25 mm e un diametro interno di 0,3 mm].

Condizionare la colonna programmando la temperatura della stufa a 3 °C/min dalla temperatura ambiente a una temperatura di 10 °C inferiore al limite di decomposizione della fase stazionaria. Mantenere la stufa a questa temperatura per 1 h fino a stabilizzazione della linea di base. Riportarla a 180 °C in modo da lavorare in condizioni di isothermicità.

▼B

Nota 6: Sono disponibili in commercio opportune colonne preconvenzionate.

- 3.1.5. Rivelatore, di preferenza idoneo ad essere riscaldato a una temperatura superiore a quella della colonna.

3.2. **Siringa**

La siringa deve avere una capacità massima di 10 µl ed essere graduata in divisioni di 0,1 µl.

3.3. **Registratore**

Se la curva di registrazione deve essere usata per calcolare la composizione della miscela analizzata, è necessario un registratore elettronico di alta precisione compatibile con l'apparecchiatura usata. Detto registratore deve avere le seguenti caratteristiche:

- a) tasso di risposta, al di sotto di 1,5 s, di preferenza 1 s (il tasso di risposta è il periodo necessario affinché la punta di registrazione passi dallo 0 % al 90 % a seguito dell'introduzione improvvisa di un segnale del 100 %);
- b) ampiezza della carta, minimo 20 cm;
- c) velocità della carta, adattabile a valori compresi tra 0,4 cm/min e 2,5 cm/min.

3.4. **Integratore o calcolatore (*facoltativo*)**

Un calcolo rapido ed accurato può essere effettuato con l'ausilio di un integratore o calcolatore elettronico. Quest'ultimo deve dare una risposta lineare con una sensibilità adeguata e la correzione della deviazione della linea di base deve essere soddisfacente.

4. **PROCEDIMENTO**

Nelle operazioni descritte dal paragrafo 4.1 al paragrafo 4.3 si fa accenno all'uso di un rivelatore a ionizzazione di fiamma.

Come alternativa può essere usato un gascromatografo munito di catarometro (che funziona in base al principio della variazione di conducibilità termica). Le condizioni di funzionamento vengono pertanto modificate come descritto nella clausola 6.

4.1. **Condizioni dell'analisi**

4.1.1. **Selezione delle condizioni operative ottimali**

4.1.1.1. **Colonna a riempimento**

Nella scelta delle condizioni per effettuare la prova, devono essere prese in considerazione le seguenti varianti:

- a) la lunghezza ed il diametro della colonna;
- b) la natura e la quantità della fase stazionaria;
- c) la temperatura della colonna;
- d) il flusso di gas vettore;
- e) la risoluzione necessaria;
- f) le dimensioni del campione da analizzare, scelto in modo che il collegamento tra il rivelatore e l'elettrometro diano una risposta lineare;
- g) la durata dell'analisi.

In linea di massima i valori riportati nella tabella 1 e nella tabella 2 danno i risultati auspicati, cioè almeno 2 000 piatti teorici per metro di lunghezza della colonna per quanto si riferisce allo stearato di metile, e l'eluizione dello stesso entro 15 minuti circa.

Se l'apparecchiatura lo consente, l'iniettore deve trovarsi a una temperatura di circa 200 °C ed il rivelatore a una temperatura pari o superiore a quella della colonna.

Di norma, il rapporto tra il flusso dell'idrogeno fornito al rivelatore a ionizzatore di fiamma e quello del gas vettore varia tra 1:2 e 1:1 in

▼B

funzione del diametro della colonna. Il flusso dell'ossigeno è di circa 5-10 volte quello dell'idrogeno.

Tabella 1

Diametro interno della colonna mm	Flusso del gas vettore ml/min
2	da 15 a 25
3	da 20 a 40
4	da 40 a 60

Tabella 2

Concentrazione della fase stazionaria % (m/m)	Temperatura della colonna °C
5	175
10	180
15	185
20	185

4.1.1.2. Colonna capillare

Le caratteristiche di efficienza e di permeabilità delle colonne capillari indicano che la separazione tra i costituenti e la durata dell'analisi sono ampiamente dipendenti dal flusso del gas vettore nella colonna. È pertanto necessario ottimizzare le condizioni operative influenzando questo parametro (o più semplicemente la pressione di testa della colonna), a seconda che si desideri migliorare le separazioni o effettuare un'analisi rapida.

4.1.2. Determinazione del numero di piatti teorici (efficacia) e risoluzione

(vedi figura 1)

Effettuare l'analisi di una miscela di stearato di metile e di oleato di metile in proporzioni più o meno equivalenti (ad es. esteri metilici del burro di cacao).

Scegliere la temperatura della colonna e il flusso di gas vettore in modo che il massimo del picco dello stearato di metile venga registrato circa 15 minuti dopo il picco del solvente. Usare un quantitativo sufficiente della miscela di esteri metilici in modo che il picco dello stearato di metile occupi circa tre quarti della scala intera.

Calcolare il numero dei piatti teorici, n (efficienza), con la formula:

$$n = 16 \left[\frac{d_{r(I)}}{W_{(I)}} \right]^2$$

e la risoluzione R usando la formula:

$$R = \frac{2\Delta}{W_{(I)} + W_{(II)}}$$

dove:

$d_{r(I)}$ = è la distanza di ritenzione, in millimetri, dall'inizio del cromatogramma fino al massimo del picco dello stearato di metile;

$W_{(I)}$ e $W_{(II)}$ = sono le ampiezze, in millimetri, dei picchi rispettivamente dello stearato di metile e dell'oleato di metile,

▼ B

misurati tra i punti d'intersezione delle tangenti ai punti di inflessione della curva con la linea di base;

Δ = è la distanza, in millimetri, tra i picchi massimi dello stearato di metile e dell'oleato di metile;

▼ M2

e l'indice di risoluzione R usando la formula:

$$\frac{a}{b}$$

dove:

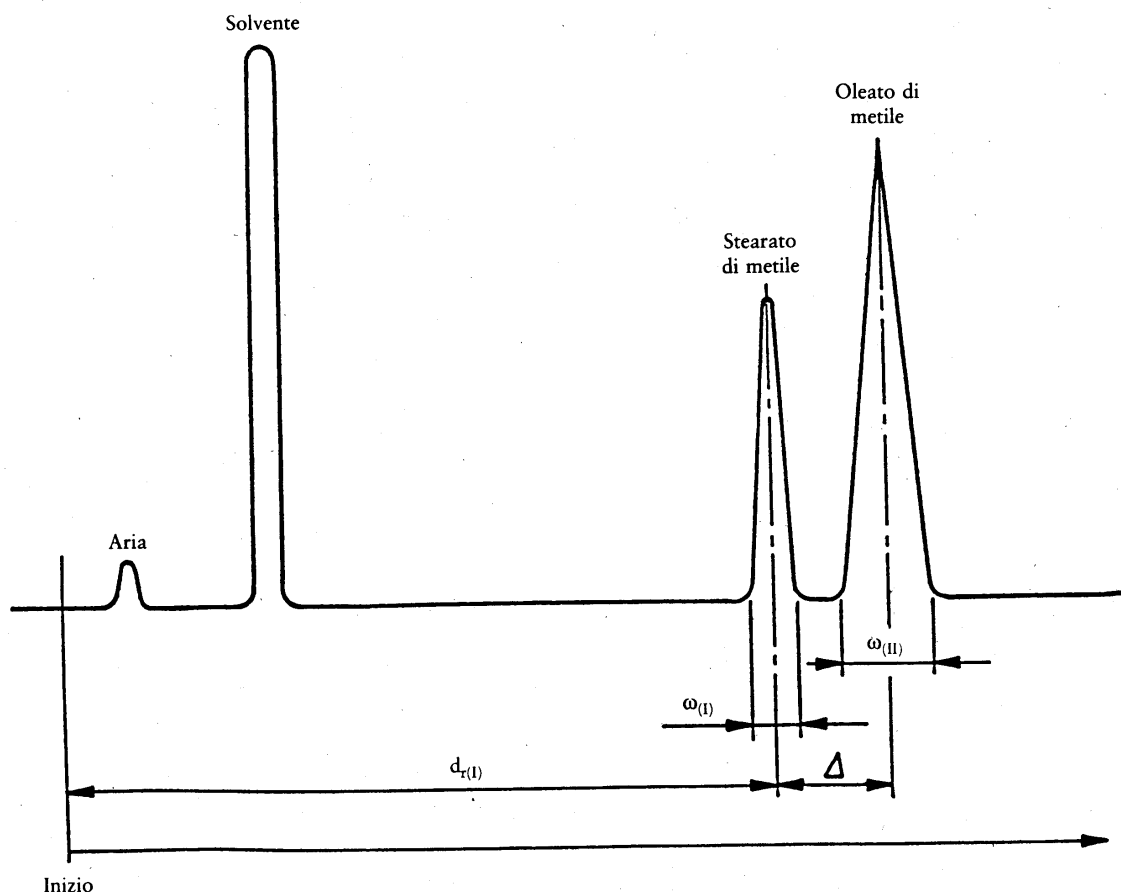
a = l'altezza del picco più basso, misurata rispetto alla linea di base;

b = l'altezza del punto più basso dell'avvallamento compreso tra i due picchi adiacenti, misurata rispetto alla linea di base.

▼ B

Figura 1

Cromatogramma per la determinazione del numero di piatti teorici (efficienza) e risoluzione



Le condizioni operative da scegliere sono quelle idonee ad almeno 2 000 piatti teorici per metro di lunghezza della colonna per quanto si riferisce allo stearato di metile e una risoluzione di almeno 1,25.

4.2. Sostanza da analizzare

Usando la siringa (3.2) prendere 0,1 μ l-2 μ l della soluzione di esteri metilici preparata conformemente all'allegato X B e iniettarli nella colonna.

▼B

Nel caso di esteri non in soluzione, preparare una soluzione di circa 100 mg/ml in eptano di qualità cromatografica ed iniettare da 0,1 µl a 1 µl di questa soluzione.

Se l'analisi riguarda costituenti presenti soltanto in tracce, la quantità di sostanza da analizzare può essere aumentata (fino a 10 volte).

4.3. Analisi

Di norma le condizioni operative sono quelle di cui al paragrafo 4.1.1.

È possibile tuttavia operare a una temperatura inferiore della colonna quando si tratta di determinare acidi grassi aventi meno di 12 atomi di carbonio oppure a una temperatura più elevata quando si tratta di determinare acidi grassi con oltre 20 atomi di carbonio. All'occasione, è possibile programmare la temperatura in entrambi questi casi. Ad esempio, se il campione contiene gli esteri metilici degli acidi grassi con meno di 12 atomi di carbonio, iniettare il campione a 100 °C (oppure da 50 °C a 60 °C se è presente acido butirrico) e raggiungere immediatamente la temperatura a un tasso compreso tra 4 °C/min e 8 °C/min in condizioni ottimali. In taluni casi possono essere associati i due procedimenti.

Dopo il riscaldamento programmato, continuare l'eluizione a temperatura costante finché tutti i componenti sono stati eluiti. Se lo strumento non prevede il riscaldamento programmato, usarlo a due temperature fisse comprese tra 100 °C e 195 °C.

Se necessario, si raccomanda di effettuare un'analisi su due fasi fisse a polarità differente per verificare l'assenza di picchi mascherati, ad esempio nel caso della presenza contemporanea di C_{18:3} e C_{20:0} oppure C_{18:3} e C_{18:2} associati.

4.4. Preparazione del cromatogramma di riferimento e dei grafici di riferimento

Analizzare la miscela standard di riferimento (2.3) nelle stesse condizioni operative di quelle usate per il campione e misurare i tempi di ritenzione o le distanze di ritenzione per gli acidi grassi costituenti. Su carta semi-logaritmica, per qualsiasi grado di insaturazione, costruire i grafici che mostrano il logaritmo del tempo o della distanza di ritenzione in funzione del numero di atomi di carbonio. In condizioni isoterme, i grafici relativi ad acidi a catena lineare aventi lo stesso grado di insaturazione devono essere linee rette. Queste linee devono essere all'incirca parallele.

È necessario evitare condizioni in cui si possano verificare i «picchi mascherati», ovvero nei quali la risoluzione è insufficiente a separare due costituenti.

5. ESPRESSIONE DEI RISULTATI**5.1. Analisi qualitativa**

Identificare i picchi dell'estere metilico del campione dai grafici preparati al paragrafo 4.4, se necessario per interpolazione.

5.2. Analisi quantitativa**5.2.1. Determinazione della composizione**

A parte casi eccezionali, usare il metodo di normalizzazione interno, cioè presumere che la totalità dei componenti del campione siano rappresentati sul cromatogramma, in modo che il totale delle aree sotto i picchi costituisca il 100 % dei costituenti (eluizione totale).

Se nell'apparecchiatura è previsto un integratore, usare i dati da esso ottenuti. In caso negativo, determinare l'area sotto ciascun picco moltiplicando l'altezza del picco per l'ampiezza a metà altezza e, se necessario, prendere in considerazione le varie attenuazioni usate durante la registrazione.

5.2.2. Metodo di calcolo**5.2.2.1. Caso generale**

Calcolare il contenuto di un dato componente I, espresso come percentuale in massa degli esteri metilici, determinando la percentuale rappresentata dall'area del picco corrispondente relativa alla somma delle aree di tutti i picchi, usando la formula seguente:

▼B

$$\frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

dove

A_i = è l'area sotto il picco corrispondente al componente i ;

$\sum A$ = è la somma delle aree sotto tutti i picchi.

Esprimere il risultato con l'approssimazione di una decimale.

Nota 7: In questo caso generale, si ritiene che il risultato del calcolo basato sulle aree relative rappresenti una percentuale in massa. Per i casi nei quali questa asserzione non è giustificata, vedi 5.2.2.2.

5.2.2.2. Uso dei fattori di correzione

In taluni casi, ad esempio in presenza di acidi grassi aventi meno di 8 atomi di carbonio oppure di acidi aventi gruppi secondari, quando si usano rivelatori di conduttività termica oppure quando è necessario il grado più elevato di accuratezza, devono essere usati fattori di correzione che convertano le percentuali delle aree e dei picchi in percentuali in peso dei componenti.

Determinare i fattori di correzione con l'ausilio di un cromatogramma derivato dall'analisi di una miscela di riferimento di esteri metilici di composizione nota, effettuata in condizioni operative identiche a quelle usate per il campione.

Per questa miscela di riferimento, la percentuale in peso del componente i è data dalla formula:

$$\frac{m_i}{\sum m} \times 100$$

dove

m_i = è il peso del componente i nella miscela di riferimento;

$\sum m$ = è il totale delle masse dei vari componenti della miscela di riferimento.

Dal cromatogramma della miscela di riferimento (4.4) calcolare la percentuale (area/area) del componente i come segue:

$$\frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

dove

A_i = è l'area sotto il picco corrispondente al componente i ,

$\sum A$ = è la somma delle aree sotto tutti i picchi.

Il fattore di correzione viene quindi calcolato come segue:

$$K_i = \frac{m_i \times \sum A}{A_i \times \sum m}$$

Di norma i fattori di correzione vengono espressi facendo riferimento a K_{C16} sicché i fattori relativi diventano:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C16}}$$

Per il campione il contenuto di ciascun componente espresso come percentuale in degli esteri metilici è:

▼ B

$$\frac{K'_i \times A_i}{\sum (K'_i \times A_i)} \times 100$$

Esprimere i risultati con l'approssimazione di una decimale.

5.2.2.3. Uso di uno standard interno

In alcune analisi (ad es. quando non tutti gli acidi grassi sono quantificati, ad esempio quando sono presenti acidi con 4 e 6 atomi di carbonio accanto ad acidi con 16 e 18 atomi di carbonio, oppure quando è necessario determinare il quantitativo assoluto di un acido grasso in un campione) è necessario ricorrere ad uno standard interno. Vengono spesso usati acidi grassi con 5,15 o 17 atomi di carbonio. Deve essere determinato l'eventuale fattore di correzione per lo standard interno.

La percentuale in peso del componente i, espressa come esteri metilici, è data dalla formula:

$$\frac{m_s \times K'_i \times A_i}{m \times K'_s \times A_s} \times 100$$

dove

A_i è l'area sotto il picco corrispondente al componente i;

A_s è l'area sotto il picco corrispondente allo standard interno;

K'_i è il fattore di correzione per il componente i (relativo a K_{C16});

K'_s è il fattore di correzione dello standard interno (relativo a K_{C16});

m è il peso, in milligrammi, della sostanza da analizzare;

m_s è il peso, in milligrammi, dello standard interno.

Esprimere i risultati con l'approssimazione di una decimale.

▼ M2

6. CASO PARTICOLARE DELLA DETERMINAZIONE DEGLI ISOMERI TRANS

Il contenuto degli isomeri trans degli acidi grassi, con il numero di atomi di carbonio compreso tra 10 e 24, può essere determinato mediante separazione degli esteri metilici, usando colonne cromatografiche capillari che presentino una particolare polarità.

- 6.1. Colonna capillare in silice, avente un diametro interno da 0,25 mm a 0,32 mm e una lunghezza di 50 mm, ricoperta di cianopropilsilicone, la cui pellicola ha uno spessore compreso tra 0,1 e 0,3 μm (tipo SP 2340, tipo SP 2380, C.P. sil 88, Silor 10 e tipi simili).

▼ M21

- 6.2. Gli esteri metilici vengono preparati con il procedimento B descritto nell'allegato X.B. Le sostanze grasse con acidità libera superiore al 3 % devono essere previamente neutralizzate come indicato al punto 5.1.1 dell'allegato VII.

▼ M2

- 6.3. Le condizioni operative per la cromatografia in fase gassosa sono complessivamente le seguenti:

- temperatura della colonna programmata da 150 °C a 230 °C (ad esempio 165 °C per 15 minuti, aumentata poi di 5 °C/minuto sino a 200 °C);
- temperatura dell'iniettore: 250 °C, con il sistema dell'iniettore divisore, oppure temperatura iniziale della colonna, con il sistema «on column»;
- temperatura del rivelatore: 260 °C;
- flusso del gas vettore (elio e idrogeno): 1,2 ml/minuto.

La quantità iniettata deve essere tale che nelle condizioni di sensibilità utilizzate l'altezza del picco corrispondente all'estere metilico dell'acido arachico sia pari o superiore al 20 % della parte inferiore della scala.

