



METODO DI ANALISI

DETERMINAZIONE DELLA DIFFERENZA TRA IL CONTENUTO REALE E IL CONTENUTO TEORICO DI TRIGLICERIDI CON ECN 42

1. Oggetto

Determinazione della composizione dei trigliceridi contenuti negli oli d'oliva (TG), in funzione del loro numero di carbonio equivalente, per differenza fra i risultati analitici ottenuti per cromatografia in fase liquida ad alta prestazione (HPLC), e il contenuto teorico, calcolato a partire dalla composizione in acidi grassi.

2. Campo di applicazione

La norma è applicabile agli oli d'oliva. Il metodo è applicabile alla rivelazione della presenza di piccole quantità di oli di semi (ricchi in acido linoleico) in qualunque categoria di oli d'oliva.

3. Principio

Per gli oli d'oliva genuini, il contenuto in trigliceridi con ECN 42, determinato per HPLC, corrisponde in una certa misura al contenuto teorico in trigliceridi con ECN 42, calcolato in base alla determinazione per GLC della composizione in acidi grassi. Una differenza superiore ai valori adottati per ciascun olio indica che l'olio contiene oli di semi.

4. Metodo

Il metodo fondato sul calcolo della differenza tra il contenuto teorico e i dati HPLC dei trigliceridi con ECN 42 si basa su tre stadi:

- determinazione della composizione in acidi grassi per gascromatografia capillare
- calcolo della composizione teorica dei trigliceridi con ECN 42
- determinazione HPLC dei trigliceridi con ECN 42.

4.1. Apparecchiatura

- 4.1.1 Palloni a fondo arrotondato da 250 e 500 ml
- 4.1.2 Bicchiere da 100 ml
- 4.1.3. Colonna cromatografica in vetro (diametro interno: 21 mm, lunghezza 450 mm), provvista di unione conica normalizzata (femmina) alla sommità e di rubinetto
- 4.1.4. Imbuti separatori da 250 ml con cono normalizzato (maschio) al fondo, adatto al collegamento con la sommità della colonna
- 4.1.5. Bacchetta di vetro, lunghezza 600 mm
- 4.1.6. Imbuto di vetro, diametro 80 mm
- 4.1.7. Matracci volumetrici, 50 ml
- 4.1.8. Matracci volumetrici, 20 ml
- 4.1.9. Evaporatore rotativo
- 4.1.10. Cromatografo in fase liquida ad alta prestazione, che permetta il controllo termostatico della temperatura della colonna
- 4.1.11. Iniettore cromatografico capace di erogare dosi da 10 µl
- 4.1.12. Rivelatore cromatografico di tipo rifrattometro differenziale. La sensibilità a fondo scala dev'essere pari almeno a 10^{-4} unità dell'indice di rifrazione
- 4.1.13 Colonna cromatografica in acciaio inossidabile della lunghezza di 250 mm e del diametro interno di 4,5 mm, riempito con particelle del diametro di 5 µm di silice contenente il 22-23% di carbonio sotto forma di ottadecilsilano*.
- 4.1.14 Registratore-integratore del segnale

* esempi : Lichrosorb (Merck) RP 18 Art 50333
 Lichrosphere o equivalente (Merck) 100 CH18 Art 50377

4.2. Reattivi

I reattivi debbono essere di purezza analitica. I solventi di eluizione debbono essere degassati e possono essere riciclati più volte senza effetti sulle separazioni.

- 4.2.1. Etere di petrolio 40-60 °C, qualità per cromatografia
- 4.2.2. Etere etilico, esente da perossidi, distillato di fresco
- 4.2.3 Solvente per eluizione cromatografica: miscela etere di petrolio/etere etilico 87:13 (v/v)
- 4.2.4 Gel di silice, 70-230, tipo Merck 7734, con un contenuto d'acqua standardizzato al 5% (p/p)
- 4.2.5. Lana di vetro
- 4.2.6. Acetone per HPLC
- 4.2.7. Acetonitrile per HPLC

4.2.8. Solvente per eluizione HPLC: acetonitrile + acetone (proporzioni da regolare in modo da ottenere la separazione desiderata: cominciare con una miscela 50:50) (v/v) o propionitrile

4.2.9. Solvente di solubilizzazione: acetone

4.2.10. Trigliceridi di riferimento: si possono usare i trigliceridi del commercio (tripalmitina, trioleina ecc.), riportando su un grafico i rispettivi tempi di ritenzione in funzione del numero di carbonio equivalente, oppure utilizzare cromatogrammi di riferimento ottenuti impiegando olio di soia, miscele 30:70 (v/v) olio di soia-olio di oliva e olio di oliva puro (vedi note 1 e 2 e figure 1, 2, 3 e 4)

4.3. Preparazione del campione

Poiché un certo numero di sostanze capaci di interferire può dar luogo a risultati falsamente positivi durante l'analisi HPLC, il campione dev'essere sempre purificato secondo il metodo IUPAC 2.507 (determinazione dei componenti polari nei grassi di frittura).

