



## **METODO GLOBALE PER LA SCOPERTA DI OLI ESTRANEI NEGLI OLI DI OLIVA**

### **1. OGGETTO**

Scopo del presente metodo è individuare la presenza di oli vegetali estranei nell'olio di oliva. Il metodo individua gli oli vegetali alto linoleici (soia, colza, girasole, ecc.) e alcuni oli vegetali alto oleici (nociola, girasole alto oleico e oli di sansa). Il livello di individuazione dipende dal tipo di olio estraneo e dalla varietà delle olive. Per l'olio di nocciole si raggiunge di solito un livello di individuazione tra il 5 e il 15%. Il metodo non è in grado di individuare il tipo di olio estraneo, e si limita ad indicare se l'olio è genuino o meno.

### **2. PRINCIPIO**

L'olio viene purificato mediante estrazione in fase solida (SPE) su cartucce di gel di silice. Il contenuto in triacilgliceroli (TAG) è determinato mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione in fase inversa, mediante un misuratore dell'indice di rifrazione e con propionitrile come fase mobile. Gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) vengono preparati a partire da oli purificati per mezzo di metilazione con una soluzione fredda di KOH in metanolo (metodo A in COI/T.20/Doc. n. 24) e in seguito gli esteri sono analizzati mediante gascromatografia capillare utilizzando colonne polari (COI/T.20/Doc.n. 17). La composizione teorica del triacilglicerolo si calcola a partire dalla composizione degli acidi grassi mediante un programma informatico ipotizzando una distribuzione 1,3 random, 2 random degli acidi grassi nel triacilglicerolo, con restrizioni per gli acidi grassi saturi in posizione 2. Il metodo di calcolo è una modifica della procedura descritta dal metodo COI/T.20/Doc. n. 20. Diversi algoritmi matematici vengono calcolati in base alle composizioni (HPLC) di triacilglicerolo teoriche e sperimentali, e i valori risultanti sono confrontati con quelli contenuti in una base dati in cui sono stati inseriti dati provenienti da oli oliva genuini.

### 3. MATERIALI E REAGENTI

- 3.1. Purificazione dell'olio
  - 3.1.1. matracci conici da 25 ml.
  - 3.1.2. provette da 5 ml con tappo a vite e tappi muniti di giunti PTFE.
  - 3.1.3. Cartucce di gel di silice (1 g, 6 ml) per l'estrazione in fase solida (e.g. tipo Waters, Massachusetts, USA).
  - 3.1.4. *n*-esano di grado analitico.
  - 3.1.5. Miscela solvente esano/ossido di diethyle (87:13, v/v).
  - 3.1.6. *n*-eptano di grado analitico.
  - 3.1.7. Acetone di grado analitico
  
- 3.2. Analisi HPLC dei triacilgliceroli
  - 3.2.1. Microsiringhe (50  $\mu$ L) e aghi per HPLC
  - 3.2.2. Propionitrile, purezza superiore o grado HPLC (per esempio, ROMIL, Cambridge, United Kingdom), usato come fase mobile.
  - 3.2.3. Colonna HPLC (25 cm x 4 mm d.i.), riempita con RP-18 (particelle da 4 $\mu$ m).
  
- 3.3. Preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi  
(Vedi Metodo A in COI/T.20/Doc. n. 24)
  - 3.3.1. Metanolo con un contenuto di acqua non superiore allo 0.5%.
  - 3.3.2. Eptano di grado analitico.
  - 3.3.3. Potassio idrossido, soluzione metanolica 2 N: si sciolgono 1.1 g di idrossido di potassio in 10 ml di metanolo.
  - 3.3.4. provette da 5 ml con tappo a vite e tappi muniti di giunti PTFE.
  
- 3.4. analisi gascromatografica dei FAME  
(Vedi metodo per la determinazione degli acidi grassi *trans*isomeri mediante analisi gascromatografica con colonna capillare; COI/T.20/Doc. n. 17).
  - 3.4.1. Microsiringhe da 5  $\mu$ L e aghi per GC.
  - 3.4.2. Gas vettore: idrogeno o elio
  - 3.4.3. Idrogeno ed ossigeno per rivelatore FID
  - 3.4.4. Gas ausiliari: azoto o elio
  - 3.4.5. Colonna capillare in silice fusa (50-60 m x 0.25 – 0.30 mm d.i.) ricoperta di cianopropilpolisilossano o cianopropilfenilsilossano (tipo SP 2380 o simili) la cui pellicola ha uno spessore compreso tra 0,20 a 0,25  $\mu$  m.

### 4. APPARECCHIATURA

- 4.1. Dispositivo per vuoto per l'estrazione in fase solida
- 4.2. Evaporatore rotativo.

- 4.3. Cromatografo liquido ad alte prestazioni costituito da
  - 4.3.1. Degassificatore per la fase mobile.
  - 4.3.2. Valvola di iniezione Rheodyne (con loop da 10 $\mu$ L).
  - 4.3.3. Pompa ad alta pressione.
  - 4.3.4. Camera termostatica per colonna HPLC in grado di mantenere temperature sub-ambiente (15-20 °C), (per esempio, tipo Peltier).
  - 4.3.5. Rivelatore dell'indice di rifrazione.
  - 4.3.6. Sistema informatico per l'acquisizione dei dati munito di un programma di integrazione.
  
- 4.4. Gascromatografo capillare descritto in COI/T.20/Doc. n. 17 dotato di
  - 4.4.1. sistema di iniezione split
  - 4.4.2. Rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID)
  - 4.4.3. Forno con a temperatura programmabile
  - 4.4.4. Sistema informatico di acquisizione dei dati munito di un programma di integrazione.
  
