



METODO DI ANALISI

DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI CERE MEDIANTE GASCROMATOGRAFIA CON COLONNA CAPILLARE

1. OGGETTO

Il presente metodo permette di determinare il contenuto di cere negli oli di oliva. Le singole cere sono separate in funzione del numero di atomi di carbonio. L'impiego del metodo viene consigliato come mezzo atto a differenziare l'olio di oliva di pressione da quello ricavato dalla sansa di oliva (olio di sansa).

2. PRINCIPIO

La sostanza grassa, addizionata di opportuno riferimento interno, viene frazionata mediante cromatografia su colonna di gel di silice idratato; la frazione eluita nelle condizioni di prova (con polarità minore di quella dei trigliceridi) viene recuperata ed analizzata direttamente mediante gascromatografia in colonna capillare.

3. APPARECCHIATURA

3.1. Beuta da 25 ml.

3.2. Colonna in vetro per cromatografia liquida avente diametro interno 15,0 mm e altezza da 30 a 40 cm con opportuno 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 con programmatore di temperatura

3.3.2. Iniettore a freddo per l'introduzione diretta in colonna.

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

3.3.4. Registratore-integratore (*Nota 1*) idoneo per il funzionamento con il convertitore-amplificatore (3.3.3) con tempo di risposta non maggiore di 1 secondo, e con velocità della carta variabile.

3.3.5. Colonna capillare di vetro o silice fusa, lunga da 8 a 12 m, diametro interno da 0,25 a 0,32 mm, internamente ricoperta con liquido di ripartizione (nota 2) con spessore uniforme compreso fra 0,10 e 0,30 μm .

3.4. Microsiringa idonea per iniezione diretta in colonna da 10 μl con ago cementato.

3.5. Vibratore elettrico

3.6. Evaporatore rotante

3.7. Muffola

3.8. Bilancia analitica in grado di garantire un'accuratezza della misura di $\pm 0,1$ mg.

3.9. Normale vetreria da laboratorio.

4. REAGENTI

4.1. Gel di silice con granulometria compresa tra 60 e 200 μm . Porre il gel di silice in muffola a 500 °C per almeno 4 h. Dopo raffreddamento aggiungere il 2% di acqua riferito alla quantità di gel di silice prelevata. Agitare bene allo scopo di omogeneizzare la massa e conservare al buio almeno per 12 h prima del suo impiego.

4.2. n-Esano per cromatografia

AVVERTENZA – I vapori possono incendiarsi. Tenere lontano da sorgenti di calore, scintille o fiamme libere. Tenere i contenitori ben chiusi, usare con adeguata ventilazione. Evitare l'accumulo di vapori ed eliminare ogni possibile causa d'incendio, quali riscaldatori o apparecchi elettrici non antideflagranti. Nocivo per inalazione: può causare danni alle cellule del sistema nervoso. Evitare di respirarne i vapori, usare se necessario un apparecchio respiratorio adatto. Evitare il contatto con gli occhi e la pelle.

Nota 1: È possibile utilizzare anche sistemi computerizzati che prevedono l'acquisizione dei dati gascromatografici attraverso Personal Computer

Nota 2: Liquidi di ripartizione idonei allo scopo reperibili in commercio sono per es. il SE52 e il SE54 ecc.

4.3. **Etere etilico**, per cromatografia

AVVERTENZA – È altamente infiammabile. Moderatamente tossico. Irritante per la pelle. Nocivo per inalazione. Può causare danni agli occhi. Gli effetti possono essere differiti. Può formare perossidi esplosivi. I vapori possono incendiarsi. Tenere lontano da fonti di calore, scintille o fiamme libere. Tenere i contenitori ben chiusi. Usare con adeguata ventilazione. Evitare l'accumulo di vapori ed eliminare ogni possibile causa di incendio quali riscaldatori o apparecchi elettrici non antideflagranti. Non evaporare a secchezza o quasi-secchezza. L'aggiunta di acqua o di un agente riducente appropriato può ridurre la formazione di perossidi. Non ingerire. Evitare di respirarne i vapori. Evitare il contatto prolungato o ripetuto con la pelle.

