



DETERMINAZIONE DEI BIOFENOLI DEGLI OLI DI OLIVA MEDIANTE HPLC

1

OGGETTO

La presente norma descrive un procedimento per l'estrazione ed il dosaggio dei composti minori polari di natura biofenolica (BMP) quali i derivati naturali e ossidati dell'oleuropeina e del ligstroside, i lignani, i flavonoidi e gli acidi fenolici presenti negli oli di oliva, utilizzando la tecnica HPLC. Il campo di misura va da 30 mg/kg a 800 mg/kg.

AVVERTENZA: l'utilizzo della presente norma può richiedere l'impiego di apparecchiature e sostanze pericolose o l'esecuzione di operazioni che comportano un certo rischio. La presente norma internazionale non ha lo scopo di affrontare tutti i problemi di sicurezza connessi col suo impiego, perciò l'utilizzatore è responsabile della definizione di procedure di sicurezza e di igiene appropriate e del rispetto della legislazione vigente.

2

PRINCIPIO

La metodica si basa su un'estrazione dei composti minori polari di natura biofenolica direttamente dall'olio di oliva mediante una soluzione metanolica e successiva determinazione quantitativa mediante HPLC con rivelatore UV a 280 nm. Lo standard interno è costituito da acido sirigico.

Il contenuto relativo ai derivati naturali e ossidati dell'oleuropeina e del ligstroside, dei lignani, dei flavonoidi e degli acidi fenolici viene espresso in mg/kg di tirosolo.

3

APPARECCHIATURA

3.1

Cromatografo liquido ad alta risoluzione (HPLC), a gradiente ternario, munito di colonna (4,6 mm x 25 cm) a fase inversa C18, del tipo Spherisorb ODS-2 5µm, 100 Å°, corredato di rivelatore spettrofotometrico UV a 280 nm e di integratore. Temperatura ambiente.

La registrazione degli spettri per un tentativo di identificazione è facilitata dall'uso di un rivelatore di fotodiodi con range di acquisizione da 200 nm a 400 nm.

3.2

Matracci da 10 ml e 100 ml, classe A.

3.3

Pipetta da 100 µl, 1000 µl e 5000 µl.

3.4

Provette con tappo a vite, da 10 ml.

3.5

Agitatore per provette^{fn}.

3.6

Bagno di estrazione a ultrasuoni.

3.7

Filtri a siringa Ø13 mm, tipo PVDF 0.45 µm.

3.8 **Centrifuga** in grado di assicurare una velocità di 5000 min⁻¹.

3.9 **Bilancia**, in grado di garantire una accuratezza di $\pm 0,001$ g.

3.10 **Siringhe in plastica** da 5 ml.

3.11 Normale vetreria da laboratorio.

4 REAGENTI

I reagenti devono essere puri per analisi cromatografiche HPLC.

4.1 **Acido orto-fosforico 85% (V/V)**.

4.2 **Metanolo** per cromatografia.

4.3 **Acetonitrile** per cromatografia.

4.4 **Acqua** per cromatografia.

4.5 **Gradiente ternario lineare di eluizione:** acqua 0,2 % H₃PO₄ (V/V) (A), metanolo (B), acetonitrile (C). I solventi di eluizione devono essere degassati. Lo sviluppo del gradiente deve avvenire secondo lo schema:

Gradiente di eluizione

Tempo min	Flusso ml/min	A %	B %	C %
0	1.00	96	2	2
40	1.00	50	25	25
45	1.00	40	30	30
60	1.00	0	50	50
70	1.00	0	50	50
72	1.00	96	2	2
82	1.00	96	2	2

4.6 **2- (4 - Idrossifenil) etanolo (tirosole) ≥ 98 %.**

4.7 **Acido 3,5 dimetossi 4-idrossi benzoico (acido siringico) ≥ 97 %.**

4.8 **Soluzione per l'estrazione:** metanolo/acqua 80/20 (V/V).

4.9 **Soluzione degli standard esterni di calibrazione (tirosole e acido siringico).** Pesare accuratamente 0,030 g di tirosole (4.6) e 0,015 g di acido siringico (4.7) in un matraccio tarato da 10 ml (3.2). Diluire a volume con la soluzione di metanolo/acqua 80/20 (V/V) (4.8). Prelevare 100 μ l (3.3) della soluzione e trasferirli in un matraccio tarato da 10 ml. Diluire a volume con la soluzione di metanolo/acqua 80/20 (V/V) (4.8).

Le concentrazioni della soluzione di calibrazione esterna sono le seguenti: tirosole 0,030 mg/ml, acido siringico 0,015 mg/ml.

