



PREPARAZIONE DEGLI ESTERI METILICI DI ACIDI GRASSI DA OLIO DI OLIVA E DI SANSO DI OLIVA

Per la preparazione degli esteri metilici di acidi grassi da oli di oliva e di sansa di oliva si raccomandano i due metodi che seguono:

- METODO A. Transesterificazione a freddo con soluzione metanolica di idrossido di potassio
- METODO B. Metilazione a caldo con metilato di sodio in metanolo seguita da esterificazione in ambiente acido

La scelta del metodo avverrà in funzione del parametro analitico da determinare e della categoria dell'olio, secondo lo schema che segue:

- a) Determinazione di ΔECN_{42} (differenza tra il valore teorico e sperimentale dei trigliceridi ECN_{42})
- Il metodo A si applica a campioni di oli di tutte le categorie dopo purificazione dell'olio mediante passaggio su una colonna di gel di silice.
- b) Determinazione della composizione in acidi grassi
- Il metodo A si applica direttamente ai campioni di olio delle seguenti categorie
 - Olio di oliva vergine di acidità non superiore a 3,3%
 - Olio di oliva raffinato
 - Olio di oliva (miscela di olio di oliva vergine e raffinato)
 - Olio di sansa di oliva raffinato
 - Olio di sansa di oliva (miscela di olio di oliva vergine e olio di sansa di oliva raffinato)

- Il metodo B si applica direttamente a campioni delle categorie di olio indicate di seguito
 - Olio di oliva vergine di acidità superiore al 3,3%
 - Olio di sansa di oliva grezzo

- c) Determinazione degli isomeri *trans* degli acidi grassi
 - Il metodo A si applicherà direttamente ai campioni di olio delle seguenti categorie:
 - Olio di oliva vergine di acidità non superiore a 3,3%
 - Olio di oliva raffinato
 - Olio di oliva (miscela di olio di oliva vergine e raffinato)
 - Olio di sansa di oliva raffinato
 - Olio di sansa di oliva (miscela di olio di oliva vergine e olio di sansa di oliva raffinato)

 - Il metodo A si applicherà agli oli delle seguenti categorie dopo purificazione mediante passaggio su una colonna di gel di silice:
 - Olio di oliva vergine di acidità superiore al 3,3%
 - Olio di sansa di oliva grezzo

PURIFICAZIONE DEI CAMPIONI DI OLIO

Se necessario, i campioni verranno purificati facendo passare l'olio su una colonna di gel di silice, utilizzando come solvente di eluizione esano-ossido di diethyle (87:13, v/v) secondo quanto descritto dal metodo IUPAC 2.507.

Come procedimento alternativo si può ricorrere all'estrazione in fase solida utilizzando cartucce di gel di silice. Una cartuccia di gel di silice (1 g, 6 ml) 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, si deposita nella colonna una soluzione di olio (0.12 g circa) in 0,5 ml di esano e si opera il collegamento con la pompa a vuoto. La soluzione si introduce così nella silice e si eluisce con 10 ml of esano/ossido di diethyle (87:13 v/v) sotto vuoto. Si omogeneizzano gli eluati totali e si dividono in due volumi simili. Si evapora un'aliquota fino ad essiccamento in un evaporatore rotante, operando sotto pressione ridotta, a temperatura ambiente. Si dissolve il residuo in 1 ml di eptano ottenendo una soluzione pronta per l'analisi degli acidi grassi mediante GC. Si evapora la seconda aliquota e si dissolve il residuo in 1 ml di acetone, per l'analisi dei trigliceridi mediante HPLC.

METODI PER LA PREPARAZIONE DEGLI ESTERI METILICI DI ACIDI GRASSI

1. METODO A. Transesterificazione a freddo con soluzione metanolica di idrossido di potassio

1.1. Osservazioni generali

Questo metodo rapido è applicabile agli oli di oliva e di sansa il cui contenuto in acidi grassi liberi non sia superiore a 3,3%. Gli acidi grassi liberi non vengono esterificati dall'idrossido di potassio. Gli esteri etilici degli acidi grassi vengono transesterificati più lentamente degli esteri gliceridici, e possono essere metilati solo parzialmente.

1.2. Principio del metodo

Gli esteri metilici si formano per transesterificazione con una soluzione metanolica di idrossido di potassio come fase intermedia prima della saponificazione (punto 5 di ISO-5509:2000, punto 5 del metodo IUPAC 2.301).

1.3. Reagenti

Metanolo dal contenuto in acqua non superiore allo 0,5% (m/m)

Eptano puro per cromatografia

Idrossido di potassio, soluzione metanolica circa 2 N: sciogliere 11,2 g di idrossido di potassio in 100 ml di metanolo.

1.4. Apparecchiatura

Provette con tappo a vite (volume 5 ml) munito di giunto PTFE

Pipette tarate o automatiche da 2 ml e 0,2 ml.

1.5. Procedimento

Si pesano circa 0,1 g del campione di olio in una provetta da 5 ml con tappo a vite. Si aggiungono 2 ml di eptano e si mescola. Si aggiungono 0,2 ml di soluzione metanolica di idrossido di potassio N2, si chiude con il tappo munito di giunto PTFE, si stringe bene il tappo e si agita energicamente per 30 secondi. Si lascia stratificare finché la soluzione superiore diventa trasparente. Decantare lo strato superiore che contiene gli esteri di metile. La soluzione di eptano ottenuta è adatta ad essere iniettata nel gascromatografo. Si consiglia di conservare la soluzione in frigorifero fino al momento dell'analisi gascromatografica. Non si consiglia di conservare la soluzione per un periodo superiore alle 12 ore

2. METODO B. Metilazione a caldo con sodio metilato in metanolo seguita da esterificazione in ambiente acido

2.1. Osservazioni generali

Questo metodo è applicabile a oli di oliva e oli di sansa di oliva il cui contenuto in acidi grassi liberi è superiore a 3,3%.

