

METODO COLORIMETRICO PER LA DETERMINAZIONE DEI COMPOSTI *O*-DIFENOLICI NEGLI OLI DI OLIVA

REVISIONE: dicembre 2007

Arturo Cert. Ana Romero e R. Cert
Istituto de la Grasa, (CSIC), Siviglia, Spagna

1.- Materiali e apparecchiatura

- 1.1.- Materiale per l'estrazione in fase solida (SPE)
- 1.2.- Cartucce in fase diol-bonded da 6 mL (0,5g) (Waters o simili)
- 1.3.- Filtro per siringa in acetato di cellulosa (0,45 μ m diametro dei pori), (Alltech, Scharlab o simili)
- 1.4.- Evaporatore rotativo sotto vuoto
- 1.5.- Spettrofotometro UV-vis a $\lambda=370$ nm, con cuvette di quarzo con 10,0 mm di traiettoria

2.- Solventi e reagenti

- 2.1.- n-esano AR
- 2.2.- Miscela n-esano/acetato di etile 90 :10 (v/v)
- 2.3.- Metanolo per spettrometria UV
- 2.4.- Acqua distillata o deionizzata
- 2.5.- Sodio molibdato diidrato AR (Merck o simili)
- 2.6.- Pirocatecolo (catecolo) ($\geq 99\%$) (Aldrich o simili)
- 2.7.- Soluzione metanolo/acqua 1:1 (v/v)
- 2.8.- Soluzione A. metanolo/acqua 1:1 acidificata con acido cloridrico preparato con l'aggiunta di 0,5 ml di 6N HCl a 100 ml di soluzione metanolo/acqua 1:1 (2.7)
- 2.9.- Soluzione di 5% sodio molibdato diidrato in metanolo/acqua 1:1 (2.7)

3.- Retta di taratura

Costruire una retta di taratura (concentrazione, espressa in millimoli/mL, vs *assorbanza*) misurando soluzioni di pirocatecolo in soluzione A (2.8). Preparare soluzioni di pirocatecolo nel range 0,02 – 0,07 mg/mL. Le soluzioni devono essere preparate di fresco e protette dall'esposizione alla luce. Mediante una pipetta prelevare 2mL di soluzione fenolica e travasarli in una provetta di vetro. Aggiungere 0,5 mL di soluzione di sodio molibdato (2.9) e agitare la miscela. Dopo 15 minuti misurare l'assorbanza a $\lambda=370$ nm. L'assorbanza della soluzione fenolica è corretta con l'assorbanza di un bianco costituito miscelando 2 mL della soluzione fenolica con 0.5 mL di metanolo/acqua 1:1 (2.7).

Per il range di assorbanza 0,2-0,8, soluzioni di catecolo, idrossitirosolo e idrossitirosolo acetato hanno dato la seguente equazione:

$$\text{Concentrazione di } o\text{-difenoli (mmol/mL)} = (-0.170 + 8.236 * \text{ABS}) * 10^{-4}$$

dove ABS = assorbanza della soluzione fenolica – assorbanza del bianco

4.- Isolamento dell'estratto fenolico

Diluire un campione di olio d'oliva (6 ± 0.001 g) in 6 mL di esano (2.1).

Sistemare una cartuccia diol-bonded da 6-mL (1.2) in un apparecchio per l'eluizione sottovuoto e condizionarla mediante il passaggio consecutivo di 9 ml di metanolo (2.3) e di 9 ml di esano (2.1). Interrompere il vuoto per evitare l'essiccamento della colonna.

Si deposita nella colonna la soluzione di olio e si fa passare attraverso la cartuccia. Si lava il contenitore del campione con due porzioni di esano da 4-ml fuoriuscite dalla cartuccia. Si lava nuovamente il contenitore del campione con 3 ml di miscela esano/acetato di etile (90:10, v/v) (2.2) fuoriusciti dalla cartuccia e scartati. In seguito, si sistema un matraccio conico da 25-mL e si eluisce la colonna con 15 ml di metanolo (2.3). Si fa evaporare il solvente fino a secchezza a temperatura ambiente in un evaporatore rotante. Si diluisce il residuo in 5 mL di soluzione acidificata A (2.8).

5.- Determinazione spettrofotometrica

Mediante una pipetta munita di filtro per siringa in acetato di cellulosa, prelevare 2mL di estratto fenolico e travasarli in una provetta di vetro. Aggiungere 0,5 mL di soluzione di sodio molibdato (2.9) e agitare la miscela. Dopo 15 minuti misurare l'assorbanza a $\lambda=370$ nm. L'assorbanza della soluzione fenolica è corretta con l'assorbanza di un bianco costituito miscelando 2 mL dell'estratto fenolico con 0,5 mL di metanolo/acqua 1:1 (2.7).

Se l'assorbanza della soluzione fenolica è superiore a 0,8 è necessario ottenere un nuovo estratto fenolico e diluirlo in 10 mL di soluzione A (2.8) invece che in 5 mL. Un'alternativa è l'estrazione da 3 g di olio.

Se l'assorbanza della soluzione fenolica è inferiore a 0,2, gli estratti fenolici di due o più cartucce devono essere combinati e diluiti in 5 mL soluzione A (2.8). Usando una sola cartuccia, la concentrazione minima determinata è 0,15 mmol/kg di olio.

5.- Calcoli

La concentrazione di *o*-difenoli negli oli, espressa in millimoli/kg, si calcola secondo la formula seguente:

$$[C] \text{ nell'olio (mmol/kg)} = (C_{\text{extr}} * 2,5 * V_{\text{extr}} * 1000) / 2 * W_{\text{oil}}$$

Dove:

C_{extr} (mmol/mL) = concentrazione nell'estratto calcolata mediante applicazione dell'assorbanza alla retta di taratura

2,5 = volume (mL) della miscela di reazione

V_{extr} = volume totale (mL) della soluzione dell'estratto (solitamente 5 mL)

2 = Volume (mL) di soluzione dell'estratto impiegato per questa reazione

W_{oil} = peso (g) del campione di olio

I risultati devono essere espressi in millimoli di *o*-difenoli/Kg di olio.