



METODO DI ANALISI

DETERMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE E DEL CONTENUTO DI STEROLI E DIALCOLI TRITERPENICI MEDIANTE GASCROMATOGRAFIA CON COLONNA CAPILLARE

1. AMBITO

Il metodo descrive un procedimento per la determinazione del contenuto individuale e totale di steroli e dialcoli triterpenici degli oli di oliva e di sansa di oliva.

2. PRINCIPIO

Gli oli, addizionati di α -colestano come standard interno, vengono saponificati con idrossido di potassio in soluzione etanolica, quindi l'insaponificabile viene estratto con etere etilico.

La frazione costituita da steroli e dialcoli triterpenici viene separata dall'insaponificabile mediante cromatografia su strato sottile su una placca di gel di silice basica. Le frazioni recuperate dal gel di silice vengono trasformate in trimetilsilileteri e analizzati mediante gascromatografia in colonna capillare.

3. APPARECCHIATURA

La normale attrezzatura da laboratorio e, in particolare, quanto segue:

- 3.1. Matraccio da 250 ml munito di refrigerante a ricadere con giunti a smeriglio.
- 3.2. Imbuto separatore da 500 ml.
- 3.3. Matracci da 250 ml.
- 3.4. Attrezzatura completa per analisi cromatografica su strato sottile per placche di vetro 20 x 20 cm.
- 3.5. Lampada a luce ultravioletta, con lunghezza d'onda 366 o 254 nm.
- 3.6. Microsiringhe da 100 μ l e 500 μ l.

- 3.7. Imbuto cilindrico filtrante a setto poroso G3 (porosità 15-40 μm) del diametro di circa 2 cm e lunghezza di circa 5 cm, adatto per filtrazione sotto vuoto e giunto smerigliato maschio.
- 3.8. Beuta da vuoto da 50 ml con giunto femmina smerigliato, adattabile all'imbuto filtrante (3.7).
- 3.9. Provetta da 10 ml con fondo conico e tappo in vetro a tenuta.
- 3.10 Gascromatografia utilizzabile con colonna capillare e dispositivo di iniezione di tipo split, costituito da:
 - 3.10.1. Camera termostatica per le colonne, in grado di mantenere la temperatura desiderata con una precisione di ± 1 $^{\circ}\text{C}$.
 - 3.10.2. Complesso di iniezione termoregolabile con elemento vaporizzatore in vetro persilanizzato e sistema split.
 - 3.10.3. Rivelatore a ionizzazione di fiamma.
 - 3.10.4. Sistema di acquisizione dati adatto all'uso con il rivelatore a ionizzazione di fiamma, integrabile manualmente.
- 3.11. Colonna capillare in silice fusa, lunga da 20 a 30 m, con diametro interno da 0,25 a 0,32 mm, internamente ricoperta di una miscela costituita da 5% difenil - 95% dimetilpolisilossano (fase stazionaria SE-52 o SE-54, o equivalenti), con spessore uniforme compreso fra 0,10 e 0,30 μm .
- 3.12. Microsiringa per gascromatografia da 10 μl con ago cementato, adatta all'iniezione split.
- 3.13. Essiccatore a cloruro di calcio.

4. REAGENTI

- 4.1. Idrossido di potassio, titolo minimo 85%.
- 4.2. Idrossido di potassio, soluzione etanolica circa 2 N.

Si sciolgono, sotto raffreddamento, 130 g di idrossido di potassio (4.1) in 200 ml di acqua distillata, quindi si porta ad 1 litro con etanolo (4.10). La soluzione si conserva in bottiglie di vetro scuro ben tappate per un massimo di 2 giorni.

- 4.3. Etere etilico, puro per analisi.
- 4.4. Idrossido di potassio, soluzione etanolica circa 0,2 N.

Si sciolgono 13 g di idrossido di potassio (4.1) in 20 ml di acqua distillata, quindi si porta a 1 litro con etanolo (4.10).