2.2. Principio del metodo

Neutralizzazione degli acidi grassi liberi e metanolisi alcalina dei gliceridi, seguita da esterificazione degli acidi grassi in ambiente acido (punto 4.2. del metodo IUPAC 2.301).

2.3. Reagenti

Eptano, puro per cromatografia

Metanolo dal contenuto in acqua non superiore allo 0,05% (m/m)

Metilato sodico, soluzione metanolica 0,2 N: sciogliere 5 g di sodio in 1.000 ml di metanolo (può essere preparata a partire da soluzioni commerciali).

Fenolftaleina, 0,2% soluzione metanolica

Acido solforico, 1 N in soluzione metanolica:aggiungere 3 ml di acido solforico al 96% a 100 ml di metanolo

Soluzione satura di cloruro di sodio in acqua

2.4. Apparecchiatura

Matraccio volumetrico da 50 ml con collo a smeriglio lungo e stretto

Refrigeratore a ricadere

Condensatore ad aria, di 1 m di lunghezza, con giunto smerigliato idoneo ad essere montato sul matraccio.

Granuli ebullioscopici

Imbuto di vetro

2.5. Procedimento

Si trasferiscono 0,25 g circa del campione di olio in un matraccio volumetrico da 50 ml con il collo smerigliato. Con l'aiuto di un imbuto si aggiungono 10 ml della soluzione metanolica 0,2 N di metilato sodico e granuli ebullioscopici. Si applica il refrigerante a ricadere, si agita e si porta a ebollizione. La soluzione dovrebbe diventare trasparente in circa 10 minuti. La reazione è completa in 15 minuti. Si toglie il matraccio dalla fonte di calore, si attende che cessi il riflusso, si stacca il refrigerante e si aggiungono due gocce di soluzione di fenolftaleina. Si aggiungono pochi ml di acido solforico 1N in soluzione metanolica finché la soluzione diventa incolore e si aggiunge 1 ml in eccesso. Si applica il refrigerante e si fa bollire nuovamente per 20 minuti. Si rimuove la fonte di calore e si raffredda il matraccio sotto acqua corrente. Si stacca il refrigeratore, si aggiungono 20 ml di soluzione satura di cloruro di sodio e si agita. Si aggiungono 5 ml di eptano, si tappa il matraccio e si agita energicamente per 15 secondi. Si lascia sedimentare fino alla separazione delle due fasi. Si aggiunge nuovamente la soluzione satura di cloruro di sodio finché lo strato acquoso non raggiunge la base del collo del matraccio. Lo

strato superiore contenente gli esteri di metile riempie il collo del matraccio. Questa soluzione è pronta per l'iniezione nel gascromatografo.

Avvertenza : La metilazione con il metodo B deve essere effettuata sotto una cappa.

2.6 ALTERNATIVE AL METODO DI METILAZIONE B

2.6.1 METODO C.

2.6.1.1. Principio del metodo

La sostanza grassa in esame viene trattata con metanolo-acido cloridrico, in fiala chiusa, a 100° C.

2.6.1.2. Apparecchiatura

Fiala di vetro, a pareti robuste, da circa 5 ml (altezza 40 - 45 mm, diametro 14 - 16 mm).
Pipette tarate da 1 e 2 ml.

2.6.1.3. Reagenti

Soluzione di acido cloridrico in metanolo al 2%. Si prepara con acido cloridrico gassoso e metanolo anidro(Nota 1)
Esano per gascromatografia.

2.6.1.4. Procedimento

Si introducono nella fiala di vetro 0,2 g di sostanza grassa, preventivamente disidratata su solfato sodico e filtrata, e 2 ml di soluzione di acido cloridrico-metanolo. Si chiude la fiala alla fiamma .

Si mantiene la fiala in bagno a 100° C per 40 minuti.

Si raffredda la fiala sotto acqua corrente, si apre, si aggiungono 2 ml di acqua distillata e 1 ml di esano. Si centrifuga e si preleva la fase esanica che è pronta per l'impiego.

Nota 1: Si possono impiegare le soluzioni di cloruro di idrogeno in metanolo disponibili in commercio. È possibile preparare facilmente in laboratorio piccole quantità di acido cloridrico gassoso, modificando la soluzione disponibile in commercio ($r = 1,18$) aggiungendo qualche goccia di acido solforico concentrato ($r = 1,84$). Il gas liberato può facilmente essere seccato se viene fatto gorgogliare nell'acido solforico concentrato. Poiché l'acido cloridrico è rapidamente assorbito dal metanolo, si raccomanda di prendere le precauzioni abituali al momento della dissoluzione, ad esempio introducendo il gas con una piccola fiala rovesciata il cui bordo sfiora la superficie del liquido. La soluzione metanolica di acido cloridrico può essere preparata in anticipo in grandi quantità, poiché si conserva perfettamente in bottiglie con tappo di vetro conservate nell'oscurità. In alternativa, questo reagente può essere preparato dissolvendo cloruro di acetile in metanolo anidro.