Tale soluzione è stabile per 3 mesi in frigorifero a + 4 °C.

- 4.10** **Preparazione della soluzione di standard interno (acido siringico).** Pesare accuratamente 0,015 g di acido siringico (4.7) in un matraccio tarato da 10 ml e portare a volume con la soluzione di metanolo/acqua 80/20 (V/V) (4.8). Prelevare 1 ml (3.3) della soluzione e trasferirla in un matraccio tarato da 10 ml (3.2). Diluire a volume con la soluzione di metanolo/acqua 80/20 (V/V) (4.8). La concentrazione finale è di 0,015 mg/ml. Tale soluzione è stabile per 3 mesi in frigorifero a + 4 °C.

5 PROCEDIMENTO

5.1 Preparazione del campione

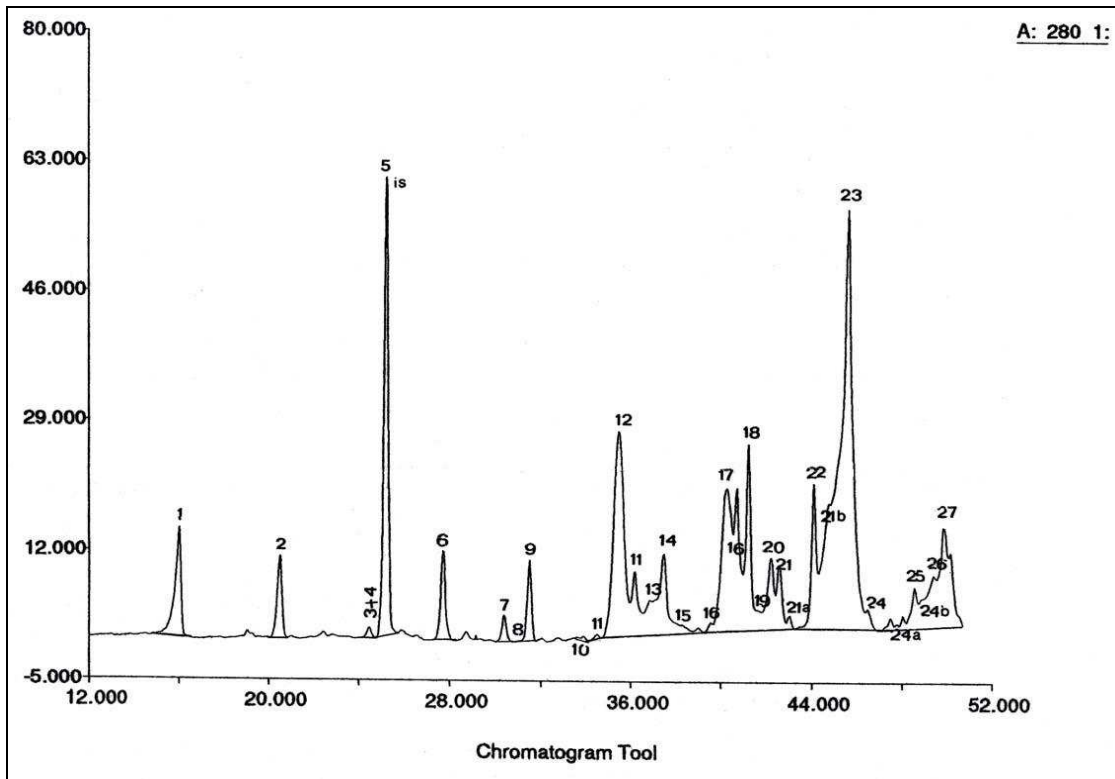
Pesare accuratamente 2,0 g di olio di oliva in una provetta con tappo a vite da 10 ml (3.4).
Trasferire 1 ml della soluzione di standard interno (4.10) nel campione precedentemente pesato.
Chiudere con tappo a vite e agitare (3.5) per 30 secondi esatti.
Aggiungere 5 ml (3.3) della soluzione di estrazione costituita da metanolo/acqua 80/20 (V/V) (4.8).
Agitare (3.5) per 1 minuto esatto.
Estrarre in bagno a ultrasuoni (36) per 15 minuti a temperatura ambiente.
Centrifugare a 5000 giri/min per 25 minuti (3.8).
Prelevare un'aliquota del surnatante e filtrare su siringa in plastica da 5 ml (3.10), con filtro in PVDF da 0,45 µm (3.7).

