



METODO DI ANALISI

DETERMINAZIONE DEGLI STIGMASTADIENI NEGLI OLI VEGETALI

1. OGGETTO

Determinazione degli stigmastadieni negli oli vegetali contenenti basse concentrazioni di questi idrocarburi, in particolare negli oli di oliva vergini e nell'olio di sansa di oliva greggio.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo può essere applicato a tutti i tipi di oli vegetali; la determinazione è tuttavia possibile soltanto per contenuti di questi idrocarburi compresi tra 0,01 e 4,0 mg/kg. Il metodo risulta particolarmente adatto per individuare la presenza di oli vegetali raffinati (di oliva, sansa di oliva, girasole, soia, palma, ecc.) in olio d'oliva vergine, in quanto gli oli vergini, contrariamente a quelli raffinati, non contengono stigmastadieni.

3. PRINCIPIO

Isolamento dell'insaponificabile. Separazione della frazione di idrocarburi steroidei mediante cromatografia in colonna su gel di silice e analisi gascromatografica in colonna capillare.

4. APPARECCHIATURA

- 4.1 Matracci da 250 ml con refrigerante a riflusso.
- 4.2 Imbuti separatori da 500 ml.
- 4.3 Palloni da 100 ml.
- 4.4 Evaporatore rotante.

- 4.5 Colonna di vetro per cromatografia, (1,5 cm di diametro interno e 50 cm di lunghezza), provvista di chiavetta teflonata e di un tappo di fibra di lana di vetro nella parte inferiore. Preparare la colonna di gel di silice, versare esano nella colonna per cromatografia fino a circa 5 cm e riempire poi di gel di silice diluito in esano (15 g in 40 ml) con l'aiuto di piccole porzioni di esano. Lasciar decantare e completare la sedimentazione applicando una lieve vibrazione. Eluire l'esano eccedente. Aggiungere solfato di sodio anidro fino all'altezza di 0,5 cm.
- 4.6 Gascromatografo con rivelatore a ionizzazione di fiamma, iniettore con divisore di flusso o in colonna e forno programmabile con la precisione di $\pm 1^\circ\text{C}$.
- 4.7 Colonne capillari di silice fusa per gascromatografia (0,25 o 0,32 mm di diametro interno e 25 m di lunghezza) rivestite con fase 5%-fenilmetil-silicone, spessore 0,25 μm .

Nota 1: Possono essere utilizzate altre colonne di polarità simile o più bassa.

- 4.8 Registratore-integratore con possibilità di integrare da valle a valle.
- 4.9 Microsiringa da 5-10 μl per gascromatografia con ago cementato.

5. REAGENTI

Tutti i reagenti devono essere di qualità per analisi, se non si specifica altrimenti. L'acqua impiegata deve essere acqua distillata o acqua di purezza almeno equivalente.

- 5.1 Esano o miscela di alcani con p. e. di 65-70°C, distillati in colonna di rettificazione.

Nota 2: È necessario distillare l'esano per eliminarne le impurità.

- 5.2 Etanolo 96 v/v.
- 5.3 Solfato di sodio anidro.
- 5.4 Soluzione alcolica di potassio idrossido al 10% p/v. Aggiungere 10 ml di acqua a 50 g di idrossido di potassio, agitare e diluire con 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 60extra 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. Gas vettore per cromatografia: idrogeno o elio puro al 99,9990 %.
- 5.9. Gas ausiliari per il rivelatore a ionizzazione di fiamma: idrogeno puro al 99,9990 % ed aria purificata.
- 5.10. Soluzione di n-nonacosano in esano ad una concentrazione di circa 100 ppm.

6. PROCEDIMENTO

- 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 steroidico:

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 sommità del solfato di sodio e 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.

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 stigmastadiene, a un tempo di ritenzione relativo di circa 1,29 (cfr. figura 1b).

Lo stigmastadiene 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 risolvante, l'isomero può comparire sotto forma di piccolo picco prima e accanto a quello dello stigmastadiene. In questo caso le due aree devono essere sommate (Figura 2). Per essere certi che gli stigmastadieni vengano eluiti in un picco unico, è consigliabile sostituire la 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.

Nota 10: È necessario accertare che lo standard interno e gli stigmastadieni non si sovrappongono a nessuno dei picchi che appaiono nella prima frazione eluita nella cromatografia su colonna.

6.3.3. Analisi quantitativa

Il tenore di stigmastadiene viene determinato con la formula seguente:

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

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 ».

Nota 11: Quando gli stigmastadieni compaiono in concentrazioni di oltre 4 mg/kg, l'analisi quantitativa deve essere effettuata con il metodo per la determinazione degli idrocarburi steroidei.

Figura 1

Gasromatogrammi 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.

a) Prima frazione (30 ml) di olio vergine, addizionata intenzionalmente con lo standard.