- 4.5. PC dotato di programma Microsoft EXCEL , versione 2000 o XP.

## 5. PROCEDIMENTO ANALITICO

### 5.1. Purificazione dell'olio

Una cartuccia di gel di silice SPE si sistema in un apparecchio per l'eluizione sotto vuoto e si lava con 6 ml di esano. Si interrompe il vuoto per evitare l'essiccamento della colonna e si sistema sotto la cartuccia un matraccio conico. Si deposita nella colonna una soluzione di olio (0,12 g circa) in 0,5 ml di esano. La soluzione si introduce e si eluisce con 10 ml di esano/ossido di diethylene (3.15) (87.13 v/v) sotto vuoto. Si omogeneizzano gli eluati e si trasferisce circa la metà del volume in un'altro matraccio conico. Entrambe le aliquote sono evaporate fino ad essiccamento, separatamente, in un evaporatore rotante, operando sotto pressione ridotta, a temperatura ambiente. Per l'analisi dei triacilgliceroli, si dissolve uno dei residui in 1 ml di acetone (vedi primo paragrafo del punto 5.2) e si versa la soluzione in una provetta di vetro dal tappo a vite. L'altro residuo si dissolve in 1 ml di *n*-eptano e si versa in una seconda provetta con tappo a vite per preparare gli esteri metilici degli acidi grassi.

Nota: La purificazione dell'olio può anche essere realizzata mediante una colonna di gel di silice, secondo quanto descritto dal metodo IUPAC 2.507.

## 5.2. Analisi HPLC dei triacilgliceroli

Montare il sistema HPLC mantenendo la temperatura della colonna a 20°C e usando il propionitrile come fase mobile a una velocità di efflusso di 0,6 ml/min. Una volta stabilizzata la linea di base far passare una iniezione di solvente; se la linea base appare alterata nella regione da 12 a 25 minuti, usare un altro tipo di acetone o una miscela di propionitrile/acetone (25:45) per risolvere il campione.

Nota: Alcuni tipi di acetone producono alterazioni della linea di base nella regione sopra citata.

Iniettare un'aliquota di 10 µl della soluzione olio purificato in acetone (5%). Il passaggio richiede circa 60 minuti. La temperatura del forno e/o la velocità di efflusso devono essere programmate al fine di ottenere un cromatogramma simile a quello rappresentato in figura 1: la trilinoleina (picco 1) compare a 15.5 minuti e le risoluzioni tra le coppie LLL/OLL (picchi 1 e 2) e OLL/OLLn (picchi 4 e 5) sono buone.

L'altezza del picco 2 (OLLn+PoLL) deve essere pari ad almeno il 3% del fondo scala.

## 5.3. Preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi.

Si aggiungono 0.1 mL di una soluzione metanolica di idrossido di potassio alla soluzione di olio purificato in 1 mL di *neptano*. Tappare la provetta e avvitare bene. Si agita la provetta vigorosamente per 15 secondi e si lascia stratificare finché lo strato superiore non diventa trasparente (5 minuti), La soluzione di *n*-eptano è pronta per l'iniezione nel gascromatografo. La soluzione può essere lasciata a temperatura ambiente per un massimo di 12 ore.

## 5.4. Analisi gascromatografica degli esteri metilici degli acidi grassi

Il procedimento da impiegare è quello descritto nel metodo per la determinazione degli acidi grassi *trans*-insaturi (COI/T.20/Doc. n. 17).

Regolare il complesso gascromatografico a una temperatura di 165 °C. La temperatura raccomandata è isotermica a 165°C per 10 minuti, in seguito portata a 200°C

Si raccomanda una temperatura dell'iniettore tra 220 °C e 250 ° C per ridurre al minimo la formazione di acidi grassit*rans* (v. metodo COI). Temperatura del rilevatore 250°C. Come gas di trasporto vanno usati idrogeno o elio a una pressione in testa alla colonna di 130 kPa circa. Volume di sostanza iniettata 1µ nella modalità di iniezione a split.

Deve essere ottenuto un profilo gascromatografico simile a quello della Figura 2. Verificare in particolare la risoluzione dei picchi C18:3 e C20:1 (il picco C18:3 deve comparire prima del picco C20:1). Per ottenere queste condizioni la temperatura iniziale e/o la pressione in testa di colonna devono essere ottimizzate. Regolare le condizioni operative dell'iniettore (temperatura, rapporto di splittaggio e volume iniezione) per minimizzare la discriminazione dell'acido palmitico e palmitoleico.

L'altezza del picco C20:0 deve essere del 20% circa del fondo scala per consentire la quantificazione degli isomeri *trans*. Se il picco C18:0 appare distorto, ridurre il quantitativo del campione.

## 5. INTEGRAZIONE DEI PICCHI CROMATOGRAFICI

### 5.1. Cromatogramma HPLC

La figura 1 mostra un tipico cromatogramma HPLC dei triacilgliceroli di un olio di oliva purificato. Per l'integrazione dei picchi si devono tracciare tre linee di base: la prima tra l'inizio del picco 1 e la fine del picco 3; la seconda tra l'inizio del picco 4 e la valle prima del picco 8; la terza tra la valle che precede il picco 8 e la fine del picco 18.

L'area totale risulta dalla somma delle aree di tutti i picchi (identificati e non identificati) dal picco 1 al picco 18. La percentuale di ogni picco si ricava mediante

$$\text{TAG}_x (\%) = 100 (A_x + A_T)$$

I risultati in percentuale devono essere espressi con due cifre decimali.

