



## **METODO DI ANALISI**

### **DETERMINAZIONE DEGLI STERENI NEGLI OLI VEGETALI RAFFINATI**

#### **1. OGGETTO**

Determinazione degli stereni (campestadieni e stigmastadieni), idrocarburi derivati dagli steroli durante i trattamenti di raffinazione o di desterolizzazione applicati agli oli vegetali.

#### **2. CAMPO DI APPLICAZIONE**

La presente norma può essere impiegata per scoprire oli di semi desterolizzati nell'olio d'oliva raffinato, nell'olio di sansa di oliva raffinato e nelle miscele di questi oli con olio d'oliva vergine. Il metodo può essere impiegato anche per quantificare gli stigmastadieni negli oli quando vi si trovano a concentrazione maggiore di 4,0 mg/kg.

#### **3. PRINCIPIO**

Isolamento della frazione di idrocarburi steroidei mediante cromatografia in colonna di gel di silice impregnata di nitrato di argento e analisi per gascromatografia in colonna capillare.

#### **4. APPARECCHIATURA**

- 4.1 Palloni a fondo rotondo da 100 ml
- 4.2 Palloni a fondo rotondo da 500 ml
- 4.3 Erlenmayer da 25 ml
- 4.4 Essiccatore contenente gel di silice attivato
  
- 4.5 Evaporatore rotante
- 4.6 Colonna di vetro per cromatografia (diametro interno 1,5-2,0 cm e 50 cm di lunghezza)

provvista di chiavetta teflonata, e di un tappo di fibra di lana di vetro o disco di vetro agglomerato nella parte inferiore. Preparazione della colonna di gel di silice: versare dell'esano nella colonna fino a quasi 5 cm di altezza, riempire di pasta di gel di silice argentata (5,5) in esano (20 g in 40 ml) con l'aiuto di porzioni di esano. Lasciar decantare e completare la sedimentazione applicando una lieve vibrazione. Aggiungere solfato di sodio anidro fino a quasi 0,5 cm di altezza, ed eluire poi l'eccesso di esano.

- 4.7 Gascromatografo con rivelatore a ionizzazione di fiamma, iniettore con divisore di flusso (o "on-column" freddo) e forno programmabile con la precisione  $\pm 1$  °C.
- 4.8 Colonna capillare di silice fusa per gascromatografia (diametro interno 0,25 mm e lunghezza 25 m) rivestita di fenilmetilsilicone al 5 %, spessore 0,25  $\mu\text{m}$ .

**Nota 1: Possono impiegarsi altre colonne di polarità simile o piú bassa**

- 4.9 Registratore-integratore con possibilità di integrare da valle a valle.
- 4.10 Microsiringa da 5-10  $\mu\text{l}$  per gascromatografia con ago cementato.

## 5. REAGENTI

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

Per verificare la purezza dei reagenti, fare una prova in bianco.

- 5.1 Esano o miscela di alcani con p.e. di 65-70 °C, distillati in colonna di rettificazione.
- 5.2 Nitrato d'argento.
- 5.3 Solfato di sodio anidro.
- 5.4 Gel di silice 60 per cromatografia in colonna, 70-230 mesh (art. 7734 Merck o similare), riscaldato in forno a 110 °C per due ore o piú, e raffreddato poi nell'essiccatore (4.4).
- 5.5 Preparazione del gel di silice argentato per due colonne.

In un pallone a fondo rotondo da 500 ml (4.2), pesare 30 g di silice attivato (5.4) In un erlenmeyer da 25 ml (4.3) dissolvere 3,0 g di nitrato d'argento in 7 ml di acqua distillata; versare poi, con una pipetta, a goccia a goccia la soluzione sul gel di silice, agitando di quando in quando. Tappare il pallone e agitare vigorosamente durante 20 secondi; mettere il pallone nell'evaporatore rotante e lasciar girare durante 30 minuti alla pressione

atmosfera e a temperatura ambiente. Il gel di silice vira leggermente al grigio e può essere mantenuto al buio nel pallone tappato.