2.6.2. METODO D.

2.6.2.1. Principio del metodo

La sostanza grassa in esame viene riscaldata a ricadere con metanolo-esano-acido solforico. Gli esteri metilici ottenuti si estraggono con etere di petrolio.

2.6.2.2. Apparecchiatura

Provetta da 20 ml circa, munita di refrigerante a ricadere ad aria, della lunghezza di 1 m circa, con giunti a smeriglio
Pipetta tarata da 5 ml
Imbuto separatore da 50 ml
Cilindri graduati da 10 e 25 ml
Provetta da 15 ml, a fondo conico.

2.6.2.3. Reagenti

Reagente di metilazione: metanolo anidro, esano, acido solforico concentrato ($d = 1,84$) in rapporto 75:25:1 (V/V/V)
Etere di petrolio 40 - 60° C
Sodio solfato anidro.

2.6.2.4. Procedimento

Nella provetta da 20 ml si introduce il materiale recuperato dalla placca e si aggiungono 5 ml di reagente di metilazione.

Si collega il refrigerante a ricadere e si riscalda per 30 minuti in bagnomaria bollente (*Nota 2*).

Si trasferisce quantitativamente la miscela in un imbuto separatore da 50 ml, aiutandosi con 10 ml di acqua distillata e 10 ml di etere di petrolio. Si agita energicamente, si lasciano separare le fasi, si allontana lo strato acquoso e si lava lo strato eterico per due volte con 20 ml di acqua distillata. Si aggiunge nell'imbuto separatore una piccola quantità di solfato sodico anidro, si agita, si lascia a riposo per qualche minuto e si filtra, raccogliendo il filtrato in una provetta a fondo conico da 15 ml.

Si evapora il solvente su bagnomaria, in corrente di azoto.

Nota 2: Per controllare l'ebollizione introdurre una bacchetta di vetro nella provetta e limitare la temperatura del bagnomaria a 90°C.

3. Parametri di precisione

La valutazione statistica della precisione dei metodi A e B è stata pubblicata su *Grasas y Aceites*, Vol. 51, Fasc. 6 (2000), 447-456, da A. Cert, W. Moreda e M.C. Pérez-Camino.

La prova collettiva è stata condotta da 16 laboratori di sette paesi, su cinque campioni:

1. Olio di oliva extra vergine (acidità libera 0,18%)
2. Olio di oliva vergine (acidità libera 2,0%)
3. Olio di oliva vergine (acidità libera 3,3%)
4. Olio di oliva (acidità libera 0,88%)
5. Olio di sansa di oliva grezzo (acidità libera 15,8%)

La prova collettiva è stata condotta secondo le istruzioni fornite da W. Horwitz (Horwitz 1988). L'analisi statistica della ripetibilità e della riproducibilità è stata condotta secondo il metodo ISO 5725 (ISO 1986) e le norme AOAC (AOAC 1995), che descrivono le procedure di identificazione dei valori fuori scala e i procedimenti matematici, utilizzando un programma informatico messo a punto dagli autori. Per identificare i valori fuori scala sono stati usati i test di Cochran e Grubbs, che hanno determinato rispettivamente i laboratori che hanno ottenuto risultati molto diversi per campioni in replica e quelli che hanno ottenuto valori estremamente alti o bassi.

Sono stati usati i seguenti parametri statistici:

- S_r : Deviazione standard della ripetibilità
- r : Ripetibilità ($2.8 \sqrt{S_r^2}$)
- RSD_r : Deviazione standard relativa della ripetibilità
- S_R : Deviazione standard della riproducibilità
- R : Riproducibilità ($2.8 \sqrt{S_R^2}$)
- RSD_R : Deviazione standard relativa della riproducibilità
- Ho_R : Rapporto di Horwitz $\left[\frac{RSD_R}{RSD_{R_{th}}} \right]$ laddove $RSD_{R_{th}} = 2^{(1 - 0.5 \log C)}$, C è il valore della concentrazione degli analiti elevato alla decima potenza.

Tabella 1. Parametri statistici relativi alla determinazione dell'acido C14:0 negli oli di oliva e di sansa di oliva										
Campione	Extra vergine		Vergine		Lampante		Olio di oliva		Olio di sansa di oliva grezzo	
Metodo	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida
Partecipanti	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Fuori scala	0	1	0	0	1	3	1	0	3	3
Media (%)	0.0090	0.0087	0.0127	0.0138	0.0118	0.0098	0.0100	0.0100	0.0181	0.0296
Ripetibilità										
Sr	0.0018	0.0026	0.0026	0.0043	0.0042	0.0034	0.0038	0.0043	0.0020	0.0059
R	0.0051	0.0072	0.0072	0.0121	0.0118	0.0092	0.0106	0.0121	0.0055	0.0165
<i>RSD_r</i> (%)	20	30	20	31	36	37	38	43	11	20
Riproducibilità										
S _R	0.0041	0.0044	0.0059	0.0071	0.0062	0.0060	0.0047	0.0057	0.0058	0.0060
R	0.0114	0.0123	0.0166	0.0200	0.0173	0.0161	0.0133	0.0160	0.0162	0.0168
<i>RSD_R</i> (%)	45	51	47	52	52	64	42	57	32	20
<i>Ho_R</i>	0.5	0.6	0.5	0.6	0.6	0.7	0.5	0.6	0.4	0.3

S_r: Deviazione standard della ripetibilità; *r*: Ripetibilità; *RSD_r*: Deviazione standard relativa della ripetibilità; *S_R*: Deviazione standard della riproducibilità; *R*: Riproducibilità; *RSD_R*: Deviazione standard relativa della riproducibilità; *Ho_R*: Rapporto Horwitz.