### 5.2. Cromatogramma GC

La figura 2 mostra un cromatogramma degli esteri alchilici degli acidi grassi ottenuto da un olio di oliva purificato. È necessario calcolare le percentuali dei seguenti acidi grassi:

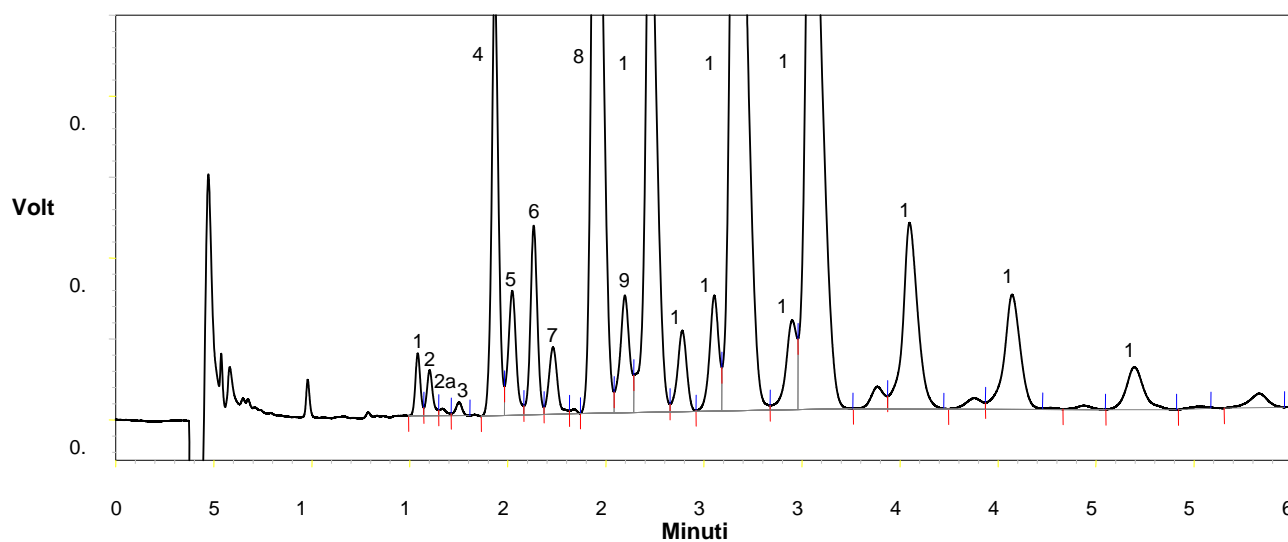
Palmitico;	P (C16:0) = estere metilico + estere etilico
Stearico;	S (C18:0) = estere metilico
Palmitoleico;	Po (C16:1) = somma degli esteri metilici dei due isomeri <i>cis</i> -
Oleico;	O (C18:1) = somma degli esteri metilici dei due isomeri <i>cis</i> - + estere etilico + <i>trans</i> -isomeri
Linoleico;	L (C18:2) = estere metilico + estere etilico + isomeri <i>trans</i>
Linolenico;	Ln (C18:3) = estere metilico + isomeri <i>trans</i>
Arachico;	A (C20:0) = estere metilico
Eicosenoico (gondoico);	G (C20:1) = estere metilico

Gli esteri etilici e gli isomeri *trans* possono essere assenti dal cromatogramma GC. L'area totale (AT) è la somma di tutti i picchi che appaiono nel cromatogramma, da C:14 a C:24, tranne il picco corrispondente allo squalene. La percentuale di ogni picco si calcola come segue:

$$FA_x (\%) = 100 (A_x + A_T)$$

I risultati devono essere espressi con due cifre decimali.

Per i calcoli del programma informatico non è necessario normalizzare a 100 in quanto tale operazione viene effettuata automaticamente.



**Figura 1.** Cromatogramma HPLC dei triacilgliceroli di un olio di oliva vergine “Chamlali” . Componenti principali dei picchi cromatografici