- 5.6 Soluzione tampone (200 ppm) di colest-3,5-diene (Sigma) in esano (10 mg in 50 ml).
- 5.7 Soluzione standard di colest-3,5-diene in esano alla concentrazione di 20 ppm, ottenuta per diluizione della soluzione 5.6.

**Nota 2:** Se conservate a temperatura inferiore a 4 °C, le soluzioni 5.6 e 5.7 non si deteriorano per almeno quattro mesi.

- 5.8 Soluzione di n-nonacosano in esano alla concentrazione di circa 100 ppm.
- 5.9 Gas vettore per cromatografia: elio o idrogeno di purezza 99,9990 %.
- 5.10 Gas ausiliari per rivelatore a ionizzazione di fiamma: idrogeno di purezza 99,9990 % e aria purificata.

## 6. PROCEDIMENTO

- 6.1 Separazione della frazione di idrocarburi steroidei
  - 6.1.1 Pesare  $1 \pm 0,01$  g di olio in un becher da 0 ml, aggiungere 1 ml della soluzione controllo di colest-3,5-diene (20 µg), travasare la miscela alla colonna di frazionamento mediante due porzioni di 1 ml di esano, introdurre il campione nella colonna badando a che il livello della soluzione ricopra il solfato di sodio.
  - 6.1.2 Cominciare l'eluizione cromatografica con esano, con flusso di 1 ml/min circa. Scartare i primi 40 ml dell'eluizione, raccogliere la successiva frazione di 60 ml e, a parte, la seguente di 20 ml.

**Nota 3:** L'ottimizzazione dei volumi della prima e della seconda frazione può essere garantita esaminando i gascromatogrammi ottenuti di ciascuna frazione. La prima deve contenere idrocarburi saturi e non contiene colestadiene; la seconda deve mostrare idrocarburi steroidei ma insaturi e la terza frazione non dovrebbe contenere stereni (Figura 1).

**Nota 4:** Alla fine del processo cromatografico, la colonna dovrebbe essere svuotata e il gel di silice argentato versato in un recipiente e conservato per riciclarne l'argento.

- 6.1.3 Trasferire la seconda frazione in un pallone a fondo rotondo di 100 ml (4.1) ed da evaporarla in un evaporatore rotante a 30 °C e a bassa pressione fino a secchezza e immediatamente sciogliere il residuo in 0,2 ml di esano. Conservare la soluzione in frigorifero fino al momento dell'analisi.

**Nota 5: Il residuo (6.1.3) non deve essere conservato secco a temperatura ambiente. Appena ottenuto va addizionato con solvente e le soluzioni conservate in frigorifero.**

## 6.2 Gascromatografia

### 6.2.1 Condizioni operative per l'iniettore con divisore di flusso

- Temperatura dell'iniettore: 300 °C
- Temperatura del rivelatore: 320 °C
- Temperature del forno programmate: iniziale di 235 °C per sei minuti; quindi aumento progressivo (2 °C/min.) fino a raggiungere i 285 °C.
- Rapporto di divisione dell'iniettore con divisore di flusso: 1:15.
- Quantità di soluzione iniettata: 2 µl.
- Sensibilità circa 16 volte l'attenuazione minima.
- Gas vettore: elio o idrogeno alla pressione di circa 120 e 80 kPa rispettivamente.
- Registratore-integratore. I parametri d'integrazione devono essere impostati in modo da ottenere una corretta valutazione delle aree.

Tali condizioni devono essere modificate in funzione delle caratteristiche del cromatografo e della colonna, in maniera da ottenere cromatogrammi che soddisfino i seguenti requisiti: il picco dello standard interno deve apparire in capo a  $\pm 3$  minuti rispetto al tempo di ritenzione indicato al 6.2.2; il picco dello standard interno deve raggiungere almeno l'80 % della scala del registratore.

Il sistema gascromatografico deve essere comprovato iniettando una miscela della soluzione tampone di colestadiene (5.6) e della soluzione di n-nonacosano (5.8). Il picco risolto del colestadiene deve apparire prima di quello dell'n-nonacosano (**Figura 2**); se così non fosse, si può procedere in due modi: modificare la temperatura del forno e/o utilizzare una colonna a polarità inferiore. In queste condizioni, non si hanno interferenze tra i picchi degli idrocarburi saturi e i picchi degli stereni (**Figura 2**).