- 4.5. Sodio solfato anidro, puro per analisi.
- 4.6. Placche di vetro stratificate con gel di silice, senza indicatore di fluorescenza, spessore 0,25 mm (sono reperibili in commercio già pronte per l'uso).
- 4.7. Toluene, per cromatografia.
- 4.8. Acetone, per cromatografia.
- 4.9. n-esano, per cromatografia.
- 4.10. Etere etilico, per cromatografia.
- 4.11. Etanolo per analisi.
- 4.12. Acetato di etile per analisi.
- 4.13. Soluzione di riferimento per la cromatografia su strato sottile: soluzione di colesterolo o fitosteroli ed eritrodiolo al 5% in acetato di etile (4.11).
- 4.14. 2,7-diclorofluoresceina, soluzione etanolica allo 0,2%. Si rende leggermente basica aggiungendo qualche goccia di soluzione alcolica 2 N di idrossido di potassio (4.2).
- 4.15. Piridina anidra, per cromatografia (vedere la Nota 5).
- 4.16. Esametildisilazano per analisi.
- 4.17. Trimetilclorosilano per analisi.
- 4.18. Soluzioni campione di trimetilsilileteri degli steroli:
si preparano al momento dell'impiego partendo da steroli ed eritrodiolo ottenuti da oli che li contengano.
- 4.19. α -colestano puro ad oltre il 99% (la purezza deve essere verificata mediante analisi gascromatografica).
- 4.20. α -colestano, soluzione di standard interno allo 0,2% (m/V) in acetato di etile (4.11).
- 4.21. Soluzione di fenolftaleina, 10 g/l in etanolo (4.10).
- 4.22. Gas vettore: idrogeno o elio, puri per cromatografia.
- 4.23. Gas ausiliari: idrogeno, elio, azoto e aria, puri per gascromatografia.
- 4.24. Miscela n-esano (4.9)/etere etilico (4.10) 65:35 (V/V).
- 4.25. Reagente per sililazione costituito da una miscela 9:3:1 (V/V/V) di piridina/esametildisilazano/trimetilclorosilano.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Preparazione dell'insaponificabile.

5.1.1. Nel matraccio da 250 ml (3.1) si introduce, impiegando la microsiringa da 500 µl (3.6), un volume di soluzione di standard interno α -colestano (4.20) contenente una quantità di colestano corrispondente a circa il 10% del contenuto di steroli del campione. Ad esempio, per 5 g di campione di olio di oliva si aggiungano 500 µl di soluzione di α -colestano (4.20), 1500 µl se si tratta di olio di sansa di oliva. Si evapora in corrente di azoto debole in un bagno di acqua calda fino a secchezza quindi, dopo il raffreddamento, nello stesso matraccio, si pesano $5 \pm 0,01$ g di campione secco filtrato.

Nota 1. In oli e grassi animali o vegetali contenenti notevoli quantità di colesterolo può essere presente un picco avente tempo di ritenzione identico al colestano. In questi casi occorre analizzare la frazione sterolica in doppio con e senza standard interno.

5.1.2. Si aggiungono 50 ml di soluzione etanolica di idrossido di potassio 2 N (4.2) e della pomice, si applica il refrigerante a ricadere e si scalda a leggera ebollizione fino ad avvenuta saponificazione (la soluzione diviene limpida). Si continua il riscaldamento ancora per 20 minuti, quindi si aggiungono 50 ml di acqua distillata facendoli scendere dall'alto del refrigerante, si stacca il refrigerante e si raffredda il matraccio a circa 30 °C.

5.1.3. Si travasa il contenuto del matraccio quantitativamente, in un imbuto separatore da 500 ml (3.2) aiutandosi con acqua distillata, a più riprese (50 ml). Si aggiungono circa 80 ml di etere etilico (4.10), si agita energicamente per circa 60 secondi, smettendo periodicamente di applicare pressione mediante capovolgimento dell'imbuto separatore e apertura del rubinetto. Si lascia quindi riposare fino alla completa separazione delle due fasi (Nota 2).

A questo punto si raccoglie la maggior quantità possibile di soluzione saponificata in un secondo imbuto separatore. Sulla fase acquosa-alcolica si effettuano ancora due estrazioni, con le stesse modalità, impiegando ogni volta 60-70 ml di etere etilico (4.10).

Nota 2: eventuali emulsioni possono essere eliminate aggiungendo piccole quantità di etanolo (4.11).

5.1.4. Si uniscono i tre estratti eterici in un imbuto separatore contenente 50 ml di acqua e si continua il lavaggio con acqua (50 ml) finché quest'ultima non presenta più colorazione rosa all'aggiunta di una goccia di soluzione di fenoltaleina (4.21).