4.4. **n-Eptano** per cromatografia

AVVERTENZA – È infiammabile. Nocivo per inalazione. Tenere lontano da sorgenti di calore, scintille o fiamme libere. Tenere i contenitori ben chiusi. Usare con adeguata ventilazione. Evitare di respirarne prolungatamente i vapori. Evitare il contatto prolungato o ripetuto con la pelle.

4.5. **Soluzione campione di lauril arachidato** (Nota 3), allo 0,1% (m/V) in esano (riferimento interno)

4.5.1. **Sudan 1 (1-phenylazo-2-naphthol)**

4.6. **Gas vettore:** idrogeno o elio puro per gascromatografia

AVVERTENZA

Idrogeno. È altamente infiammabile, sotto pressione. Tenere lontano da fonti di calore, scintille o fiamme libere o apparecchi elettrici non antideflagranti. Tenere sempre la valvola della bombola chiusa quando non in uso. Usare sempre con riduttore di pressione. Togliere la tensione alla molla del riduttore prima di aprire la valvola della bombola. Non sostare davanti al foro di uscita della bombola quando si apre la valvola. Usare con adeguata ventilazione. Non trasferire l'idrogeno da una bombola ad un'altra. Non miscelare gas nella bombola. Tenere sempre ben assicurate le bombole affinché non possano cadere. Tenere le bombole lontano dal sole o da fonti di calore. Non tenere in ambienti corrosivi. Non usare bombole danneggiate o senza etichetta.

Elio. Compresso sotto alta pressione. Riduce l'ossigeno disponibile per la respirazione, tenere il contenitore chiuso. Usare con ventilazione adeguata. Non entrare nei locali di conservazione se non sono adeguatamente ventilati. Usare sempre un regolatore di pressione. Togliere la tensione alla molla del riduttore prima di aprire la valvola della bombola. Non trasferire il gas da una bombola all'altra. Tenere sempre ben avvicinate le bombole affinché non possano cadere. Non sostare davanti al foro di uscita quando si apre la bombola. Tenere la bombola lontano dal sole o da sorgenti di calore. Non tenere in ambienti corrosivi. Non usare bombole danneggiate o senza etichetta. Non usare per inalazione, e farne solo uso tecnico.

Nota 3: È possibile utilizzare anche palmitil palmitato o miristil stearato

4.7. Gas ausiliari:

- idrogeno, puro per gascromatografia
- aria, pura per gascromatografia.

AVVERTENZA

Aria. Gas compresso sotto alta pressione. Usare con cautela in presenza di sostanze combustibili in quanto la temperatura di autoaccensione della maggior parte dei composti organici nell'aria si abbassa notevolmente ad alta pressione. Tenere sempre la valvola della bombola chiusa quando non si usa. Usare sempre con riduttore di pressione, togliere la tensione alla molla del riduttore prima di aprire la valvola della bombola. Non sostare davanti al foro di uscita della bombola quando si apre la valvola. Non trasferire il gas da una bombola all'altra. Non miscelare gas nella bombola. Tenere sempre ben assicurate le bombole affinché non possano cadere. Tenere le bombole lontane dal sole o da sorgenti di calore. Non tenere in ambienti corrosivi. Non usare bombole danneggiate o senza etichetta. Non usare per inalazione o per apparecchi respiratori l'aria destinata ad usi tecnici.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Preparazione della colonna cromatografica.

Mettere in sospensione 15 g di gel di silice (4.1) in n-esano (4.2) ed introdurla in colonna (3.2). A sedimentazione avvenuta completare l'assestamento mediante l'uso di un vibratore elettrico (3.5) al fine di 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 campione di riferimento (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.

Trasferire il campione così preparato nella colonna cromatografica aiutandosi con due porzioni da 2 ml ciascuna di n-esano (4.2).

Lasciare fluire il solvente fino ad un battente di 1 mm quindi far percolare altri 70 ml di n-esano allo scopo di allontanare i n-alcanti naturalmente presenti, iniziare quindi l'eluizione cromatografica raccogliendo 180 ml di miscela (*Nota 4*) (*Nota 5*) n-esano/etere etilico nel rapporto 99:1, rispettando un flusso di circa 15 gocce ogni 10 secondi. L'ambiente in cui si effettua l'eluizione del campione dovrà essere a una temperatura di $22^{\circ}\text{C} \pm 4$.