Tabella 2. Parametri statistici relativi alla determinazione dell'acido C16:0 negli oli di oliva e di sansa di oliva										
Campione	Extra vergine		Vergine		Lampante		Olio di oliva		Olio di sansa di oliva grezzo	
Metodo	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida
Partecipanti	15	16	15	16	15	16	15	15	15	16
Fuori scala	2	3	3	4	1	3	0	2	0	4
Media (%)	7.96	8.06	10.32	10.51	10.35	10.62	10.51	10.41	9.67	10.28
Ripetibilità										
S_r	0.04	0.09	0.06	0.13	0.15	0.13	0.10	0.08	0.14	0.09
R	0.12	0.26	0.18	0.35	0.42	0.35	0.29	0.22	0.38	0.25
$RSD_R(\%)$	0.53	1.1	0.62	1.2	1.5	1.2	0.98	0.75	1.4	0.87
Riproducibilità										
S_R	0.24	0.14	0.16	0.18	0.33	0.17	0.46	0.42	0.45	0.15
R	0.68	0.40	0.44	0.49	0.93	0.48	1.3	1.2	1.3	0.41
$RSD_R(\%)$	3.0	1.8	1.5	1.7	3.2	1.6	4.4	4.0	4.7	1.4
Ho_R	0.09	0.05	0.05	0.05	0.10	0.05	0.14	0.13	0.15	0.05

S_r : Deviazione standard della ripetibilità; r : Ripetibilità; RSD_R : Deviazione standard relativa della ripetibilità; S_R : Deviazione standard della riproducibilità; R : Riproducibilità; RSD_R : Deviazione standard relativa della riproducibilità; Ho_R : Rapporto Horwitz .

Tabella 3. Parametri statistici relativi alla determinazione dell'acido C16:1 negli oli di oliva e di sansa di oliva

Campione	Extra vergine		Vergine		Lampante		Olio di oliva		Olio di sansa di oliva grezzo	
	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida
Partecipanti	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Fuori scala	0	1	2	2	0	1	1	1	1	2
Media (%)	0.504	0.501	0.675	0.662	0.735	0.718	0.906	0.870	0.636	0.674
Ripetibilità										
<i>S_r</i>	0.014	0.017	0.010	0.027	0.026	0.020	0.012	0.012	0.014	0.018
<i>R</i>	0.041	0.049	0.027	0.077	0.074	0.057	0.034	0.034	0.040	0.050
<i>RSD_r</i> (%)	2.9	3.5	1.4	4.1	3.6	2.8	1.3	1.4	2.3	2.7
Riproducibilità										
<i>S_R</i>	0.034	0.034	0.027	0.047	0.047	0.044	0.44	0.057	0.046	0.049
<i>R</i>	0.966	0.095	0.077	0.131	0.132	0.122	0.123	0.159	0.128	0.138
<i>RSD_R</i> (%)	6.8	6.8	4.1	7.0	6.4	6.1	4.9	6.5	7.2	7.3
<i>Ho_R</i>	0.14	0.14	0.08	0.15	0.13	0.13	0.11	0.14	0.15	0.15

S_r: Deviazione standard della ripetibilità; *r*: Ripetibilità; *RSD_r*: Deviazione standard relativa della ripetibilità; *S_R*: Deviazione standard della riproducibilità; *R*: Riproducibilità; *RSD_R*: Deviazione standard relativa della riproducibilità; *Ho_R*: Rapporto Horwitz.

Tabella 4. Parametri statistici relativi alla determinazione dell'acido C18:0 nell'olio d'oliva e nell'olio di sansa										
Campione	Extra vergine		Vergine		Lampante		Olio di oliva		Olio di sansa di oliva grezzo	
Metodo	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida
Partecipanti	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Fuori scala	2	1	0	1	0	1	0	0	1	0
Media (%)	2.883	2.871	2.490	2.508	2.618	2.676	3.492	3.495	3.118	3.256
Ripetibilità										
<i>S_r</i>	0.032	0.018	0.012	0.017	0.030	0.027	0.034	0.035	0.038	0.047
<i>R</i>	0.089	0.049	0.034	0.047	0.084	0.075	0.094	0.972	0.107	0.133
<i>RSD_R</i> (%)	1.1	0.61	0.49	0.66	1.1	1.0	0.96	0.99	1.2	1.5
Riproducibilità										
<i>S_R</i>	0.061	0.110	0.092	0.109	0.088	0.106	0.131	0.147	0.117	0.128
<i>R</i>	0.171	0.308	0.259	0.306	0.246	0.297	0.367	0.411	0.328	0.358
<i>RSD_R</i> (%)	2.1	3.8	3.7	4.4	3.4	4.0	3.8	4.2	3.8	3.9
<i>Ho_R</i>	0.05	0.10	0.09	0.11	0.09	0.10	0.10	0.11	0.10	0.10

S_r: Deviazione standard della ripetibilità; *r*: Ripetibilità; *RSD_R*: Deviazione standard relativa della ripetibilità; *S_R*: Deviazione standard della riproducibilità; *R*: Riproducibilità; *RSD_R*: Deviazione standard relativa della riproducibilità; *Ho_R*: Rapporto Horwitz.