Eliminata l'acqua di lavaggio, si filtra con sodio solfato anidro (4.5) in un matraccio da 250 ml precedentemente pesato, lavando l'imbuto e il filtro con piccole quantità di etere etilico (4.10).

5.1.5. Si distilla il solvente in un evaporatore rotante a 30 °C sotto vuoto. Si aggiungono 5 ml di acetone e quindi si rimuove completamente il solvente volatile in una debole corrente d'aria. Il residuo viene essiccato in stufa a 103 ± 2 °C per 15 min., raffreddato in essiccatori e pesato approssimando a 0,1 mg.

5.2. Separazione della frazione costituita da steroli e dialcoli triterpenici (eritrodiolo + uvaolo)

5.2.1. Preparazione delle placche basiche per la cromatografia su strato sottile: si immergono le placche al gel di silice (4.6) per circa 4 cm nella soluzione etanolica 0,2 N di idrossido di potassio (4.5) per 10 secondi, si lasciano quindi asciugare sotto cappa per due ore e infine si pongono in stufa a 100 °C per un'ora.

Si estraggono dalla stufa e si conservano in essiccatore a cloruro di calcio (3.13) fino al momento dell'impiego (le placche così trattate devono essere utilizzate entro 15 giorni).

Nota 3: impiegando per la separazione della frazione sterolica delle placche al gel di silice basiche si elimina la necessità di trattare l'insaponificabile con allumina. In tal modo vengono trattenuti sulla linea di caricamento tutti i composti di natura acida (acidi grassi ed altro) ottenendo così la banda degli steroli nettamente separata dalle bande degli alcoli alifatici e triterpenici.

5.2.2. Nella camera di sviluppo delle lastre si introduce una miscela di esano/estere etilico (4.24) (Nota 4), fino all'altezza di circa 4 cm. Si chiude la camera con l'apposito coperchio e si lascia così per almeno mezz'ora, in un luogo fresco, in modo che si stabilisca l'equilibrio liquido-vapore. Sulle superfici interne della camera possono essere fissate delle strisce di carta da filtro che peschino nell'eluente: questo accorgimento permette di ridurre di circa 1/3 il tempo di sviluppo e di ottenere una più uniforme e regolare eluizione dei componenti.

Nota 4: al fine di ottenere condizioni di eluizione perfettamente riproducibili, la miscela di sviluppo deve essere sostituita a ogni prova; in alternativa è possibile utilizzare un solvente costituito da n-esano/etere etilico 50:50 (V/V).

5.2.3. Si prepara una soluzione al 5% circa di insaponificabile (5.1.5) in acetato di etile (4.12) e, con la microsiringa da 100 µl, si depositano su una placca cromatografica, a 2 cm circa da una estremità, 0,3 ml della soluzione in una striscia sottile e uniforme (5.2.1). Si depositano 2 o 3 µl di soluzione di riferimento (4.13) parallelamente alla striscia in modo da poter identificare la banda di steroli e dialcoli triterpenici dopo che si sarà formata.

5.2.4. Si pone la placca nella camera di sviluppo preparata come descritto al punto 5.2.2. La temperatura ambiente dovrà essere mantenuta fra 15 e 20 °C (Nota 5). Si chiude subito la camera con il coperchio e si lascia eluire finché il fronte del solvente non sia arrivato a circa 1 cm dal bordo superiore della placca. Si rimuove quindi la placca dalla camera di sviluppo e si evapora il solvente in corrente di aria calda o lasciando la placca sotto la cappa per qualche istante.

Nota 5: una temperatura più elevata potrebbe peggiorare la separazione.

5.2.5. Si spruzza la placca debolmente e uniformemente con la soluzione di 2,7-diclorofluoresceina (4.14) e la si lascia asciugare. Osservando la placca alla luce ultravioletta, si individuano le bande degli steroli e dei dialcoli triterpenici per allineamento con la macchia ottenuta con la soluzione di riferimento (4.13). Si delimitano con una matita nera i limiti delle bande lungo i margini di fluorescenza (vedere la figura 3 relativa alla placca cromatografica).

5.2.6. Con una spatola metallica si raschia il gel di silice compreso nell'area delimitata. Il materiale asportato, finemente sminuzzato, viene introdotto nell'imbuto filtrante (3.7); si aggiungono 10 ml di acetato di etile caldo (4.12), si miscela accuratamente con la spatola metallica e si filtra sotto vuoto, raccogliendo il filtrato nella beuta conica (3.8.) collegata all'imbuto filtrante.