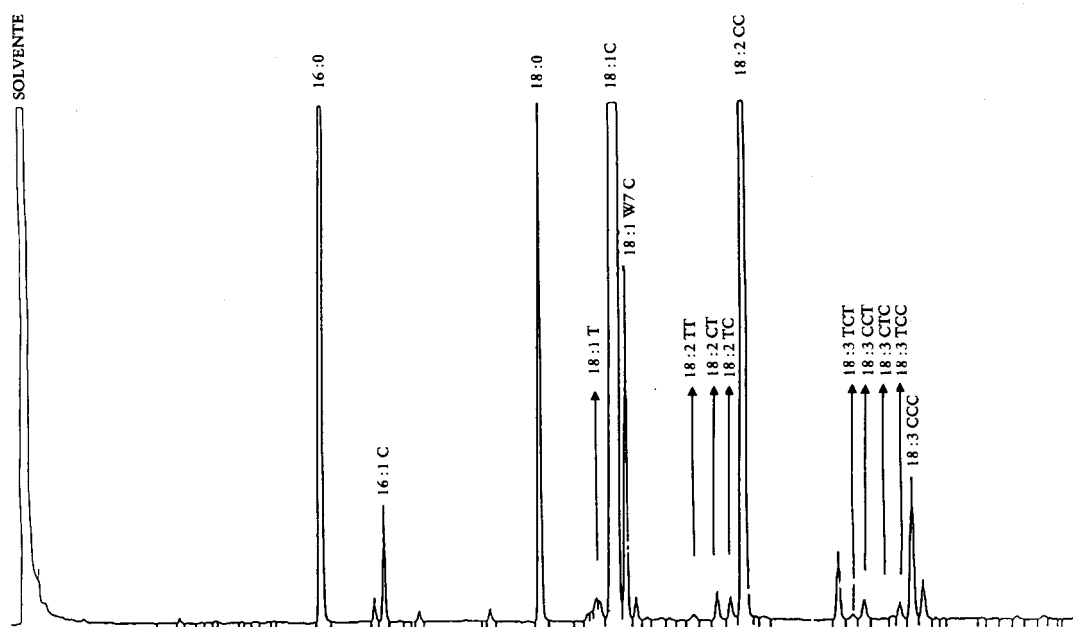
▼ M2

- 6.4. I diversi esteri metilici vengono identificati in base ai tempi di ritenzione che vengono confrontati con quelli di miscele di riferimento (come indicato al punto 2.3).

Gli esteri degli acidi grassi trans vengono eluiti prima degli isomeri corrispondenti cis. Un esempio di cromatogramma è riportato nella figura 2.

Fig. 2

Gascromatogramma tipo relativo alla determinazione degli isomeri trans degli acidi con colonna capillare



- 6.5. L'efficienza della colonna determinata conformemente al punto 4.1.2 deve consentire la separazione di talune coppie critiche, ad esempio la coppia formata dall'insieme degli acidi transisoleici e il picco dell'acido oleico, trans C18: 1/cis C18: 1, con un indice di risoluzione superiore a 2.
- 6.6. La percentuale dei diversi acidi grassi trans è calcolata in base al rapporto tra la superficie del picco attinente e la somma delle superfici di tutti i picchi presenti.

Si considerano le percentuali degli acidi:

- trans ottadecenoici (T 18: 1), indicati nell'allegato I del presente regolamento come somma degli isomeri transoleici;
- cis-trans e trans-cis ottadecadienoici [(CT/TC) 8: 2]: indicati nell'allegato I del presente regolamento come somma degli isomeri translinoleici;
- trans-cis-trans, cis-cis-trans, cis-trans-cis, trans-cis-cis, ottadecatrienoici [(TCT + CCT + CTC + TCC)18: 3], indicati nell'allegato I del presente regolamento come somma degli isomeri translinolenici.

Nota 8: viste le caratteristiche particolari di questo metodo, dare i risultati con due decimali.

▼ B

7. CASO SPECIALE — USO DI UN CATAROMETRO (FUNZIONANTE IN BASE AL PRINCIPIO DEI MUTAMENTI DI CONDUTTIVITÀ TERMICA)

Per la determinazione della composizione qualitativa e quantitativa di una miscela di esteri metilici degli acidi grassi può essere usato altresì un gascromatografo associato a un rivelatore funzionante in base al

▼B

principio dei mutamenti di conduttività termica (catarometro). Se quest'ultimo viene usato, le condizioni specificate alle clausole 3 e 4 devono essere modificate come indicato nella tabella 3.

Per l'analisi quantitativa, usare i fattori di correzione definiti al paragrafo 5.2.2.2.

Tabella 3

Variabile	Valore/condizioni
Colonna	Lunghezza: da 2 m a 4 m Diametro interno: 4 mm
Supporto	Granulometria compresa tra 160 µm e 200 µm
Concentrazione della fase stazionaria	Dal 15 % (m/m) al 25 % (m/m)
Gas vettore	Elio oppure, in mancanza di quest'ultimo, idrogeno, col tenore più basso possibile di ossigeno
Gas ausiliari	Nessuno
Temperatura dell'iniettore	Da 40 °C a 60 °C al di sopra di quella della colonna
Temperatura della colonna	Da 180 °C a 200 °C
Flusso del gas vettore	Di norma tra 60 ed 80 ml/min
Entità del campione di sostanza iniettato	Di norma tra 0,5 µl e 2 µl

8. RELAZIONE SULLA PROVA

La relazione sulla prova deve specificare i metodi usati per la preparazione degli esteri metilici e per l'analisi gascromatografica nonché i risultati tenuti. Essa deve citare altresì tutti i dettagli operativi non specificati nella presente norma internazionale oppure considerati come facoltativi, nonché i particolari di qualsiasi evento che possa avere influenzato i risultati.

La relazione sulla prova deve comprendere tutti i dati necessari per la completa identificazione del campione.

▼M19*ALLEGATO X.B***PREPARAZIONE DEGLI ESTERI METILICI DI ACIDI GRASSI DA OLIO DI OLIVA E DI SANSÀ DI OLIVA**

Per la preparazione degli esteri metilici di acidi grassi da oli di oliva e di sansa di oliva si raccomandano i due metodi che seguono:

Metodo A: Transesterificazione a freddo con soluzione metanolica di idrossido di potassio

Metodo B: Metilazione a caldo con metilato di sodio in metanolo seguita da esterificazione in ambiente acido

La scelta del metodo avverrà in funzione del parametro analitico da determinare e della categoria dell'olio, secondo lo schema che segue:

a) determinazione di ECN42 (differenza tra il valore teorico e sperimentale dei trigliceridi ECN42):

— il metodo A si applica a campioni di oli di tutte le categorie dopo purificazione dell'olio mediante passaggio su una colonna di gel di silice;

b) determinazione della composizione in acidi grassi:

— il metodo A si applicherà direttamente ai campioni di olio delle seguenti categorie:

— oli di oliva vergini di acidità inferiore a 3,3 %,

— olio di oliva raffinato,

— olio di oliva (miscela di oli di oliva vergini e olio di oliva raffinato),

— olio di sansa di oliva raffinato,

— olio di sansa di oliva (miscela di oli di oliva vergini e olio di sansa di oliva raffinato),

— il metodo B si applica direttamente a campioni delle categorie di olio indicate di seguito:

— olio di oliva vergine di acidità superiore al 3,3 %,

— olio di sansa di oliva grezzo;

c) determinazione degli isomeri trans degli acidi grassi:

— il metodo A si applicherà direttamente ai campioni di olio delle seguenti categorie:

— oli di oliva vergini di acidità inferiore a 3,3 %,

— olio di oliva raffinato,

— olio di oliva (miscela di oli di oliva vergini e olio di oliva raffinato),

— olio di sansa di oliva raffinato,

— olio di sansa di oliva (miscela di oli di oliva vergini e olio di sansa di oliva raffinato),

— il metodo A si applicherà agli oli delle seguenti categorie dopo purificazione mediante passaggio su una colonna di gel di silice:

— olio di oliva vergine di acidità superiore al 3,3 %,

— olio di sansa di oliva grezzo.

PURIFICAZIONE DEI CAMPIONI DI OLIO

Se necessario, i campioni verranno purificati facendo passare l'olio su una colonna di gel di silice, utilizzando come solvente di eluizione esano-ossido di diethyle (87:13, v/v) secondo quanto descritto dal metodo IUPAC 2.507.

Come procedimento alternativo si può ricorrere all'estrazione in fase solida utilizzando cartucce di gel di silice. Una cartuccia di gel di silice (1 g, 6 ml) si sistema in un apparecchio per l'eluizione sotto vuoto e si lava con 6 ml di esano. Si interrompe il vuoto per evitare l'essiccamento della colonna. Si deposita nella colonna una soluzione di olio (0,12 g circa) in 0,5 ml di esano e si opera il collegamento con la pompa a vuoto. La soluzione si introduce così nella silice e si eluisce con 10 ml di esano/ossido di diethyle (87:13 v/v) sotto vuoto. Si

▼ **M19**

omogeneizzano gli eluati totali e si dividono in due volumi simili. Si evapora un'aliquota fino ad essiccamento in un evaporatore rotante, operando sotto pressione ridotta, a temperatura ambiente. Si dissolve il residuo in 1 ml di eptano, ottenendo una soluzione pronta per l'analisi degli acidi grassi mediante GC. Si evapora la seconda aliquota e si dissolve il residuo in 1 ml di acetone, per l'analisi dei trigliceridi mediante HPLC.

METODI PER LA PREPARAZIONE DEGLI ESTERI METILICI DI ACIDI GRASSI

1. *Metodo A: Transesterificazione a freddo con soluzione metanolica di idrossido di potassio*

1.1. Osservazioni generali

Questo metodo rapido è applicabile agli oli di oliva e di sansa il cui contenuto in acidi grassi liberi non sia superiore a 3,3 %. Gli acidi grassi liberi non vengono esterificati dall'idrossido di potassio. Gli esteri etilici degli acidi grassi vengono transesterificati più lentamente degli esteri gliceridici, e possono essere metilati solo parzialmente.

1.2. Principio del metodo

Gli esteri metilici si formano per transesterificazione con una soluzione metanolica di idrossido di potassio come fase intermedia prima della saponificazione (punto 5 di ISO-5509:2000, punto 5 del metodo IUPAC 2.301).

1.3. Reagenti

Metanolo dal contenuto in acqua non superiore allo 0,5 % (m/m).

Eptano, puro per cromatografia.

Idrossido di potassio, soluzione metanolica circa 2 N: sciogliere 11,2 g di idrossido di potassio in 100 ml di metanolo.

1.4. Apparecchiatura

Provette con tappo a vite (volume 5 ml) munito di giunto PTFE.

Pipette tarate o automatiche da 2 ml e 0,2 ml.

1.5. Procedimento

Si pesano circa 0,1 g del campione di olio in una provetta da 5 ml con tappo a vite. Si aggiungono 2 ml di eptano e si mescola. Si aggiungono 0,2 ml di soluzione metanolica di idrossido di potassio N2, si chiude con il tappo munito di giunto PTFE, si stringe bene il tappo e si agita energicamente per 30 secondi. Si lascia stratificare finché la soluzione superiore diventa trasparente. Decantare lo strato superiore che contiene gli esteri di metile. La soluzione di eptano ottenuta è adatta ad essere iniettata nel gascromatografo. Si consiglia di conservare la soluzione in frigorifero fino al momento dell'analisi gascromatografica. Non si consiglia di conservare la soluzione per un periodo superiore alle 12 ore.

2. *Metodo B: Metilazione a caldo con metilato di sodio in metanolo seguita da esterificazione in ambiente acido*

2.1. Osservazioni generali

Questo metodo è applicabile a oli di oliva e oli di sansa di oliva il cui contenuto in acidi grassi liberi è superiore a 3,3 %.

2.2. Principio del metodo

Neutralizzazione degli acidi grassi liberi e metanolisi alcalina dei gliceridi, seguita da esterificazione degli acidi grassi in ambiente acido (punto 4.2 del metodo IUPAC 2.301).

2.3. Reagenti

— Eptano, puro per cromatografia.

— Metanolo dal contenuto in acqua non superiore allo 0,05 % (m/m).

— Metilato sodico, soluzione metanolica 0,2 N: sciogliere 5 g di sodio in 1 000 ml di metanolo (può essere preparata a partire da soluzioni commerciali).

— Fenoltaleina, 0,2 % soluzione metanolica.

▼M19

— Acido solforico, 1 N in soluzione metanolica: aggiungere 3 ml di acido solforico al 96 % a 100 ml di metanolo.

— Soluzione satura di cloruro di sodio in acqua.

2.4. Apparecchiatura

— Matraccio volumetrico da 50 ml con collo a smeriglio lungo e stretto.

— Refrigerante a ricadere. Condensatore ad aria, di 1 m di lunghezza, con giunto smerigliato idoneo ad essere montato sul matraccio.

— Granuli ebullioscopici.

— Imbuto di vetro.

2.5. Procedimento

Si trasferiscono 0,25 g circa del campione di olio in un matraccio volumetrico da 50 ml con il collo smerigliato. Con l'aiuto di un imbuto si aggiungono 10 ml della soluzione metanolica 0,2 N di metilato sodico e granuli ebullioscopici. Si applica il refrigerante a ricadere, si agita e si porta a ebollizione. La soluzione dovrebbe diventare trasparente in circa 10 minuti. La reazione è completa in 15 minuti. Si toglie il matraccio dalla fonte di calore, si attende che cessi il riflusso, si stacca il refrigerante e si aggiungono due gocce di soluzione di fenoltaleina. Si aggiungono pochi ml di acido solforico 1 N in soluzione metanolica finché la soluzione diventa incolore e si aggiunge 1 ml in eccesso. Si applica il refrigerante e si fa bollire nuovamente per 20 minuti. Si rimuove la fonte di calore e si raffredda il matraccio sotto acqua corrente. Si stacca il refrigeratore, si aggiungono 20 ml di soluzione satura di cloruro di sodio e si agita. Si aggiungono 5 ml di eptano, si tappa il matraccio e si agita energicamente per 15 secondi.

Si lascia sedimentare fino alla separazione delle due fasi. Si aggiunge nuovamente la soluzione satura di cloruro di sodio finché lo strato acquoso non raggiunge la base del collo del matraccio. Lo strato superiore contenente gli esteri di metile riempie il collo del matraccio. Questa soluzione è pronta per l'iniezione nel gascromatografo.

Avvertenza: La metilazione con il metodo B deve essere effettuata sotto una cappa.

2.6. Alternative al Metodo di metalizzazione B**2.6.1. Metodo C****2.6.1.1. Principio del metodo**

La sostanza grassa in esame viene trattata con metanolo-acido cloridrico, in fiala chiusa, a 100 °C.

2.6.1.2. Apparecchiatura

— Fiala di vetro, a pareti robuste, da circa 5 ml (altezza 40-45 mm, diametro 14-16 mm).

— Pipette tarate da 1 e 2 ml.

2.6.1.3. Reagenti

Soluzione di acido cloridrico in metanolo al 2 %. Si prepara con acido cloridrico gassoso e metanolo anidro (nota 1).

Esano per gascromatografia.

▼ **M19**

Nota 1: Si possono impiegare le soluzioni di cloruro di idrogeno in metanolo disponibili in commercio. È possibile preparare facilmente in laboratorio piccole quantità d'acido cloridrico gassoso, modificando la soluzione disponibile in commercio ($p = 1,18$) aggiungendo qualche goccia d'acido solforico concentrato. Poiché l'acido cloridrico è rapidamente assorbito dal metanolo, si raccomanda di prendere le precauzioni abituali al momento della dissoluzione (ad esempio introducendo il gas con una piccola fiala rovesciata il cui bordo sfiora la superficie del liquido). La soluzione metanolica di acido cloridrico può essere preparata in anticipo in grandi quantità, poiché si conserva perfettamente in bottiglie con tappo di vetro conservate nell'oscurità. In alternativa, questo reagente può essere preparato dissolvendo cloruro di acetile in metanolo anidro.

2.6.1.4. Procedimento

- Si introducono nella fiala di vetro 0,2 g di sostanza grassa, preventivamente disidratata su solfato sodico e filtrata, e 2 ml di soluzione di acido cloridrico-metanolo. Si chiude la fiala alla fiamma.
- Si mantiene la fiala in bagno a 100 °C per 40 minuti.
- Si raffredda la fiala sotto acqua corrente, si apre, si aggiungono 2 ml di acqua distillata e 1 ml di esano.
- Si centrifuga e si preleva la fase esanica che è pronta per l'impiego.

2.6.2. Metodo D

2.6.2.1. Principio del metodo

La sostanza grassa in esame viene riscaldata a ricadere con metanolo-esano-acido solforico. Gli esteri metilici ottenuti si estraggono con etere di petrolio.

2.6.2.2. Apparecchiatura

- Provetta da 20 ml circa, munita di refrigerante a ricadere ad aria, della lunghezza di 1 m circa, con giunti a smeriglio.
- Pipetta tarata da 5 ml.
- Imbutto separatore da 50 ml.
- Cilindri graduati da 10 e 25 ml.
- Provetta da 15 ml, a fondo conico.

2.6.2.3. Reagenti

- Reagente di metilazione: metanolo anidro, esano, acido solforico concentrato ($p = 1,84$) in rapporto 75:25:1 (V/V/V).
- Etere di petrolio 40-60 °C.
- Sodio solfato anidro.

2.6.2.4. Procedimento

Nella provetta da 20 ml si introduce il materiale recuperato dalla placca e si aggiungono 5 ml di reagente di metilazione.

Si collega il refrigerante a ricadere e si riscalda per 30 minuti a bagnomaria bollente (nota 2).

Si trasferisce quantitativamente la miscela in un imbuto separatore da 50 ml, aiutandosi con 10 ml di acqua distillata e 10 ml di etere di petrolio. Si agita energicamente, si lasciano separare le fasi. Si allontana lo strato acquoso e si lava lo strato eterico per due volte con 20 ml di acqua distillata. Si aggiunge nell'imbuto separatore una piccola quantità di solfato sodico anidro, si agita, si lascia a riposo per qualche minuto e si filtra, raccogliendo il filtrato in una provetta a fondo conico da 15 ml.

Si evapora il solvente su bagnomaria, in corrente di azoto.

▼M19

Nota 2: Per controllare l'ebollizione introdurre una bacchetta di vetro nella provetta e limitare la temperatura del bagnomaria a 90 °C.

3. **Parametri di precisione**

La valutazione statistica della precisione dei metodi A e B è stata pubblicata dal consiglio oleicolo internazionale nel suo metodo COI/T.20/DOC n. 24.

