



## METODO DI ANALISI

### DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI TRANS-ISOMERI MEDIANTE ANALISI GASCROMATOGRAFICA CON COLONNA CAPILLARE

#### 1. Scopo e campo di applicazione

La presente norma descrive un procedimento per la determinazione del contenuto degli acidi grassi trans nelle sostanze grasse vegetali mediante gascromatografia con colonna capillare. Il metodo è applicabile alle sostanze grasse i cui acidi grassi abbiano un numero di atomi di carbonio compreso fra 10 e 24; non è applicabile alle sostanze grasse vegetali comunque idrogenate.

**AVVERTENZA:** La presente norma può richiedere l'impiego di apparecchiature e sostanze pericolose o l'esecuzione di operazioni che comportano un certo rischio. Il metodo non tocca tutti i problemi di sicurezza connessi col suo impiego, ma è lasciato alla responsabilità di chiunque lo userà, il ricercare e stabilire preventivamente le misure di sicurezza appropriate e le eventuali misure di legge da applicare.

#### 2. Principio

Si preparano gli esteri metilici degli acidi grassi a partire dalla sostanza grassa. Questi sono quindi analizzati mediante gascromatografia capillare. Gli acidi grassi si identificano in funzione dei loro tempi di ritenzione. La percentuale viene determinata dal rapporto fra l'area dei corrispondenti picchi e la sommatoria delle aree dei picchi di tutti gli acidi grassi.

#### 3. Significato della prova

Il significato della prova è quello di determinare gli isomeri trans degli acidi grassi insaturi a 18 atomi di carbonio che possono essere presenti in concentrazioni definite nelle sostanze grasse vegetali naturali ed in quelle sottoposte a processo di raffinazione.

#### **4. Definizioni**

Secondo questo metodo la percentuale in acidi grassi trans di una sostanza grassa vegetale è data dalla somma delle percentuali degli acidi:

- trans-octadecenoici (T 18:1)
- trans, trans-octadecadienoici (TT 18:2)
- cis-trans e trans-cis octadecadienoici [(CT + TC) 18:2]
- trans-cis-trans, cis-cis-trans, cis-trans-cis e trans-cis-cis octadecatrienoici [(TCT + CCT + CTC + TCC) 18:3], rispetto agli acidi grassi totali.

#### **5. Apparecchiatura**

- 5.1.** Gascromatografo idoneo per il funzionamento con colonna capillare, dotato di sistema di splittaggio, e costituito da:
- 5.1.1.** Camera termostatica per la colonna, idonea a mantenere la temperatura desiderata con la precisione di 0,1 °C
  - 5.1.2.** Complesso di iniezione termoregolabile
  - 5.1.3.** Rilevatore a ionizzazione di fiamma e convertitore-amplificatore
  - 5.1.4.** Regolatori di flusso per il gas di trasporto e i gas ausiliari
- 5.2.** Colonna capillare in vetro o silice fusa, con diametro interno da 0,25 a 0,32 mm, lunga 50 m, ricoperta con cianopropilsilicone (1) e spessore del film da 0,1 a 0,3 µm
- 5.3.** Registratore-integratore idoneo per il funzionamento con il convertitore-amplificatore, con tempo di risposta non superiore a 1 s. e con velocità della carta variabile
- 5.4.** Microsiringa per gascromatografia, da 10 µl ad ago cementato

---

(1) Sono reperibili in commercio colonne cromatografiche già pronte (ad es. SP 2340, CP Sii 88, Silar 10 etc.).

5.5. Evaporatore rotante

5.6. Le apparecchiature necessarie per la preparazione degli esteri metilici

6. Reagenti e materiali

6.1. Gas di trasporto: elio o idrogeno puri per uso cromatografico (Attenzione veder appendice)

6.2. Gas ausiliario, aria e idrogeno per uso gascromatografico (Attenzione vedere appendice)

6.3. Campioni di riferimento: esteri metilici di acidi grassi puri, in particolare degli isomeri cis e trans degli acidi octadecenoici, (1), octadecadienoici (2) e octadecatrienoici (1).