### 6.2.2. Identificazione dei picchi

Utilizzando elio come gas vettore, il picco dello standard interno appare dopo circa 19 minuti e lo stigmasta-3,5-diene a un tempo di ritenzione relativo di circa 1,28 (**Figura 1b**). Il picco del campesta-3,5-diene appare al tempo di ritenzione di circa 1,15 rispetto allo standard interno e di circa 0,90 rispetto allo stigmasta-3,5-diene.

Utilizzando idrogeno come gas vettore, il picco dello standard interno appare al tempo di ritenzione di circa 15 minuti e quello dello stigmasta-3,5-diene al tempo di ritenzione relativo di circa 1,33. Il picco del campesta-3,5-diene appare al tempo di ritenzione dell'1,18 ca. rispetto allo standard interno e di circa lo 0,88 rispetto allo stigmasta-3,5-diene.

Il campesta-3,5-diene e lo stigmasta-3,5-diene possono apparire con piccole quantità dei rispettivi isomeri 2,4. Di solito, questi isomeri non danno luogo a una eluizione separata e si presentano dunque come un solo picco cromatografico. Tuttavia, se la colonna è troppo polare o mostra un alto potere risolvante, gli isomeri 2,4 possono presentarsi come un piccolo picco e apparire prima e vicino al picco degli isomeri 3,5 (**Figura 3**). Per garantire l'eluizione degli stigmastadieni in un solo picco, è consigliabile sostituire la

colonna con una meno polare o dal diametro interno maggiore.

**Nota 6:** Riferimenti gascromatografici di questi idrocarburi steroidi possono essere ottenuti analizzando campioni di olio di palma o di girasole raffinato o di olio di girasole riscaldato col 10 % v/p di acido solforico:acqua (1:1) a 150 °C per 5 minuti.

6.2.3 Analisi quantitativa

Il contenuto di stigmastadieni si determina applicando la formula:

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

Dove:  $A_s$  = area del picco degli stigmastadieni

$A_c$  = area dello standard interno

$M_c$  = massa, in microgrammi, dello standard aggiunto

$M_o$  = massa, in grammi, della presa d'olio.

I rapporti tra gli idrocarburi sono così calcolati:

$$R1 = \frac{\text{area del picco degli stigmastadieni}}{\text{area del picco dei campestadieni}}$$

Di solito, ogni paio di isomeri dà un solo picco cromatografico, ma se i due isomeri danno due picchi differenti, le due aree devono essere sommate.

Questi rapporti sono validi solo se i picchi degli stigmastadieni raggiungono almeno il 50 % della scala del registratore.

**Nota 7:** Se la quantità di stigmastadieni è superiore a 50 ppm, l'analisi deve essere ripetuta su un campione d'olio niú piccolo. per ottenere una quantificazione niú esatta.