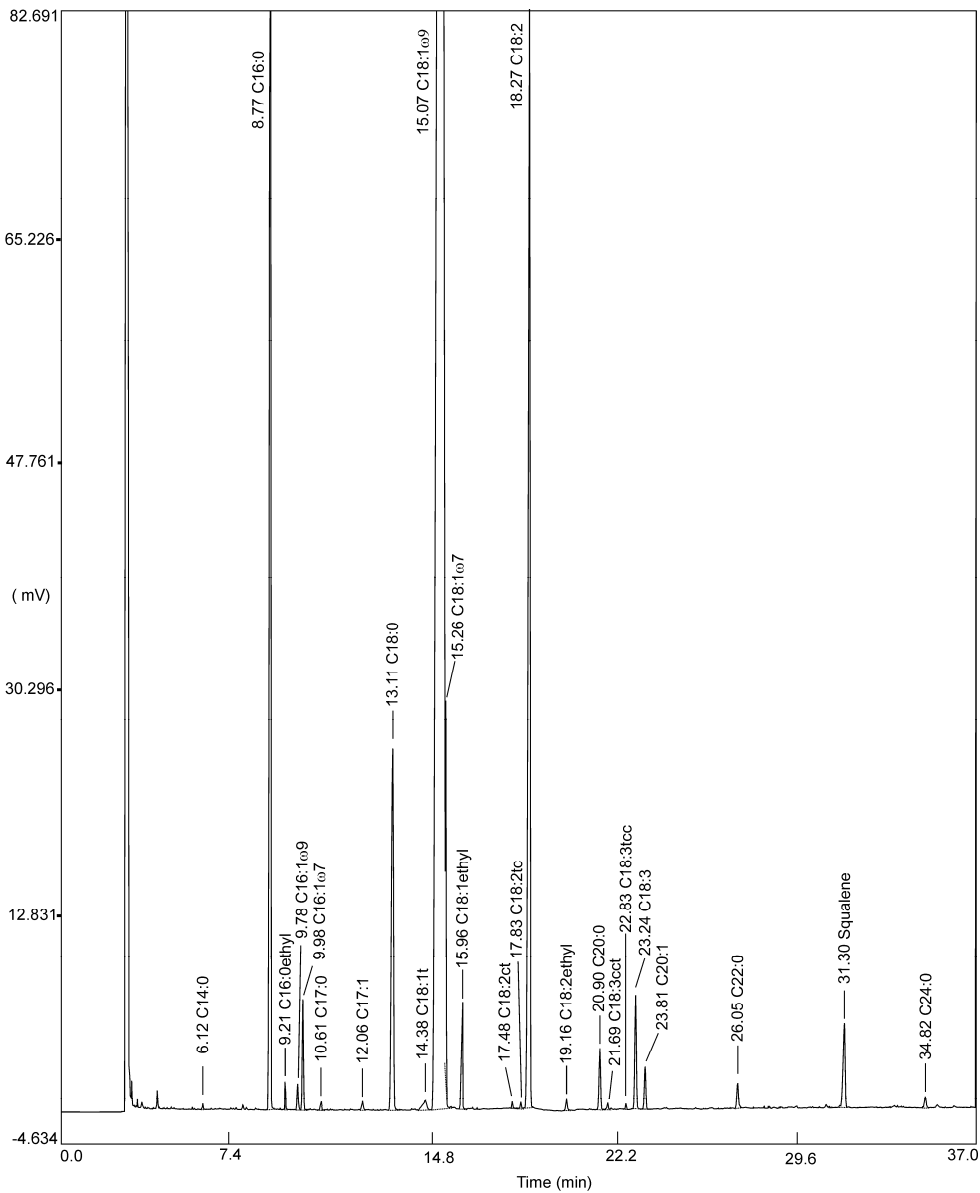
- (1) LLL; (2) OLLn+PoLL; (3) PLLn; (4) OLL; (5) OOLn+PoOL;
- (6) PLL+PoPoO; (7) POLn+PPoPo+PPoL; (8) OOL+LnPP; (9) PoOO;
- (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; (12) PLP;
- (13) OOO+PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; (17) SOO;
- (18) POS+SLS.

**Tabella 1:** Dati relativi alla ripetibilità della determinazione dei TAG nell'olio di oliva vergine mediante HPLC in colonna a una temperatura di 20° C, utilizzando come fase mobile il propionitrile.

ECN	Picchi HPLC	TAG	Campione 1		Campione 2		Campione 3		Campione 4		Campione 5	
			Media (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	Media (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	Media (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	Media (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	Media (%)	RSD <sub>r</sub> (%)
42	1	LLL	0.020	7.23	0.066	5.18	0.095	4.10	0.113	0.95	0.34	1.05
	2	OLLn+ PoLL	0.085	7.44	0.24	1.78	0.26	2.25	0.35	2.02	0.50	2.83
	3	PLLn	0.023	15.74	0.039	5.51	0.057	5.62	0.082	4.35	0.12	6.15
44	4	OLL	0.47	1.52	1.53	0.42	2.62	0.98	3.35	1.05	4.37	1.13
	5	OOLn+ PoOL	1.07	2.01	1.54	0.46	1.61	0.71	1.72	1.07	1.77	2.40
	6	PLLn+ PoPoO	0.11	12.86	0.24	4.37	0.65	1.32	1.35	0.73	2.28	1.24
	7	POLn+ PpoPo+ PpoL	0.42	5.11	0.49	2.89	0.55	2.01	0.85	1.83	1.09	1.96
46	8	OOL+ LnPP	6.72	0.63	8.79	0.31	11.21	0.42	13.25	0.33	15.24	0.23
	9	PoOO	1.24	2.86	1.49	0.95	1.63	0.85	2.12	0.45	2.52	0.56
	10	SLL+ PLO	2.70	0.65	4.05	0.70	6.02	0.65	9.86	0.53	11.53	0.31
	11	PoOP+ SpoL+ SOLn+ SpoPo	0.64	4.42	0.69	3.02	0.79	1.23	1.53	0.89	1.70	1.66
48	12+13	OOO+ PLP+ PoPP	49.60	0.07	48.15	0.06	42.93	0.06	33.25	0.10	24.16	0.06

	<b>14</b>	SOL	0.82	1.72	0.92	1.56	1.05	1.32	1.25	1.05	1.60	1.77
	<b>15</b>	POO	22.75	0.25	21.80	0.20	21.05	0.30	20.36	0.35	20.17	0.14
<b>50</b>	<b>16</b>	POP	3.05	0.46	4.56	0.42	4.98	0.52	5.26	0.41	5.57	0.38
	<b>17</b>	SOO	6.87	0.21	5.56	0.33	4.86	0.43	4.12	0.72	3.09	0.69
	<b>18</b>	POS+ SLS	1.73	1.23	1.65	1.10	1.54	0.99	1.49	1.10	1.41	1.00

n = 3 repliche  
 RSD<sub>r</sub> = Deviazione standard relativa della ripetibilità



**Figura 2.** Cromatogramma GC degli alchil esteri degli acidi grassi ottenuti da un olio di sansa mediante transesterificazione con una soluzione fredda di KOH in metanolo.