RACCOMANDAZIONI PER L'ANALISI GASCROMATOGRAFICA DEGLI ESTERI DEGLI ACIDI GRASSI DELL'OLIO DI OLIVA E DELL'OLIO DI SANSA DI OLIVA

1. **Procedimento**

L'analisi mediante gascromatografia di soluzioni di esteri grassi in esano verrà condotta secondo la norma ISO-5508, utilizzando una colonna capillare (della lunghezza di 50 m e dal diametro interno di 0,25 o 0,32 mm) impregnata di cianopropilsilicone, come indicato per la determinazione degli acidi grassi trans isomeri (COI/T.20/Doc. n. 17).

La figura 1 riproduce il tipico profilo gascromatografico di un olio di sansa che contiene esteri metilici ed etilici degli acidi grassi, e isomeri trans degli esteri metilici.

2. **Calcoli**

2.1. Per calcolare la composizione in acidi grassi e il ΔECN_{42} devono essere presi in considerazione i seguenti acidi grassi:

Miristico (C14:0).

Palmitico (C16:0). Somma delle aree dei picchi che corrispondono agli esteri metilici ed etilici.

Palmitoleico (C16:1). Somma delle aree dei picchi che corrispondono agli isomeri $\omega 9$ e $\omega 7$ dell'estere metilico.

Margarico (C17:0).

Margaroleico (C17:1).

Stearico (C18:0).

Oleico (C18:1). Somma delle aree dei picchi che corrispondono agli isomeri $\omega 9$ e $\omega 7$ dell'estere metilico, dell'estere etilico e degli isomeri trans dell'estere metilico.

Linoleico (C18:2). Somma delle aree dei picchi che corrispondono agli esteri metilici ed etilici e agli isomeri trans dell'estere metilico.

Arachico (C20:0).

Linolenico (C18:3). Somma delle aree dell'estere metilico e degli isomeri trans dell'estere metilico.

Eicosanoico (C20:1).

Behenico (C22:0).

Lignocerico (C24:0).

Lo squalene non viene preso in considerazione per il calcolo del totale dell'area.

2.2. Per calcolare la percentuale di trans-C18:1 verrà utilizzato il picco che corrisponde agli esteri metilici di questo acido grasso. Per la somma [trans-C18:2 + trans-C18:3], verranno sommati tutti i picchi corrispondenti agli isomeri trans di questi due acidi grassi. Per calcolare l'area totale si terrà conto di tutti i picchi menzionati in 2.1 (cfr. COI/T.20/Doc. n. 17).

Il calcolo della percentuale di ogni acido grasso verrà effettuato in base alla formula che segue:

$$\% X = (\text{Area } X \times 100) / (\text{area totale})$$

▼ M19

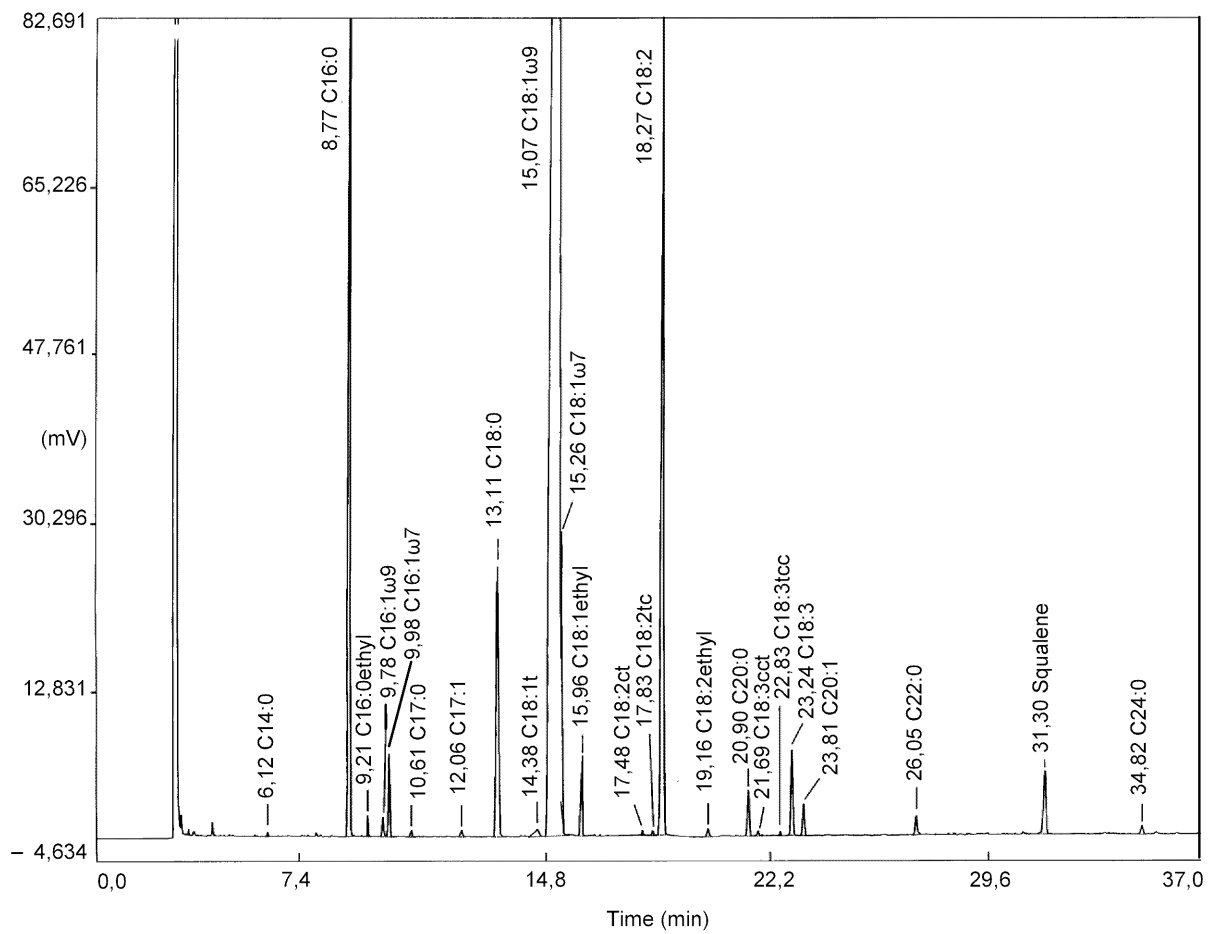


Figura 1: Profilo gascromatografico di un olio di sansa di oliva, ottenuto con il metodo della metilazione a freddo. I picchi cromatografici corrispondono agli esteri metilici, salvo altre indicazioni.

*ALLEGATO XI***DETERMINAZIONE DEL TENORE DI SOLVENTI ALOGENATI
VOLATILI NELL'OLIO DI OLIVA****1. PRINCIPIO**

Analisi mediante cromatografia in fase gassosa secondo la tecnica dello spazio di testa (head space).

2. APPARECCHIATURA

2.1. Apparecchio di cromatografia in fase gassosa, munito di rivelatore a cattura di elettroni.

2.2. Apparecchiatura per spazio di testa.

2.3. Colonna per cromatografia in fase gassosa, in vetro, di 2 m di lunghezza e 2 mm di diametro, fase stazionaria.

OV101 al 10 % o equivalente, impregnato su una terra di diatomee calcinata, lavata con acidi e silanizzata, di granulometria 80-100 Mesh.

2.4. Gas vettore e gas ausiliario; azoto per cromatografia in fase gassosa, idoneo alla rivelazione per cattura di elettroni.

2.5. Bottiglie in vetro da 10 a 15 ml, munite di una guarnizione in teflon e di un tappo d'alluminio provvisto di un orifizio per prelievo a mezzo siringa.

2.6. Pinze a chiusura ermetica.

2.7. Siringa per gas da 0,5 a 2 ml.

3. REATTIVI

Solventi alogenati volatili di purezza idonea all'impiego per cromatografia in fase gassosa.

4. PROCEDIMENTO

4.1. Pesare con precisione 3 g d'olio circa in una bottiglia di vetro (da non riutilizzare) e chiudere la bottiglia ermeticamente. Riporre la bottiglia in un termostato a 70 °C per un'ora. Prelevare con precisione con la siringa un volume da 0,2 a 0,5 ml dallo spazio di testa ed iniettarlo nella colonna del cromatografo in fase gassosa regolato come segue:

— temperatura dell'iniettore: 150 °C

— temperatura della colonna: 70-80 °C

— temperatura del rivelatore: 200-250 °C

Si possono usare temperature diverse purché i risultati siano equivalenti.

4.2. Soluzioni di riferimento: preparare soluzioni standard, usando olio d'oliva, raffinato senza traccia di solventi, a concentrazioni variabili tra 0,05 e 1 mg/kg ed in relazione con il tenore presunto del campione. L'eventuale diluizione deve essere fatta con pentano.

4.3. Valutazione quantitativa: fare il rapporto tra le superfici o le altezze dei picchi del campione e della soluzione standard corrispondente alla concentrazione presunta più vicina. Se lo scarto relativo supera il 10 % occorre ripetere l'analisi comparato con una nuova soluzione standard, fino a che la sua concentrazione rientri nel suddetto scarto relativo. Il tenore è determinato in base ad una media di iniezioni elementari.

4.4. Espressione dei risultati: i risultati sono espressi in mg/kg (ppm). Il limite di rivelazione del metodo è di 0,01 mg/kg.

▼ **M19***ALLEGATO XII***VALUTAZIONE ORGANOLETTICA DEGLI OLI DI OLIVA VERGINI****1. FINALITÀ E CAMPO D'APPLICAZIONE**

Lo scopo del presente metodo è quello di stabilire i criteri necessari per la valutazione delle caratteristiche organolettiche degli oli d'oliva vergini ai sensi del punto 1 dell'allegato del regolamento n. 136/66/CEE e di descrivere il metodo per la loro classificazione.

Il metodo descritto è applicabile soltanto alla classificazione degli oli d'oliva vergini in funzione dell'esistenza del flavor fruttato e dell'intensità dei difetti, determinati da un gruppo di assaggiatori selezionati e addestrati, costituito in panel, conformemente al punto 4.

2. ASPETTI GENERALI

Per il vocabolario generale di base, la sala di degustazione, la metodologia generale e il bicchiere di degustazione dell'olio, si raccomanda di conformarsi alle prescrizioni del consiglio oleicolo internazionale.

3. VOCABOLARIO SPECIFICO**3.1. Attributi positivi**

Fruttato: insieme delle sensazioni olfattive, dipendenti dalla varietà delle olive, e caratteristiche dell'olio ottenuto da frutti sani e freschi, verdi o maturi, percepite per via diretta o retronasale.

Amaro: sapore caratteristico dell'olio ottenuto da olive verdi o invaiate.

Piccante: sensazione tattile pungente caratteristica di oli prodotti all'inizio della campagna, principalmente da olive ancora verdi.

3.2. Attributi negativi

Riscaldamento: flavor caratteristico dell'olio ottenuto da olive ammassate che hanno sofferto un avanzato grado di fermentazione anaerobica.

Muffa-umidità: flavor caratteristico dell'olio ottenuto da frutti nei quali si sono sviluppati abbondanti funghi e lieviti per essere rimasti ammassati per molti giorni e in ambienti umidi.

Morchia: flavor caratteristico dell'olio rimasto in contatto con i fanghi di decantazione in depositi sotterranei e aerei.

Avvinato-inacetito: flavor caratteristico di alcuni oli che ricorda quella del vino o dell'aceto. È dovuta fondamentalmente a un processo fermentativo delle olive che porta alla formazione di acido acetico, acetato di etile ed etanolo.

Metallico: flavor che ricorda il metallo. È caratteristico dell'olio mantenuto a lungo in contatto con superfici metalliche durante i procedimenti di macinatura, gramolatura, pressione o stoccaggio.

Rancido: flavor degli oli che hanno subito un processo ossidativo.

Cotto o stracotto: flavor caratteristico dell'olio, dovuta ad eccessivo e/o prolungato riscaldamento durante l'ottenimento, specialmente durante la termo-impastatura, se avviene in condizioni termiche inadatte.

Fieno-legno: flavor caratteristico di alcuni oli provenienti da olive secche.

Grossolano: sensazione orale/tattile densa e pastosa prodotta da alcuni oli.

Lubrificanti: flavor dell'olio che ricorda il gasolio, il grasso o l'olio minerale.

Acqua di vegetazione: flavor acquisito dall'olio a causa di un contatto prolungato con le acque di vegetazione.

Salamoia: flavor dell'olio estratto da olive conservate in salamoia.

Sparto: flavor caratteristico dell'olio ottenuto da olive pressate in fiscoli nuovi di sparto. Essa può essere diversa se il fiscolo è fatto con sparto verde o con sparto secco.

Terra: flavor dell'olio ottenuto da olive raccolte con terra o infangate e non lavate.

▼ **M19**

Verme: flavor dell'olio ottenuto da olive fortemente colpite da larve di mosca dell'olivo (*Bactrocera oleae*).

Cetriolo: flavor che si produce caratteristicamente nell'olio durante un condizionamento ermetico eccessivamente prolungato, particolarmente in lattine, che è attribuita alla formazione di 2-6 nonadienale.

4. PANEL DI ASSAGGIATORI

Il panel è nominato dallo Stato membro ed è composto da un capo e da otto a dodici assaggiatori. Tuttavia, per la campagna 2001/02 il numero di assaggiatori può essere inferiore a otto.

Il capo del panel deve possedere una solida formazione ed essere un esperto nei vari tipi di olio. Egli è responsabile del panel, della sua organizzazione, del funzionamento, della preparazione, della codificazione e della presentazione dei campioni agli assaggiatori nonché del compendio dei dati e del loro trattamento statistico.

Il capo panel seleziona gli assaggiatori e provvede al loro addestramento e al controllo del loro operato in modo da garantire il mantenimento di un adeguato livello attitudinale.

Gli assaggiatori per le prove organolettiche dell'olio di oliva devono essere prescelti e addestrati in funzione della loro abilità a distinguere tra campioni simili, conformemente alla guida del consiglio oleicolo internazionale per la selezione, l'addestramento e il controllo degli assaggiatori qualificati di olio di oliva vergine.

I panel devono impegnarsi a partecipare alle valutazioni organolettiche previste a livello nazionale, comunitario o internazionale per il controllo periodico e l'armonizzazione dei criteri percettivi. Essi devono inoltre inviare ogni anno allo Stato membro interessato tutte le informazioni in merito alla loro composizione e al numero di valutazioni realizzate in quanto panel riconosciuto.

5. PROCEDURA DA SEGUIRE PER LA VALUTAZIONE ORGANOLET-TICA E LA CLASSIFICAZIONE

5.1. Uso del foglio di profilo da parte dell'assaggiatore

Il foglio di profilo che deve utilizzare l'assaggiatore figura nell'appendice A del presente metodo.

Ogni assaggiatore facente parte del panel deve odorare, poi assaggiare ⁽¹⁾ l'olio sottoposto ad esame, contenuto nel bicchiere di assaggio, per analizzarne le percezioni olfattive, gustative, tattili e cinestetiche. Deve poi appuntare nel foglio di profilo a sua disposizione l'intensità alla quale percepisce ciascuno degli attributi negativi e positivi.

Nel caso in cui fossero percepiti attributi negativi non enumerati, questi devono essere indicati alla voce «altri» impiegando il o i termini che li descrivono con la maggior precisione possibile, tra quelli definiti al punto 3.2 del presente metodo.

5.2. Uso dei dati da parte del capo panel

Il capo panel deve raccogliere i fogli di profilo riempiti da ciascuno degli assaggiatori; deve controllare le intensità attribuite; nell'ipotesi di un'anomalia constatata chiederà all'assaggiatore di rivedere il suo foglio di profilo e, se necessario, di ripetere la prova.

Il responsabile del panel deve riprendere i dati di ogni giudice sul programma informatico allegato al metodo (appendice B) per il calcolo statistico della mediana. La ripresa dei dati per un campione deve essere fatta servendosi della matrice composta di dieci colonne corrispondenti ai dieci attributi sensoriali e n linee corrispondenti agli n giudici impiegati.

Quando un attributo negativo è riportato alla voce «altri» da almeno il 50 % del panel, il responsabile del panel deve procedere al calcolo della mediana di questo attributo e alla corrispondente classificazione.

Nel caso di analisi eseguite nel quadro di controlli di conformità alla norma o di controperizie, il capo panel deve far procedere alla valutazione organolettica dell'olio tre volte, ad almeno una giornata di intervallo; la mediana

⁽¹⁾ Potrà astenersi dall'assaggiare quando osservi qualche attributo negativo estremamente intenso e appunterà nel foglio di profilo questa circostanza eccezionale.

▼ M19

degli attributi sarà calcolata a partire dall'insieme dei dati dei fogli di profilo delle tre prove.

5.3. Classificazione degli oli

L'olio è classificato secondo le denominazioni sotto riportate, in funzione della mediana dei difetti e della mediana dell'attributo fruttato. Per mediana dei difetti si intende la mediana dell'attributo negativo percepito con l'intensità più alta. Il valore del coefficiente di variazione robusto per tale attributo negativo deve essere inferiore o pari al 20 %.

- a) *olio extra vergine di oliva*: la mediana dei difetti è pari a 0 e la mediana del fruttato è superiore a 0;
- b) *olio di oliva vergine*: la mediana dei difetti è superiore a 0 e inferiore o pari a 2,5 e la mediana del fruttato è superiore a 0;
- c) *olio di oliva vergine corrente*: la mediana dei difetti è superiore a 2,5 e inferiore o pari a 6,0; oppure la mediana dei difetti è inferiore o pari a 2,5 e la mediana del fruttato è pari a 0;
- d) *olio di oliva vergine lampante*: la mediana dei difetti è superiore a 6,0.

Tuttavia, a partire dal 1° novembre 2003 le categorie c) e d) sono sostituite dalla categoria:

- c) *olio di oliva lampante*: la mediana dei difetti è superiore a 2,5; oppure la mediana dei difetti è inferiore o pari a 2,5 e la mediana del fruttato è pari a 0.

5.4. Caso particolare

Quando la mediana di un attributo positivo diverso dal fruttato è superiore a 5,0, il capo panel lo deve segnalare nel certificato di analisi dell'olio.

