

**REGOLAMENTO (CE) N. 796/2002 DELLA COMMISSIONE****del 6 maggio 2002****recante modifica del regolamento (CEE) n. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva, nonché ai metodi ad essi attinenti e le note complementari di cui all'allegato del regolamento (CEE) n. 2658/87 del Consiglio relativo alla nomenclatura tariffaria e statistica ed alla tariffa doganale comune**

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità 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 <sup>(1)</sup>, modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 1513/2001 <sup>(2)</sup>, in particolare l'articolo 35,

visto il regolamento (CEE) n. 2658/87 del Consiglio, del 23 luglio 1987, relativo alla nomenclatura tariffaria e statistica ed alla tariffa doganale comune (

---

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

*Articolo 1*

Il regolamento (CEE) n. 2568/91 è modificato come segue:

1) all'articolo 2, paragrafo 1:

a) il terzo trattino è sostituito dal testo seguente:

«— per la determinazione del tenore di cere, il metodo di cui all'allegato IV,»;

b) è aggiunto il trattino seguente:

«— per la determinazione del tenore in alcoli alifatici, il metodo di cui all'allegato XIX,»;

2) all'articolo 2, il paragrafo 2 è sostituito dal seguente:

«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.

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

Fatto a Bruxelles, il 6 maggio 2002.

*Per la Commissione*  
Franz FISCHLER  
*Membro della Commissione*

---

---

*ALLEGATO*

1. Al sommario degli allegati del regolamento (CEE) n. 2568/91:
  - a) l'allegato XIV: Note complementari 2, 3 e 4 del capitolo 15 della nomenclatura combinata è soppresso;
  - b) è aggiunto il seguente titolo: «Allegato XIX: Metodo per la determinazione del tenore in alcoli alifatici».
2. L'allegato I è sostituito dalle tabelle e dal testo seguenti:

«ALLEGATO I

CARATTERISTICHE DEGLI OLI D'OLIVA

Categoria	Acidità (%) (*)	Indice di perossidi mEq O2/kg (*)	Solventi alogenati mg/kg (*) (1)	Cere mg/kg (**)	Acidi saturi in posizione 2 del trigliceride (%)	Stigmastadieni mg/kg (2)	Differenza ECN42 — HPLC e calcolo teorico di ECN42	K <sub>232</sub> (*)	K <sub>270</sub> (*)	K <sub>270</sub> con allumina (3)	Delta-K (*)	Valutazione organolettica Mediana del difetto (Md) (*)	Valutazione organolettica Mediana de fruttato (Mf) (*)
1. Olio extra vergine di oliva	1,0	20	0,20	250	1,3	0,15	0,2	2,50	0,20	0,10	0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Olio di oliva vergine	2,0	20	0,20	250	1,3	0,15	0,2	2,60	0,25	0,10	0,01	Md 2,5	Mf > 0
3. Olio di oliva vergine corrente	3,3	20	0,20	250	1,3	0,15	0,2	2,60	0,25	0,10	0,01	Md 6,0 (4)	—
4. Olio di oliva vergine lampante	> 3,3	> 20	> 0,20	300 (5)	1,3	0,50	0,3	3,70	> 0,25	0,11	—	Md > 6	—
5. Olio di oliva raffinato	0,5	5	0,20	350	1,5	—	0,3	3,40	1,20	—	0,16	—	—
6. Olio di oliva	1,5	15	0,20	350	1,5	—	0,3	3,30	1,00	—	0,13	—	—
7. Olio di sansa di oliva greggio	> 0,5 (**)	—	—	>350 (6)	1,8	—	0,6	—	—	—	—	—	—
8. Olio di sansa di oliva raffinato	0,5	5	0,20	> 350	2,0	—	0,5	5,50	2,50	—	0,25	—	—
9. Olio di sansa di oliva	1,5	15	0,20	> 350	2,0	—	0,5	5,30	2,00	—	0,20	—	—

(1) Limite massimo per i composti totali alogenati rivelati dal rivelatore a cattura di elettroni.

Per i componenti accertati singolarmente il limite massimo è 0,10 mg/kg.

(2) Somma degli siomeri che potrebbero (o meno) essere separati mediante colonna capillare.