Tabella 5. Parametri statistici relativi alla determinazione dell'acido C18:1 nell'olio di oliva e di sansa di oliva

Campione	Extra vergine		Vergine		Lampante		Olio di oliva		Olio di sansa di oliva grezzo	
Metodo	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida
Partecipanti	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Fuori scala	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
Media (%)	79.42	79.39	74.55	74.56	75.55	75.41	76.14	76.22	75.80	75.02
Ripetibilità										
<i>S_r</i>	0.15	0.10	0.11	0.16	0.14	0.14	0.08	0.14	0.16	0.11
<i>R</i>	0.42	0.29	0.30	0.45	0.39	0.40	0.23	0.40	0.46	0.32
<i>RSD_R</i> (%)	0.19	0.13	0.15	0.21	0.19	0.19	0.11	0.19	0.21	0.15
Riproducibilità										
<i>S_R</i>	0.49	0.42	0.45	0.49	0.45	0.48	0.47	0.48	0.64	0.57
<i>R</i>	1.37	1.18	1.26	1.37	1.26	1.34	1.33	1.33	1.80	1.58
<i>RSD_R</i> (%)	0.61	0.53	0.61	0.66	0.60	0.63	0.62	0.63	0.85	0.75
<i>Ho_R</i>	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03

S_r: Deviazione standard della ripetibilità; *r*: Ripetibilità; *RSD_R*: Deviazione standard relativa della ripetibilità; *S_R*: Deviazione standard relativa della riproducibilità; *R*: Riproducibilità; *RSD_R*: Deviazione standard relativa della riproducibilità; *Ho_R*: Rapporto Horwitz.

Tabella 6. Parametri statistici relativi alla determinazione dell'acido C18:2 negli oli di oliva e di sansa di oliva										
Campione	Extra vergine		Vergine		Lampante		Olio di oliva		Olio di sansa di oliva grezzo	
Metodo	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida
Partecipanti	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Fuori scala	2	2	1	2	0	1	1	1	0	1
Media (%)	7.33	7.25	9.66	9.60	8.52	8.44	7.18	7.12	8.75	8.85
Ripetibilità										
S_r	0.02	0.04	0.03	0.06	0.06	0.08	0.04	0.04	0.05	0.04
R	0.07	0.12	0.08	0.16	0.17	0.21	0.12	0.11	0.13	0.10
$RSD_R(\%)$	0.33	0.58	0.28	0.59	0.70	0.90	0.62	0.56	0.55	0.41
Riproducibilità										
S_R	0.12	0.17	0.19	0.20	0.18	0.19	0.16	0.12	0.21	0.17
R	0.34	0.47	0.52	0.55	0.50	0.52	0.45	0.33	0.59	0.48
$RSD_R(\%)$	1.7	2.3	1.9	2.0	2.1	2.2	2.2	1.6	2.4	1.9
Ho_R	0.05	0.07	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.05	0.07	0.06

S_r : Deviazione standard della ripetibilità; r : Ripetibilità; RSD_R : Deviazione standard relativa della ripetibilità; S_R : Deviazione standard della riproducibilità; R : Riproducibilità; RSD_R : Deviazione standard relativa della riproducibilità; Ho_R : Rapporto Horwitz.

Tabella 7. Parametri statistici relativi alla determinazione degli acidi C18:3 negli oli di oliva e di sansa di oliva										
Campione	Extra vergine		Vergine		Lampante		Olio di oliva		Olio di sansa di oliva grezzo	
Metodo	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida
Partecipanti	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Fuori scala	2	1	0	2	0	0	0	1	4	1
Media (%)	0.730	0.719	0.896	0.876	0.860	0.834	0.744	0.720	0.753	0.852
Ripetibilità										
Sr	0.013	0.012	0.017	0.013	0.010	0.015	0.014	0.010	0.020	0.018
R	0.036	0.025	0.049	0.037	0.029	0.042	0.039	0.029	0.055	0.051
<i>RSDR</i> (%)	1.8	1.7	1.9	1.5	1.2	1.8	1.9	1.4	2.6	2.2
Riproducibilità										
S _R	0.029	0.032	0.041	0.039	0.036	0.043	0.028	0.030	0.041	0.035
R	0.080	0.089	0.116	0.110	0.101	0.120	0.079	0.083	0.115	0.097
<i>RSDR</i> (%)	3.9	4.4	4.6	4.5	4.2	5.2	3.8	4.1	5.4	4.1
<i>Ho_R</i>	0.08	0.09	0.10	0.10	0.09	0.11	0.08	0.09	0.12	0.09

S_r: Deviazione standard della ripetibilità; *r*: Ripetibilità; *RSD_R*: Deviazione standard relativa della ripetibilità; *S_R*: Deviazione standard della riproducibilità; *R*: Riproducibilità; *RSD_R*: Deviazione standard relativa della riproducibilità; *Ho_R*: Rapporto Horwitz.

Tabella 8. Parametri statistici relativi alla determinazione degli acidi C20:0 negli oli di oliva e di sansa di oliva										
Campione	Extra vergine		Vergine		Lampante		Olio di oliva		Olio di sansa di oliva grezzo	
Metodo	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida
Partecipanti	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Fuori scala	1	1	0	1	0	1	1	1	0	4
Media (%)	0.394	0.405	0.441	0.465	0.440	0.464	0.424	0.423	0.425	0.429
Ripetibilità										
S_r	0.015	0.016	0.018	0.015	0.013	0.017	0.013	0.013	0.019	0.013
R	0.041	0.044	0.050	0.042	0.037	0.047	0.037	0.037	0.053	0.038
$RSD_R(\%)$	3.8	3.9	4.0	3.2	3.0	3.7	3.1	3.1	4.4	3.1
Riproducibilità										
S_R	0.029	0.037	0.032	0.041	0.031	0.039	0.042	0.038	0.036	0.028
R	0.080	0.104	0.089	0.114	0.086	0.108	0.117	0.107	0.102	0.080
$RSD_R(\%)$	7.3	9.1	7.2	8.8	7.0	8.4	9.8	9.0	8.6	6.6
Ho_R	0.14	0.18	0.14	0.17	0.14	0.16	0.19	0.18	0.17	0.13

S_r : Deviazione standard della ripetibilità; r : Ripetibilità; RSD_R : Deviazione standard relativa della ripetibilità; S_R : Deviazione standard della riproducibilità; R : Riproducibilità; RSD_R : Deviazione standard relativa della riproducibilità; Ho_R : Rapporto Horwitz.