4.3.1. Preparazione della colonna cromatografica

Riempire la colonna (4.1.3.) con 30 ml circa di solvente di eluizione (4.2.3.), introducendo poi nella colonna un poco di lana di vetro (4.2.5.), spingendola al fondo della colonna mediante la bacchetta di vetro (4.1.5.).

In un bicchiere da 100 ml, sospendere 25 ml di gel di silice (4.2.4.) in 80 ml di miscela di eluizione (4.2.3.), trasferendola quindi nella colonna mediante un imbuto di vetro (4.1.6.).

Per assicurare il completo trasferimento del gel di silice nella colonna, lavare il bicchiere con la miscela di eluizione e trasferire nella colonna anche le porzioni di lavaggio.

Aprire il rubinetto e lasciar eluire il solvente dalla colonna fin quando il suo livello superi di circa 1 cm quello del gel di silice.

4.3.2. Cromatografia su colonna

In un matraccio tarato da 50 ml (4.1.7.), pesare, con la precisione di 0,001g, $2,5 \pm 0,1$ g di olio previamente filtrato, omogeneizzato e se necessario disidratato.

Disciogliere in 20 ml circa di solvente di eluizione (4.2.3.), se necessario riscaldando leggermente per facilitare la dissoluzione. Raffreddare a temperatura ambiente e portare a volume col solvente di eluizione.

Con una pipetta volumetrica, introdurre 20 ml di soluzione preparata come al punto 4.3.1, aprire il rubinetto e lasciar defluire il solvente fino al livello dello strato di gel di silice.

Eluire con 150 ml di solvente di eluizione (4.2.3.), regolando la velocità di passaggio del solvente a 2 ml/min. circa (per passare attraverso la colonna, 150 ml impiegheranno 60-70 minuti circa).

Recuperare l'eluato in un matraccio a fondo arrotondato da 250 ml (4.1.1.), precedentemente tarato in stufa e pesato con esattezza. Eliminare il solvente sotto depressione (Rotavapor) e pesare il residuo che verrà impiegato per preparare la soluzione per l'analisi HPLC e per la preparazione dell'estere metilico.

Il recupero del campione dalla colonna non dovrà essere inferiore al 90% per le categorie olio vergine extra, olio vergine, olio corrente, olio raffinato e olio d'oliva, e all'80% per gli oli di oliva vergini lampanti e per gli oli di sansa di oliva.

4.4. ANALISI HPLC

4.4.1. Preparazione dei campioni per l'analisi cromatografica

Preparare una soluzione del 5% del campione da analizzare pesando $0,5 \pm 0,001$ g del campione in un matraccio tarato da 10 ml e portare a volume con il solvente di solubilizzazione (4.2.9.)

4.4.2. Procedimento

Montare il sistema cromatografico. Far passare il solvente di eluizione (4.2.8.) alla portata di 1,5 ml/min, in modo da spurgare l'intero sistema. Attendere finché la linea di base sia stabile. Iniettare 10 μ l del campione preparato come indicato in 4.3.

4.4.3. Calcolo ed espressione dei risultati

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

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

I risultati debbono essere espressi con almeno due cifre decimali.

Vedi note 1, 2, 3 e 4

4.5. Calcolo della composizione teorica in trigliceridi (moli %) dai dati CLG relativi agli acidi grassi

4.5.1 Determinazione della composizione in acidi grassi

La composizione in acidi grassi viene determinata secondo il metodo ISO 5508, mediante colonna capillare. La preparazione degli esteri metilici viene eseguita conformemente al metodo COI/T.20/Doc.n 24.

4.5.2 Acidi grassi per il calcolo

I gliceridi sono raggruppati secondo i loro numeri di carbonio equivalente (ECN), tenendo conto delle equivalenze fra ECN e acidi grassi riportate qui di seguito. Sono stati presi in considerazione soltanto gli acidi grassi con 16 e 18 atomi di carbonio, poiché sono i soli che abbiano importanza per l'olio d'oliva.

Acidi grassi (FA)	Abbreviazione	Peso molecolare (PM)	ECN
Acido palmitico	P	256.4	16
Acido palmitoleico	Po	254.4	14
Acido stearico	S	284.5	18
Acido oleico	O	282.5	16
Acido linoleico	L	280.4	14
Acido linolenico	Ln	278.4	12

4.5.3. Trasformazione dell'area % in moli per tutti gli acidi grassi

$$\left. \begin{array}{l}
 \text{moli P} = \frac{\text{area \% P}}{\text{PM P}} \quad \text{moli S} = \frac{\text{area \% S}}{\text{PM S}} \quad \text{moliPo} = \frac{\text{area \% Po}}{\text{PM Po}} \\
 \text{moli O} = \frac{\text{area \% O}}{\text{PM O}} \quad \text{moli L} = \frac{\text{area \% L}}{\text{PM L}} \quad \text{moliLn} = \frac{\text{area \% Ln}}{\text{PM Ln}}
 \end{array} \right\} (1)$$