▼ M19*APPENDICE A***Foglio di profilo**

(ad uso dell'assaggiatore)

PERCEZIONE DEI DIFETTI	INTENSITÀ
Riscaldo	
Muffa-umidità	
Avvinato-inacetito	
Morchia	
Metallico	
Rancido	
Altri (precisare)	
PERCEZIONE DEGLI ATTRIBUTI POSITIVI	
Fruttato	
Amaro	
Piccante	

Nome dell'assaggiatore:Codice del campione:Data:

▼ **M19***APPENDICE B***METODO DI CALCOLO DELLA MEDIANA E DEGLI INTERVALLI DI
CONFIDENZA****Mediana**

$$Me = [P(X < X_m) \leq 1/2 \wedge P(X \leq X_m) \geq 1/2]$$

La mediana è quel numero reale X_m caratterizzato dal fatto che la probabilità (P) che i valori della distribuzione (X) siano minori a questo numero (X_m), è minore e uguale a 0,5 e che contemporaneamente la probabilità (P) che i valori della distribuzione (X) siano minori o uguali a X_m , è maggiore o uguale a 0,5. Una definizione più operativa è quella che definisce la mediana come il 50 ° percentile di una distribuzione di numeri ordinata in modo crescente. In altri termini, la mediana rappresenta il valore centrale di una serie ordinata di numeri dispari, oppure la media dei due valori centrali di una serie ordinata di numeri pari.

Deviazione standard robusta

$$S = \frac{1,25 \text{ IQR}}{1,35 \sqrt{N}}$$

Per avere una stima attendibile della variabilità intorno alla mediana ci si rifà alla stima della deviazione standard robusta secondo Stuart e Kendall. La formula della deviazione standard robusta S dipende da N e IQR. N è il numero dei casi e IQR l'intervallo interquartile ovvero la stima robusta della variabilità dei dati considerati (l'intervallo interquartile racchiude esattamente il 50 % dei casi di una qualsiasi distribuzione probabilistica). Il calcolo dell'intervallo interquartile si esegue calcolando la dimensione dello scarto tra il 75° e il 25° percentile.

$$\text{IQR} = 75^\circ \text{ percentile} - 25^\circ \text{ percentile}$$

Il percentile è quel valore X_{pc} caratterizzato dal fatto che la probabilità (P) che i valori della distribuzione siano minori a X_{pc} è minore e uguale a un determinato centesimo e che contemporaneamente la probabilità (P) che i valori della distribuzione siano minori o uguali a X_{pc} è maggiore e uguale a quel determinato centesimo. Il centesimo indica la frazione di distribuzione scelta. Nel caso della mediana questa è pari a 50/100.

$$\text{Percentile} = [P(X < X_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge P(X \leq X_{pc}) \geq \frac{n}{100}]$$

Operativamente il percentile è quel valore di distribuzione che corrisponde ad una determinata area sottesa dalla curva di distribuzione o di densità. Ad esempio il 25° percentile rappresenta il valore della distribuzione corrispondente a un'area pari a 0,25 o 25/100.

Coefficiente di variazione % robusto

$$\text{CVR} = \frac{S}{Me} 100$$

Le CVR rappresenta un numero puro, ovvero senza dimensione, che indica la percentuale di variabilità della serie di numeri analizzata rispetto al valore Me della mediana; per questo motivo risulta molto informativo sulla attendibilità dei giudizi del panel.

▼ M19**Intervalli di confidenza al 95 % sulla mediana**

Gli intervalli di confidenza (I.C.) al 95 % (valore dell'errore del primo tipo pari a 0,05 o 5 %) rappresentano l'intervallo dove il valore della mediana potrebbe variare se fosse possibile ripetere infinite volte un esperimento. In pratica indica l'intervallo di variabilità della prova nelle condizioni operative adottate qualora si potesse ripeterla parecchie volte. L'intervallo aiuta a valutare, come con i CVR, l'attendibilità della prova.

$$\text{I.C. Sup.} = \text{Me} + (c.S)$$

$$\text{I.C. Inf.} = \text{Me} - (c.S)$$

Dove c nel caso della confidenza pari a 0,95 è uguale a 1,96.

La classificazione avviene confrontando i valori della mediana con gli intervalli determinati al punto 5.3 del metodo. Il programma informatico permette di visualizzare la classificazione sulla tabella dei dati statistici e sul grafico.

▼ M20

▼ M19



ALLEGATO XV

1. METODO DI DETERMINAZIONE DEL TENORE IN OLIO D'OLIVA DELLE SANSE

1.1. Materiale

- apparecchio da estrazione appropriato, munito di un pallone da 200-250 ml,
- bagno a riscaldamento elettrico (bagno a sabbia, bagno ad acqua, ecc.) o piastra riscaldante,
- bilancia analitica,
- stufa regolata su un massimo di 80 °C,
- stufa a riscaldamento elettrico, provvista di un dispositivo di termoregolazione regolato su 103 ± 2 °C e tale da consentire una insufflazione d'aria o una depressione,
- frantoio meccanico facile da pulire, che permette la frantumazione dei noccioli senza riscaldamento e senza modificazione sensibile del loro tenore in acqua e in olio,
- ditale da estrazione e cotone idrofilo o carta da filtro, esenti da sostanze estraibili con esano,
- essiccatore,
- setaccio a maglie da 1 mm di diametro,
- pietra pomice in granuli, previamente essiccata.

1.2. Reattivo

n-esano tecnico, il cui residuo all'evaporazione completa dev'essere inferiore a 0,002 g/100 ml.

2. MODO DI OPERARE

2.1. Preparazione del campione per l'analisi

Frantumare il campione contrattuale, se necessario, nel frantoio meccanico ben pulito in precedenza, allo scopo di ridurlo in particelle che attraversino completamente il setaccio.

Utilizzare $\frac{1}{20}$ circa del campione per completare la pulizia del frantoio, scartare il prodotto di questa macinazione, frantumare il resto, raccoglierlo, mescolarlo con cura e analizzarlo immediatamente.

2.2. Quantità di sostanza da analizzare

Immediatamente dopo la fine della frantumazione, pesare con l'approssimazione di 0,01 g circa 10 g del campione.

2.3. Preparazione del ditale da estrazione

Porre la sostanza destinata all'analisi nella cartuccia, che va tappata con il tampone di cotone idrofilo. Nel caso che si utilizzi una carta da filtro, impacchettare le sanse frantumate in tale carta.

2.4. Preessiccazione

Se la sansa è molto umida (tenore in acqua ed in sostanze volatili superiore al 10 %), effettuare un'essiccazione preliminare ponendo per un tempo conveniente il ditale riempito (o la carta da filtro) nella stufa riscaldata ad un massimo di 80 °C, per ricondurre il tenore in acqua ed in materie volatili al di sotto del 10 %.

2.5. Preparazione del pallone

Pesare con l'approssimazione di 1 mg il pallone contenente 1-2 granuli di pomice, previamente essiccato in stufa a 103 ± 2 °C e poi raffreddato per almeno un'ora in essiccatore.

2.6. Prima estrazione

Porre nell'apparecchio da estrazione il ditale (o la carta da filtro) contenente la sostanza da analizzare. Versare nel pallone la quantità necessaria di esano. Adattare il pallone all'apparecchio da estrazione e porre il tutto sul bagno a riscaldamento elettrico. Effettuare il riscaldamento in condizioni tali che la

▼B

portata del riflusso sia di almeno tre gocce al secondo (ebollizione moderata, non tumultuosa).

Dopo quattro ore di estrazione, lasciar raffreddare. Togliere il ditale dall'apparecchio di estrazione e porlo in una corrente d'aria, al fine di eliminare la maggior parte del solvente che lo impregna.

2.7. Seconda estrazione

Vuotare il ditale nel microfrantoio e macinare il più finemente possibile. Reintrodurre quantitativamente la miscela nel ditale e rimettere questo nell'apparecchio da estrazione.

Ricominciare l'estrazione per altre due ore, utilizzando lo stesso pallone che contiene la prima sostanza estratta.

La soluzione ottenuta nel pallone da estrazione dev'essere limpida. Se così non fosse, filtrarla su carta, lavando più volte il primo pallone e la carta da filtro con esano. Raccogliere filtrato e solvente di lavaggio in un secondo pallone, previamente essiccato e tarato con l'approssimazione di 1 mg.

2.8. Eliminazione del solvente e pesata dell'estratto

Eliminare la maggior parte del solvente distillato su bagno a riscaldamento elettrico. Eliminare le ultime tracce di solvente riscaldando il pallone in stufa a 103 ± 2 °C per 20 minuti. Facilitare questa eliminazione sia insufflando ogni tanto dell'aria o, preferibilmente, del gas inerte, sia operando sotto pressione ridotta.

Lasciar raffreddare il pallone in essiccatore per almeno un'ora, poi pesarlo con l'approssimazione di 1 mg.

Riscaldare di nuovo per 10 minuti nelle stesse condizioni, poi raffreddare in essiccatore e pesare.

La differenza fra i risultati di queste due pesate dev'essere inferiore od uguale a 10 mg. In caso contrario, riscaldare di nuovo per periodi di 10 minuti, seguiti da raffreddamento e pesata, finché la differenza di massa sia uguale tutt'al più a 10 mg. Adottare per il calcolo il valore dato dall'ultima pesata.

Effettuare due determinazioni sullo stesso campione.

3. ESPRESSIONE DEI RISULTATI**3.1. Modo di calcolo e formula**

- a) L'estratto, espresso come massa percentuale sul prodotto tal quale, è dato dalla formula:

$$S = m_1 \times \frac{100}{m_0}$$

nella quale:

S = percentuale in massa sul prodotto tal quale,

m_0 = massa in grammi della quantità di sostanza prelevata per l'analisi,

m_1 = massa in grammi dell'estratto dopo essiccazione.

Prendere come risultato la media aritmetica delle due determinazioni, se le condizioni di ripetibilità sono adempiute.

Esprimere il risultato con una sola cifra decimale.

- b) L'estratto viene riferito alla sostanza secca utilizzando la formula seguente:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{estratto in \% grasso/secco}$$

dove:

S = percentuale in massa di estratto sul prodotto tal quale (vedi lettera a),

▼B

U = suo tenore in acqua e in sostanze volatili.

3.2. Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o in rapida successione dallo stesso analista non deve eccedere i 0,2 g di estratto ottenuto con l'esano per ogni 100 g di campione.

In caso contrario, ripetere l'analisi su due altri quantitativi di sostanza. Se ancora questa volta la differenza eccede gli 0,2 g, assumere come risultato la media aritmetica delle quattro determinazioni effettuate.



ALLEGATO XVI

DETERMINAZIONE DEL NUMERO DI IODIO

1. OGGETTO

La presente norma internazionale definisce un metodo per la determinazione del numero di iodio nei grassi e negli oli di origine animale e vegetale, qui di seguito denominati «grassi».

2. DEFINIZIONE

Ai fini della presente norma internazionale, si applica la seguente definizione.

- 2.1. *Numero di iodio*: la massa di iodio assorbita dal campione nelle condizioni specificate nella presente norma internazionale.

Il numero di iodio viene espresso in grammi di iodio per 100 g di campione.

3. PRINCIPIO

Scioglimento della sostanza da analizzare nel solvente ed aggiunta di reagente di Wijs. Trascorso un certo lasso di tempo, aggiunta di soluzione di ioduro di potassio e di acqua e titolazione dello iodio liberato con soluzione di tiosolfato di sodio.

4. REAGENTI

Tutti i reagenti devono essere di grado analitico riconosciuto.

- 4.1. Ioduro di potassio, soluzione di 100 g/l, non contenente iodato o iodio libero.

- 4.2. Amido, soluzione.

Versare 5 g di amido solubile in 30 ml d'acqua, aggiungere questa miscela a 1 000 ml di acqua bollente, fare bollire per 3 minuti e lasciar raffreddare.

- 4.3. Tiosolfato di sodio, soluzione volumetrica standard c ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) = 0,1 mol/l, standardizzato non oltre 7 giorni prima dell'uso.

- 4.4. Solvente, preparato miscelando volumi eguali di cicloesano e di acido acetico.

- 4.5. Reagente di Wijs, contenente monocloruro di iodio in acido acetico. È opportuno usare il reagente di Wijs disponibile in commercio.

Nota: Il reagente contiene 9 g di ICl_3 + 9 g di I in acido acetico.

5. APPARECCHIATURA

La consueta apparecchiatura di laboratorio e in particolare quanto segue.

- 5.1. Ditali da pesata, in vetro, idonei per la sostanza da analizzare e per l'inserimento nelle beute (5.2).

- 5.2. Beute, aventi una capacità di 500 ml, provviste di tappi in vetro smerigliato e completamente asciutte.

6. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DI SOSTANZA DA ANALIZZARE

Il campione omogeneizzato è seccato su solfato sodico e filtrato.

7. PROCEDIMENTO

- 7.1. Sostanza da analizzare

Il peso della sostanza da analizzare varia a seconda del numero di iodio che si prevede, come indicato nella tabella 1.

Tabella 1

Numero di iodio previsto	massa della sostanza da analizzare g
inferiore a 5	3,00
da 5 a 20	1,00

▼B

Numero di iodio previsto	massa della sostanza da analizzare g
da 21 a 50	0,40
da 51 a 100	0,20
da 101 a 150	0,13
da 151 a 200	0,10

Pesare la sostanza da analizzare con l'approssimazione di 0,1 mg in un ditale da pesata in vetro (5.1).

7.2. Determinazione

Versare la sostanza da analizzare in una beuta da 500 ml (5.2). Aggiungere 20 ml del solvente (4.4) in modo da sciogliere la sostanza. Aggiungere esattamente 25 ml del reagente di Wijs (4.5), inserire il tappo, agitare il contenuto e riporre la beuta al buio. Per il reagente di Wijs non usare una pipetta a bocca.

Analogamente preparare un bianco col solvente ed il reagente, ma tralasciando la sostanza da analizzare.

Per le sostanze aventi un numero di iodio inferiore a 150, mantenere le beute al buio per un'ora; per quelle aventi un numero di iodio superiore a 150 nonché per i prodotti polimerizzati oppure per i prodotti notevolmente ossidati, lasciar riposare per due ore.

Trascorso il periodo necessario, aggiungere 20 ml della soluzione di ioduro di potassio (4.1) e 150 ml di acqua a ciascuna delle beute.

Titolare con la soluzione volumetrica standard di tiosolfato di sodio (4.3) finché la colorazione gialla dovuta allo iodio non sia quasi scomparsa. Aggiungere alcune gocce della soluzione di amido (4.2) e continuare la titolazione finché la colorazione blu sia appena scomparsa a seguito di agitazione molto vigorosa.

Nota — È consentita la determinazione potenziometrica del punto finale.

7.3. Numero di determinazioni

Effettuare due determinazioni sullo stesso campione.

8. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il numero di iodio viene dato dalla seguente espressione:

$$\frac{12,69 \, c \, (V_1 - V_2)}{m}$$

Dove:

c = è il numerico della concentrazione esatta, in moli per litro, della soluzione di Tiosolfato di sodio Titolata (5.4) utilizzata;

V_1 = è il valore numerico del volume, in ml, della soluzione di Tiosolfato di sodio Titolata (5.4) utilizzata;

V_2 = è il valore numerico del volume, in ml, delle soluzioni di Tiosolfato di sodio (5.4) utilizzato per la determinazione;

m = è il valore numerico del peso, in g, della sostanza da analizzare (7.1).

Prendere come risultato la media aritmetica di due determinazioni.

▼ **M11***ALLEGATO XVII***METODO DI DETERMINAZIONE DEGLI STIGMASTADIENI NEGLI OLI VEGETALI****1. SCOPO**

Determinazione degli stigmastadieni negli oli vegetali contenenti basse concentrazioni di questi idrocarburi, soprattutto oli d'oliva vergini e oli di sansa d'oliva grezzi.

2. OGGETTO

Il metodo può essere applicato a tutti gli oli vegetali, ma è attendibile soltanto se il tenore di questi idrocarburi è compreso tra 0,01 e 4,0 mg/kg. Esso è particolarmente adatto a rivelare la presenza di oli vegetali raffinati (oliva, sansa, girasole, palma, ecc.) nell'olio di oliva vergine, dato che gli oli raffinati contengono stigmastadieni, mentre gli oli vergini non li contengono.

3. PRINCIPIO

Isolamento dell'insaponificabile. Separazione della frazione costituita dagli steroidi a carattere di idrocarburi mediante cromatografia su colonna di gel di silice e analisi mediante gascromatografia su capillare.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Palloni idonei da 250 ml, con condensatore a riflusso.

4.2. Imbuti separatori da 500 ml.

4.3. Palloni a fondo rotondo da 100 ml.

4.4. Evaporatore rotante.

4.5. Colonna per cromatografia in vetro (1,5-2,0 cm di diametro interno, della lunghezza di 50 cm) provvista di rubinetto in teflon e di tappo in fibra di lana di vetro o disco di vetro sinterizzato all'estremità inferiore. Per preparare la colonna di gel di silice versare l'esano nella colonna cromatografica fino a raggiungere uno spessore di circa 5 cm e riempire quindi con un impasto di gel di silice in esano (15 g in 40 ml) aiutandosi con porzioni di esano. Lasciar depositare completando poi il deposito con leggere vibrazioni. Aggiungere solfato di sodio anidro fino all'ottenimento di uno spessore di circa 0,5 cm ed infine eluire l'esano in eccesso.

4.6. Gascromatografo provvisto di rilevatore a ionizzazione di fiamma, iniettore a separazione o a freddo, lungo la colonna e stufa programmabile con l'approssimazione di ± 1 °C.

4.7. Colonna capillare di silice fusa per gascromatografia (0,25 o 0,30 mm di diametro interno, della lunghezza di 25 m) ricoperte di fase di fenilmetilsilicone al 5 %, spessore 0,25 mm.

Nota 1.

Possono essere usate altre colonne di polarità equivalente o inferiore.

4.8. Registratore-integratore con possibilità d'integrazione da valle a valle.

4.9. Microsiringa per gascromatografia da 5-10 ml con ago cementato.

4.10. Camicia di riscaldamento o piastra termica, elettrica.

5. REAGENTI

Tutti i reagenti debbono essere puri per analisi se non specificato diversamente. L'acqua usata dev'essere distillata oppure di purezza per lo meno equivalente.

5.1. Esano o miscela di alcani con intervallo di ebollizione a 65-70 °C, distillato su colonna di rettificazione.

Nota 2.

Il solvente dev'essere distillato in modo da eliminare le impurezze.

5.2. Etanolo al 96 % v/v.

5.3. Solfato di sodio anidro.

▼ **M11**

- 5.4. Soluzione alcolica di idrossido di potassio al 10 %. Aggiungere 10 ml d'acqua a 50 g di idrossido di potassio, agitare e sciogliere quindi la miscela in etanolo fino a 500 ml.

Nota 3.