Tabella 9. Parametri statistici relativi alla determinazione degli acidi C20:1 negli oli di oliva e di sansa di oliva										
Campione	Extra vergine		Vergine		Lampante		Olio di oliva		Olio di sansa di oliva grezzo	
Metodo	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida
Partecipanti	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Fuori scala	1	1	1	0	1	2	0	1	1	4
Media (%)	0.372	0.375	0.388	0.400	0.370	0.379	0.280	0.284	0.296	0.298
Ripetibilità										
<i>S_r</i>	0.009	0.013	0.011	0.016	0.013	0.009	0.017	0.011	0.026	0.013
<i>R</i>	0.026	0.038	0.032	0.046	0.036	0.024	0.047	0.032	0.073	0.037
<i>RSDR</i> (%)	7.8	3.6	3.0	4.1	3.5	2.3	6.0	4.0	8.9	4.4
Riproducibilità										
<i>S_R</i>	0.029	0.032	0.034	0.032	0.023	0.027	0.028	0.024	0.027	0.016
<i>R</i>	0.082	0.091	0.095	0.091	0.064	0.077	0.079	0.069	0.077	0.045
<i>RSDR</i> (%)	7.9	8.7	8.7	8.1	6.2	7.2	10	8.6	9.3	5.4
<i>Ho_R</i>	0.15	0.17	0.17	0.16	0.12	0.14	0.18	0.16	0.17	0.10

S_r: Deviazione standard della ripetibilità; *r*: Ripetibilità; *RSD_R*: Deviazione standard relativa della ripetibilità; *S_R*: Deviazione standard relativa della riproducibilità; *R*: Riproducibilità; *RSD_R*: Deviazione standard della riproducibilità; *Ho_R*: Rapporto Horwitz.

Tabella 10. Parametri statistici relativi alla determinazione degli acidi C22:0 negli oli di oliva e di sansa di oliva										
Campione	Extra vergine		Vergine		Lampante		Olio di oliva		Olio di sansa di oliva grezzo	
Metodo	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida
Partecipanti	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Fuori scala	0	1	1	0	1	1	1	1	3	2
Media (%)	0.111	0.114	0.135	0.141	0.135	0.143	0.116	0.114	0.185	0.205
Ripetibilità										
Sr	0.008	0.011	0.013	0.008	0.014	0.008	0.016	0.010	0.013	0.015
R	0.022	0.032	0.036	0.022	0.039	0.021	0.045	0.029	0.036	0.041
RSDR(%)	7.0	9.9	9.6	5.5	10	5.3	14	9.0	6.9	7.2
Riproducibilità										
S _R	0.014	0.014	0.016	0.020	0.018	0.018	0.020	0.017	0.015	0.024
R	0.038	0.039	0.044	0.056	0.050	0.050	0.056	0.047	0.043	0.067
RSDR(%)	12	12	12	14	13	12	17	15	8.3	12
H_{OR}	0.19	0.20	0.19	0.23	0.22	0.20	0.27	0.23	0.14	0.20

S_r: Deviazione standard della ripetibilità; r: Ripetibilità; RSD_R: Deviazione standard relativa della ripetibilità; S_R: Deviazione standard della riproducibilità; R: Riproducibilità; RSD_R: Deviazione standard relativa della riproducibilità; H_{OR}: Rapporto Horwitz.

Tabella 11. Parametri statistici relativi alla determinazione degli acidi C24:0 negli oli di oliva e di sansa di oliva										
Campione	Extra vergine		Vergine		Lampante		Olio di oliva		Olio di sansa di oliva grezzo	
Metodo	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida
Partecipanti	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16
Fuori scala	1	1	0	2	0	2	0	2	3	3
Media (%)	0.040	0.047	0.062	0.076	0.058	0.075	0.049	0.056	0.075	0.125
Ripetibilità										
S_r	0.006	0.014	0.005	0.004	0.012	0.010	0.012	0.006	0.014	0.013
R	0.017	0.039	0.0153	0.012	0.033	0.029	0.033	0.017	0.040	0.036
RSD_R(%)	15	30	8.9	5.6	20	14	24	11	19	10
Riproducibilità										
S_R	0.020	0.021	0.026	0.014	0.026	0.016	0.019	0.015	0.014	0.024
R	0.055	0.059	0.073	0.040	0.072	0.045	0.054	0.043	0.040	0.068
RSD_R(%)	49	44	42	19	45	21	39	27	19	19
Ho_R	0.67	0.62	0.61	0.28	0.64	0.32	0.55	0.39	0.29	0.31

S_r: Deviazione standard della ripetibilità; *r*: Ripetibilità; *RSD_R*: Deviazione standard relativa della ripetibilità; *S_R*: Deviazione standard della riproducibilità; *R*: Riproducibilità; *RSD_R*: Deviazione standard relativa della riproducibilità; *Ho_R*: Rapporto Horwitz.