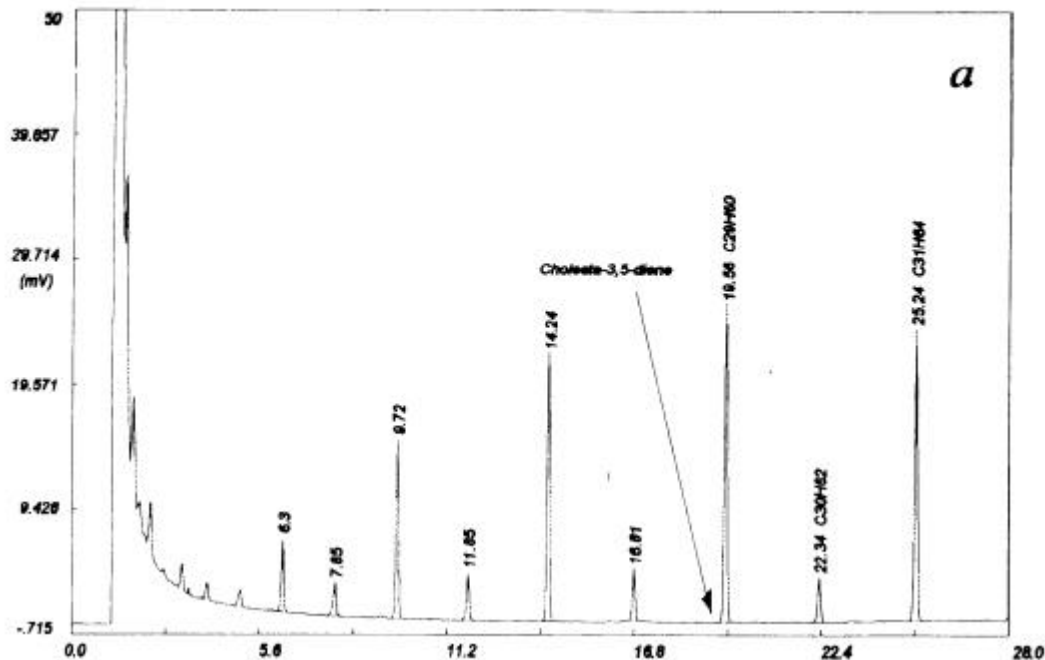


Figura 1. Gascromatogrammi delle prima e seconda frazione ottenuti da campioni analizzati in colonna capillare (diametro interno 0,25 mm, lunghezza 25 m) internamente rivestita di fenilmetilsilicone al 5 % (spessore 0,25  $\mu\text{m}$ ), servendosi di elio come gas vettore.

- a) 1<sup>a</sup> frazione di un campione di olio d'oliva
- b) 2<sup>a</sup> frazione di un campione di olio di arachide

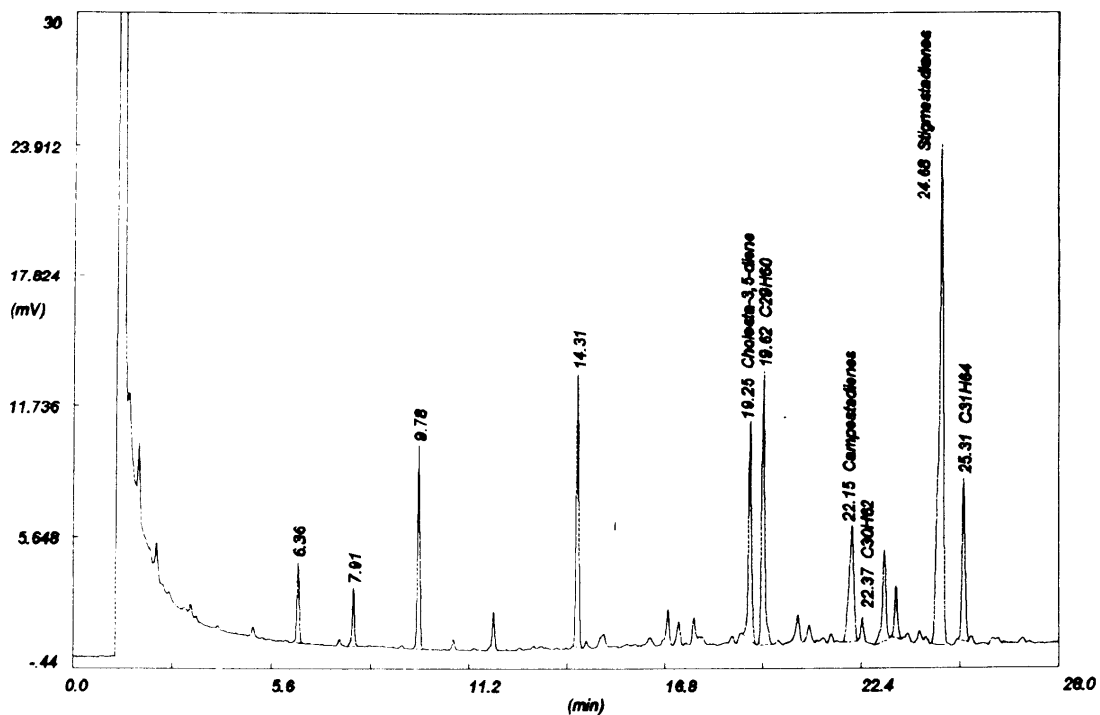


Figura 2. Gascromatogramma (1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> frazioni) ottenuto da una miscela di olio d'oliva raffinato e di olio di girasole desterolizzato, analizzato in colonna capillare (diametro interno 0,25 mm, lunghezza 25 m) internamente rivestita di fenilmetilsilicone al 5 %, spessore 0,25 µm, servendosi di elio come vettore.