## **ALLEGATO 1**

### **SCOPERTA DI OLI ESTRANEI NEGLI OLI DI OLIVA MEDIANTE IL RAPPORTO R42/R44**

#### **1. CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI**

##### 1.1 Contenuto in triacilgliceroli

Impiegare il metodo della normalizzazione delle aree, vale a dire ipotizzare che la somma delle aree dei picchi corrispondenti ai TAG da ECN 42 ad ECN 52, sia uguale a 100.  
Calcolare la percentuale relativa di ciascun triacilglicerolo impiegando la formula:

$$\% \text{ di triacilglicerolo} = \text{area del picco} \times 100 / \text{somma delle aree dei picchi}$$

I risultati debbono essere espressi con almeno due cifre decimali.

##### 1.1.1. Triacilgliceroli con ECN42

Il calcolo dei triacilgliceroli con ECN42 avviene in base alle equazioni COI T.20/Doc. 20 e i risultati vengono riportati secondo l'ordine di eluizione HPLC prevista (di norma solo tre picchi).

LLL  
PoLL e l'isomero posizionale LPoL

OLLn e gli isomeri posizionali OLnL e LnOL  
PoPoL e l'isomero posizionale PoLPo  
PoOLn e gli isomeri posizionali OPoLn e OLnPo

PLLn e gli isomeri posizionali LLnP e LnPL  
PoPoPo  
SLnLn e l'isomero posizionale LnSLn  
PPoLn e gli isomeri posizionali PLnPo e PoPLn

I triacilgliceroli con ECN42 risultano dalla somma dei nove triacilgliceroli, compresi i loro isomeri posizionali. I risultati debbono essere espressi con almeno due cifre decimali.

#### 1.1.2. Triacilgliceroli con ECN44

Il calcolo dei triacilgliceroli con ECN44 avviene in base alle stesse equazioni matematiche e i risultati vengono riportati secondo l'ordine di eluizione HPLC prevista.

LLO e l'isomero posizionale LOL  
PoLO e gli isomeri posizionali OPoL e LOPo  
PoPoO e l'isomero posizionale PoOPo  
LnOO e l'isomero posizionale OLnO  
LnOP e gli isomeri posizionali OPLn e PLnO  
PLnP e l'isomero posizionale LnPP  
LLP e l'isomero posizionale LPL  
PoLP e gli isomeri posizionali LPoP e LPPo  
PoPoP e l'isomero posizionale PoPPo  
LLnS e gli isomeri posizionali LSLn e LnLS  
PoLnS e gli isomeri posizionali LnPoS e LnSPo

I triacilgliceroli con ECN44 risultano dalla somma degli undici triacilgliceroli, compresi i loro isomeri posizionali. I risultati debbono essere espressi con almeno due cifre decimali.

#### 1.2 Composizione in acidi grassi

La composizione teorica dei triacilgliceroli si calcola a partire dalla composizione degli acidi grassi C16 e C18 - acido palmitico, acido stearico, acido oleico, acido linoleico e acido linolenico - secondo il metodo COI/T.20/Doc.n. 20.

## 2. VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Si calcola la differenza tra il contenuto teorico e i dati HPLC per ECN 42 ed ECN 44. Occorre calcolare i rapporti seguenti:

$$\begin{aligned}r_{\text{ecn42}} &= \text{ecn42}_{\text{hplc}} / \text{ecn42}_{\text{theor}} \\ r_{\text{ecn44}} &= \text{ecn44}_{\text{hplc}} / \text{ecn44}_{\text{theor}}\end{aligned}$$

La genuinità di tutti gli oli di oliva, vergini e raffinati (tranne gli oli di sansa di oliva) è definita dal rapporto R:

$$R = r_{\text{ecn42}} / r_{\text{ecn44}}$$

**L'olio è genuino quando**

per gli oli il cui rapporto acido oleico/ linoleico $\leq 5$	<b>R <math>\leq 0.95</math></b>
per oli il cui rapporto acido oleico/linoleico $> 5 < 15$	<b>R <math>\leq 1.05</math></b>
per gli oli il cui rapporto acido oleico/ linoleico $\geq 15$	<b>R <math>\leq 1.10</math></b>

### **3. APPLICAZIONE DEL PROGRAMMA INFORMATICO**

3.1 Caricare sul computer il programma EXCEL.

3.2 Aprire il file EXEMPLA.xls, che contiene tre esempi di calcolo.

Introdurre i dati del calcolo **esclusivamente** nelle caselle azzurre. **Non scrivere** al di fuori delle zone indicate.

3.3 L'introduzione dei dati nel programma comincia con il campione # 1; il codice del campione è introdotto sulla striscia gialla.

3.4 In seguito introdurre i dati relativi agli acidi grassi nella linea che corrisponde a **FA found**.

Gli acidi grassi sono disposti in sequenza, come segue:

P = 16:0 = palmitico; M = 16:1 = palmitoleico; S = 18:0 = stearico;  
O = 18:1 = oleico; L = 18:2 = linoleico; T = 18:3 = linolenico.

L'indicazione degli altri acidi grassi non è necessaria. Introdurre nel programma solo i dati specificati, che sono normalizzati automaticamente e appaiono nella fila **FA corr**.