Evaporare la frazione così ottenuta mediante evaporatore rotante (3.6) fino ad allontanamento quasi completo del solvente, eliminare gli ultimi 2 ml con l'aiuto di un debole flusso di azoto e riprendere il tutto con 2-4 ml di n-eptano.

Nota 4: La miscela n-esano/etere etilico (99:1) dovrà essere preparata ogni giorno.

Nota 5: Onde controllare visivamente la corretta eluizione delle cere, è possibile aggiungere al campione in soluzione 100 μl di Sudan I 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.

5.2. Analisi gascromatografica

5.2.1. Operazioni preliminari

Installare nel gascromatografo (3.3) la colonna, collegando il terminale di ingresso connesso col sistema on column, ed 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 e iniziare un riscaldamento graduale fino a raggiungere, dopo circa 4 h, la temperatura di 350 °C.

Mantenere tale temperatura per almeno 2 h, 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 (*Nota 6*)

Le condizioni operative di massima sono le seguenti:

- temperatura della colonna:

inizio a 80°C (1') $\xrightarrow{20^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 240°C $\xrightarrow{5^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 325°C (6') $\xrightarrow{20^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 340°C (10')

- temperatura del rivelatore: 350°C;
- quantità di sostanza iniettata: 1 µl della soluzione (2-4 ml) di n-eptano
- gas di trasporto: elio o idrogeno alla velocità lineare ottimale per il gas prescelto. (Vedere Appendice A).
- 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 ed una risoluzione soddisfacente dei picchi (vedi figura) e una ritenzione dello Standard interno di 18 ± 3 minuti e il picco delle cere più rappresentativo deve avere un'altezza superiore al 60% del fondo scala.

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.

Nota 6: Vista l'elevata temperatura finale è ammessa una deriva positiva che non deve superare il 10% del fondo scala.

5.3. Esecuzione dell'analisi

Con la microsiringa da 10 µl si preleva 1 µl di soluzione; si alza lo stantuffo della siringa in modo che l'ago sia vuoto. Si introduce l'ago attraverso il dispositivo di iniezione e dopo 1-2 s si inietta rapidamente e si estrae quindi lentamente l'ago dopo circa 5 s.

Si effettua la registrazione fino a completa eluizione delle cere.

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

5.4. Identificazione dei picchi

L'identificazione dei singoli picchi viene effettuata in base ai tempi di ritenzione e per paragone con 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

Si procede al calcolo con l'integratore delle aree dei picchi dello standard interno e degli esteri alifatici da C 40 a C 46.

Si calcola il contenuto di ogni singolo estere, in mg/kg di sostanza grassa come segue:

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

dove:

A_x = è l'area del picco del singolo estere, in millimetri quadrati;

A_s = è l'area del picco dello standard interno, in millimetri quadrati;

m_s = massa di standard interno aggiunta, in milligrammi;

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

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Riportare la somma dei contenuti delle singole cere da C40 a C46 (*Nota 7*) in milligrammi per chilogrammo di sostanza grassa (ppm).

I risultati vengono espressi con una cifra decimale.

Nota 7: *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 allegata. Qualora l'estere C46 risulti sdoppiato, si consiglia, al fine della sua identificazione, di analizzare la frazione cerosa di un olio di sansa dove il picco C46 risulta individuabile in quanto nettamente maggioritario.*