6.4. n-Esano (Attenzione vedere appendice).

## 7. Procedimento

7.1. Preparazione degli esteri metilici: si deve usare un procedimento che preveda la catalisi basica (metodo NGO C4 1-1976 proc. B).

Le sostanze grasse con acidità libera superiore al 3 % devono essere preventivamente neutralizzate (metodo NGD C16- 1976).

7.2. Controllo del gascromatografo e condizionamento della colonna

Eseguiti i controlli preliminari del complesso e del registratore, montare sul gascromatografo la colonna, senza però collegare il terminale di uscita al rivelatore.

---

(1) Gli esteri metilici degli acidi octadecenoici e octadecatrienoici sono reperibili in commercio (ad esempio presso le ditte Alltech, Supelco etc.).

(2) Gli isomeri dell'acido octadecadienoico possono essere preparati in laboratorio per isomerizzazione di acido linoleico puro con selenio (vedi: Strocchi A. et al.: Rivista Italiana delle Sostanze Grasse 45 (8) 607 (1968); Schonfield et al., Journal of the American Oil Chemists Society 38, 208, 1961).

Far fluire attraverso la colonna una leggera corrente di gas di trasporto (1-2 ml/min) e iniziare un riscaldamento graduale fino a raggiungere, in non meno di 4 h, la temperatura di 210°C. Mantenere la colonna a tale temperatura per almeno una notte, quindi lasciare raffreddare; collegare poi il terminale di uscita con il rivelatore e, controllata la tenuta della connessione, riportare il complesso alla temperatura di condizionamento. Inserire il rivelatore ed il registratore e dopo 3-4 h controllare che la linearità e la deriva della linea di base, operando a sensibilità almeno quattro volte superiore a quella prevista per l'esecuzione dell'analisi, siano soddisfacenti (una deriva positiva superiore al 5 % fondo scala/ora è indizio di condizionamento insufficiente).

### 7.3. Scelta delle condizioni operative e controllo dell'efficienza della colonna

#### 7.3.1. Condizioni operative

Le condizioni operative di massima sono le seguenti:

- temperatura della colonna da 150 a 200 °C eventualmente in temperatura programmata (ad es. 165 °C per 15 min, quindi un incremento di 5 °C/min sino alla temperatura di 200 °C)
- temperatura dell'iniettore: 250 °C
- temperatura del rivelatore: da 260 a 280 °C
- volume del gas di trasporto (elio o idrogeno): 1,2 ml/min
- quantità di sostanza iniettata: 1 ÷ 1 di soluzione al 2 % in esano

Tali condizioni possono essere variate in funzione delle caratteristiche della colonna e del gascromatografo in modo da avere un profilo simile a quello della Figura 1. Comprovare che il picco dell'acido linolenico (C18:3) appaia come un picco risolto giusto prima del picco dell'acido eicosenoico (C20:1). Se così non fosse, si può o cambiare la temperatura del forno e/o impiegare una colonna di differente polarità.

#### 7.3.2. Efficienza della colonna

7.3.2.1. L'efficienza di una colonna è determinata dal suo potere di separazione e di risoluzione. Pertanto ai fini di una corretta esecuzione delle analisi, essa deve fornire dei cromatogrammi rispondenti ai seguenti requisiti:

- potere di separazione: deve aversi separazione netta dei picchi degli esteri metilici di tutti gli acidi grassi presenti;

- potere di risoluzione: è necessario che i picchi oltre che separati siano anche completamente risolti, cioè che il tracciato del picco raggiunga la linea di base prima dell'uscita del picco successivo. È tuttavia tollerata per alcune coppie critiche, come ad esempio gli acidi trans C18: 1/cis C18:1 una risoluzione incompleta; in tali casi si considera la colonna efficiente quando l'indice di risoluzione risulta maggiore di 2. L'indice di risoluzione tra due picchi, è definito dal rapporto.

a



b

dove:

a = distanza dalla linea di base alla sommità del picco più piccolo;

b = distanza dalla linea di base al punto più basso della valle fra i due picchi.