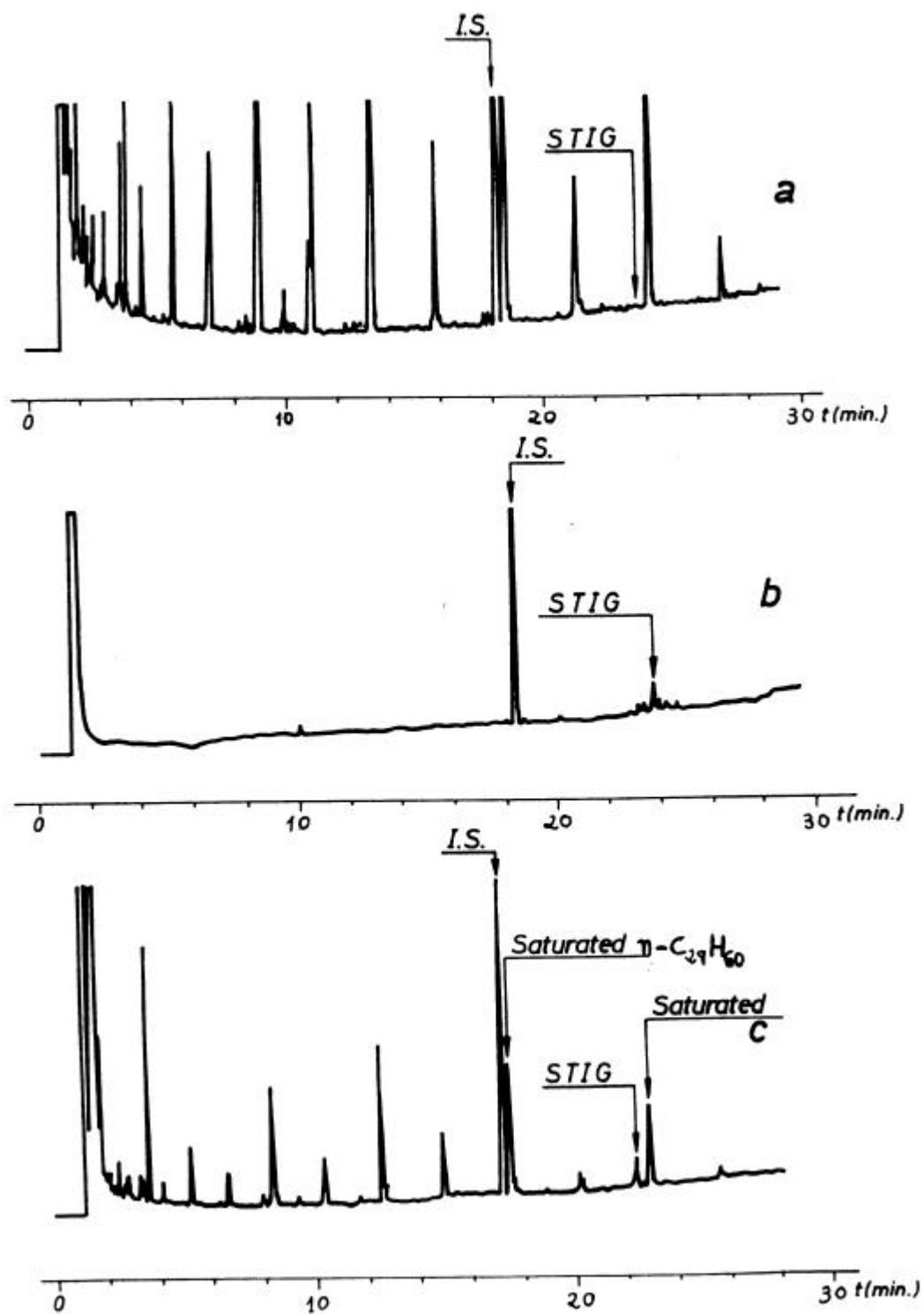


Figure 1

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.

