



METODO DI ANALISI

DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI ALCOLI ALIFATICI MEDIANTE GASCROMATOLOGRAFIA 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. Imbutto 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. Imbutto cilindrico filtrante a setto poroso G3 (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, 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 di tipo "split" con elemento vaporizzante in vetro persilanizzato, o di tipo "on column".
 - 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 da 20 a 30 m, diametro interno da 0,25 a 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 etanolica circa 2 N: si sciolgono, 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. (5.2.2).
- 4.7. Acetone, per cromatografia (5.2.2).
- 4.8. Esano, per cromatografia (5.2.2).

- 4.9. Etere etilico, per cromatografia (5.2.2).
- 4.10. Cloroformio, puro per analisi.
- 4.11. Soluzione di riferimento per la cromatografia su placca: soluzione al 5% in cloroformio di 1-eicosanolo o di una frazione di alcoli ottenuta come indicato al punto 5.2 a partire dall'insaponificabile di un olio di sansa di oliva.
- 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 C₂₀ a C₂₈. 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 (nota 2).

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(*).

(*) In questi casi, in particolare, si deve utilizzare la miscela eluente benzene-acetone 95/5 (v/v) per ottenere una buona separazione delle bande.

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).

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).

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 blando riscaldamento in leggera corrente di azoto, si riprende con qualche goccia di acetone, si riporta ancora a secco, si pone 10 minuti circa in stufa a 105 °C, indi si lascia raffreddare in essiccatore e si pesa.

Il residuo contenuto nella provetta è costituito dalla frazione alcolica.

5.3. Preparazione dei trimetilsilileteri.

5.3.1. Nella provetta contenente la frazione alcolica si aggiunge il reattivo per la sililazione, costituito da una miscela di piridina-esametildisilazano-trimetilclorosilano 9:3:1 (V/V/V) (nota 5) in ragione di 50 microlitri per ogni milligrammo di alcoli alifatici, evitando ogni assorbimento di umidità (nota 6).

Nota 5: Esistono in commercio soluzioni già pronte per l'uso; sono inoltre disponibili altri reagenti silanizzanti, quali ad esempio il bis-trimetiltrifluorolacetammide + 1 % trimetilclorosilano da diluire con uno stesso volume di piridina anidra.

Nota 6: L'eventuale formazione di una leggera opalescenza è normale e non è causa di alcun disturbo. La formazione di un flocculato bianco o la comparsa di una colorazione rosa sono indizio della presenza di umidità o di alterazione del reattivo. In questo caso la prova dovrà essere ripetuta.

5.3.2. Si tappa la provetta, si agita cautamente (senza capovolgere) fino a completa solubilizzazione degli alcoli alifatici. Si lascia a sé per almeno 15 minuti a temperatura ambiente, quindi si centrifuga per alcuni minuti: la soluzione limpida è pronta per l'analisi gascromatografica.

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. Le condizioni operative di massima per un sistema cromatografico con iniettore “split” 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'iniettore: 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 mVolts 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 C₂₆ deve essere di 18 ± 5 minuti,
- il picco dell'alcol C₂₂ deve giungere a 80 ± 20 % del fondo scala per l'olio di oliva e a 40 ± 20 % del fondo scala per gli oli di sansa di oliva.

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 condizioni.

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 C₂₂ C₂₄, C₂₆, C₂₈.

5.4.5.2. Si calcola il contenuto di ogni singolo alcool alifatico, in mg/1000 g di sostanza grassa come segue:

$$\text{Alcool x} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

in cui:

A_x = area del picco dell'alcool x;

A_s = area del picco dell'1-eicosanolo;

m_s = peso di 1-eicosanolo aggiunto, in milligrammi;

m = peso del campione prelevato per la determinazione, in grammi.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Si riportano i contenuti dei singoli alcoli alifatici, in mg/1000 g di sostanza grassa e, come "alcoli alifatici totali", la loro somma.

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 (tM).

La velocità lineare in cm/s è data da L/tM in cui L è la lunghezza della colonna in centimetri e tM è il tempo cronometrato in secondi.