- 7.3.2.2.** Per verificare i suddetti requisiti, iniettare più volte uguali quantità di miscela campione di esteri metilici e variare opportunamente temperatura e flusso del gas di trasporto fino ad avere la separazione migliore. Inoltre verificare il potere di risoluzione diminuendo eventualmente la quantità di campione ed aumentando la sensibilità fino ad avere la migliore risoluzione dei picchi.

Se si ottiene separazione di tutti gli acidi grassi presenti e indice di risoluzione superiore a 2, ritenere la colonna idonea e mantenere le condizioni operative prescelte per tutte le determinazioni successive; in caso contrario considerare la colonna non efficiente.

- 7.4.** Esecuzione dell'analisi. Con la microsiringa da 10  $\mu$ l prelevare 1  $\mu$ l di esano, aspirare 0,5  $\mu$ l di aria e successivamente 0,5 + 1  $\mu$ l della soluzione del campione; alzare ancora lo stantuffo della siringa in modo che l'ago sia vuoto. Introdurre l'ago attraverso la membrana del complesso di iniezione e dopo 1-2 s iniettare rapidamente ed estrarre quindi lentamente l'ago dopo 5 s. Effettuare la registrazione fino a completa eluizione degli esteri metilici presenti. La linea di base dovrà soddisfare sempre ai requisiti richiesti in 7.3.2.1

- 7.5.** Identificazione dei picchi. Gli esteri metilici degli acidi grassi compaiono nel cromatogramma secondo una progressione che è funzione diretta del numero di atomi di carbonio. Gli esteri insaturi vengono eluiti dopo i corrispondenti esteri saturi e la loro eluizione è funzione diretta del numero di doppi legami. Gli esteri degli acidi grassi trans sono eluiti prima dei corrispondenti isomeri cis.

L'identificazione dei singoli esteri metilici viene effettuata quindi attraverso la misura dei tempi di ritenzione, che vengono comparati con i tempi di ritenzione di miscele di riferimento. Un esempio di cromatogramma è riportato in fig. 1.

## 7.6. Valutazione quantitativa

**7.6.1.** Si procede al calcolo delle aree di ogni singolo picco mediante integratore elettronico. Al fine di ottenere una sensibilità analitica adeguata, l'altezza del picco corrispondente all'estere metilico dell'acido arachico dovrà essere non inferiore al 20 % del fondo scala. Per l'olio di arachide tale altezza dovrà essere non inferiore al 50%.

**7.6.2.** La percentuale di ogni singolo acido grasso viene calcolata dal rapporto tra area del picco corrispondente e la sommatoria delle aree di tutti i picchi presenti secondo la formula:

$$100 \frac{A_x}{\sum A}$$

dove:

$A_x$  = area del picco dell'acido grasso x;

$\sum A$  = sommatoria delle aree di tutti i picchi.

## 8. Espressione dei risultati

**8.1.** Riportare come "acidi grassi trans totali, %" la somma delle percentuali degli acidi:

- trans-octadecenoici;
- trans-trans octadecadienoici;
- cis-trans e trans-cis octadecadienoici;
- trans-cis-trans, cis-cis-trans, cis-trans-cis e trans-cis-cis octadecatrienoici.

Esprimere il risultato con due cifre decimali.

### **Nota**

È necessario per una corretta valutazione analitica osservare alcune precauzioni. Piccole quantità di acidi grassi trans oleici possono formarsi durante la fase d'introduzione del campione nell'iniettore cromatografico. Onde evitare questo fenomeno occorre verificare la procedura nel modo seguente:

Un campione di esteri metilici di olio extra vergine di oliva di sicura origine (o standard di oleato di metile, o miscela con esteri metilici acidi grassi con contenuto minimo. Acido oleico 60% certificati esenti Trans) preparato come descritto in 7:1 viene analizzato nelle condizioni previste dal metodo; si misura la percentuale di trans octadecenoici: normalmente non si ha presenza di acidi grassi trans; è tuttavia tollerata una presenza di acidi trans octadecenoici pari allo 0,01 %.