5.2 Analisi HPLC

L'accensione dello spettrofotometro UV deve avvenire almeno 1 ora prima dell'analisi.
La colonna cromatografica deve essere condizionata per almeno 15 minuti con il solvente di eluizione di composizione iniziale (acqua 0,2% H₃PO₄ (V/V)/metanolo/acetonitrile 96/2/2 (V/V/V)) (gradiente di eluizione).
È necessario effettuare sempre una prima corsa cromatografica definita "gradiente a vuoto" (per essere sicuri che non ci siano picchi interferenti di coeluizione), iniettando 20 µl di metanolo/acqua 80/20 (V/V) nel sistema HPLC.
Iniettare 20 µl della soluzione degli standard esterni di calibrazione (4.9), registrando il cromatogramma a 280 nm. Calcolare i valori dei fattori di risposta RF relativi a 1 µg di tirosolo e a 1 µg di acido siringico.
Calcolare il rapporto tra il fattore di risposta dell'acido siringico rispetto al tirosolo, denominato $RRF_{sir/tir}$. Registrare i valori in un apposito quaderno (6.2).
Iniettare 20 µl della soluzione finale del campione nel sistema HPLC, registrando il cromatogramma a 280 nm.
Eseguire due diverse determinazioni indipendenti sullo stesso campione e verificare che i risultati rientrino nei parametri di precisione del metodo.
Nella figura 1 viene riportato un cromatogramma tipico dei biofenoli di un olio extra vergine di oliva caratterizzato per singolo componente.
Per la valutazione del contenuto totale deve essere considerata la somma delle aree dei singoli picchi.
A fine giornata far fluire sulla colonna cromatografica metanolo/acetonitrile 1/1 (V/V) a flusso di 1,0 ml/min per almeno 15 minuti e conservare la colonna in metanolo/acetonitrile 1/1 (V/V).

Figura 1

Cromatogramma HPLC registrato a 280 nm relativo ai biofenoli presenti in un olio extra vergine di oliva



6 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

6.1 Calcolo dei fattori di risposta degli standard esterni di calibrazione (RF)

$RF_{1\mu g}$ (acido sirringico) = Area acido sirringico/ μg iniettati acido sirringico

$RF_{1\mu g}$ (tirosole) = Area tirosole/ μg iniettati tirosole

6.2 Calcolo del rapporto tra i due fattori di risposta (RRF)

$RRF_{sir/tir} = RF_{1\mu g}$ (acido sirringico)/ $RF_{1\mu g}$ (tirosole)

Il valore di $RRF_{sir/tir}$ deve essere costante e compreso nel range $5,1 \pm 0,4$. Tale valore permette di esprimere il risultato finale in tirosole, utilizzando come standard interno l'acido sirringico.

6.3

Calcolo del contenuto in biofenoli nell'olio vergine di oliva

Il contenuto in biofenoli (derivati naturali e ossidati dell'oleuropeina e del ligstroside, lignani, flavonoidi e acidi fenolici), espresso in mg/kg, viene calcolato misurando la somma delle aree dei relativi picchi cromatografici (identificati nella tabella 1), secondo la formula che segue, esprimendo il risultato senza cifre decimali.

$$(\text{mg/kg}) = \frac{(\Sigma A) \times 1000 \times \text{RRF}_{\text{sir/tir}} \times (\text{P ac. sir.})}{(\text{A ac. sir.}) \times (\text{P})}$$

dove:

(ΣA) è la somma delle aree dei picchi dei biofenoli (idrossitorosolo, tirosolo, derivati naturali e ossidati dell'oleuropeina e del ligstroside, lignani, flavonoidi e acidi fenolici) registrate a 280 nm;

A ac. sir. è l'area dello standard interno dell'acido siringico registrata a 280 nm;

1000 è il fattore utilizzato per esprimere il risultato in mg/kg;

P è il peso in grammi di olio utilizzato;

$\text{RRF}_{\text{sir/tir}}$ è il coefficiente di moltiplicazione utilizzato per esprimere i risultati finali in tirosolo;

P ac. sir. è il peso in milligrammi di acido siringico utilizzato come standard interno in 1 ml di soluzione aggiunta al campione.