4.5.4. Riconduzione degli acidi grassi al 100%

$$\begin{aligned} \text{moli \% P (1,2,3)} &= \frac{\text{moli P} * 100}{\text{moli (P+S+Po+O+L+Ln)}} \\ \text{moli \% S (1,2,3)} &= \frac{\text{moli S} * 100}{\text{moli (P+S+Po+O+L+Ln)}} \\ \text{moli \% Po (1,2,3)} &= \frac{\text{moli Po} * 100}{\text{moli (P+S+Po+O+L+Ln)}} \\ \text{moli \% O (1,2,3)} &= \frac{\text{moli O} * 100}{\text{moli (P+S+Po+O+L+Ln)}} \\ \text{moli \% L (1,2,3)} &= \frac{\text{moli L} * 100}{\text{moli (P+S+Po+O+L+Ln)}} \\ \text{moli \% Ln (1,2,3)} &= \frac{\text{moli Ln} * 100}{\text{moli (P+S+Po+O+L+Ln)}} \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \text{moli \% P (1,2,3)} \\ \text{moli \% S (1,2,3)} \\ \text{moli \% Po (1,2,3)} \\ \text{moli \% O (1,2,3)} \\ \text{moli \% L (1,2,3)} \\ \text{moli \% Ln (1,2,3)} \end{aligned}} \right\} (2)$$

Il risultato esprime la percentuale di ciascun acido grasso in moli % sulla posizione complessiva (1,2,3-) dei TG.

Si calcola quindi la somma degli acidi grassi saturi P e S (SFA) e degli acidi grassi insaturi Po, O, L e Ln (UFA):

$$\begin{aligned} \text{moli \% SFA} &= \text{moli \% P} + \text{moli \% S} \\ \text{moli \% UFA} &= 100 - \text{moli \% SFA} \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \text{moli \% SFA} \\ \text{moli \% UFA} \end{aligned}} \right\} (3)$$

4.5.5. Calcolo della composizione in acidi grassi nelle posizioni 2- e 1,3- dei TG

Gli acidi grassi sono distribuiti in tre gruppi, nel modo seguente: due identici per le posizioni 1- e 3-, ed uno per la posizione 2-, con coefficienti diversi per gli acidi saturi (P e S) e gli acidi insaturi (Po, O, L e Ln).

4.5.5.1. Acidi grassi saturi in posizione 2 [P(2) e S(2)]

$$\left. \begin{aligned} \text{moli \% P(2)} &= \text{moli \% P (1,2,3)} * 0,06 \\ \text{moli \% S(2)} &= \text{moli \% S (1,2,3)} * 0,06 \end{aligned} \right\} (4)$$

4.5.5.2 Acidi grassi insaturi in posizione 2 [Po(2), O(2), L(2) e Ln(2)]:

$$\left. \begin{aligned} \text{moli \% Po(2)} &= \frac{\text{moli \% Po(1,2,3)}}{\text{moli \% UFA}} * (100 - \text{moli \% P(2)} - \text{moli \% S(2)}) \\ \text{moli \% O(2)} &= \frac{\text{moli \% O(1,2,3)}}{\text{moli \% UFA}} * (100 - \text{moli \% P(2)} - \text{moli \% S(2)}) \\ \text{moli \% L(2)} &= \frac{\text{moli \% L(1,2,3)}}{\text{moli \% UFA}} * (100 - \text{moli \% P(2)} - \text{moli \% S(2)}) \\ \text{moli \% Ln(2)} &= \frac{\text{moli \% Ln(1,2,3)}}{\text{moli \% UFA}} * (100 - \text{moli \% P(2)} - \text{moli \% S(2)}) \end{aligned} \right\} (5)$$

4.5.5.3 Acidi grassi in posizione 1,3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3), e Ln(1,3)]:

$$\left. \begin{aligned} \text{moli \% P(1,3)} &= \frac{\text{moli \% P(1,2,3)} - \text{moli \% P(2)}}{2} + \text{moli \% P(1,2,3)} \\ \text{moli \% S(1,3)} &= \frac{\text{moli \% S(1,2,3)} - \text{moli \% S(2)}}{2} + \text{moli \% S(1,2,3)} \\ \text{moli \% Po(1,3)} &= \frac{\text{moli \% Po(1,2,3)} - \text{moli \% Po(2)}}{2} + \text{moli \% Po(1,2,3)} \end{aligned} \right\} (6)$$

$$\begin{aligned}
 \text{moli \% O(1,3)} &= \frac{\text{moli \% O(1,2,3)} - \text{moli \% O(2)}}{2} + \text{moli \% O(1,2,3)} \\
 \text{moli \% L(1,3)} &= \frac{\text{moli \% L(1,2,3)} - \text{moli \% L(2)}}{2} + \text{moli \% L(1,2,3)} \\
 \text{moli \% Ln(1,3)} &= \frac{\text{moli \% Ln(1,2,3)} - \text{moli \% Ln(2)}}{2} + \text{moli \% Ln(1,2,3)}
 \end{aligned}
 \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \text{moli \% O(1,3)} \\ \text{moli \% L(1,3)} \\ \text{moli \% Ln(1,3)} \end{aligned}} \right\} (6)$$

4.5.6. Calcolo dei trigliceridi

4.5.6.1 TG con un solo acido grasso (AAA, in questo caso A=L o A=Po; LLL, PoPoPo)

$$\text{moli \% AAA} = \frac{\text{moli \% A(1,3)} * \text{moli \% A(2)} * \text{moli \% A(1,3)}}{10.000} \quad \left. \vphantom{\text{moli \% AAA}} \right\} (7)$$