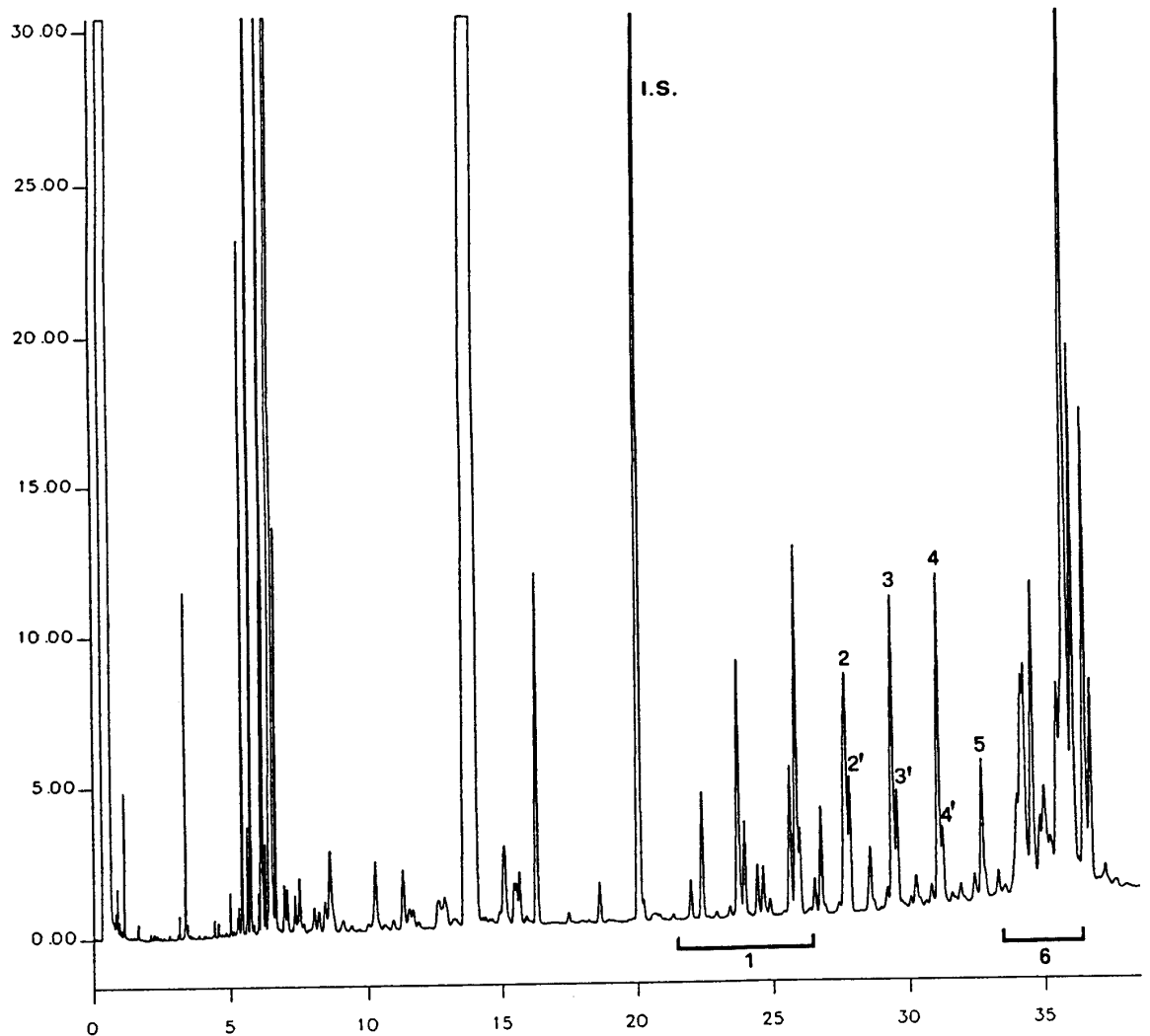


FIGURA -Esempio di gascromatogramma della frazione cere di un olio di oliva (*)

Legenda:

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

(*) Dopo l'eluizione degli esteri degli steroli il tracciato gascromatografico non deve presentare picchi significativi (trigliceridi)

APPENDICE

Determinazione della velocità lineare del gas

Nel gascromatografo, regolato alle normali condizioni operative, si iniettano 1:3 μ l 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).

Le 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 s.

—

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 cere (mg/kg)

	A	B	C	D	E
n	19	19	19	19	19
outliers	5	5	4	3	5
mean	120.32	123.14	222.41	174.1	345.93
r	9.51	12.56	10.51	12.22	14.91
S_r	3.39	4.48	3.75	4.72	5.32
RSD_r (%)	2.82	3.64	1.69	2.71	1.54
R	38.83	48.89	58.93	25.65	44.39
S_R	13.86	17.46	21.04	9.16	15.85
RSD_R(%)	11.53	14.18	9.46	5.26	4.58

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
-