(3) Per la verifica della presenza di oli raffinati, se il K<sub>270</sub> supera il limite della categoria corrispondente, si deve procedere alla determinazione del K<sub>270</sub> dopo passaggio su allumina.

(4) Se la mediana del fruttato è uguale a 0, la mediana del difetto deve essere inferiore o uguale a 2,5.

(5) Gli oli con un tenore in 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 uvaole è pari o inferiore a 3,5.

(6) Gli oli con un tenore in 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 uvaole è superiore a 3,5.

Categoria	Composizione acidica						Somma degli isomeri transoleici (%)	Somma degli isomeri translinoleici e translinolenici (%)	Colesterolo (%)	Brassicasterolo (%)	Campesterolo (%)	Stigmasterolo (%)	Betasitosterolo (%) (1)	Delta-7-Stigmasterolo (%)	Steroli totali (mg/kg)	Eritrodiole e uvaolo (%) (**)
	Miristico (%)	Linolenico (%)	Arachido (%)	Eicosanoico (%)	Beenico (%)	Lignocericico (%)										
1. Olio extra vergine di oliva	0,05	0,9	0,6	0,4	0,2	0,2	0,05	0,05	0,5	0,1	4,0	< Camp.	93,0	0,5	1 000	4,5
2. Olio di oliva vergine	0,05	0,9	0,6	0,4	0,2	0,2	0,05	0,05	0,5	0,1	4,0	< Camp.	93,0	0,5	1 000	4,5
3. Olio di oliva vergine corrente	0,05	0,9	0,6	0,4	0,2	0,2	0,05	0,05	0,5	0,1	4,0	< Camp.	93,0	0,5	1 000	4,5
4. Olio di oliva vergine lampante	0,05	0,9	0,6	0,4	0,2	0,2	0,10	0,10	0,5	0,1	4,0	—	93,0	0,5	1 000	4,5 (2)
5. Olio di oliva raffinato	0,05	0,9	0,6	0,4	0,2	0,2	0,20	0,30	0,5	0,1	4,0	< Camp.	93,0	0,5	1 000	4,5
6. Olio di oliva	0,05	0,9	0,6	0,4	0,2	0,2	0,20	0,30	0,5	0,1	4,0	< Camp.	93,0	0,5	1 000	4,5
7. Olio di sansa di oliva greggio	0,05	0,9	0,6	0,4	0,3	0,2	0,20	0,10	0,5	0,2	4,0	—	93,0	0,5	2 500	> 4,5 (3)
8. Olio di sansa di oliva raffinato	0,05	0,9	0,6	0,4	0,3	0,2	0,40	0,35	0,5	0,2	4,0	< Camp.	93,0	0,5	1 800	> 4,5
9. Olio di sansa di oliva	0,05	0,9	0,6	0,4	0,3	0,2	0,40	0,35	0,5	0,2	4,0	< Camp.	93,0	0,5	1 600	> 4,5

(1) Somma di: Delta-5,23-Stigmastadienolo + Clerosterolo + Beta-Sitosterolo + Sitostanolo + Delta-5-Avenasterolo + Delta-5,24-Stigmastadienolo.

(2) Gli oli con un tenore in 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 citrodiole e uvaolo è pari o inferiore a 3,5.

(3) Gli oli con un tenore in 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.

**Nota:**

- a) I risultati delle analisi devono essere espressi con un numero di decimali uguale a quello previsto per ogni caratteristica. L'ultima cifra deve essere aumentata di una unità se la cifra successiva è superiore a 4.
- b) 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.
- c) Le caratteristiche contrassegnate con (\*) e riguardanti la qualità dell'olio implicano che:  
 — per l'olio d'oliva vergine lampante, corrispondenti valori limite (eccetto il  $K_{232}$ ) possono non essere rispettati simultaneamente,  
 — per gli altri oli d'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 d'oliva vergini.
- d) Le caratteristiche contrassegnate con (\*\*) implicano che per tutti gli oli di sansa di oliva i corrispondenti valori limite possono non essere rispettati simultaneamente.»

3. L'allegato X.B è sostituito dall'allegato seguente:

«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 B 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 diethylene (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 diethylene (87:13 v/v) sotto vuoto. Si 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 metanoli 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.

— 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.



- 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 etero 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.