4.5.6.2 TG con due acidi grassi (AAB, in questo caso A=Po e B=L o A=L e B=Po; PoPoL, PoLL)

$$\begin{aligned}
 \text{moli \% AAB} &= \frac{\text{moli \% A(1,3)} * \text{moli \% A(2)} * \text{moli \% B(1,3)} * 2}{10.000} \\
 \text{moli \% ABA} &= \frac{\text{moli \% A(1,3)} * \text{moli \% B(2)} * \text{moli \% A(1,3)}}{10.000}
 \end{aligned}
 \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \text{moli \% AAB} \\ \text{moli \% ABA} \end{aligned}} \right\} (8)$$

4.5.6.3 TG con tre acidi grassi diversi (ABC, in questo caso A=O, B=L, C=Ln o A=Po, B=O, C=Ln o A=P, B=Po, C=Ln; OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln)

$$\begin{aligned}
 \text{moli \% ABC} &= \frac{\text{moli \% A(1,3)} * \text{moli \% B(2)} * \text{moli \% C(1,3)} * 2}{10.000} \\
 \text{moli \% BCA} &= \frac{\text{moli \% B(1,3)} * \text{moli \% C(2)} * \text{moli \% A(1,3)} * 2}{10.000} \\
 \text{moli \% CAB} &= \frac{\text{moli \% C(1,3)} * \text{moli \% A(2)} * \text{moli \% B(1,3)} * 2}{10.000}
 \end{aligned}
 \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \text{moli \% ABC} \\ \text{moli \% BCA} \\ \text{moli \% CAB} \end{aligned}} \right\} (9)$$

4.5.6.4 Trigliceridi con ECN 42

I seguenti trigliceridi con ECN 42 sono calcolati secondo le equazioni 7, 8 e 9 e si indicano qui secondo l'ordine previsto di eluizione in HPLC (normalmente si osservano soltanto tre picchi cromatografici).

LLL

PoLL e isomero di posizione LPoL

OLLn e isomeri di posizione OLnL e LnOL

PoPoL e isomero di posizione PoLPo

PoOLn e isomeri di posizione OPoLn e OLnPo

PLLn e isomeri di posizione LLnP e LnPL

PoPoPo

SLnLn e isomero di posizione LnSLn

PPoLn e isomeri di posizione PLnPo e PoPLn

I trigliceridi con ECN 42 sono espressi dalla somma dei nove trigliceridi, compresi i loro isomeri di posizione. I risultati debbono essere espressi con almeno due cifre decimali.

5. Valutazione del risultato

Si confrontano il contenuto teorico calcolato e il contenuto determinato per HPLC. Se la differenza fra i dati HPLC e i dati teorici è superiore ai valori indicati nella norma, il campione contiene olio di semi.

Nota: i risultati della differenza vanno espressi con una sola cifra decimale.

6. ESEMPIO (Il numero si riferisce alle sezioni nel testo del metodo)

- 4.5.1. Calcolo delle moli % di acidi grassi a partire dai dati GLC (area %)

I dati che seguono sono ottenuti per la composizione in acidi grassi per GLC:

FA	P	S	Po	O	L	Ln
PM	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
Area %	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

- **4.5.3. Trasformazione dell'area % in moli per tutti gli acidi grassi**

$$\text{moli P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moli P}$$

$$\text{moli S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moli S}$$

$$\text{moli Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moli Po}$$

$$\text{moli O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moli O}$$

$$\text{moli L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moli L}$$

$$\text{moli Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,003594 \text{ moli Ln}$$

Vedi formula (1)

$$\text{Somma} = 0,35822 \text{ moli TG}$$

- **4.5.4. Normalizzazione degli acidi grassi al 100%**

$$\text{moli \% P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ moli P} * 100}{0,35822 \text{ moli}} = 10,888\%$$

$$\text{moli \% S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ moli S} * 100}{0,35822 \text{ moli}} = 2,944\%$$

$$\text{moli \% Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ moli Po} * 100}{0,35822 \text{ moli}} = 1,097\%$$

$$\text{moli \% O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ moli O} * 100}{0,35822 \text{ moli}} = 74,113\%$$

$$\text{moli \% L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ moli L} * 100}{0,35822 \text{ moli}} = 9,956\%$$

$$\text{moli \% Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ moli Ln} * 100}{0,35822 \text{ moli}} = 1,003\%$$

$$\text{Totale moli \%} = 100,0\%$$

Vedi formula (2)

Somma degli acidi grassi saturi e insaturi nella posizione 1,2,3 dei TG

$$\left. \begin{array}{l} \text{moli \% SFA} = 10,888\% + 2,944\% = 13,831\% \\ \text{moli \% UFA} = 100,000\% - 13,831\% = 86,169\% \end{array} \right\} \text{Vedi formula (3)}$$

- **4.5.5. Calcolo della composizione in acidi grassi nelle posizioni 2 e 1,3 dei TG**