Tabella 1

Identificazione dei picchi dei biofenoli

Valori dei massimi di assorbimento (max UV abs) e dei tempi di ritenzione relativi (RRT)*

N. picco	Biofenoli	RRT*	Max UV abs. nm
1	Idrossitirosolo	0.62	230-280
2	Tirosolo	0.80	230-275
3	Acido vanillico	0.96	260
4	Acido caffeico	0.99	325
5	Acido siringico (standard Interno)	1.00	280
6	Vanillina	1.10	310
7	Acido p-coumarico	1.12	310
8	Idrossitirosilacetato	1.20	232-285
9	Acido ferulico	1.26	325
10	Acido orto-coumarico	1.31	325
11;11a	Aglicone decarbossimetiloleuropeina, forma dialdeidica ossidata	-	235-280
12	Aglicone decarbossimetiloleuropeina, forma dialdeidica	1.45	235-280
13	Oleuropeina	1.48	230-280
14	Aglicone oleuropeina forma dialdeidica	1.52	235-280
15	Tirosilacetato	1.54	230-280
16;16a	Aglicone decarbossimetilligstroside forma dialdeidica ossidata	1.63	235-275
17	Aglicone decarbossimetilligstroside, forma dialdeidica	1.65	235-275
18	Pinoresinolo, 1 acetossipinoresinolo	1.69	232-280
19	Acido cinnamico	1.73	270
20	Aglicone ligstroside, forma dialdeidica	1.74	235-275
21;21a;21b	Aglicone oleuropeina, forma aldeidica e idrossilica ossidata	-	235-280
22	Luteolina	1.79	255-350
23	Aglicone oleuropeina, forma aldeidica e idrossilica	1.87	235-280
24;24a;24b	Aglicone ligstroside, forma aldeidica e idrossilica ossidata	-	235-275
25	Apigenina	1.98	230-270-340
26	Metil-luteolina	-	255-350
27	Aglicone ligstroside, forma aldeidica e idrossilica	2.03	235-275

(*) Il valore del tempo di ritenzione relativo è calcolato rispetto al tempo di ritenzione dell'acido siringico. L'identificazione è stata eseguita per HPLC-MS.

7

RAPPORTO DI PROVA

Nel rapporto di prova dovranno essere riportate le informazioni seguenti:

- (a) Il riferimento al presente metodo.
- (b) I risultati di prova espressi in mg/kg di olio (senza cifre decimali).
- (c) Il valore di RRF utilizzato per il calcolo.
- (d) Qualsiasi deviazione dalla presente norma risultante da un accordo tra le parti o da altre circostanze.
- (e) I dati di riconoscimento del laboratorio, la data di effettuazione della prova e la firma del responsabile.

MARGINI DI PRECISIONE

1. Analisi dei risultati della prova interlaboratorio

I margini di precisione del metodo figurano nella tabella allegata.

Nel 2008, 17 laboratori di 8 paesi riconosciuti dal COI hanno svolto una prova collettiva proposta dal Segretariato esecutivo.

Campione A – Olio extra vergine di oliva (Italia)
Campione B – Olio extra vergine di oliva (Spagna)
Campione C – Olio extra vergine di oliva (Tunisia)
Campione D – Olio extra vergine di oliva (Slovenia)
Campione E – Olio extra vergine di oliva (Grecia)
Campione R – Olio extra vergine di oliva (Italia)

Il Segretariato esecutivo del COI ha condotto l'analisi statistica dei risultati della prova interlaboratorio secondo le regole definite dalla norma ISO 5725.

Accuratezza (veridicità e precisione) dei metodi e dei risultati delle misurazioni

L'analisi 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).

La tabella riporta:

N	Numero dei laboratori che hanno partecipato alla prova
Outlier	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.
Sr	Deviazione standard della ripetibilità
RSDr	(%) Coefficiente di variazione della ripetibilità ($Sr \times 100 / \text{mean}$)
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 ($Sr \times 100 / \text{mean}$)
Ho _R	è il valore di HORRAT per la riproducibilità, $[RSD_{R \text{ effettivo}} / RSD_{R \text{ teorico}}] = 2^{(1-0.5 \log C)}$ e C è la concentrazione del composto espressa elevata alla decima (equazione di Horwitz).

Margini di previsione del contenuto totale dei biofenoli, (mg/1000 g)

	CAMPIONE	CAMPIONE	CAMPIONE	CAMPIONE	CAMPIONE	CAMPIONE
	A	B	C	D	E	R
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Mean	694	573	153	343	297	301
N	17	17	17	17	17	17
Outlier	3	3	1	2	2	2
non-outlier	14	14	16	15	15	15
numero prove	28	28	32	30	30	30
R	29	36	18	24	22	17
S_r	10.4	12.7	6.4	8.7	7.7	6.2
RSD_r (%)	2	2	4	3	3	2
R	101	84	60	63	77	32
S_R	36,0	29,9	21,3	22,4	27,5	11,5
RSD_R(%)	5	5	14	7	9	4
HO_R	0.9	0.8	1.9	1.0	1.4	0.6

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