Tabella 12. Parametri statistici relativi alla determinazione degli acidi <i>trans</i> C18:1 negli oli di oliva e di sansa di oliva										
Campione	Extra vergine		Vergine		Lampante		Olio di oliva		Olio di sansa di oliva grezzo	
Metodo	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida
Partecipanti	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Fuori scala	1	2	1	1	1	1	1	3	2	1
Media (%)	0.0100	0.0115	0.0114	0.0129	0.0107	0.0114	0.0127	0.0117	0.1173	0.0961
Ripetibilità										
S_r	0.0038	0.0078	0.0046	0.0027	0.0027	0.0046	0.0045	0.0050	0.0158	0.0109
R	0.0106	0.0220	0.0130	0.0075	0.0075	0.0130	0.0125	0.0140	0.0443	0.0304
$RSD_R(\%)$	38	68	41	21	25	41	35	43	13	11
Riproducibilità										
S_R	0.0096	0.0097	0.0098	0.0103	0.0107	0.0106	0.0113	0.0088	0.0559	0.0270
R	0.0268	0.0273	0.0276	0.0289	0.0300	0.0297	0.0316	0.0247	0.1566	0.0756
$RSD_R(\%)$	96	84	86	80	100	93	89	76	48	28
Ho_R	1.1	0.95	0.97	0.92	1.1	1.1	1.0	0.85	0.76	0.44

S_r : Deviazione standard della ripetibilità; r : Ripetibilità; RSD_R : Deviazione standard relativa della ripetibilità; S_R : Deviazione standard della riproducibilità; R : Riproducibilità; RSD_R : Deviazione standard relativa della riproducibilità; Ho_R : Rapporto Horwitz.

Tabella 13. Parametri statistici relativi alla determinazione degli acidi <i>trans</i> C18:2 negli oli di oliva e di sansa di oliva										
Campione	Extra vergine		Vergine		Lampante		Olio di oliva		Olio di sansa di oliva grezzo	
Metodo	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida
Partecipanti	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Fuori scala	1	2	0	1	2	1	2	1	0	1
Media (%)	0.0061	0.0058	0.0111	0.0096	0.0081	0.0089	0.0073	0.0086	0.0133	0.0129
Ripetibilità										
S _r	0.0042	0.0034	0.0050	0.0019	0.0020	0.0019	0.0020	0.0053	0.0045	0.0038
R	0.0118	0.0095	0.0140	0.0053	0.0055	0.0053	0.0055	0.0150	0.0125	0.0129
<i>RSD_r</i> (%)	70	59	45	20	24	21	27	62	34	29
Riproducibilità										
S _R	0.0064	0.0051	0.0079	0.0076	0.0058	0.0085	0.0068	0.0086	0.0120	0.0099
R	0.0178	0.0143	0.0223	0.0212	0.0162	0.0237	0.0190	0.0240	0.0337	0.0278
<i>RSD_R</i> (%)	105	88	72	79	71	95	93	100	90	77
<i>Ho_R</i>	1.1	0.90	0.81	0.86	0.76	1.0	0.98	1.1	1.0	0.89

S_r: Deviazione standard della ripetibilità; r: Ripetibilità; *RSD_r*: Deviazione standard relativa della ripetibilità; S_R: Deviazione standard della riproducibilità; R: Riproducibilità; *RSD_R*: Deviazione standard relativa della riproducibilità; *Ho_R*: Rapporto Horwitz.

Tabella 14. Parametri statistici relativi alla determinazione degli acidi <i>trans</i> C18:2 + <i>trans</i>C18:3 negli oli di oliva e di sansa di oliva										
Campione	Extra vergine		Vergine		Lampante		Olio di oliva		Olio di sansa di oliva grezzo	
Metodo	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida	KOH in metanolo	Metilazione basica +acida
Partecipanti	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Fuori scala	3	3	3	3	4	2	2	2	3	1
Media (%)	0.0054	0.0054	0.0100	0.0088	0.0077	0.0092	0.0088	0.0081	0.0254	0.0186
Ripetibilità										
S_r	0.0046	0.0035	0.0050	0.0046	0.0021	0.0028	0.0102	0.0044	0.0061	0.0038
R	0.0128	0.0099	0.0140	0.0128	0.0060	0.0078	0.0285	0.0123	0.0171	0.0106
$RSD_R(\%)$	84	65	50	52	28	30	115	54	24	20
Riproducibilità										
S_R	0.0067	0.0051	0.0079	0.0069	0.0063	0.0095	0.0115	0.0086	0.0211	0.0151
R	0.0186	0.0144	0.0221	0.0193	0.0175	0.0267	0.0321	0.0241	0.0590	0.0423
$RSD_R(\%)$	123	95	79	79	81	103	130	117	83	81
Ho_R	1.2	0.96	0.87	0.85	0.86	1.1	1.4	1.1	1.1	0.99

S_r : Deviazione standard della ripetibilità; r : Ripetibilità; RSD_R : Deviazione standard relativa della ripetibilità; S_R : Deviazione standard della riproducibilità; R : Riproducibilità; RSD_R : Deviazione standard relativa della riproducibilità; Ho_R : Rapporto Horwitz.