- 3.5 Introdurre i dati per HPLC ECN42, denominati **T42**, nell'apposita casella, sotto **HPLC42**.
- 3.6 Introdurre i dati per HPLC ECN44, denominati **T44**, nell'apposita casella sotto **HPLC44**.
- 3.7 Il programma determina se l'olio di oliva contiene o meno oli estranei: genuino - adulterato

<b>sample#</b>	<b>2144</b>						
<b>INTRODUCE FATTY ACID ANALYSIS(FOUND)</b>							
	P	M	S	O	L	T	Tot
<b>FA found</b>	8,96	0,63	3,05	25,00	3,50	0,54	41,7
<b>FA corr</b>	23,13	1,64	7,10	58,59	8,26	1,28	100,0

<b>INTRODUCE TGC ANALYSIS VALUES</b>			
GLI	HPLC	GLI	HPLC
T42	0,18	T44	2,21

<b>RESULTS</b>	
r42	0,26
r44	0,43
r42/r44	0,60
O/L	7,09

<b>CONSIDERATIONS</b>		<b>LIMITS</b>	
IF	O/L > 15	r42/r44	< = 1,10
IF	O/L > 5 < 15	r42/r44	< = 1,05
IF	O/L < = 5	r42/r44	< = 0,95

<b>CONCLUSIONS</b>	
The sample is:	GENUINE

**Legend**  
 P=16:0  
 M=16:1  
 S=18:0  
 O=18:1  
 L=18:2  
 T=18:3

EXEMPLA.xls

## **ALLEGATO 2**

### **SCOPERTA DI OLI ESTRANEI NEGLI OLI DI OLIVA MEDIANTE UN RAFFRONTO DI ALGORITMI MATEMATICI CON UNA BASE DATI COSTRUITA A PARTIRE A OLI DI OLIVA GENUINI**

#### **1. CALCOLO**

##### 1.1. Composizione di triacilgliceroli

###### **Picchi di TAG con ENC42**

LLL = picco 1

OLLn = picco 2+spalla 2a devono essere sommati (*Nota 1*)

PLLn = picco 3

*Nota 1. Per alcuni oli, e in condizioni cromatografiche molto buone, la spalla può presentarsi come un picco separato. In questo caso, l'area va sommata a quella del picco 2.*

###### **Picchi di TAG con ENC44**

OLL = picco 4

OOLn = picco 5 + spalla posteriore, qualora presente (nella Figura 1 la spalla non è presente).

PLL = picco 6  
POLn = picco 7 + spalla posteriore qualora presente (nella Figura 1 la spalla non è presente)

**Picchi di TAG con ENC46**

OOL = picco 8

1.2. Composizione in acidi grassi

La Figura 2 mostra un cromatogramma GC degli esteri alchilici degli acidi grassi ottenuti da un olio purificato mediante transmetilazione a freddo con una soluzione metanolica di KOH.

È necessario calcolare le percentuali degli acidi P, Po, S, O, L, Ln, A, e G.

**2. ALGORITMI MATEMATICI PER LA DISCRIMINAZIONE DEGLI OLI .**

2. 1. Parametri in base ai quali classificare gli oli in gruppi

$LLL_{Teor.}$

$\Delta OOL = OOL_{Teor.} - OOL_{HPLC}$

$\Delta LLL = LLL_{HPLC} - LLL_{Teor}$

Ln = % acido linolenico

$\Delta ECN44_p = (PLL + POLn)_{HPLC} - (PLL + POLn)_{Teor}$

Il campione di olio viene classificato in uno degli otto gruppi a seconda del suo valore  $LLL_{Teor.}$ :

- a)  $\leq 0.018 \%$
- b)  $> 0.018 - \leq 0.040 \%$
- c)  $> 0.040 - \leq 0.090 \%$
- d)  $> 0.090 - \leq 0.15 \%$
- e)  $> 0.15 - \leq 0.25 \%$
- f)  $> 0.25 - \leq 0.35 \%$
- g)  $> 0.35 - \leq 0.55 \%$
- h)  $> 0.55 \%$

Entro ogni gruppo gli oli vengono nuovamente classificati in sottogruppi in base ai valori di  $\Delta OOL$  o  $\Delta LLL$ .

2.2. Parametri di raffronto con la base dati

2.2.1. Limite a norma di legge:  $\Delta ECN42 = ECN42_{HPLC} - ECN42_{Teor.}$

Solo a fini di informazione, in quanto questo limite non viene impiegato per verificare la genuinità degli oli.

2.2.2. Criterio precedente per in gruppi a, b ed h.  $R1_{exp} = LLL_{HPLC}/OLLn_{HPLC}$   
Se  $R1_{exp} \leq \text{limite}$ , l'olio è genuino.

2.2.3. 1° criterio:

$$K1 = (LLL_{HPLC} + OLLn_{HPLC}) * (OLL_{Teor} + OOLn_{Teor}) / (LLL_{Teor} + OLLn_{Teor}) * (OLL_{HPLC} + OOLn_{HPLC})$$

Se  $K1 \leq \text{limite}_{inf}$ , l'olio è genuino

Se  $K1 > \text{limit}_{sup}$ , l'olio non è genuino

Per i gruppi b, c e d esiste un limite intermedio. Se K1 si trova tra il limite intermedio e quello superiore, ed L3 (vedi più avanti) è più alto di 0.50, l'olio non è genuino.

2.2.4. 2° criterio:  $\Delta R1 = [LLL / OLLn]_{HPLC} - [LLL / OLLn]_{Teor}$ .

Se  $\Delta R1 \leq \text{limite}_{inf}$ , l'olio è genuino

Se  $\Delta R1 > \text{limite}_{superiore}$ , l'olio non è genuino

2.2.5. 3° criterio:  $\Delta R3 = [OLL / OOLn]_{HPLC} - [OLL / OOLn]_{Teor}$ .

Se  $\Delta R3 \leq \text{limite}_{inf}$ , l'olio è genuino

Se  $\Delta R3 > \text{limite}_{sup}$ , l'olio non è genuino

2.2.6. 4° criterio:  $L4 = [\Delta LLL - \Delta OLLn] / LLL_{Teor}$ .