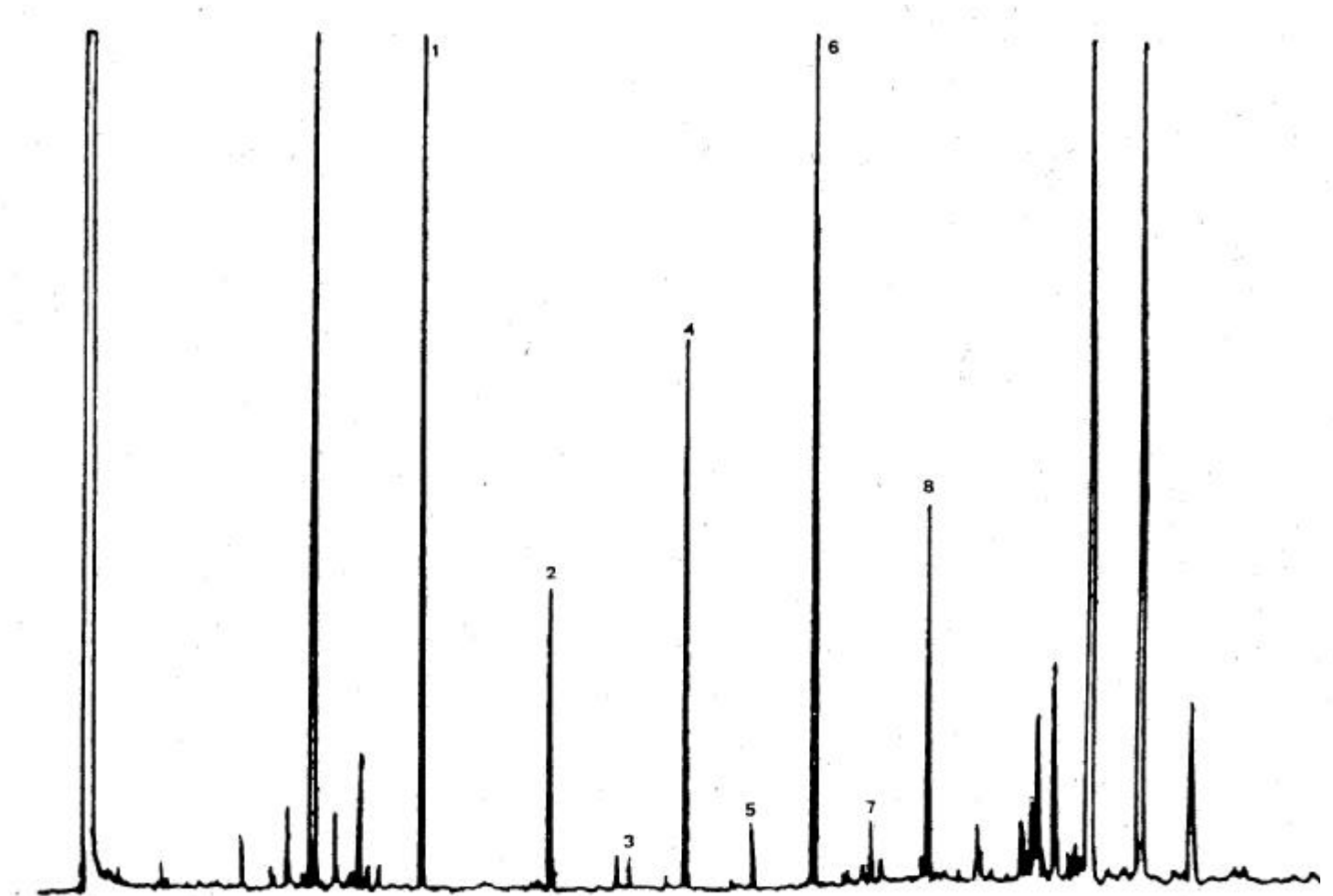


Figura 1- Cromatogramma della frazione alcolica di un olio di oliva vergine

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

MARGINI DI PRECISIONE DEL METODO

1. Analisi dei risultati del ring test

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

Al ring test, organizzato tra maggio e giugno del 2003 e coordinato da Arturo Cert (Istituto de la Grasa, Siviglia), hanno partecipato 15 laboratori riconosciuti dal Consiglio oleicolo internazionale e appartenenti a sette diversi paesi membri.

L'esperimento si è svolto su cinque campioni: olio di oliva vergine lampante (LVOO), olio di sansa di oliva grezzo derivante da sansa proveniente dal decanter a due fasi (COPO), miscele dei due oli citati.

- A: 100 % LVOO
- B: 85% LVOO + 15% COPO
- C: 75% LVOO + 25% COPO
- D: 60% LVOO + 40% COPO
- E: 100% COPO.

L'elaborazione statistica dei risultati della prova, a cura del coordinatore, è stata realizzata in base agli orientamenti forniti dalle "Collaborative Study Guidelines", pubblicate sul *J. of AOAC International* 78, 143A-160A, 1995. . L'esame dei valori aberranti è stato condotto 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 x 100 / 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 ($S_R \times 100 / \text{mean}$)
- HoR** Horowitz ratio $[\frac{RSD_{R \text{ exp}}}{RSD_{R \text{ teor}}}]$ where $RSD_{R \text{ teor}} = 2^{(1-0.5 \log C)}$ and C is the concentration of the compound expressed to the power 10.

Contenuto totali in alcoli alifatici C22 + C24 + C26 + C28 (mg/kg)

	A	B	C	D	E
n	15	15	15	15	15
outliers	3	1	1	1	1
mean	245	363	440	541	997
r	16	28	29	36	54
S_r	5.8	10	10	13	19
RSD_r (%)	2.4	2.8	2.3	2.4	1.9
R	47	78	161	150	198
S_R	17	28	58	54	71
RSD_R(%)	6.9	7.6	13.1	9.9	7.1
HoR	0.35	0.41	0.72	0.56	0.44