RACCOMANDAZIONI PER L'ANALISI GASCROMATOGRAFICA DEGLI ESTERI DEGLI ACIDI GRASSI DELL'OLIO DI OLIVA E DELL'OLIO DI SANSÀ DI OLIVA

1. Procedimento

L'analisi mediante gascromatografia di soluzioni di esteri grassi in esano verrà condotta secondo la norma ISO-5508, utilizzando una colonna capillare (della lunghezza di 50 m e dal diametro interno di 0.25 o 0.32 mm) impregnata di cianopropilsilicone, come indicato per la determinazione degli acidi grassi *trans* isomeri (COI/T.20/Doc.n.17).

La figura 1 riproduce il tipico profilo gascromatografico di un olio di sansa che contiene esteri metilici ed etilici degli acidi grassi, e isomeri *trans* degli esteri metilici.

2. Calcoli

2.1. Per calcolare la composizione in acidi grassi e il ΔE_{CN42} , verranno presi in considerazione i seguenti acidi grassi:

Miristico (C14:0)

Palmitico (C16:0). Somma delle aree dei picchi che corrispondono agli esteri metilici ed etilici.

Palmitoleico (C16:1). Somma delle aree dei picchi che corrispondono agli isomeri ω_9 e ω_7 dell'estere metilico.

Margarico (C17:0).

Margaroleico (C17:1).

Stearico (C18:0).

Oleico (C18:1). Somma delle aree dei picchi che corrispondono agli isomeri ω_9 e ω_7 dell'estere metilico, dell'estere etilico e degli isomeri *trans* dell'estere metilico.

Linoleico (C18:2). Somma delle aree dei picchi che corrispondono agli esteri metilici ed etilici e agli isomeri *trans* dell'estere metilico.

Arachico (C20:0).

Linolenico (C18:3). Somma delle aree dell'estere metilico e degli isomeri *trans* dell'estere metilico.

Eicosanoico (C20:1).

Beenico (C22:0).

Lignocerico (C24:0).

Lo squalene non viene preso in considerazione per il calcolo del totale dell'area.

2.2. Per calcolare la percentuale di *trans*-C18:1 verrà utilizzato il picco che corrisponde agli esteri metilici di questo acido grasso. Per la somma [*trans*-C18:2 + *trans*-C18:3], verranno sommati tutti i picchi corrispondenti agli isomeri *trans* di questi due acidi grassi. Per calcolare l'area totale si terrà conto di tutti i picchi menzionati in 2.1. (vedi COI/T.20/Doc.n.17).

Il calcolo della percentuale di ogni acido grasso verrà effettuato in base alla formula che segue:

$$\% X = (\text{Area } X \times 100) / (\text{area totale})$$

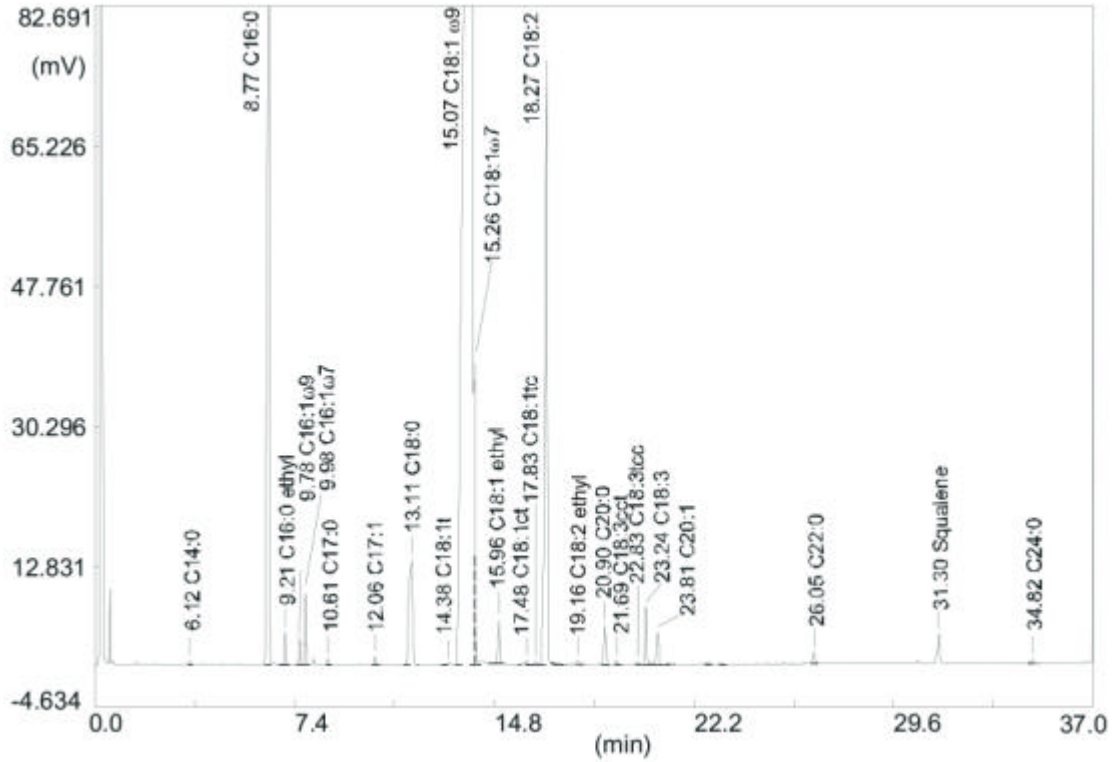


Figura 1 Profilo gascromatografico di un olio di sansa di oliva, ottenuto con il metodo della metilazione a freddo. I picchi cromatografici corrispondono agli esteri metilici, salvo altre indicazioni.