Nel caso si riscontrino valori superiori occorre sostituire l'inserito dell'iniettore con uno perfettamente pulito e disattivato (e ripetere l'analisi).

Un'ulteriore precauzione riguarda gli inserti d'iniezione riempiti con materiali diversi (lana di vetro, terra di diatomee, ecc. ecc.) in quanto la presenza di questi prodotti può catalizzare la formazione di acidi grassi trans.

Pertanto occorre attenersi ad alcune precauzioni.

Si procede su di un olio extravergine sicuro come nel caso visto in precedenza, si valuta la percentuale di acidi trans octadecenoici, nel caso si riscontrassero valori percentuali superiori allo 0,01 occorre procedere come segue:

- 1) Cambiare l'inserito con uno pulito e disattivato;
- 2) Ridurre la temperatura dell'iniettore di 30 + 50 °C e ripetere la prova sino a che eventuali valori di acidi octadecenoici non rientrano nel limite menzionato.
- 3) Togliere eventuale riempimento iniettore\*.

Nell'analisi degli oli di oliva extravergini occorre attenersi anche ad un'altra precauzione. Solitamente nell'analisi di oli genuini appare un picco avente una ritenzione pressoché identica al cis-trans linoleico, questo picco il cui valore oscilla nell'intorno dello 0,01 non deve essere considerato nel calcolo qualora appaia isolato nel cromatogramma, deve viceversa essere calcolato qualora appaia insieme al trans cis linoleico.

---

\* Il riempimento (lana di vetro, terra di diatomee ecc.) è necessario in caso si usino autocampionatori, solitamente iniettando manualmente il riempimento può essere tolto.

## 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:

<b>n</b>	Numero dei laboratori che hanno partecipato alla prova
<b>outliers</b>	Numero di laboratori che presentano risultati aberranti
<b>mean</b>	Media dei risultati accettati
<b>r</b>	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.
<b>S<sub>r</sub></b>	Deviazione standard della ripetibilità
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	Coefficiente di variazione della ripetibilità ( $S_r \times 100 / \text{mean}$ )
<b>R</b>	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<sub>R</sub>** Deviazione standard della riproducibilità

**RSD<sub>R</sub> (%)** Coefficiente di variazione della riproducibilità ( $S_R \times 100 / \text{mean}$ )

**Composizione in acidi grassi trans (%): C18:1T**

	A	B	C	D	E
	17	17	17	17	17
	5	2	4	0	0
	0,012	0,020	0,020	0,021	0,051
<b>r</b>	0,007	0,009	0,010	0,010	0,020
<b>S<sub>r</sub></b>	0,003	0,003	0,004	0,004	0,007
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	22,610	20,160	32,110	22,001	14,080
<b>R</b>	0,010	0,021	0,021	0,023	0,031
<b>S<sub>R</sub></b>	0,004	0,008	0,008	0,008	0,011
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	30,960	46,580	32,110	50,003	21,741

**Composizione in acidi grassi trans (%): C18:2T+ C18:3T**

	A	B	C	D	E
	16	17	16	17	17
<b>Outliers</b>	5	2	2	4	0
<b>Mean</b>	0,014	0,032	0,011	0,044	0,303
<b>r</b>	0,011	0,010	0,007	0,010	0,043
<b>S<sub>r</sub></b>	0,004	0,004	0,003	0,004	0,015
<b>RSD<sub>r</sub> (%)</b>	34,920	13,361	18,983	9,852	5,061
<b>R</b>	0,016	0,020	0,017	0,023	0,131
<b>S<sub>R</sub></b>	0,006	0,007	0,006	0,008	0,047
<b>RSD<sub>R</sub> (%)</b>	47,702	25,643	42,801	22,413	15,392

**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

Fig. 1. Gascromatogramma tipo relativo alla determinazione degli acidi grassi trans, ottenuta con colonna capillare.