- **4.5.5.1. Acidi grassi saturi in posizione 2 [P(2) e S(2)]**

$$\left. \begin{array}{l} \text{moli \% P(2)} = 10,888\% * 0,06 = 0,653 \text{ moli \%} \\ \text{moli \% S(2)} = 2,944\% * 0,06 = 0,177 \text{ moli \%} \end{array} \right\} \text{Vedi formula (4)}$$

- **4.5.5.2. Acidi grassi insaturi in posizione 2 [Po(2), O(2), L(2) e Ln(2)]**

$$\left. \begin{array}{l} \text{moli \% Po(2)} = \frac{1,097\%}{86,169\%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 1,262 \text{ moli \%} \\ \text{moli \% O(2)} = \frac{74,113\%}{86,169\%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 85,295 \text{ moli \%} \\ \text{moli \% L(2)} = \frac{9,956\%}{86,169\%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 11,458 \text{ moli \%} \\ \text{moli \% Ln(2)} = \frac{1,003\%}{86,169\%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 1,154 \text{ moli \%} \end{array} \right\} \text{Vedi formula (5)}$$

- **4.5.5.3. Acidi grassi in posizione 1,3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) e Ln(1,3)]**

$$\begin{aligned}
 \text{moli \% P(1,3)} &= \frac{10,888 - 0,659}{2} + 10,888 = 16,005 \text{ moli \%} \\
 \text{moli \% S(1,3)} &= \frac{2,944 - 0,177}{2} + 2,944 = 4,327 \text{ moli \%} \\
 \text{moli \% Po(1,3)} &= \frac{1,097 - 1,263}{2} + 1,097 = 1,015 \text{ moli \%} \\
 \text{moli \% O(1,3)} &= \frac{74,113 - 85,295}{2} + 74,113 = 68,522 \text{ moli \%} \\
 \text{moli \% L(1,3)} &= \frac{9,956 - 11,458}{2} + 9,956 = 9,205 \text{ moli \%} \\
 \text{moli \% Ln(1,3)} &= \frac{1,003 - 1,154}{2} + 1,003 = 0,927 \text{ moli \%}
 \end{aligned}$$

} Vedi formula (6)

- **4.5.6. Calcolo dei trigliceridi**

Dalla composizione calcolata in acidi grassi nelle posizioni sn-2- e sn-1,3-

AG in	posiz. 1,3-%	posiz. 2 -%
P	16,005	0,653
S	4,327	0,177
Po	1,015	1,263
O	68,522	85,295
L	9,205	11,458
Ln	0,927	1,154
Somma	100,0	100,0

si calcolano i seguenti trigliceridi:

LLL

PoPoPo

PoLL con 1 isomero di posizione

SLnLn con 1 isomero di posizione

oPoL con 1 isomero di posizione

PPoLn con 2 isomeri di posizione

OLLn con 2 isomeri di posizione

PLLn con 2 isomeri di posizione

PoOLn con 2 isomeri di posizione

- **4.5.6.1 TG con un solo acido grasso (LLL, PoPoPo)** Vedi formula (7)

$$\text{moli \% LLL} = \frac{9,205\% * 11,458\% * 9,205\%}{10.000} = \underline{\underline{0,09708 \text{ moli LLL}}}$$

$$\text{moli \% PoPoPo} = \frac{1,015\% * 1,263\% * 1,015\%}{10.000} = \underline{\underline{0,00013 \text{ moli PoPoPo}}}$$

- **4.5.6.2 TG con due acidi grassi (PoLL, SLnLn, PoPoL)** Vedi formula (8)

$$\text{moli \% PoLL+LLPo} = \frac{1,015\% * 11,458\% * 9,205\% * 2}{10.000} = 0,02141$$

$$\text{moli \% LpoL} = \frac{9,205\% * 1,263\% * 9,205\%}{10.000} = 0,01070$$

0,03211 moli PoLL

$$\text{moli \% SLnLn+LnLnS} = \frac{4,327\% * 1,154\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,00093$$

$$\text{moli \% LnSLn} = \frac{0,927\% * 0,177\% * 0,927\%}{10.000} = 0,00002$$

0,00095 moli SLnLn

$$\text{moli\%PoPoL+LPoPo} = \frac{1,015\% * 1,263\% * 9,205\% * 2}{10.000} = 0,00236$$

$$\text{moli \% PoLPo} = \frac{1,015\% * 11,458\% * 1,015\%}{10.000} = 0,00118$$

0,00354 moli PoPoL

- **4.5.6.3 TG con tre diversi acidi grassi (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn)**Vedi formula (9)

$$\text{moli \% PPoLn} = \frac{16,005\% * 1,263\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,00375$$

$$\text{moli \% LnPPo} = \frac{0,927\% * 0,653\% * 1,015\% * 2}{10.000} = 0,00012$$

$$\text{moli \% PoLnP} = \frac{1,015\% * 1,154\% * 16,005\% * 2}{10.000} = 0,00375$$

0,00762 moli PPoLn

$$\text{moli \% OLLn} = \frac{68,522\% * 11,458\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,14577$$

$$\text{moli \% LnOL} = \frac{0,927\% * 85,295\% * 9,205\% * 2}{10.000} = 0,14577$$

$$\text{moli \% LLnO} = \frac{9,205\% * 1,154\% * 68,522\% * 2}{10.000} = 0,14577$$