La potassa alcolica vira al bruno se lasciata riposare. Dev'essere preparata di fresco ogni giorno e tenuta in bottiglie di vetro scure ben tappate.

- 5.5. Gel di silice 60 per cromatografia su colonna 70-230 mesh (Merck, ref. 7734 o simili).

Nota 4.

Di regola il gel di silice può essere usato prelevandolo direttamente dal contenitore senza alcun trattamento preliminare. Tuttavia alcune partite di silice sono scarsamente attive e determinano separazioni cromatografiche di cattiva qualità. In casi del genere, il gel di silice dev'essere disattivato scaldandolo per almeno quattro ore a 550 °C; successivamente, sistemarlo in un essiccatore fino a raffreddamento e trasferirlo quindi in un pallone provvisto di tappo. Aggiungere il 2 % di acqua e agitare fino a scomparsa dei grumi e libero flusso della polvere. Il gel di silice dev'essere trattato come sopra se le partite di gel di silice danno cromatogrammi con picchi di interferenza. Come alternativa, può essere usato gel di silice 60 extra puro (Merck, ref. 7754).

- 5.6. Soluzione madre (200 ppm) di colest-3,5-diene (Sigma, purezza 99 %) in esano (10 mg in 50 ml).

- 5.7. Soluzione standard di colest-3,5-diene in esano alla concentrazione di 20 ppm, ottenuta diluendo la soluzione di cui sopra.

Nota 5.

Le soluzioni 5.6 e 5.7 non si deteriorano per almeno 4 mesi se conservate a una temperatura inferiore ai 4 °C.

- 5.8. Soluzione di n-nonacosano in esano ad una concentrazione di circa 100 ppm.

- 5.9. Gas vettore per cromatografia: idrogeno o elio puro al 99,9990 %.

- 5.10. Gas ausiliari per il rivelatore a ionizzazione di fiamma: idrogeno puro al 99,9990 % ed aria purificata.

6. **PROCEDIMENTO**6.1. **Preparazione dell'insaponificabile:**

- 6.1.1. Pesare 20 g, con l'approssimazione di $\pm 0,1$ di olio in un pallone da 250 ml (4.1), aggiungere 1 ml della soluzione standard di colest-3,5-diene (20mg) e 75 ml di potassa alcolica al 10 %, preparare il condensatore a riflusso e portare a leggera ebollizione per 30 minuti. Allontanare il pallone contenente il campione dalla fonte di calore e lasciare raffreddare leggermente la soluzione (non far raffreddare completamente, altrimenti il campione si depositerebbe). Aggiungere 100 ml d'acqua e trasferire la soluzione in un imbuto a decantazione (4.2) con l'ausilio di 100 ml di esano. Agitare la miscela vigorosamente per 30 secondi e lasciar stratificare.

Nota 6.

Se si forma un'emulsione che non scompare rapidamente, aggiungere piccoli quantitativi di etanolo.

- 6.1.2. Trasferire la fase acquosa inferiore in un secondo imbuto separatore ed estrarre nuovamente con 100 ml di esano. Eliminare ancora la fase inferiore e lavare gli estratti di esano (raccolti in un altro imbuto separatore) tre volte con tre porzioni, di 100 ml ciascuna, di una miscela etanolo-acqua (1: 1) fino a raggiungimento di pH neutro.

- 6.1.3. Far passare la soluzione di esano attraverso del solfato di sodio anidro (50 g), lavare con 20 ml di esano a far evaporare in evaporatore rotante a 30 °C e bassa pressione fino a secchezza.

6.2. **Separazione della frazione di idrocarburo steroideo:**

- 6.2.1. Trasferire il residuo nella colonna di frazionamento con l'ausilio di due porzioni di esano da 1 ml, far passare il campione attraverso la colonna lasciando che la soluzione scenda fino alla somità del solfato di sodio e

▼ **M11**

avviare l'eluizione cromatografica con esano ad una velocità di efflusso di 1 ml/min. circa. Eliminare i primi 25-30 ml dell'eluizione e raccogliere quindi la rimanente frazione di 40 ml. Dopo averla raccolta, trasferirla in un pallone a fondo rotondo da 100 ml (4.3).

Nota 7.

La prima frazione contiene idrocarburi saturi (figura 1a), la seconda quelli steroidici. Continuando l'eluizione si ottiene squalene e composti connessi. Ai fini di una buona separazione tra idrocarburi saturi e steroidici, è necessario ottimizzare le frazioni di volume. A questo scopo il volume della prima frazione dev'essere regolato in modo che, quando viene analizzata la seconda frazione, i picchi che rappresentano gli idrocarburi saturi siano bassi (vedasi figura 1c); se essi non compaiono, ma l'intensità del picco standard è bassa, il volume dev'essere ridotto. In ogni caso non è necessaria una separazione completa dei componenti della prima e seconda frazione, dato che durante l'analisi gascromatografica non vi è sovrapposizione di picchi, se detta analisi viene eseguita nelle condizioni precisate al paragrafo 6.3.1. In generale non è necessaria l'ottimizzazione della seconda frazione in volume, data la buona separazione degli altri componenti. Tuttavia la presenza di un grosso picco per un tempo di ritenzione inferiore di circa 1,5 minuti rispetto allo standard è dovuta allo squalene e sta ad indicare una cattiva separazione.

- 6.2.2. Evaporare la seconda frazione in un evaporatore a 30 °C e bassa pressione fino a secchezza e sciogliere immediatamente il residuo in 0,2 ml di esano. Conservare la soluzione in frigorifero fino all'analisi.

Nota 8.

I residui 6.1.3 e 6.2.2 non devono essere lasciati asciugare, né tenuti a temperatura ambiente. Non appena essi vengono ottenuti, è necessario aggiungere il solvente e conservare le soluzioni in frigorifero.

6.3. Gascromatografia:**6.3.1. Condizioni operative per l'iniezione a separazione:**

- Temperatura dell'iniettore: 300 °C.
- Temperatura del rivelatore: 320 °C.
- Registratore-integratore: i parametri di integrazione devono essere fissati in modo che forniscano una corretta valutazione delle aree. Si raccomanda un'integrazione da valle a valle.
- Sensibilità: circa 16 volte l'attenuazione minima.
- Quantitativo di soluzione iniettato: 1ml.
- Temperature di programmazione della stufa: inizialmente 235 °C per 6 min. e successivamente aumento di 2 °C/min. fino a 285 °C.
- Iniettore provvisto di separatore di flusso a 1: 15.
- Vettore: elio o idrogeno a una pressione di circa 120 kPa.

Queste condizioni possono essere adeguate alle caratteristiche del cromatografo e della colonna in modo da ottenere cromatogrammi che rispettino i seguenti requisiti: picco dello standard interno entro 5 min. circa dei tempi definiti al paragrafo 6.3.2; detto picco dev'essere pari ad almeno l'80 % della scala completa.

Il sistema gascromatografico deve essere verificato iniettando una miscela della soluzione madre di colestadiene (5.6) con la soluzione di n-nonacosano (5.8). Il picco del colestadiene deve comparire prima di quello dell'n-nonacosano (figura 1c); se ciò non succede, si hanno due possibilità: abbassare la temperatura della stufa e/o usare una colonna meno polare.

6.3.2. Identificazione del picco

Il picco dello standard interno compare dopo circa 19 min. e lo stigmasta-3,5-diene, a un tempo di ritenzione relativo di circa 1,29 (cfr. figura 1b). Lo stigma-3,5-diene è associato a piccoli quantitativi di un isomero e di solito entrambi danno origine a un unico picco cromatografico. Tuttavia, se la colonna è troppo polare oppure mostra un forte potere risolvente, l'isomero può comparire sotto forma di piccolo picco prima e accanto a quello dello stigmasta-3,5-diene (Figura 2). Per essere certi che gli stigmastadieni vengano eluiti in un picco unico, è consigliabile sostituire la

▼M11

colonna con una meno polare oppure con una di diametro interno superiore.

Nota 9.

Gli stigmastadieni di riferimento possono essere ottenuti dall'analisi di un olio vegetale raffinato usando un quantitativo inferiore di campione (1-2 g). Gli stigmastadieni danno un picco significativo e facilmente identificabile.

6.3.3. Analisi quantitativa

Il tenore di stigmastadieni viene determinato con la formula seguente:

$$\text{mg/kg di stigmastadieni} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

dove: A_s = area del picco dello stigmastadiene (se il picco è ripartito in due isomeri, somma delle aree dei 2 picchi).

A_c = area dello standard interno (colestadiene)

M_c = massa di standard aggiunto, in microgrammi

M_o = massa di olio prelevata, in grammi

Limite di rivelazione: circa 0,01 mg/kg.

▼ M11

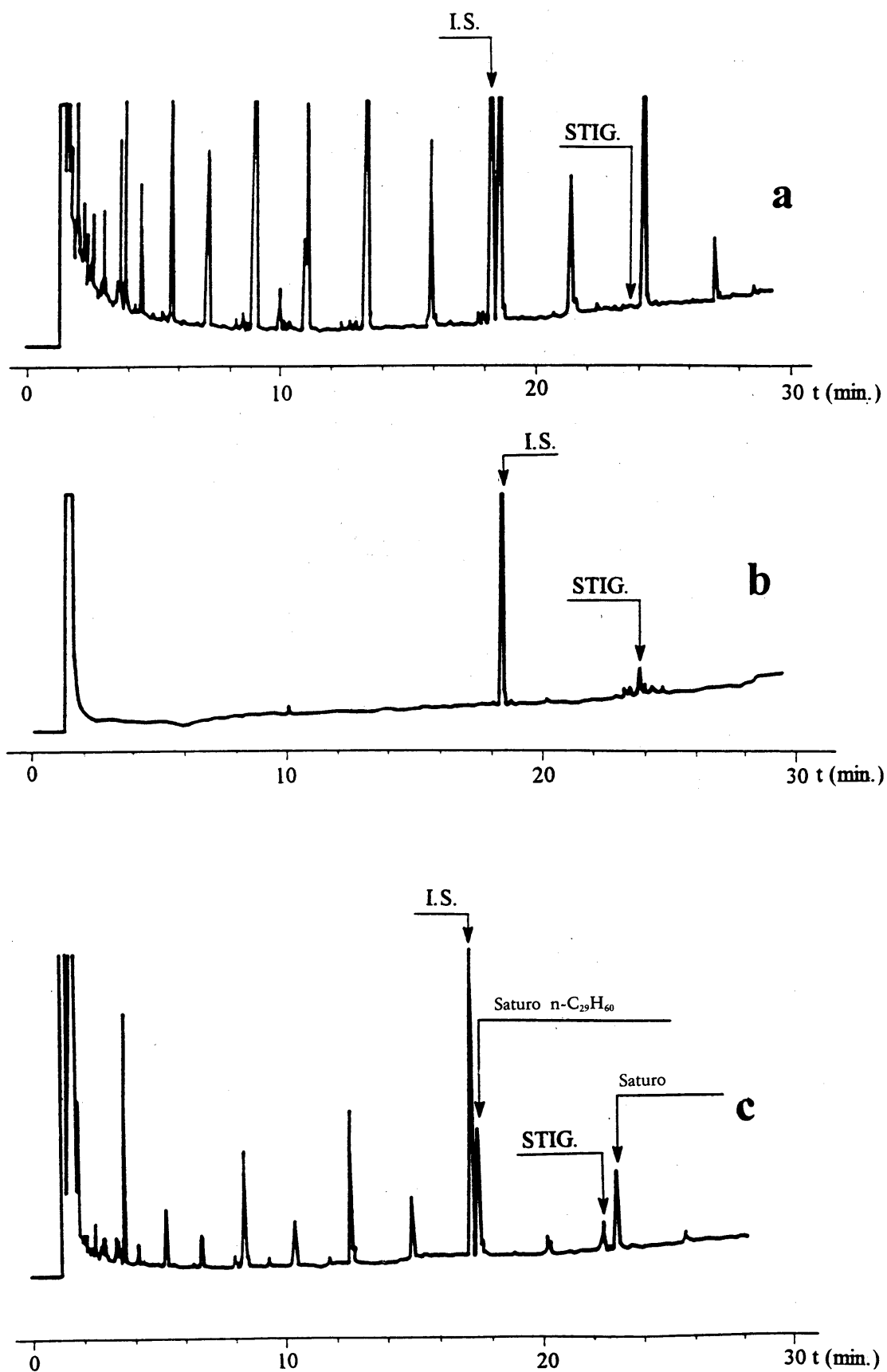
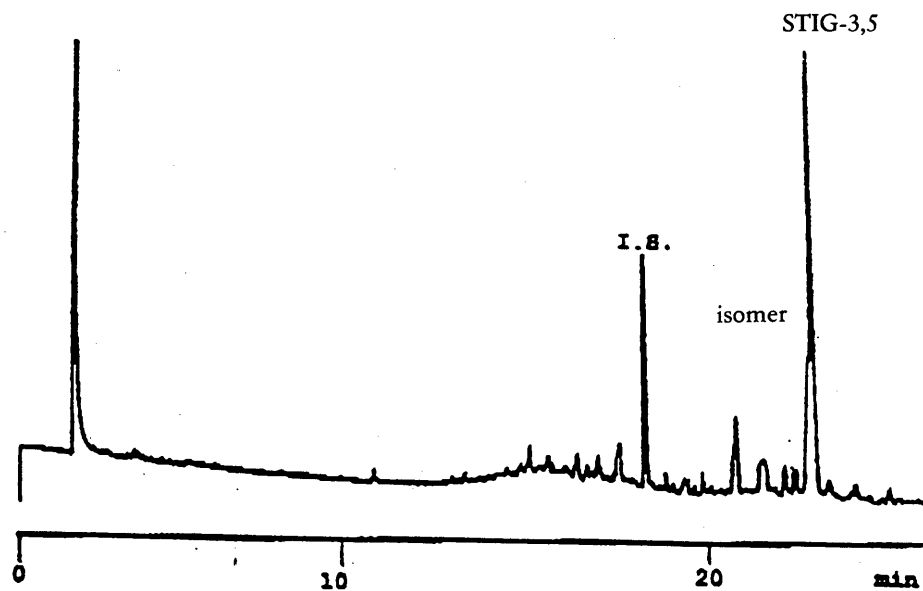


Figura 1

Gascromatogrammi ottenuti da campioni di olio d'oliva analizzati su colonna capillare di silice fusa (0,25 mm di diametro interno, della lunghezza di 25 m) ricoperti di fenilmetilsilicone al 5 %, con uno spessore 0,25 mm.

▼ M11

- a) Prima frazione (30 ml) di olio vergine, addizionata intenzionalmente con lo standard.
- b) Seconda frazione (40 ml) di olio d'oliva contenente 0,10 mg/kg di stigmastadieni.
- c) Seconda frazione (40 ml) contenente una piccola proporzione della prima frazione.

**Figura 2**

Gaschromatogramma ottenuto da un campione di olio di oliva raffinato analizzato su colonna DB-5 che mostra l'isomero dello stigmasta-3,5-diene.

▼M13*ALLEGATO XVIII***DETERMINAZIONE DEI TRIACILGLICEROLI CON ECN 42
(DIFFERENZE FRA I DATI HPLC E IL CONTENUTO TEORICO)****1. Campo di applicazione**

Determinazione della composizione dei triacilgliceroli (TAG) contenuti negli oli d'oliva, in funzione del loro numero di carbonio equivalente, per differenza fra i risultati analitici ottenuti per cromatografia in fase liquida ad alta prestazione (HPLC) e il contenuto teorico, calcolato a partire dalla composizione in acidi grassi.

2. Campo di applicazione

La norma è applicabile agli oli d'oliva. Il metodo è applicabile alla rivelazione della presenza di piccole quantità di oli di semi (ricchi in acido linoleico) in qualunque categoria di oli d'oliva.

3. Principio

Per gli oli puri, il contenuto in triacilgliceroli con ECN 42, determinato per HPLC, corrisponde in una certa misura al contenuto teorico in triacilgliceroli con ECN 42, calcolato in base alla determinazione per GLC della composizione in acidi grassi. Una differenza superiore ai valori stabiliti nel regolamento per ciascun olio indica che l'olio contiene oli di semi.

4. Metodo

Il metodo fondato sul calcolo del contenuto teorico di triacilgliceroli con ECN 42 e sulla differenza fra i dati HPLC e quelli teorici si basa essenzialmente sulla coordinazione dei dati analitici ottenuti mediante altri metodi. È possibile distinguere tre stadi: determinazione della composizione in acidi grassi per gascromatografia capillare, calcolo della composizione teorica dei triacilgliceroli con ECN 42, determinazione HPLC dei triacilgliceroli con ECN 42.

4.1. Apparecchiatura

- 4.1.1. Palloni a fondo arrotondato da 250 a 500 ml.
- 4.1.2. Beakers da 100 ml.
- 4.1.3. Colonna cromatografica in vetro (diametro interno: 21 mm, lunghezza 450 mm), provvista di cono normalizzato (femmina) alla sommità e di rubinetto.
- 4.1.4. Imbuti separatori da 250 ml con cono normalizzato (maschio) al fondo, adatto al collegamento con la sommità della colonna.
- 4.1.5. Bacchetta di vetro, lunghezza 600 mm.
- 4.1.6. Imbuti di vetro, diametro 80 mm.
- 4.1.7. Matracci volumetrici, 50 ml.
- 4.1.8. Matracci volumetrici, 20 ml.
- 4.1.9. Evaporatore rotativo.
- 4.1.10. Cromatografo in fase liquida ad alta prestazione, che permetta il controllo termostatico della temperatura della colonna.
- 4.1.11. Iniettore capace di erogare dosi da 10 µl.
- 4.1.12. Rivelatore: rifrattometro differenziale. La sensibilità a fondo scala dev'essere pari almeno a 10^{-4} unità dell'indice di rifrazione.
- 4.1.13. Colonna: tubo in acciaio inossidabile della lunghezza di 250 mm e del diametro interno di 4,5 mm, riempito con particelle del diametro di 5 µm di silice contenente il 22-23 % di carbonio sotto forma di ottadecilsilano (nota 2).
- 4.1.14. Registratore e/o integratore.

4.2. Reattivi

I reattivi debbono essere di purezza analitica.

▼M13

I solventi di eluizione debbono essere degassati e possono essere riciclati più volte senza effetti sulle separazioni.