Se  $L2 \leq \text{limite}_{inf}$ , l'olio è genuino

Se  $L2 > \text{limite}_{sup}$ , l'olio non è genuino

2.2.7. 5° criterio:  $L3 = [\Delta LLL - \Delta OLLn] / OLLn_{Teor}$

Se  $R2 \geq \text{limite}$ , l'olio è genuino

Se  $R2 < \text{limite}$ , l'olio non è genuino

2.2.8. 6° criterio:  $R2 = [\Delta OLL * LLL_{Teor}] / [\Delta LLL * OLL_{Teor}]$

$$\text{Ove} \quad \Delta LLL = LLL_{exp} - LLL_{teor}$$

$$\Delta OLLn = OLLn_{exp} - OLLn_{theor}$$

$$\Delta OLL = OLL_{exp} - OLL_{theor}$$

2.3. Determinazione dei limiti

Per ciascun sottogruppo, i limiti relativi ad alcuni parametri risultano dalla seguente equazione:

limite versus  $\Delta$ valore ECN44p

Il 1°, 2°, 3°, 4°, e 5° criterio hanno limiti inferiori e superiori (Lwlimit e Uplimit), mentre il 6° criterio ha un limite solo.

I valori di ciascun criterio vengono raffrontati sequenzialmente con i limiti superiori e inferiori. Valori intermedi indicano che occorre comparare il parametro successivo. La Figura 3 mostra il diagramma di flusso della procedura sequenziale.

Il raffronto dei criteri deve seguire l'ordine sopra indicato, tranne che nel caso dei gruppi g e h ove  $\Delta R3$  si compara dopo L3.

### 3. APPLICAZIONE DEL PROGRAMMA INFORMATICO.

- 3.1. Caricare sul computer il programma EXCEL.
- 3.2. Aprire il file GLOBAL.XLS contenuto sul dischetto.
- 3.3. Attivare “Macro” se necessario.
- 3.4. Cliccare sul tasto “**Press to initiate calculation**”.
- 3.5. Introdurre i dati **unicamente nelle** caselle gialle (Figura 4)
  - 3.5.1. Sotto “**Sample code**”, scrivere la descrizione del campione
  - 3.5.2. Sotto “**Oil category**” scrivere:
    - “**EV**” nel caso degli oli di oliva vergini commestibili (categorie extra vergine e vergine)
    - “**L**” nel caso di olio di oliva lampante
    - “**R**” nel caso delle categorie olio di oliva raffinato e olio di oliva (miscela di vergine e raffinato).Tale codice è necessario per calcolare il limite ufficiale per l' $\Delta ECN42$ .
  - 3.5.3. Sotto “**Introd. FAMES-GC**”, scrivere la composizione in acidi grassi. Il programma normalizza automaticamente le percentuali della somma degli ottanta acidi grassi. Se compare la parola **Warning**, occorre rivedere i dati relativi agli acidi grassi.
  - 3.5.4. Scrivere i dati relativi al triacilglicerolo nelle caselle corrispondenti. Rivedere i dati.
- 3.6. Il programma calcola la composizione teorica in triacilglicerolo in base alla composizione normalizzata in acidi grassi.
- 3.7. Il programma calcola il valore degli algoritmi matematici corrispondenti al campione di olio e i valori dei limiti, mediante le percentuali teoriche e sperimentali dei triacilgliceroli.
- 3.8. Il comando “**Press control+letter**” appare nella fascia rossa, indicando il range teor. LLL entro il quale viene classificato l'olio.

- 3.9. Per visionare i risultati premere contemporaneamente il tasto “control” e quello della lettera indicata; apparirà il foglio dei risultati per il campione di olio (Figura 5).
- 3.10. Leggere i risultati nelle fasce rosse.  
“**The oil is correct**” indica che si tratta di un olio di oliva genuino, o che il livello di adulterazione è basso.  
“**The oil is not correct**” indicata che si tratta di un olio non genuino.  
Per ogni criterio, i valori degli algoritmi sono indicati in caratteri in grassetto. Sono inoltre indicati il limite superiore e inferiore e i valori di altri parametri.
- 3.11. Per stampare i risultati, cliccare sul bottone “**Press to print the results**”. Verranno stampati due fogli: i dati sperimentali e i valori e limiti per il campione.
- 3.12. Cliccare sul bottone “**Press for a new calculation**” per riavviare il programma. Tutti i dati verranno cancellati.