0,43671 moli OLLn

$$\text{moli \% PLLn} = \frac{16,005\% * 11,458\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,03400$$

$$\text{moli \% LnPL} = \frac{0,927\% * 0,653\% * 9,205\% * 2}{10.000} = 0,00111$$

$$\text{moli \% LLnP} = \frac{9,205\% * 1,154\% * 16,005\% * 2}{10.000} = 0,03400$$

0,06912 moli PLLn

$$\text{moli \% PoOLn} = \frac{1,015\% * 85,295\% * 0,927\% * 2}{10.000} = 0,01605$$

$$\text{moli \% LnPoO} = \frac{0,927\% * 1,263\% * 68,522\% * 2}{10.000} = 0,01605$$

$$\text{moli \% OLnPo} = \frac{68,522\% * 1,154\% * 1,015\% * 2}{10.000} = 0,01605$$

0,04815 moli PoOLn

$$\text{ECN 42} = \underline{\underline{0,69540 \text{ moli TG}}}$$

Nota 1: l'ordine di eluizione può essere determinato calcolando i numeri di carbonio equivalente, definiti spesso dalla relazione $ECN = CN - 2n$, dove CN è il numero di carbonio ed n è il numero di doppi legami, esso può essere calcolato più precisamente tenendo conto dell'origine del doppio legame; Se n_o , n_l e n_{ln} sono i numeri di doppi legami attribuiti rispettivamente agli acidi oleico, linoleico e linolenico, il numero di carbonio equivalente può essere calcolato mediante la relazione data dalla formula:

$$ECN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln}$$

dove i coefficienti d_o , d_l e d_{ln} possono essere calcolati mediante i trigliceridi di riferimento. Nelle condizioni specificate nel presente metodo, la relazione ottenuta sarà vicina a:

$$ECN = CN - (2,60 n_o) - (2,35 n_l) - (2,17 n_{ln})$$

Nota 2: con diversi trigliceridi di riferimento è anche possibile calcolare la risoluzione rispetto alla trioleina:

$$\alpha = RT'/RT \text{ trioleina}$$

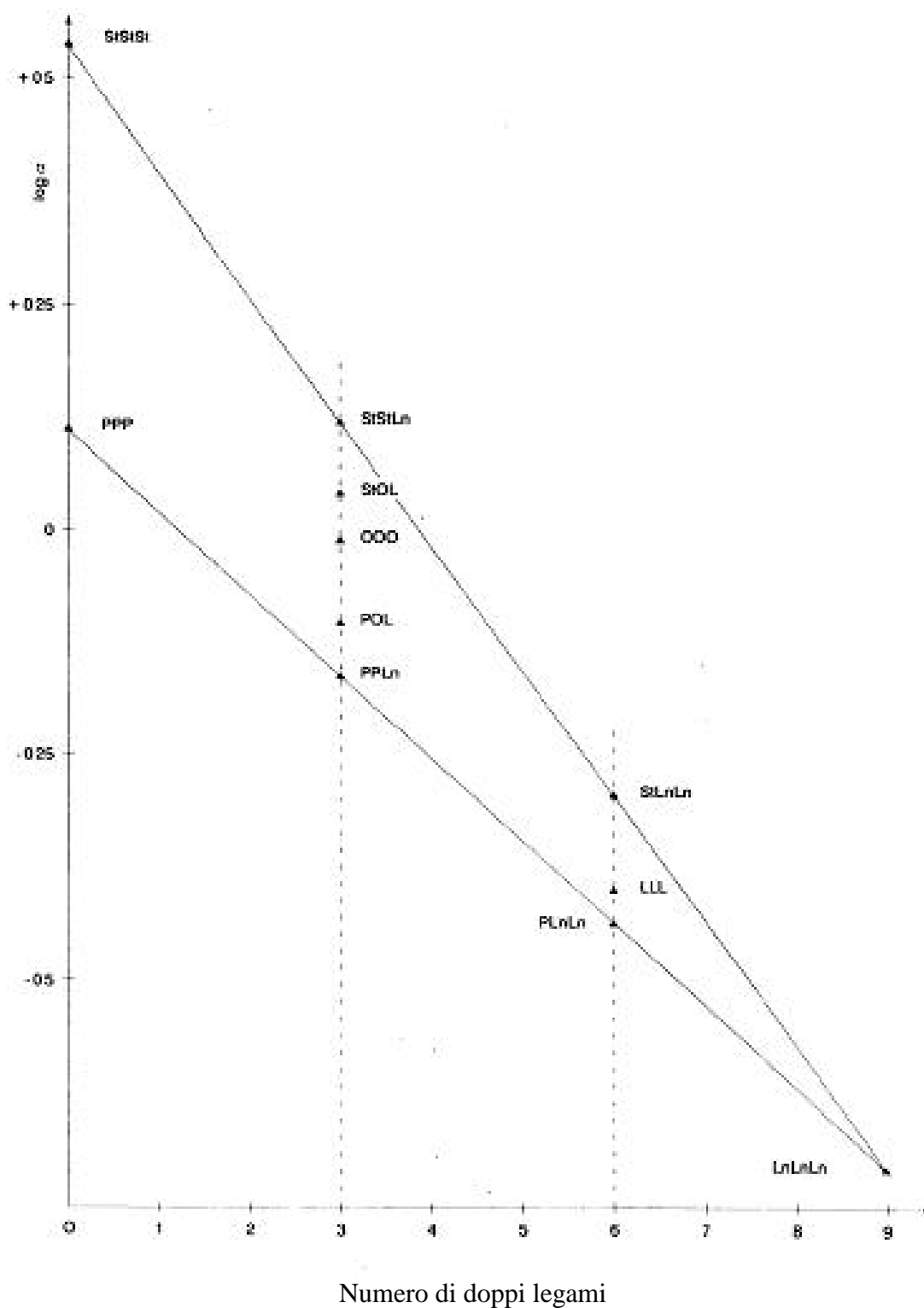
impiegando il tempo corretto di ritenzione $RT' = RT - RT \text{ solvente}$.