- 4.2.1. Etere di petrolio 40-60 °C, qualità per cromatografia.
- 4.2.2. Etere etilico, esente da perossidi, distillato di fresco.
- 4.2.3. Solvente per eluizione cromatografica: miscela etere di petrolio/etere etilico 87/13 (v/v).
- 4.2.4. Gel di silice, 70-230, tipo Merck 7734, con un contenuto d'acqua standardizzato al 5 % (m/m).
- 4.2.5. Lana de vetro.
- 4.2.6. Acetone.
- 4.2.7. Acetonitrile.
- 4.2.8. Solvente per eluizione HPLC: acetonitrile + acetone (proporzioni da regolare in modo da ottenere la separazione desiderata: cominciare con una miscela 50:50).
- 4.2.9. Solvente di solubilizzazione: acetone.
- 4.2.10. Trigliceridi di riferimento: si possono usare i trigliceridi del commercio (tripalmitina, trioleina, ecc.), riportando su un grafico i rispettivi tempi di ritenzione in funzione del numero di carbonio equivalente, oppure utilizzare cromatogrammi di riferimento ottenuti impiegando olio di soia, miscele 30:70 olio di soia-olio di oliva e olio di oliva puro (vedi note 3 e 4 e figure 1, 2, 3, 4).

4.3. Preparazione del campione

Poiché un certo numero di sostanze capaci di interferire può dar luogo a risultati falsamente positivi, il campione dev'essere sempre purificato secondo il metodo IUPAC 2.507 (determinazione delle sostanze polari negli oli ossidati).

4.3.1. Preparazione della colonna cromatografica

Riempire la colonna (4.1.3) con 30 ml circa di solvente di eluizione (4.2.3), introducendo poi nella colonna un poco di lana di vetro (4.2.5), spingendola al fondo della colonna mediante la bacchetta di vetro (4.1.5).

In un Beakers da 100 ml, sospendere 25 g di gel di silice (4.2.4) in 80 ml di miscela di eluizione (4.2.3), trasferendola quindi nella colonna mediante un imbuto di vetro (4.1.6).

Per assicurare il completo trasferimento del gel di silice nella colonna, lavare il Beakers con la miscela di eluizione e trasferire nella colonna anche le porzioni di lavaggio.

Aprire il rubinetto e lasciar eluire il solvente dalla colonna fin quando il suo livello superi di circa 1 cm quello del gel di silice.

4.3.2. Cromatografia su colonna

In un matraccio tarato da 50 ml (4.1.7), pesare, con la precisione di 0,001 g, $2,5 \pm 0,1$ g di olio previamente filtrato, omogeneizzato e se necessario disidratato.

Disciogliere in 20 ml circa di solvente di eluizione (4.2.3), se necessario riscaldando leggermente per facilitare la dissoluzione. Raffreddare a temperatura ambiente e portare a volume col solvente di eluizione.

Con una pipetta volumetrica, introdurre 20 ml di soluzione all'interno della colonna preparata come al punto 4.3.1, aprire il rubinetto e lasciar defluire il solvente fino al livello dello strato di gel di silice.

Eluire con 150 ml di solvente di eluizione (4.2.3), regolando la velocità di passaggio del solvente a 2 ml/min. circa (per passare attraverso la colonna, 150 ml impiegheranno 60-70 minuti circa).

Recuperare l'eluato in un matraccio a fondo arrotondato da 250 ml (4.1.1), precedentemente tarato in stufa e pesato con esattezza. Eliminare il solvente sotto depressione (Rotavapor) e pesare il residuo che verrà impiegato per preparare la soluzione per l'analisi HPLC e per la preparazione dell'estere metilico.

▼ M13

Il recupero del campione dalla colonna non dovrà essere inferiore al 90 % per le categorie olio extravergine, olio vergine, olio corrente, olio raffinato e olio d'oliva, ed all'80 % per l'olio lampante e per l'olio di sansa.

4.4. Analisi HPLC**4.4.1. Preparazione dei campioni per l'analisi cromatografica**

Preparare una soluzione del 5 % del campione da analizzare pesando $0,5 \pm 0,001$ g del campione in un matraccio tarato da 10 ml e portare a volume con il solvente di solubilizzazione (4.2.9).

4.4.2. Procedimento

Montare il sistema cromatografico. Far passare il solvente di eluizione (4.2.8) alla portata di 1,5 ml/min, in modo da spurgare l'intero sistema. Attendere finché la linea di base sia stabile. Iniettare 10 µl del campione preparato come indicato in 4.3.

4.4.3. Calcolo ed espressione dei risultati

Impiegare il metodo di normalizzazione, vale a dire ammettere che la somma delle aree dei picchi corrispondenti ai TAG da ECN 42 ad ECN 52 sia uguale al 100 %. Calcolare la percentuale relativa di ciascun trigliceride impiegando la formula:

% di trigliceride = area del picco $\times$ 100/somma delle aree dei picchi.

I risultati debbono essere espressi con almeno due cifre decimali.

Nota 1: L'ordine di eluizione può essere determinato calcolando i numeri di carbonio equivalente, definiti spesso dalla relazione $ECN = CN - 2n$, dove CN è il numero di carbonio ed n è il numero di doppi legami, esso può essere calcolato precisamente tenendo conto dell'origine del doppio legame. Se n_o , n_i e n_{ln} sono i numeri di doppi legami attribuiti rispettivamente agli acidi oleico, linoleico e linolenico, il numero di carbonio equivalente può essere calcolato mediante la relazione data dalla formula:

$$ECN = CN - d_o n_o - d_i n_i - d_{ln} n_{ln}$$

dove i coefficienti d_o , d_i e d_{ln} possono essere calcolati mediante i trigliceridi di riferimento. Nelle condizioni specificate nel presente metodo, la relazione ottenuta sarà vicina a:

$$ECN = CN - (2,60 n_o) - (2,35 n_i) - (2,17 n_{ln})$$

Nota 2: Esempi: Lichrosorb (Merck) RP18 Art 50333
Lichrosphere o equivalente (Merck) 100
CH18 Art 50377

Nota 3: con diversi trigliceridi di riferimento è anche possibile calcolare la risoluzione rispetto alla trioleina:

$$\alpha = RT' / RT \text{ trioleina}$$

impiegando il tempo corretto di ritenzione $RT' = RT - RT \text{ solvente}$.

Il grafico di $\log \alpha$ in funzione di f (numero di doppi legami) permette di determinare i valori di ritenzione per tutti i trigliceridi degli acidi grassi contenuti nei trigliceridi di riferimento (cfr. figura 2).

▼ **M13**

Nota 4: l'efficienza della colonna dovrebbe permettere una chiara separazione del picco della trilinoleina da quelle dei trigliceridi con un RT immediatamente prossimo. L'eluizione viene effettuata fino al picco corrispondente ad ECN 52.

Nota 5: una misura corretta delle aree di tutti i picchi aventi interesse per la presente determinazione è assicurata quando l'altezza del secondo picco della serie ECN 50 è pari al 50 % del fondo scala di registrazione.

4.5. **Calcolo della composizione in triacilgliceroli (moli %) dai dati GLC relativi agli acidi grassi**

4.5.1. **Determinazione della composizione in acidi grassi**

La composizione in acidi grassi viene determinata secondo il metodo gascromatografico CEE riportato nell'allegato X A del regolamento (CEE) n. 2568/91, mediante una colonna capillare. La preparazione degli esteri metilici viene eseguita conformemente all'allegato X B (soluzione alcolica di sodio metilato).

4.5.2. **Acidi grassi per il calcolo**

I gliceridi sono raggruppati secondo i loro numeri di carbonio equivalente (ECN), tenendo conto delle equivalenze fra ECN ed acidi grassi riportate qui di seguito. Sono stati presi in considerazione soltanto gli acidi grassi con 16 e 18 atomi di carbonio, poiché sono i soli che abbiano importanza per l'olio d'oliva.

Acidi grassi (FA)	Abbreviazione	Peso molecolare (PM)	ECN
Acido palmitico	P	256,4	16
Acido palmitoleico	Po	254,4	14
Acido stearico	S	284,5	18
Acido oleico	O	282,5	16
Acido linoleico	L	280,4	14
Acido linolenico	Ln	278,4	12

4.5.3. **Trasformazione dell'area % in moli per tutti gli acidi grassi**

$$\left. \begin{aligned} \text{moli P} &= \frac{\text{area \% P}}{\text{PM P}} & \text{moli S} &= \frac{\text{area \% S}}{\text{PM S}} & \text{moli Po} &= \frac{\text{area \% Po}}{\text{PM Po}} \\ \text{moli O} &= \frac{\text{area \% O}}{\text{PM O}} & \text{moli L} &= \frac{\text{area \% L}}{\text{PM L}} & \text{moli Ln} &= \frac{\text{area \% Ln}}{\text{PM Ln}} \end{aligned} \right\} (1)$$

4.5.4. **Riconduzione degli acidi grassi al 100 %**

$$\left. \begin{aligned} \text{moli \% P (1,2,3)} &= \frac{\text{moli P} * 100}{\text{moli (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moli \% S (1,2,3)} &= \frac{\text{moli S} * 100}{\text{moli (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moli \% Po (1,2,3)} &= \frac{\text{moli Po} * 100}{\text{moli (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moli \% O (1,2,3)} &= \frac{\text{moli O} * 100}{\text{moli (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moli \% L (1,2,3)} &= \frac{\text{moli L} * 100}{\text{moli (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moli \% Ln (1,2,3)} &= \frac{\text{moli Ln} * 100}{\text{moli (P + S + Po + O + L + Ln)}} \end{aligned} \right\} (2)$$

▼M13

Il risultato esprime la percentuale di ciascun acido grasso in moli % sulla posizione complessiva (1, 2, 3) dei TAG.

Si calcola quindi la somma degli acidi grassi saturi P e S (SFA) e degli acidi grassi insaturi Po, O, L e Ln (UFA):

$$\left. \begin{aligned} \text{moli \% SFA} &= \text{moli \% P} + \text{moli \% S} \\ \text{moli \% UFA} &= 100 - \% \text{ moli SFA} \end{aligned} \right\} (3)$$

4.5.5. Calcolo della composizione in acidi grassi nelle posizioni 2- e 1,3- dei TAG

Gli acidi grassi sono distribuiti in tre gruppi, nel modo seguente: due identici per le posizioni 1- e 3-, ed uno per la posizione 2-, con coefficienti diversi per gli acidi saturi (P e S) e gli acidi insaturi (Po, O, L e Ln).

4.5.5.1. Acidi grassi saturi in posizione 2 [P(2) e S(2)]

$$\left. \begin{aligned} \text{moli \% P(2)} &= \text{moli \% P (1,2,3)} * 0,06 \\ \text{moli \% S(2)} &= \text{moli \% S (1,2,3)} * 0,06 \end{aligned} \right\} (4)$$

4.5.5.2. Acidi grassi insaturi in posizione 2 [Po(2), O(2), L(2) e Ln(2)]:

$$\left. \begin{aligned} \text{moli \% Po(2)} &= \frac{\text{moli \% Po(1, 2, 3)}}{\text{moli \% UFA}} * [100 - \text{moli \% P(2)} - \text{moli \% S(2)}] \\ \text{moli \% O(2)} &= \frac{\text{moli \% O(1, 2, 3)}}{\text{moli \% UFA}} * [100 - \text{moli \% P(2)} - \text{moli \% S(2)}] \\ \text{moli \% L(2)} &= \frac{\text{moli \% L(1, 2, 3)}}{\text{moli \% UFA}} * [100 - \text{moli \% P(2)} - \text{moli \% S(2)}] \\ \text{moli \% Ln(2)} &= \frac{\text{moli \% Ln(1, 2, 3)}}{\text{moli \% UFA}} * [100 - \text{moli \% P(2)} - \text{moli \% S(2)}] \end{aligned} \right\} (5)$$

4.5.5.3. Acidi grassi in posizione 1,3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3) O(1,3), L(1,3) e Ln(1,3)]:

$$\left. \begin{aligned} \text{moli \% P(1, 3)} &= \frac{\text{moli \% P(1, 2, 3)} - \text{moli \% P(2)}}{2} + \text{moli \% P(1, 2, 3)} \\ \text{moli \% S(1, 3)} &= \frac{\text{moli \% S(1, 2, 3)} - \text{moli \% S(2)}}{2} + \text{moli \% S(1, 2, 3)} \\ \text{moli \% Po(1, 3)} &= \frac{\text{moli \% Po(1, 2, 3)} - \text{moli \% Po(2)}}{2} + \text{moli \% Po(1, 2, 3)} \\ \text{moli \% O(1, 3)} &= \frac{\text{moli \% O(1, 2, 3)} - \text{moli \% O(2)}}{2} + \text{moli \% O(1, 2, 3)} \\ \text{moli \% L(1, 3)} &= \frac{\text{moli \% L(1, 2, 3)} - \text{moli \% L(2)}}{2} + \text{moli \% L(1, 2, 3)} \\ \text{moli \% Ln(1, 3)} &= \frac{\text{moli \% Ln(1, 2, 3)} - \text{moli \% Ln(2)}}{2} + \text{moli \% Ln(1, 2, 3)} \end{aligned} \right\} (6)$$

4.5.6. Calcolo dei triacilgliceroli

4.5.6.1. TAG con un solo acido grasso (AAA, in questo caso LLL, PoPoPo)

$$\text{moli \% AAA} = \frac{\text{moli \% A(1,3)} * \text{moli \% A(2)} * \text{moli \% A(1,3)}}{10000} (7)$$

▼M13

4.5.6.2. TAG con due acidi grassi (AAB, in questo caso, PoPoL, PoLL)

$$\left. \begin{aligned} \text{moli \% AAB} &= \frac{\text{moli \% A(1,3)} * \text{moli \% A(2)} * \text{moli \% B(1,3)} * 2}{10000} \\ \text{moli \% ABA} &= \frac{\text{moli \% A(1,3)} * \text{moli \% B(2)} * \text{moli \% A(1,3)}}{10000} \end{aligned} \right\} (8)$$

4.5.6.3. TAG con tre acidi grassi diversi (ABC, in questo caso OLLn, PLLn, PoOLn, PPoLn)

$$\left. \begin{aligned} \text{moli \% ABC} &= \frac{\text{moli \% A(1,3)} * \text{moli \% B(2)} * \text{moli \% C(1,3)} * 2}{10000} \\ \text{moli \% BCA} &= \frac{\text{moli \% B(1,3)} * \text{moli \% C(2)} * \text{moli \% A(1,3)} * 2}{10000} \\ \text{moli \% CAB} &= \frac{\text{moli \% C(1,3)} * \text{moli \% A(2)} * \text{moli \% B(1,3)} * 2}{10000} \end{aligned} \right\} (9)$$

4.5.6.4. Triacilgliceroli con ECN42

I seguenti triacilgliceroli con ECN42 sono calcolati secondo le equazioni 7, 8 e 9 per ottenere l'eluizione attesa in HPLC (normalmente soltanto tre picchi).

LLL

PoLL e isomero di posizione LPoL

OLLn e isomeri di posizione OLnL e LnOL

PoPoL e isomero di posizione PoLPo

PoOLn e isomeri di posizione OPoLn e OLnPo

PLLn e isomeri di posizione LLnP e LnPL

PoPoPo

SLnLn e isomero di posizione LnSLn

PPoLn e isomeri di posizione PLnPo e PoPLn

I triacilgliceroli con ECN42 sono espressi dalla somma dei nove triacilgliceroli, compresi i loro isomeri di posizione. I risultati debbono essere espressi con almeno due cifre decimali.

5. Valutazione del risultato

Si confrontano il contenuto teorico calcolato e il contenuto determinato per HPLC. Se la differenza fra i dati HPLC e i dati teorici è superiore ai valori indicati nel regolamento, il campione contiene olio di semi.

Nota: i risultati vanno espressi con una sola cifra decimale.

6. Esempio (Il numero si riferisce alle sezioni nel testo del metodo)

4.5.1. Calcolo delle moli % di acidi grassi a partire dai dati GLC (area %)

I dati che seguono sono ottenuti per la composizione in acidi grassi per GLC:

FA PM	P 256,4	S 284,5	Po 254,4	O 282,5	L 280,4	Ln 278,4
area %	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼M13**4.5.3. Trasformazione dell'area % in moli per tutti gli acidi grassi**

$$\text{moli P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moli PP} \quad \text{Vedi formula (1)}$$

$$\text{moli S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moli S} \quad \text{Vedi formula (1)}$$

$$\text{moli Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moli Po} \quad \text{Vedi formula (1)}$$

$$\text{moli O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moli O} \quad \text{Vedi formula (1)}$$

$$\text{moli L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moli L} \quad \text{Vedi formula (1)}$$

$$\text{moli Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,003594 \text{ moli Ln} \quad \text{Vedi formula (1)}$$

$$\text{Somma} = 0,35822 \text{ moli TAC}$$

4.5.4. Normalizzazione degli acidi grassi al 100 %

$$\text{moli \% P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ moli P} * 100}{0,35822 \text{ moli}} = 10,888 \% \quad \text{Vedi formula (2)}$$

$$\text{moli \% S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ moli S} * 100}{0,35822 \text{ moli}} = 2,944 \% \quad \text{Vedi formula (2)}$$

$$\text{moli \% Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ moli Po} * 100}{0,35822 \text{ moli}} = 1,097 \% \quad \text{Vedi formula (2)}$$

$$\text{moli \% O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ moli O} * 100}{0,35822 \text{ moli}} = 74,113 \% \quad \text{Vedi formula (2)}$$

$$\text{moli \% L1,2,3} = \frac{0,03566 \text{ moli L} * 100}{0,35822 \text{ moli}} = 9,956 \% \quad \text{Vedi formula (2)}$$

$$\text{moli \% Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ moli Ln} * 100}{0,35822 \text{ moli}} = 1,003 \% \quad \text{Vedi formula (2)}$$

$$\text{Totale moli \%} = 100,0 \%$$

Somma degli acidi grassi saturi e insaturi nella posizione 1,2,3 dei TAG:

$$\text{moli \% SFA} = 10,888 \% + 2,944 \% = 13,831 \% \quad \text{Vedi formula (3)}$$

$$\text{moli \% UFA} = 100,000 \% - 13,831 \% = 86,169 \% \quad \text{Vedi formula (3)}$$

4.5.5. Calcolo della composizione in acidi grassi nelle posizioni 2 e 1,3 dei TAG**4.5.5.1. Acidi grassi saturi in posizione 2 [P(2) e S(2)]**

$$\text{moli \% P(2)} = 10,888 \% * 0,06 = 0,653 \text{ moli \%} \quad \text{Vedi formula (4)}$$

$$\text{moli \% S(2)} = 2,944 \% * 0,06 = 0,177 \text{ moli \%} \quad \text{Vedi formula (4)}$$