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 SANSÀ 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

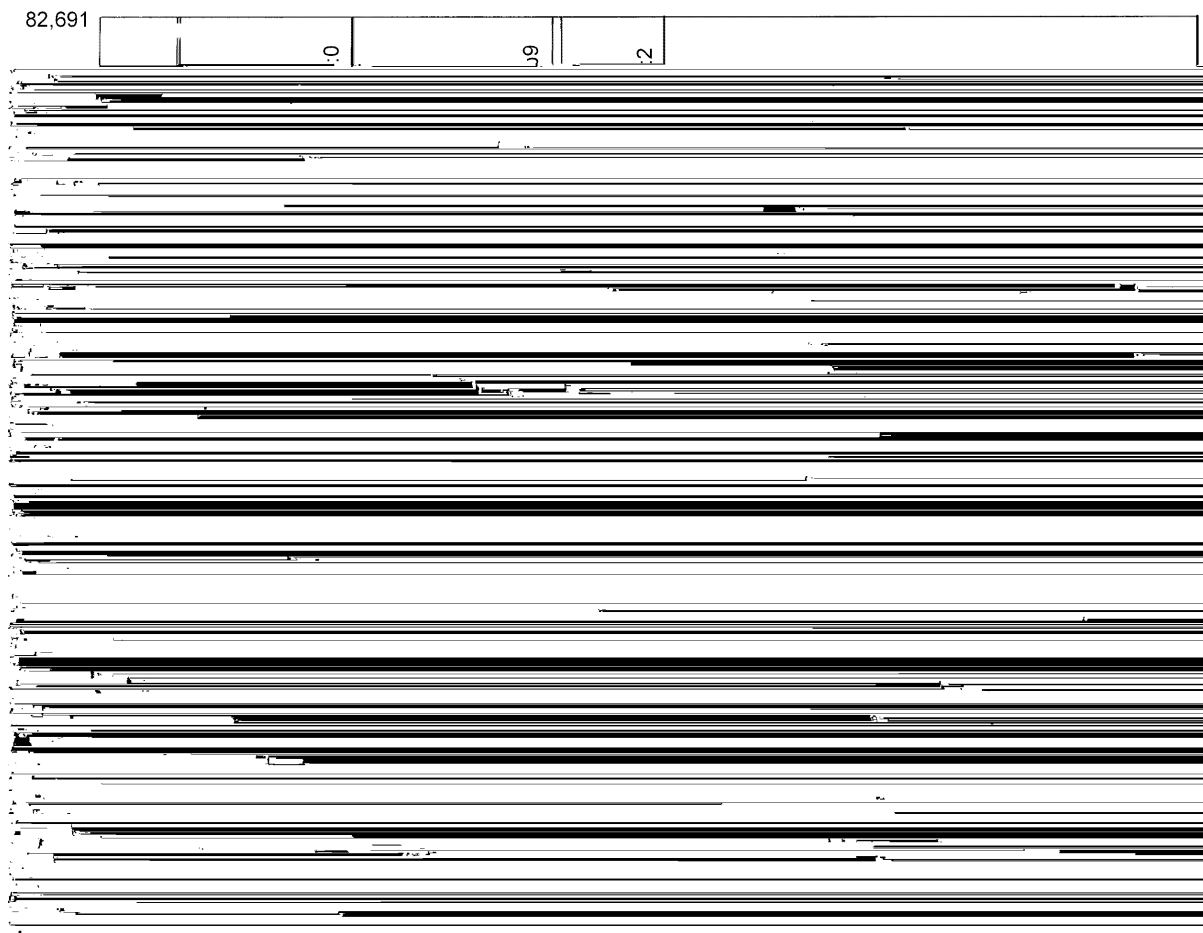


Figura 1: Profilo gascromatografico di un olio di sansa di oliva, ottenuto con il metodo della metilazione a freddo. I picchi cromatografici corrispondono agli esteri metilici, salvo altre indicazioni.»

4. L'allegato XII è sostituito dall'allegato seguente:

«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

3.2.