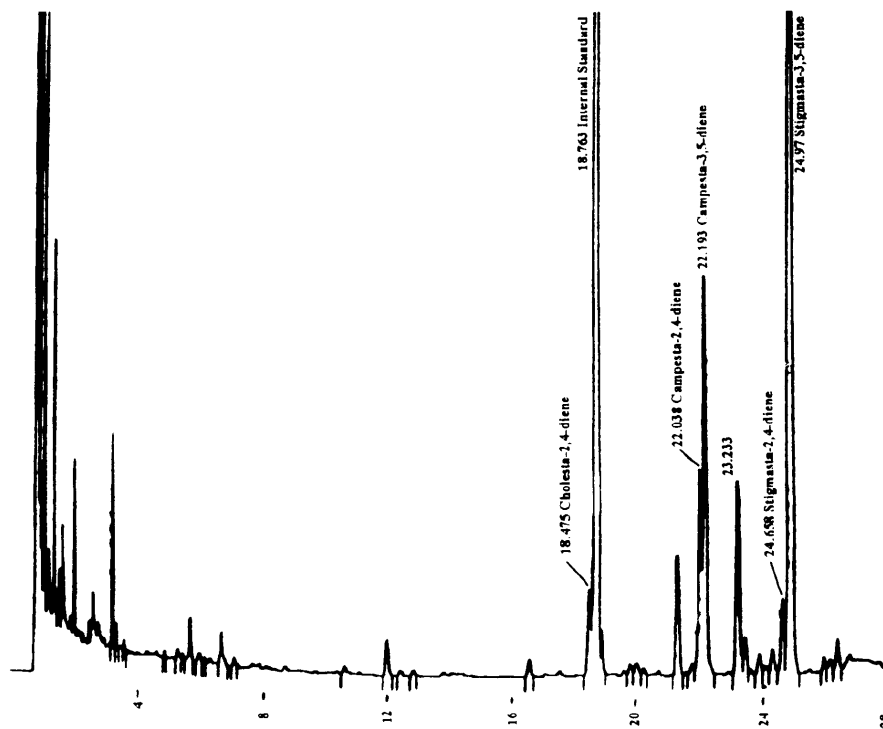


Figura 3. Gascromatogramma della seconda frazione del campione di olio di palma, analizzato in colonna polare (fenilmetilsilicone al 65 %) mostrando gli isomeri degli stereni.

### **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:

<b>n</b>	Numero dei laboratori che hanno partecipato alla prova
<b>outliers</b>	Numero di laboratori che presentano risultati aberranti
<b>mean</b>	Media dei risultati accettati
<b>r</b>	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.
<b>S<sub>r</sub></b>	Deviazione standard della ripetibilità
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	Coefficiente di variazione della ripetibilità ( $S_r \times 100 / \text{mean}$ )
<b>R</b>	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.
<b>S<sub>R</sub></b>	Deviazione standard della riproducibilità
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	Coefficiente di variazione della riproducibilità ( $S_R \times 100 / \text{mean}$ )

### Rapporto R1 di stereni

	A	B	C	D	E
<b>n</b>			18		19
<b>outliers</b>			5		7
<b>mean</b>			19.96		15.86
<b>r</b>			1.67		1.25
<b>S<sub>r</sub></b>			0.59		0.45
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>			3.00		2.84
<b>R</b>			4.38		3.04

<b>S<sub>R</sub></b>	1.56	1.08
<b>RSD<sub>R</sub>(%)</b>	7.85	6.86

## 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