4.5.5.2. Acidi grassi insaturi in posizione 1, 3 [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) e Ln(1,3)]

▼ **M13**

$$\text{moli \% Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 1,263 \text{ moli \%} \quad \text{Vedi formula (5)}$$

$$\text{moli \% O(2)} = \frac{74,113 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 85,295 \text{ moli \%} \quad \text{Vedi formula (5)}$$

$$\text{moli \% L(2)} = \frac{9,956 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 11,458 \text{ moli \%} \quad \text{Vedi formula (5)}$$

$$\text{moli \% Ln(2)} = \frac{1,003 \%}{86,169 \%} * (100 - - 0,659 - 0,177) = 1,154 \text{ moli \%} \quad \text{Vedi formula (5)}$$

4.5.5.3. Acidi grassi in posizione 1,3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) e Ln(1,3)]

$$\text{moli \% P(1,3)} = \frac{10,888 - 0,659}{2} 10,888 = 16,005 \text{ moli \%} \quad \text{Vedi formula (6)}$$

$$\text{moli \% S(1,3)} = \frac{2,944 - 0,177}{2} 2,944 = 4,327 \text{ moli \%} \quad \text{Vedi formula (6)}$$

$$\text{moli \% Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,263}{2} 1,097 = 1,015 \% \text{ moli} \quad \text{Vedi formula (6)}$$

$$\text{moli \% O(1,3)} = \frac{74,113 - 85,295}{2} 74,113 = 68,522 \% \text{ moli} \quad \text{Vedi formula (6)}$$

$$\text{moli \% L(1,3)} = \frac{9,956 - 11,458}{2} 9,956 = 9,205 \text{ moli \%} \quad \text{Vedi formula (6)}$$

$$\text{moli \% Ln(1,3)} = \frac{1,003 - 1,154}{2} 1,003 = 0,927 \text{ moli \%} \quad \text{Vedi formula (6)}$$

4.5.6. Calcolo dei triacilgliceroli

Dalla composizione calcolata in acidi grassi nelle posizioni sn-2 e sn-1,3 (cfr. più sopra):

FA in	posiz. 1,3-	posiz. 2
P	16,005 %	0,653 %
S	4,327 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,263 %
O	68,522 %	85,295 %
L	9,205 %	11,458 %
Ln	0,927 %	1,154 %
Somma	100,0 %	100,0 %

si calcolano i seguenti triacilgliceroli:

LLL

PoPoPo

PoLL con 1 isomero di posizione

SLLn con 1 isomero di posizione

PoPoL con 1 isomero di posizione

PPoLn con 2 isomeri di posizione

OLLn con 2 isomeri di posizione

▼ **M13**

PLLn con 2 isomeri di posizione

PoOLn con 2 isomeri di posizione

4.5.6.1. TAG con un solo acido grasso (LLL, PoPoPo) Vedi formula (7)

$$\text{moli \% LLL} = \frac{9,205 \% * 11,458 \% * 9,205 \%}{10000} = 0,09708 \text{ moli LLL}$$

$$\text{moli \% PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 1,015 \%}{10000} = 0,00013 \text{ moli PoPoPo}$$

4.5.6.2. TAG con due acidi grassi (PoLL, SLnLn, PoPoL) Vedi formula (8)

$$\text{moli \% PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,02141$$

$$\text{moli \% LPoL} = \frac{9,205 \% * 1,263 \% * 9,205 \%}{10000} = 0,01070$$

0,03211 moli PoLL

$$\text{moli \% SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,327 \% * 1,154 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,00093$$

$$\text{moli \% LnSLn} = \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10000} = 0,00002$$

0,00095 moli SLnLn

$$\text{moli \% PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,00236$$

$$\text{moli \% PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 1,015 \%}{10000} = 0,00118$$

0,00354 moli PoPoL

4.5.6.3. TAG con tre diversi acidi grassi (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn)

Vedi formula (9)

$$\text{moli \% PPLn} = \frac{16,005 \% * 1,263 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,00375$$

$$\text{moli \% LnPPo} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10000} = 0,00012$$

$$\text{moli \% PoLnP} = \frac{1,015 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10000} = 0,00375$$

0,00762 moli PPLn

$$\text{moli \% OLLn} = \frac{68,522 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,14577$$

$$\text{moli \% LnOL} = \frac{0,927 \% * 85,295 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,14577$$

$$\text{moli \% LLnO} = \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 68,522 \% * 2}{10000} = 0,14577$$

0,43671 moli OLLn

$$\text{moli \% PLLn} = \frac{16,005 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,03400$$

$$\text{moli \% LnPL} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,205 \% * 2}{10000} = 0,00111$$

$$\text{moli \% LLnP} = \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10000} = 0,03400$$

▼M13

0,06911 moli PLLn

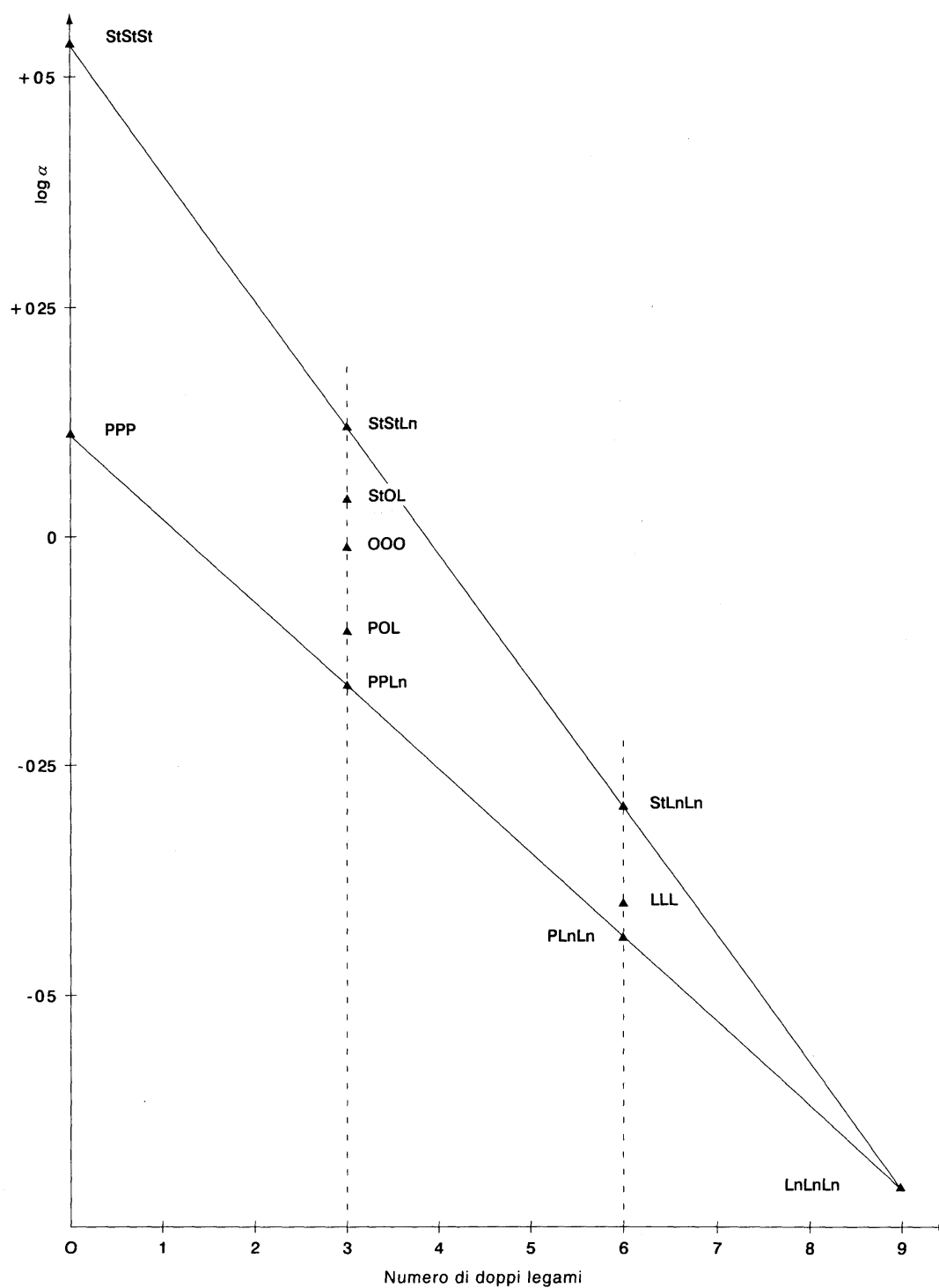
$$\text{moli \% PoOLn} = \frac{1,015 \% * 85,295 \% * 0,927 \% * 2}{10000} = 0,01605$$

$$\text{moli \% LnPoO} = \frac{0,927 \% * 1,263 \% * 68,522 \% * 2}{10000} = 0,001605$$

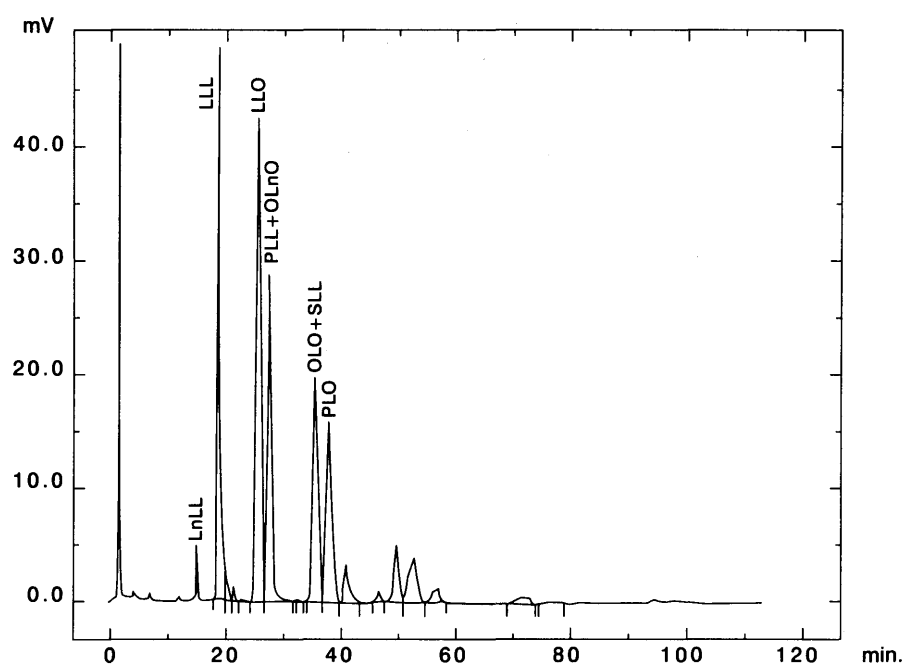
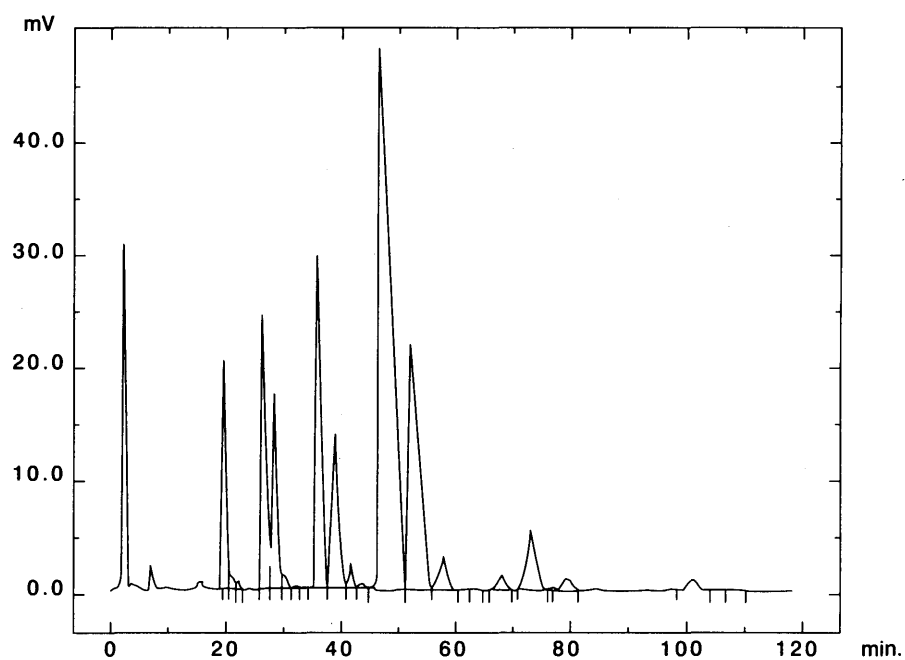
$$\text{moli \% OLnPo} = \frac{68,522 \% * 1,154 \% * 1,015 \% * 2}{10000} = 0,01605$$

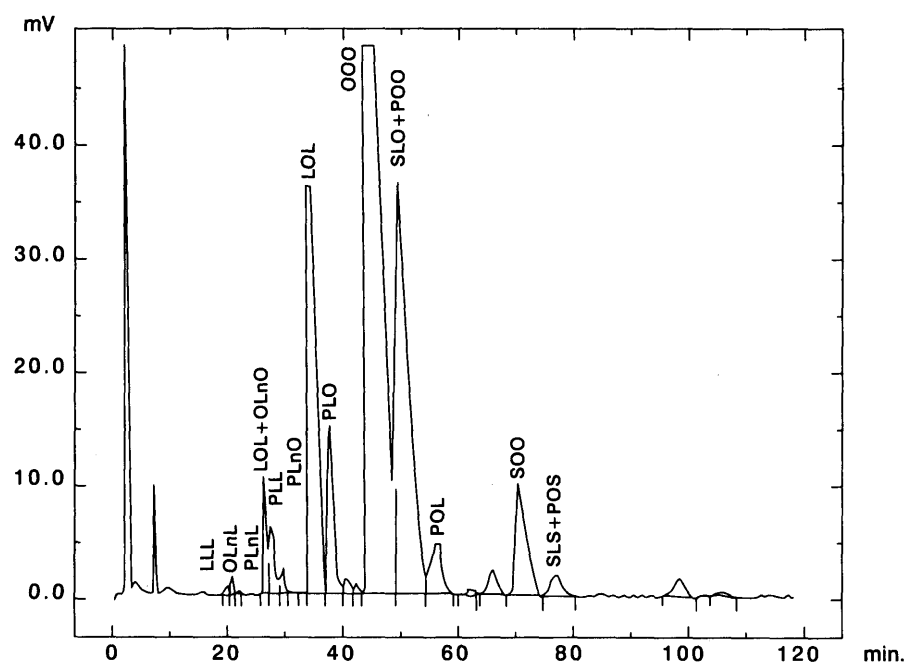
0,04815 moli PoOLn

ECN42 = 0,69540 moli TAG

▼ **M14****Figura 1:** Grafico del $\log \alpha$ in funzione di f (numero di doppi legami)

Nota: La: acido laurico; Mi: acido miristico; P: acido palmitico; St: acido stearico; O: acido oleico; L: acido linoleico; Ln: acido linolenico.

▼ **M14****Figura 2:** *Olio di soia***Figura 3:** *Olio di soia/olio d'oliva 30/70*

▼ M14Figura 4: *Olio d'oliva*

▼ **M19***ALLEGATO XIX***DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI ALCOLI ALIFATICI
MEDIANTE GASCROMATOGRAFIA CON COLONNA CAPILLARE****1. PREMESSA**

Il metodo descrive un procedimento per la determinazione del contenuto di alcoli alifatici, singoli e totali, delle sostanze grasse.

2. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza grassa, addizionata di 1-eicosanolo quale standard interno, è saponificata con idrossido di potassio in soluzione etanolica, quindi l'insaponificabile viene estratto con etere etilico. Dall'insaponificabile estratto è separata la frazione degli alcoli mediante cromatografia su placca di gel di silice basica; gli alcoli recuperati dal gel di silice vengono trasformati in trimetilsilileteri ed analizzati mediante gascromatografia in colonna capillare.

3. APPARECCHIATURA

3.1. Matraccio da 250 ml, munito di refrigerante a ricadere con giunti a smeriglio.

3.2. Imbuto separatore da 500 ml.

3.3. Matracci da 250 ml.

3.4. Attrezzatura completa per analisi cromatografica su strato sottile, per lastre di vetro 20 × 20 cm.

3.5. Lampada a luce ultravioletta, con lunghezza d'onda 366 o 254 nm.

3.6. Microsiringhe da 100 e 500 microlitri.

3.7. Imbuto cilindrico filtrante a setto poroso G 3 (porosità 15-40 micrometri) di diametro circa 2 cm e altezza circa 5 cm, con attacco idoneo per filtrazione sotto vuoto e giunto smerigliato maschio 12/21.

3.8. Beuta per vuoto da 50 ml con giunto femmina smerigliato 12/21 adattabile all'imbuto filtrante (3.7).

3.9. Provetta da 10 ml a fondo conico con tappo a tenuta.

3.10. Gascromatografo idoneo per il funzionamento con colonna capillare, dotato di sistema di splittaggio, costituito da:

3.10.1. Camera termostatica per la colonna, idonea a mantenere la temperatura desiderata con la precisione di circa 1 °C.

3.10.2. Complesso di iniezione termoregolabile con elemento vaporizzante in vetro persilanizzato.

3.10.3. Rivelatore a ionizzazione di fiamma e convertitore-amplificatore.

3.10.4. Registratore-integratore idoneo per il funzionamento con il convertitore-amplificatore (3.10.3), con tempo di risposta non superiore a 1 secondo e con velocità della carta variabile.

3.11. Colonna capillare in vetro o silice fusa, lunga 20 + 30 m, diametro interno 0,25 + 0,32 mm, internamente ricoperta con liquido SE-52 o SE-54 o equivalenti, con spessore uniforme compreso fra 0,10 e 0,30 micrometri.

3.12. Microsiringa per gascromatografia da 10 microlitri con ago cementato.

3.13. Bilancia di previsione con sensibilità di 1 mg (con indicazione 0,1 mg).

4. REATTIVI

4.1. Potassio idrossido, soluzione metanolica circa 2 N: si sciolgono, sotto raffreddamento, 130 g di idrossido di potassio (titolo minimo 85 %) in 200 ml di acqua distillata, quindi si porta ad 1 litro con etanolo. La soluzione si conserva in bottiglie di vetro scuro ben tappate.