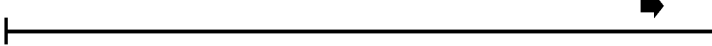
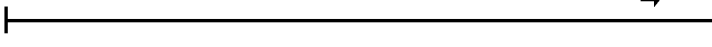
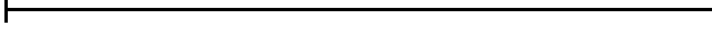



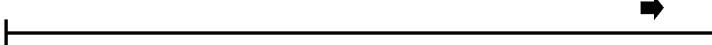

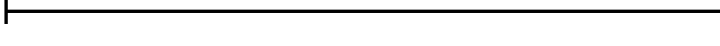
Ogni assaggiatore facente parte del panel deve odorare, poi assaggiare (

---

## 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:

## APPENDICE B

## METODO DI CALCOLO DELLA MEDIANA E DEGLI INTERVALLI DI CONFIDENZA

**Mediana**

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

5. L'allegato XIV è soppresso.
6. È aggiunto il seguente allegato XIX.

«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 sciogliono, 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.

- 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 C<sub>20</sub> a C<sub>28</sub>. 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.

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 trattenuti 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.

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 bando

#### 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.

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  $18 \pm 5$  minuti,
- il picco dell'alcol  $C_{22}$  deve essere per l'olio di oliva  $80 \pm 20$  % del fondo scala e per gli oli di semi  $40 \pm 20$  % 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-eicosanolo e degli alcoli alifatici da  $C_{22}$   $C_{24}$

## 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 ( $t_M$ ).

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.

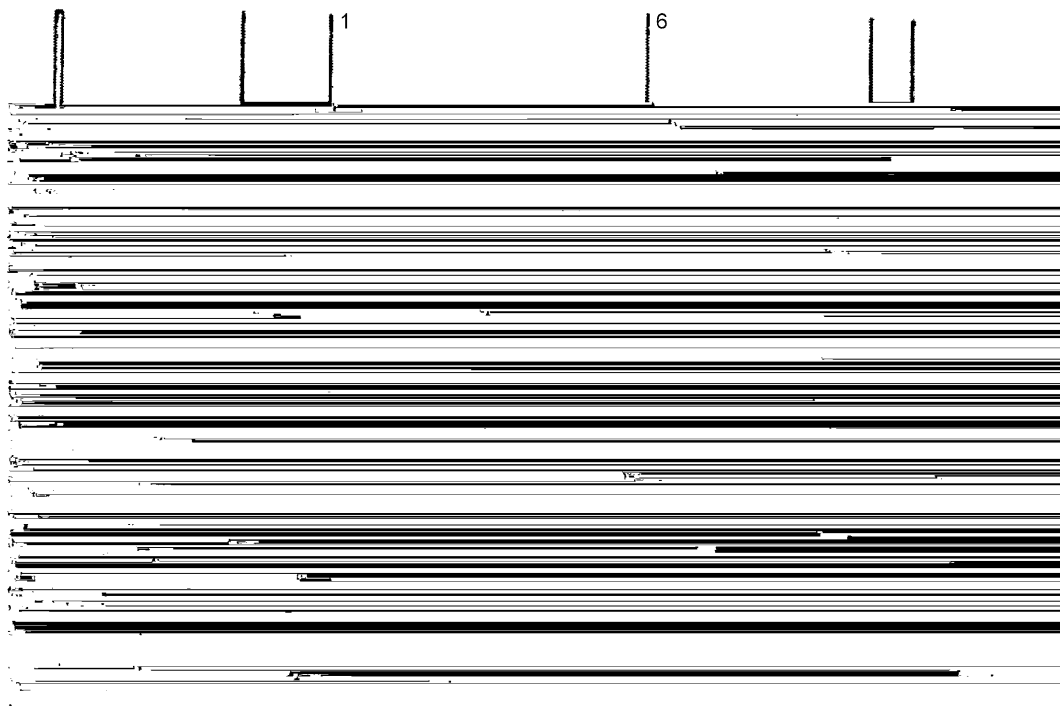


Figura 1 — Cromatogramma della frazione alcolica di un olio di oliva vergine

- |                   |                   |
|-------------------|-------------------|
| 1 = Eicosanolo    | 5 = Pentacosanolo |
| 2 = Docosanolo    | 6 = Esacosanolo   |
| 3 = Tricosanolo   | 7 = Eptacosanolo  |
| 4 = Tetracosanolo | 8 = Octacosanolo  |