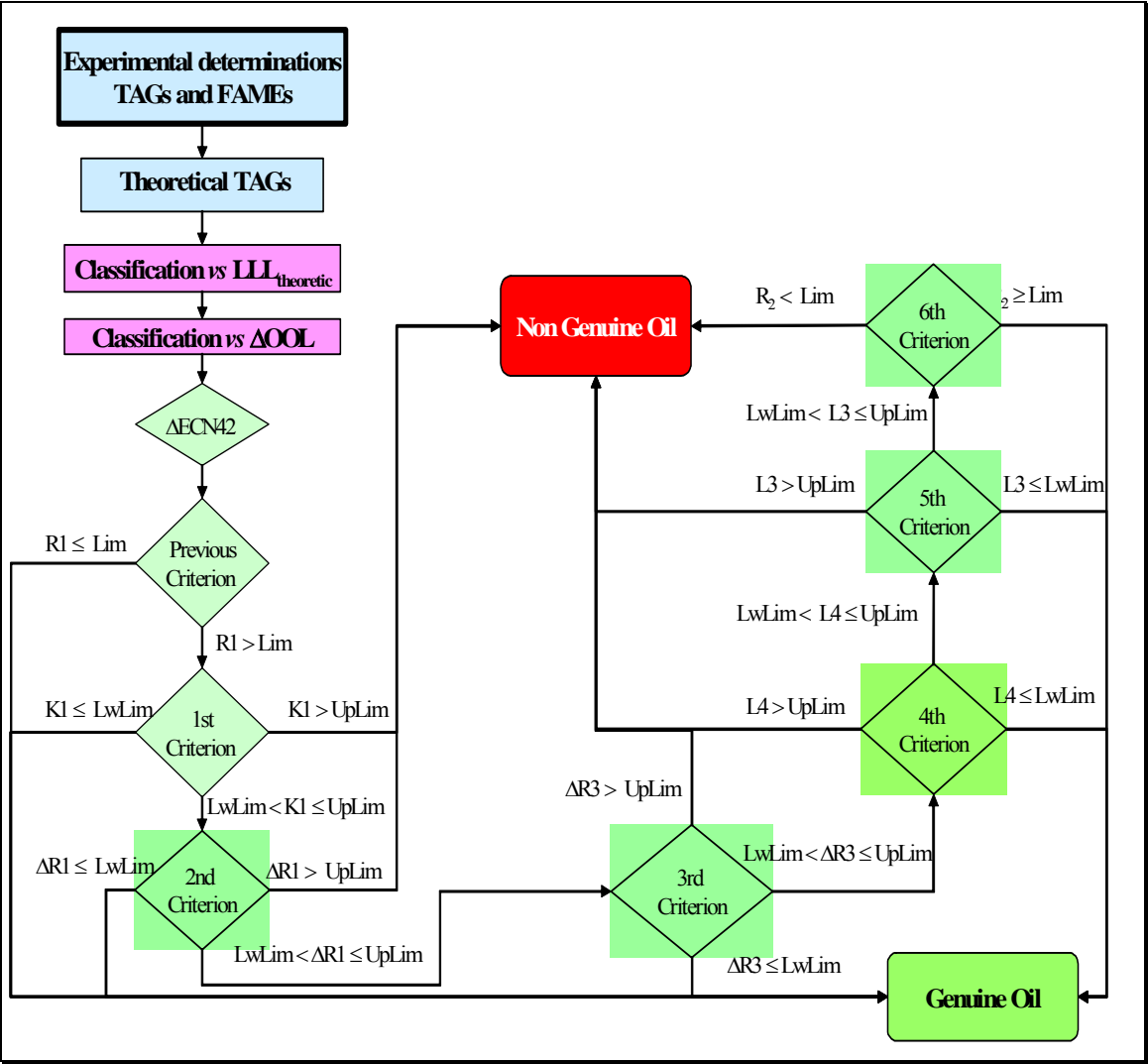


Figura 3. Diagramma di flusso della procedura sequenziale

DATI SPERIMENTALI									
Compilare solo le caselle gialle									
Sample Code	VOO + VHO								
Oil Category	R3	Refined Olive Oil							
Area % (GLC)	C16:0	C18:0	C16:1	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	Sum
FAMEs-Comp. Corr.	9,62	2,94	0,41	79,39	6,52	0,49	0,33	0,30	100,00
Introd. FAMEs-GC	9,62	2,94	0,41	79,37	6,52	0,49	0,33	0,30	99,98
HPLC Experimental Data									
ECN42			ECN44				ECN46		
LLL	OLLn	PLnL	OLL	OOLn	PLL	POLn	OOL		
0,12	0,19	0,04	1,55	1,28	0,22	0,47	12,57		
Press CTRL+b to see criteria for LLL theor. 0,018 - 0,040									

Figura 4. Scheda dati del programma di calcolo

Criteria for LLL theor. 0,018 - 0,040		
Calculation Parameters		
Sample Code	VOO + VHO	
Oil Category	R	Refined Olive Oil

$\Delta ECN42 =$	0,14	0,35	<i>Proceed to the Early Criterion</i>
------------------	------	------	---------------------------------------

**Early Criterion R1 exp.**

Parameter	Value	Limit	
R1 exp.	0,63	0,40	<i>Proceed to the Criterion 1</i>

**Criterion 1 K1**

Parameter	Value	Higher Limit	Lower Limit	<i>Proceed to the Criterion 2</i>
K1	1,15			
L3	0,41	1,35	0,95	

**Criterion 2  $\Delta ECN44p$  vs  $\Delta R1$**

Parameter	Value	Higher Limit	Lower Limit	<i>Proceed to the Criterion 3</i>
$\Delta R1 =$	0,46			
$\Delta OOL =$	-0,69			
$\Delta ECN44p$	0,26	0,51	0,37	

**Criterion 3  $\Delta ECN44p$  vs  $\Delta R3$**

Parameter	Value	Higher Limit	Lower Limit	<i>Proceed to the Criterion 4</i>
$\Delta R3 =$	0,26			
$\Delta OOL =$	-0,69			
		0,50	0,25	

**Criterion 4 L4**

Parameter	Value	Higher Limit	Lower Limit	<i>The oil is correct</i>
L4 =	2,52			
$\Delta OOL =$	-0,69			
		6,00	4,00	

**Criterion 5 L3**

Parameter	Value	Higher Limit	Lower Limit	
L3 =	0,41			
$\Delta OOL =$	-0,69			
		0,60	0,40	

**Criterion 6 R2**

Parameter	Value	Limit	
R2 =	0,168		
$\Delta OOL =$	-0,69		
		0,100	

Press to Print Results

Press for a New Calculation

Figura 6. Foglio dei risultati