4.2. Etere etilico, puro per analisi.

4.3. Sodio solfato anidro, puro per analisi.

▼M19

- 4.4. Lastre di vetro stratificate con gel di silice, senza indicatore di fluorescenza, spessore 0,25 mm (sono reperibili in commercio già pronte per l'uso).
- 4.5. Potassio idrossido, soluzione etanolica circa 0,2 N: si sciolgono 13 g di idrossido di potassio in 20 ml di acqua distillata e si porta a 1 litro con etanolo.
- 4.6. Benzene, per cromatografia (cfr. 5.2.2).
- 4.7. Acetone, per cromatografia (5.2.2).
- 4.8. Esano, per cromatografia (cfr. 5.2.2).
- 4.9. Etere etilico, per cromatografia (cfr. 5.2.2).
- 4.10. Cloroformio, puro per analisi.
- 4.11. Soluzione di riferimento per la cromatografia su placca: colesterolo o fitosteroli, soluzione a 0,5 % in cloroformio.
- 4.12. 2,7-diclorofluoresceina, soluzione etanolica allo 0,2 %. Si rende leggermente basica aggiungendo qualche goccia di soluzione alcolica 2 N di idrossido di potassio.
- 4.13. Piridina anidra, per cromatografia.
- 4.14. Esametildisilazano.
- 4.15. Trimetilclorosilano.
- 4.16. Soluzione etanolo di trimetilsilileteri degli alcoli alifatici da C₂₀ a C₂₈. Si preparano al momento dell'impiego a partire da miscele di alcoli puri.
- 4.17. 1-eicosanolo, soluzione allo 0,1 % (m/v) in cloroformio (standard interno).
- 4.18. Gas vettore: idrogeno o elio, puri per gascromatografia.
- 4.19. Gas ausiliare: azoto puro per gascromatografia.

5. PROCEDIMENTO**5.1. Preparazione dell'insaponificabile**

- 5.1.1. Nel matraccio da 250 ml si introduce, impiegando la microsiringa da 500 microlitri, un volume di soluzione di 1-eicosanolo allo 0,1 % in cloroformio (4.17) che contenga una quantità di 1-eicosanolo corrispondente a circa il 10 % del contenuto di alcoli alifatici nell'aliquota di campione da prelevare per la determinazione. Ad esempio per 5 g di campione si aggiungano 250 microlitri della soluzione di 1-eicosanolo allo 0,1 % se trattasi di oli di oliva e 1 500 microlitri se trattasi di olio di sansa di oliva.

Si evapora il cloroformio in corrente di azoto fino a secchezza, quindi nello stesso matraccio si pesano esattamente circa 5 g di campione secco e filtrato.

- 5.1.2. Si aggiungono 50 ml di soluzione etanolica di idrossido di potassio 2 N, si applica il refrigerante a ricadere e si scalda a leggera ebollizione su bagnomaria sotto continua energica agitazione, fino a saponificazione avvenuta (la soluzione diviene limpida). Si continua il riscaldamento ancora per 20 minuti, quindi si aggiungono 50 ml di acqua distillata facendoli scendere dall'alto del refrigerante, si stacca il refrigerante e si raffredda il matraccio a circa 30 °C.
- 5.1.3. Si travasa il contenuto del matraccio quantitativamente, in un imbuto separatore da 500 ml, aiutandosi con acqua distillata, a più riprese, impiegandone complessivamente circa 50 ml. Si aggiungono circa 80 ml di etere etilico, si agita energicamente per circa 30 secondi e si lascia stratificare (nota 1).

Si separa la fase acquosa sottostante raccogliendola in un secondo imbuto separatore. Sulla fase acquosa si effettuano ancora due estrazioni, con le stesse modalità impiegando ogni volta 60-70 ml di etere etilico.

▼ **M19**

Nota 1: Eventuali emulsioni possono essere eliminate aggiungendo, mediante spruzzetta, piccole quantità di alcool etilico o metilico.

- 5.1.4. Si riuniscono gli estratti eteri in un unico imbuto separatore e si lavano con acqua distillata (50 ml per volta) fino a reazione neutra delle acque di lavaggio.

Eliminata l'acqua di lavaggio, si essicca con solfato di sodio anidro e si filtra, su solfato sodico anidro, in un matraccio da 250 ml previamente pesato, lavando imbuto e filtro con piccole quantità di etere etilico.

- 5.1.5. Si distilla l'etere fino a pochi ml, quindi si porta a secco sotto leggero vuoto o in corrente di azoto, si completa l'essiccamento in stufa a 100 °C per un quarto d'ora circa e, dopo raffreddamento in essiccatore, si pesa.

5.2. Separazione della frazione degli alcoli

- 5.2.1. Preparazione delle lastre basiche: si immergono le lastre al gel di silice (4.4), completamente, nella soluzione etanolica 0,2 N di idrossido di potassio (4.5) per 10 secondi, si lasciano quindi asciugare sotto cappa per 2 ore ed infine si pongono in stufa a 100 °C per 1 ora.

Si tolgono dalla stufa e si conservano in essiccatore a cloruro di calcio fino al momento dell'impiego (le placche così trattate devono essere impiegate entro 15 giorni).

Nota 2: Impiegando per la separazione della frazione alcolica delle lastre di gel di silice basiche si elimina la necessità del trattamento dell'insaponificabile con allumina. In tal modo vengono trattati sulla linea di caricamento tutti i composti di natura acida (acidi grassi ed altro) ottenendosi così le bande degli alcoli alifatici e terpenici nettamente separate dalla banda degli steroli.

- 5.2.2. Nella camera di sviluppo delle lastre si introduce una miscela esano-etere etilico 65/35 (V/V) fino all'altezza di circa 1 cm (*).

Si chiude la camera con l'apposito coperchio e si lascia così per almeno mezz'ora in modo che si stabilisca l'equilibrio liquido-vapore. Sulle superfici interne della camera possono essere fissate delle strisce di carta da filtro che peschino nell'eluente: questo accorgimento permette di ridurre di circa 1/3 il tempo di sviluppo e di ottenere una più uniforme e regolare eluizione dei componenti.

Nota 3: Al fine di ottenere condizioni di eluizione perfettamente riproducibili la miscela di sviluppo deve essere sostituita ad ogni prova.

- 5.2.3. Si prepara una soluzione al 5 % circa di insaponificabile (5.1.5) in cloroformio e, con la microsiringa da 100 microlitri si depositano su una placca cromatografica (5.2.1) a 2 cm circa da una estremità, 0,3 ml di detta soluzione, in striscia il più possibile sottile ed uniforme. In allineamento con la linea di caricamento, ad un'estremità della lastra si depositano 2-3 microlitri della soluzione di riferimento degli alcoli (4.11), allo scopo di identificare, a sviluppo ultimato, la banda degli alcoli alifatici.

- 5.2.4. Si pone la placca nella camera di sviluppo preparata come detto in 5.2.2. La temperatura dovrà essere mantenuta fra 15 e 20 °C. Si chiude subito la camera col coperchio e si lascia eluire fino a che il fronte del solvente sia arrivato a circa 1 cm dal bordo superiore della placca.

Si rimuove quindi la placca dalla camera di sviluppo e si evapora il solvente in corrente di aria calda oppure lasciando la placca ad asciugare per un po' di tempo sotto cappa.

- 5.2.5. Si spruzza la placca debolmente ed uniformemente con la soluzione di 2,7-diclorofluoresceina. Osservando la lastra alla luce ultravioletta si individua la banda degli alcoli alifatici per allineamento con la macchia ottenuta con la soluzione di riferimento e si delimita con una matita nera l'insieme della banda degli alcoli alifatici e della banda immediatamente superiore corrispondente agli alcoli triterpenici.

(*) In questi casi, in particolare, si deve utilizzare la miscela eluente benzene-acetone 95/5 (v/v) per ottenere una buona separazione delle bande.

▼ **M19**

Nota 4: La prescrizione di raccogliere insieme alla banda degli alcoli alifatici anche la banda degli alcoli triterpenici è dettata dal fatto che in questa, nelle condizioni del metodo, vengono inglobate significative quantità di alcoli alifatici.

- 5.2.6. Con una spatola metallica si raschia il gel di silice compreso nell'area delimitata. Il materiale asportato, finemente sminuzzato, viene introdotto nell'imbuto filtrante (3.7); si aggiungono 10 ml di cloroformio caldo, si mescola accuratamente con la spatola metallica e si filtra aiutandosi con il vuoto, raccogliendo il filtrato nella beuta (3.8), collegata all'imbuto filtrante.

Si lava il residuo nell'imbuto per tre volte con etere etilico (circa 10 ml per volta) raccogliendo sempre il filtrato nella stessa beuta adattata all'imbuto. Si evapora il filtrato fino ad un volume di circa 4-5 ml, si trasferisce la soluzione residua nella provetta da 10 ml (3.9) previamente pesata, si porta a secco con blando riscaldamento in leggera corrente di azoto, si riprende con qualche goccia di acetone, si riporta ancora a secco, si pone 10 minuti circa in stufa a 105 °C, indi si lascia raffreddare in essiccatore e si pesa.

Il residuo contenuto nella provetta è costituito dalla frazione alcolica.

5.3. Preparazione dei trimetilsilileteri

- 5.3.1. Nella provetta contenente la frazione alcolica si aggiunge il reattivo per la sililazione, costituito da una miscela di piridina-esametildisilazanotrimetilclorosilano 9:3:1 (v/v/v) (nota 5) in ragione di 50 microlitri per ogni milligrammo di alcoli alifatici, evitando ogni assorbimento di umidità (nota 6).

Nota 5: Esistono in commercio soluzioni già pronte per l'uso; sono inoltre disponibili altri reagenti silanizzanti, quali ad esempio il bis-trimetiltrifluoroacetammide + 1 % trimetilclorosilano da diluire con uno stesso volume di piridina anidra.

Nota 6: L'eventuale formazione di una leggera opalescenza è normale e non è causa di alcun disturbo. La formazione di un flocculato bianco o la comparsa di una colorazione rosa sono indizio della presenza di umidità o di alterazione del reattivo. In questo caso la prova dovrà essere ripetuta.

- 5.3.2. Si tappa la provetta, si agita cautamente (senza capovolgere) fino a completa solubilizzazione degli alcoli alifatici. Si lascia a sé per almeno 15 minuti a temperatura ambiente, quindi si centrifuga per alcuni minuti: la soluzione limpida è pronta per l'analisi gascromatografica.

5.4. Analisi gascromatografica

- 5.4.1. Operazioni preliminari, condizionamento della colonna

- 5.4.1.1. Si installa nel gascromatografo la colonna, collegando il terminale di ingresso all'iniettore connesso col sistema di splittaggio, e il terminale di uscita al rivelatore. Si eseguono i controlli generali del complesso gascromatografico (tenuta dei circuiti dei gas, efficienza del rivelatore, efficienza del sistema di splittaggio e del sistema di registrazione, ecc.).

- 5.4.1.2. Se la colonna è messa in uso per la prima volta è consigliabile procedere al suo condizionamento. Si fa fluire un leggero flusso di gas attraverso la colonna stessa, quindi si accende il complesso gascromatografico e si inizia un riscaldamento graduale fino a raggiungere una temperatura di almeno 20 °C superiore a quella di esercizio (nota 7). Si mantiene tale temperatura per almeno 2 ore, quindi si porta il complesso alle condizioni di funzionamento (regolazione del flusso dei gas e dello splittaggio, accensione della fiamma, collegamento con il registratore elettronico, regolazione della temperatura della camera per la colonna, del rivelatore e dell'iniettore, ecc.) e si registra il segnale ad una sensibilità almeno 2 volte superiore a quella prevista per l'esecuzione dell'analisi. Il tracciato della linea di base deve risultare lineare, esente da picchi di qualsiasi natura, e non deve presentare deriva. Una deriva rettilinea negativa indica imperfetta tenuta delle connessioni della colonna, una deriva positiva indica un insufficiente condizionamento della colonna.

▼ M19

Nota 7: La temperatura di condizionamento deve in ogni caso essere inferiore di almeno 20 °C alla temperatura massima prevista per il liquido di ripartizione impiegato.

5.4.2. Scelta delle condizioni operative

5.4.2.1. Condizioni operative di massima sono le seguenti:

- temperatura della colonna: inizio isoterma 8 minuti a 180 °C, quindi programma 5 °C/minuto fino a 260 °C e ancora 15 minuti a 260 °C,
- temperatura dell'evaporatore: 280 °C,
- temperatura del rivelatore: 290 °C,
- velocità lineare del gas vettore: elio da 20 a 35 cm/s; idrogeno da 30 a 50 cm/s,
- rapporto di splittaggio: da 1/50 a 1/100,
- sensibilità strumentale: da 4 a 16 volte l'attenuazione minima,
- sensibilità di registrazione: da 1 a 2 mV su fondo scala,
- velocità della carta: da 30 a 60 cm/ora,
- quantità di sostanza iniettata: da 0,5 a 1 microlitri di soluzione di TMSE.

Tali condizioni possono essere modificate in funzione delle caratteristiche della colonna e del gascromatografo in modo da ottenere cromatogrammi che soddisfino le condizioni seguenti:

- il tempo di ritenzione dell'alcol C_{26} deve essere di 18 ± 5 minuti,
- il picco dell'alcol C_{22} deve essere per l'olio di oliva 80 ± 20 % del fondo scala e per gli oli di semi 40 ± 20 % del fondo scala.

5.4.2.2. Per verificare i suddetti requisiti si effettuano ripetute iniezioni con le miscele campione di TMSE degli alcoli e si ritoccano le condizioni operative fino a raggiungere i migliori risultati.

5.4.2.3. I parametri di integrazione dei picchi dovranno essere impostati in modo da ottenere una corretta valutazione delle aree dei picchi che vengono presi in considerazione.

5.4.3. Esecuzione dell'analisi

5.4.3.1. Con la microsiringa da 10 microlitri si preleva 1 ml di esano, si aspirano 0,5 microlitri di aria e successivamente da 0,5 a 1 microlitri della soluzione del campione; si alza ancora lo stantuffo della siringa in modo che l'ago sia vuoto. Si introduce l'ago attraverso la membrana del complesso di iniezione e dopo 1-2 secondi si inietta rapidamente e si estrae quindi lentamente l'ago dopo circa 5 secondi.

5.4.3.2. Si effettua la registrazione fino a completa eluizione dei TMSE degli alcoli presenti. La linea di base deve essere sempre corrispondente ai requisiti richiesti (5.4.1.2).

5.4.4. Identificazione dei picchi

L'identificazione dei singoli picchi viene effettuata in base ai tempi di ritenzione e per paragone con miscele di TMSE degli alcoli, analizzate nelle medesime condizione.

Nella figura 1 è riportato un cromatogramma della frazione alcolica di un olio di oliva vergine.

5.4.5. Valutazione quantitativa

5.4.5.1. Si procede al calcolo con l'integratore, delle aree dei picchi dell'1-eicosano e degli alcoli alifatici da C_{22} C_{24} , C_{26} , C_{28} .

5.4.5.2. Si calcola il contenuto di ogni singolo alcool alifatico, in mg/ 1 000 g di sostanza grassa come segue:

▼M19

$$\text{Alcool x} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

in cui:

A_x = area del picco dell'alcool x

A_s = area del picco dell'1-eicosanolo

m_s = peso di 1-eicosanolo aggiunto, in milligrammi

m = peso del campione prelevato per la determinazione, in grammi.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Si riportano i contenuti dei singoli alcoli alifatici, in mg/1 000 g di sostanza grassa e, come «alcoli alifatici totali», la loro somma.

▼ **M19***APPENDICE**Determinazione della velocità lineare dei gas*

Nel gascromatografo, regolato alle normali condizioni operative, si iniettano da 1 a 3 ml di metano (o propano) e si cronometra il tempo che il gas impiega a percorrere la colonna, dal momento dell'iniezione al momento dell'uscita del picco (tM).

La velocità lineare in cm/s è data da L/tM in cui L è la lunghezza della colonna in centimetri e tM è il tempo cronometrato in secondi.

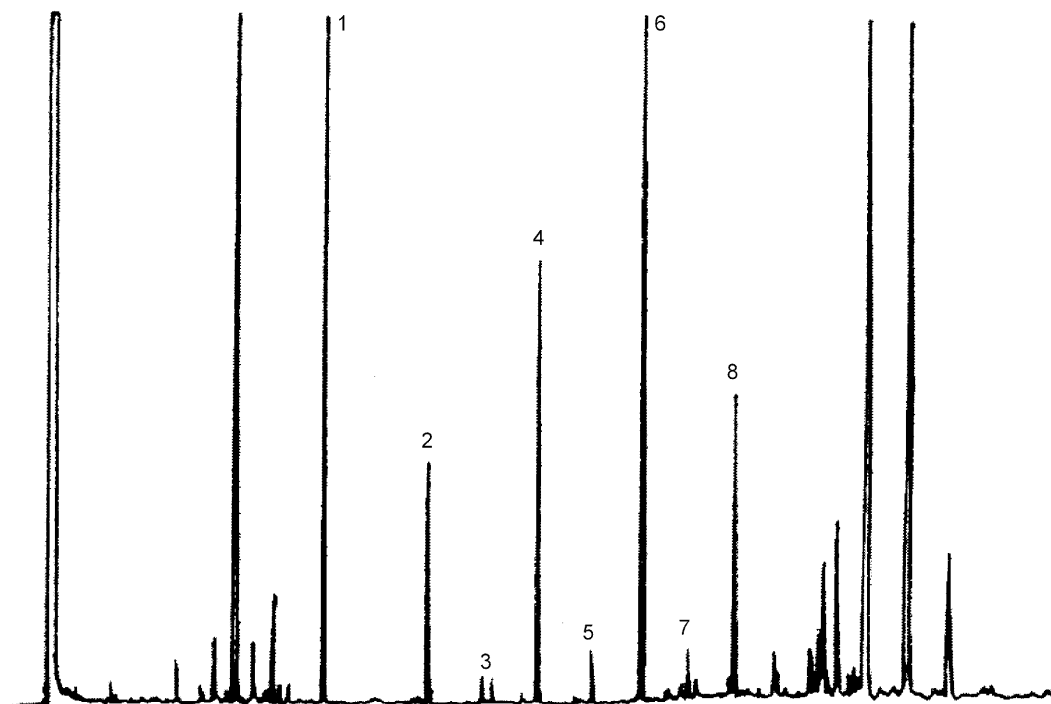


Figura 1 — Cromatogramma della frazione alcolica di un olio di oliva vergine

- 1 = Eicosanolo
- 2 = Docosanolo
- 3 = Tricosanolo
- 4 = Tetracosanolo
- 5 = Pentacosanolo
- 6 = Esacosanolo
- 7 = Eptacosanolo
- 8 = Octacosanolo