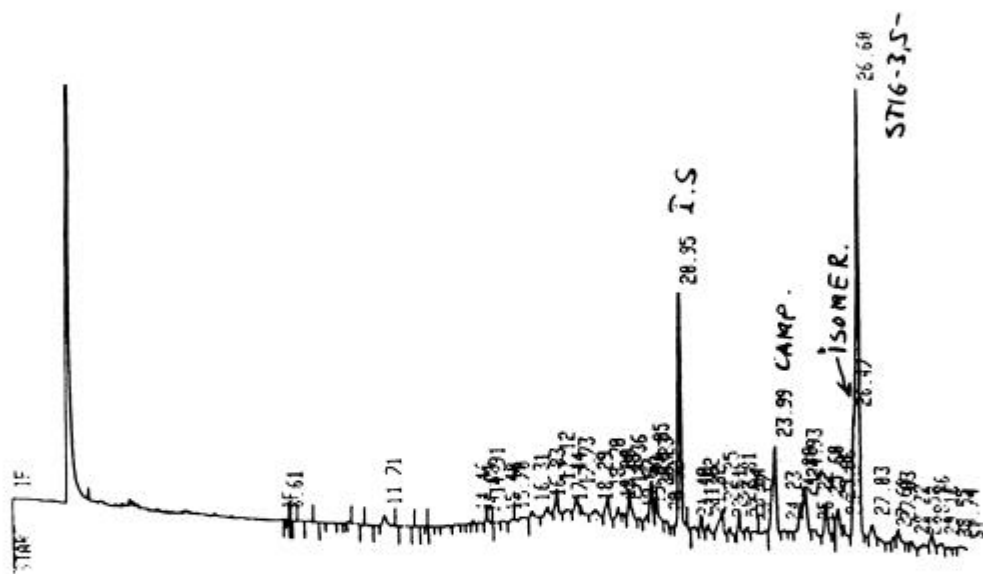


Figure 2

MARGINI DI PRECISIONE DEL METODO

1. Analisi dei risultati della prova interlaboratorio

I margini di precisione del metodo figurano nella tabella riportata oltre.

Nel 1999, il Segretariato esecutivo del Consiglio oleicolo internazionale ha proposto ai laboratori riconosciuti di svolgere una prova collettiva. Hanno partecipato alla prova diciannove laboratori di otto paesi.

L'esperimento si è svolto su cinque campioni:

- A: olio d'oliva extra vergine
- B: olio d'oliva vergine + olio di girasole raffinato
- C: olio d'oliva vergine + olio di sansa d'oliva raffinato
- D: olio d'oliva vergine + olio di soia raffinato + olio di girasole raffinato
- E: olio d'oliva raffinato + olio di sansa di oliva raffinato + olio di soia raffinato + olio d'oliva vergine lampante.

Il Segretariato esecutivo ha condotto l'analisi statistica dei risultati della prova in collaborazione secondo le regole definite dalla norma ISO 5725 **Accuratezza (veridicità e precisione) dei metodi e dei risultati delle misurazioni**; l'esame dei valori aberranti è stata condotta applicando il test di Cochran e il test di Grubbs sui risultati dei laboratori per tutte le determinazioni (a e b in duplicato) e tutti i campioni.

La tabella riporta:

| | |
|----------------------------|---|
| n | Numero dei laboratori che hanno partecipato alla prova |
| outliers | Numero di laboratori che presentano risultati aberranti |
| mean | Media dei risultati accettati |
| r | Valore al di sotto del quale è situato, con una probabilità del 95 %, il valore assoluto della differenza tra i risultati ottenuti nel corso di due prove individuali indipendenti, condotte con lo stesso metodo, su campione identico, nello stesso laboratorio, dallo stesso operatore che usa la stessa apparecchiatura e in breve intervallo di tempo. |
| S_r | Deviazione standard della ripetibilità |
| RSD_r (%) | Coefficiente di variazione della ripetibilità ($S_r \times 100 / \text{mean}$) |

R Valore al di sotto del quale è situato, con una probabilità del 95 %, il valore assoluto della differenza tra i risultati ottenuti nel corso di due prove individuali, condotte con lo stesso metodo, su identico campione, in laboratori diversi, da operatori diversi che usano apparecchiature diverse.

S_R Deviazione standard della riproducibilità

RSD_R (%) Coefficiente di variazione della riproducibilità ($S_R \times 100 / \text{mean}$)

Contenuto in stigmastadieni (ppm)

| | A | B | C | D | E |
|----------------------------|-----------------------------|------|------|-------|------|
| n | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 |
| outliers | 3 | 5 | 7 | 2 | 5 |
| mean | 0.01 | 0.80 | 9.49 | 0.22 | 7.55 |
| r | 0.01 | 0.08 | 0.39 | 0.05 | 0.48 |
| S_r | 0.004 | 0.03 | 0.14 | 0.01 | 0.17 |
| RSD_r (%) | 32.43 _(not sig.) | 3.70 | 1.5 | 8.41 | 2.29 |
| R | 0.033 | 0.15 | 1.66 | 0.06 | 1.59 |
| S_R | 0.012 | 0.05 | 0.59 | 0.025 | 0.57 |
| RSD_R(%) | 98.59 _(not sig.) | 6.73 | 6.26 | 11.45 | 7.55 |

2. Bibliografia

ISO 5725-1:1994 Accuratezza (veridicità e precisione) dei metodi e dei risultati delle misurazioni – Parte 1: Principi generali e definizioni

ISO 5725-2: 1994 Accuratezza (veridicità e precisione) dei metodi e dei risultati delle misurazioni – Parte 2: Metodo di base per la determinazione della ripetibilità e riproducibilità di un metodo di prova normalizzato

ISO 5725-5: 1998 Accuratezza (veridicità e precisione) dei metodi e dei risultati delle misurazioni – Parte 5: Metodi alternativi per la determinazione della ripetibilità e riproducibilità di un metodo di prova normalizzato

ISO 5725-6:1994 Accuratezza (veridicità e precisione) dei metodi e dei risultati delle misurazioni – Parte 6: Applicazione pratica dei valori di accuratezza