Il grafico di $\log \alpha$ in funzione di f (numero di doppi legami) permette di determinare i valori di ritenzione per tutti i trigliceridi degli acidi grassi contenuti nei trigliceridi di riferimento (cfr. figura 1).

Nota 3: L'efficienza della colonna dovrebbe permettere una chiara separazione del picco della trilinoleina da quelle dei trigliceridi con un RT immediatamente prossimo. L'eluizione viene effettuata fino al picco corrispondente ad ECN 52.

Nota 4: Una misura corretta delle aree di tutti i picchi aventi interesse per la presente determinazione è assicurata quando l'altezza del secondo picco della serie ECN 50 è pari al 50% del fondo scala di registrazione.

Figura 1: Evoluzione del $\log \alpha$ in funzione di f (numero di doppi legami)



Nota: La: acido laurico; My: acido miristico; P: acido palmitico; St: acido stearico;
O: acido oleico; L: acido linoleico; Ln: acido linolenico.

Figura 2: Olio di soia

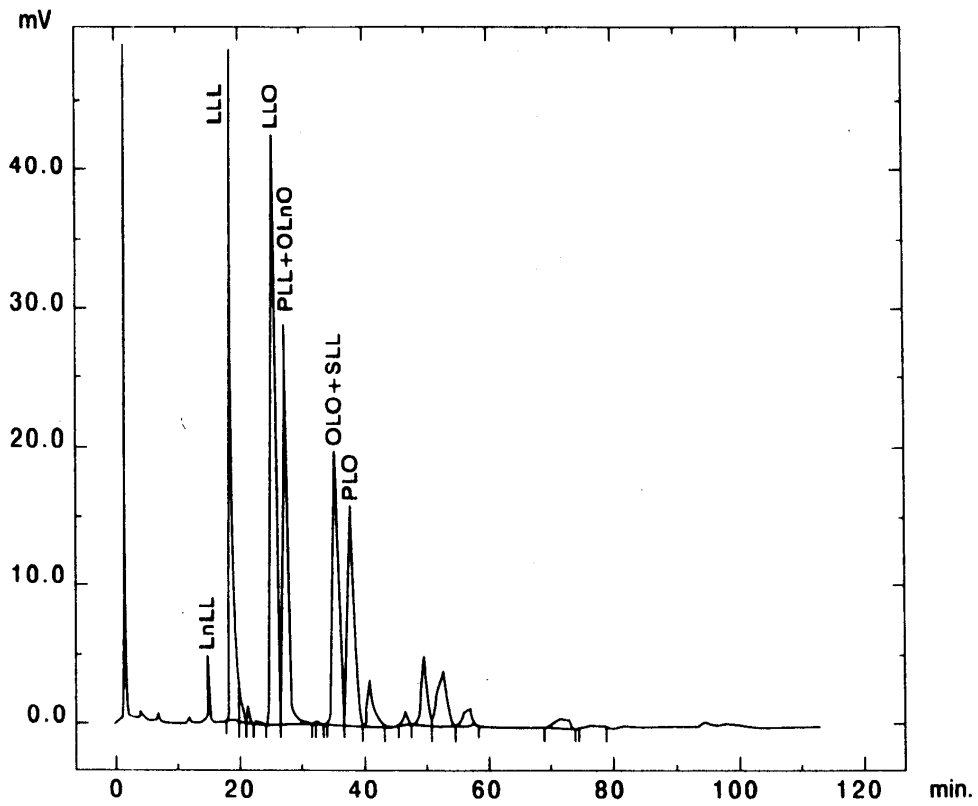


Figura 3: Olio di soia/ Olio d'oliva 30:70

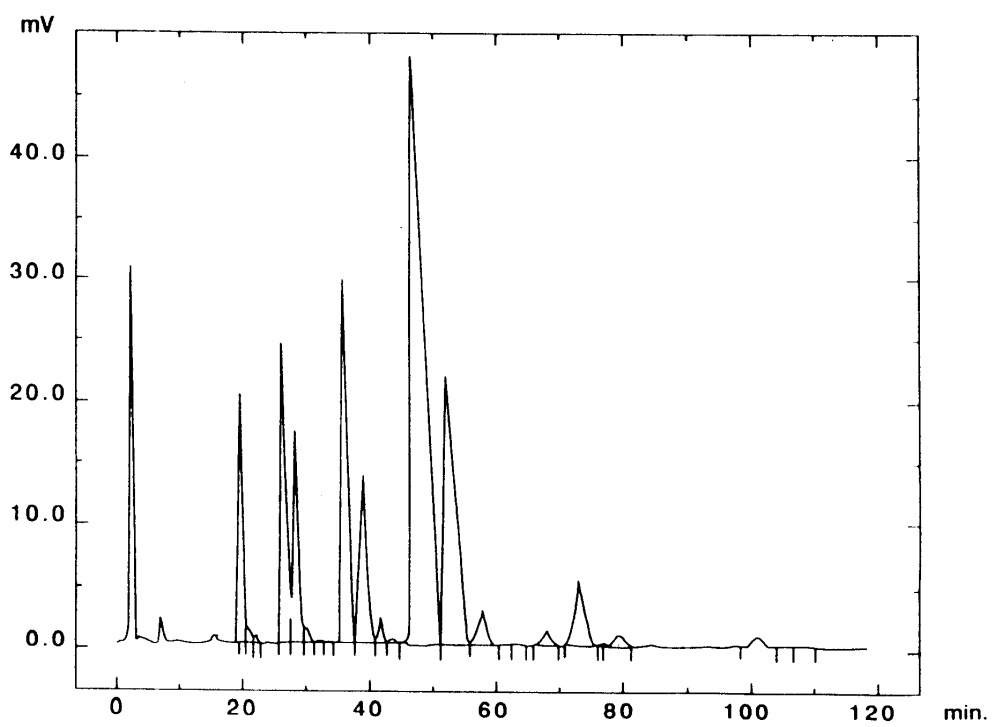
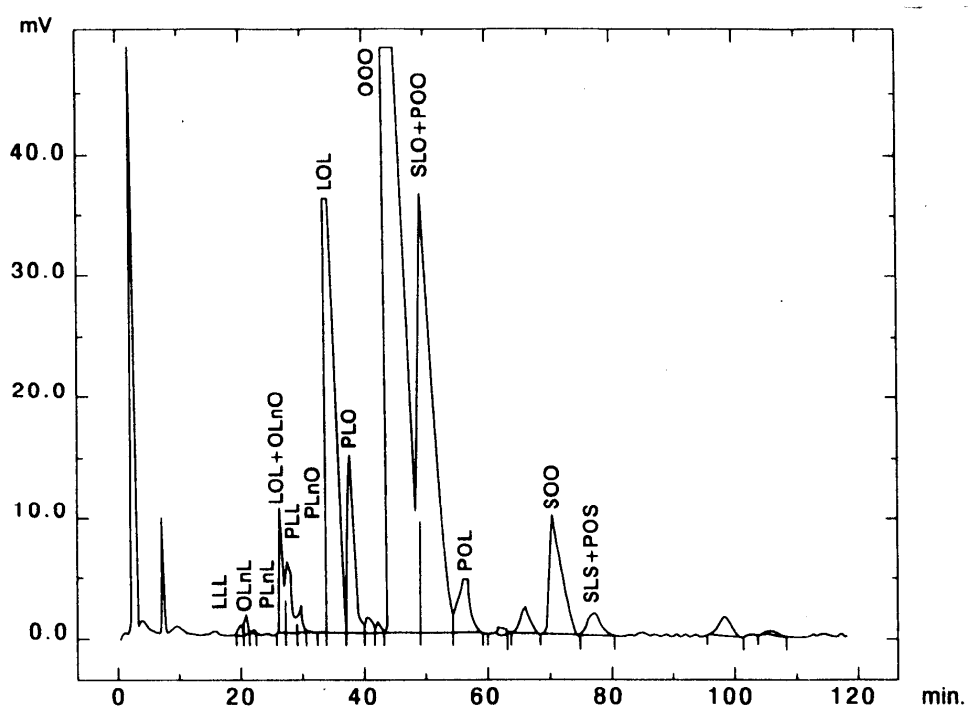


Figura 4: Olio d'oliva



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:

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 ($S_r \times 100 / \text{mean}$)

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 ($S_R \times 100 / \text{mean}$)

Differenza tra il contenuto reale e teorico di trigliceridi con ECN 42

	A	B	C	D	E
n	19	19	19	19	19
outliers	1	0	0	0	3
mean	0.04	1.66	0.04	0.18	0.82
r	0.08	0.12	0.09	0.11	0.11
S_r	0.02	0.04	0.03	0.04	0.041
RSD_r (%)	82.24 _(not sig.)	2.77	76.11 _(not sig.)	22.51	5.07
R	0.12	0.25	0.16	0.22	0.24
S_R	0.05	0.09	0.05	0.08	0.08
RSD_R(%)	127.56 _(not sig.)	5.42	132.17 _(not sig.)	46.19	10.85

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

PROGRAMMA INFORMATICO