Si lava il residuo nella beuta per tre volte con etere etilico (4.3) (circa 10 ml alla volta), raccogliendo sempre il filtrato nella stessa beuta attaccata all'imbuto, si evapora il filtrato fino a un volume di 4-5 ml, si trasferisce la soluzione residua nella provetta da 10 ml precedentemente pesata (3.9), si essicca con un riscaldamento leggero in una debole corrente di azoto, si riprende con qualche goccia di acetone (4.8) e quindi si riporta nuovamente a secco mediante evaporazione,

Il residuo contenuto nella provetta è costituito dalle frazioni di steroli e dialcoli triterpenici.

5.3. Preparazione dei trimetilsilileteri.

5.3.1. Nella provetta contenente la frazione sterolica e triterpenica si aggiunge il reagente per la sililazione (4.25) (Nota 6), in rapporto di 50 µl per ogni milligrammo di steroli e dialcoli triterpenici, evitando ogni assorbimento di umidità (Nota 7).

Nota 6: esistono in commercio soluzioni già pronte per l'uso. Sono inoltre disponibili altri reagenti sililanti, quali ad esempio il bis-trimetilsililtrifluorolacetammide + 1% di trimetilclorosilano da diluire in uno stesso volume di piridina anidra. La piridina può essere sostituita dalla stessa quantità di acetonitrile.

5.3.2. Si tappa la provetta, si agita cautamente (senza capovolgere) fino a completa solubilizzazione dei composti. Si lascia riposare per almeno 15 minuti a temperatura ambiente e quindi si centrifuga per alcuni minuti: la soluzione limpida è pronta per l'analisi gascromatografica.

Nota 7: l'eventuale formazione di una leggera opalescenza è normale e non causa alcuna anomalia. La formazione di un flocculato bianco o la comparsa di una colorazione rosa è indice della presenza di umidità o di alterazione del reagente. In questo caso la prova dovrà essere ripetuta (solo se si utilizza esametildisilazano/trimetilclorosilano).

5.4 Analisi gascromatografica

5.4.1. Operazioni preliminari, condizionamento della colonna capillare.

5.4.1.1. Si installa la colonna (3.11) nel gascromatografo, collegando il terminale di ingresso all'iniettore del dispositivo split e al terminale di uscita al rivelatore.

Si eseguono i controlli generali del complesso gascromatografico (tenuta dei circuiti dei gas, efficienza del rivelatore, del dispositivo split e del sistema di registrazione, ecc.).

5.4.1.2. Se la colonna viene utilizzata per la prima volta è consigliabile procedere al suo condizionamento: si fa scorrere un leggero flusso di gas attraverso la colonna stessa, quindi si accende il complesso gascromatografico e si inizia un riscaldamento graduale fino a raggiungere una temperatura di almeno 20 °C superiore a quella di esercizio (Nota 8). Si mantiene tale temperatura per almeno 2 ore, quindi si porta il complesso alle condizioni di funzionamento (regolazione del flusso dei gas e del dispositivo split, accensione della fiamma, collegamento con l'integratore, regolazione della temperatura di colonna, rivelatore e iniettore, ecc.) e si registra il segnale a una sensibilità almeno due volte superiore a quella prevista per l'esecuzione dell'analisi. Il tracciato della linea di base deve risultare lineare, esente da picchi di qualsiasi natura e non deve presentare deriva.

Una deriva rettilinea negativa indica una tenuta imperfetta delle connessioni della colonna, mentre una deriva positiva indica un condizionamento insufficiente della colonna.

Nota 8: la temperatura di condizionamento deve in ogni caso essere inferiore di almeno 20 °C rispetto alla temperatura massima prevista per la fase stazionaria utilizzata.

5.4.2. Scelta delle condizioni operative.

5.4.2.1 Le condizioni operative di massima sono le seguenti:

- Temperatura della colonna: 260 ± 5 °C
- Temperatura dell'iniettore: 280-300 °C
- Temperatura del rivelatore: 280-300 °C
- Velocità lineare del gas vettore: elio 20 - 35 cm/s, idrogeno 30 - 50 cm/s
- Rapporto di split: da 1:50 a 1:100
- Sensibilità strumentale: da 4 a 16 volte l'attenuazione minima
- Sensibilità di registrazione: da 1 a 2 mV f.s.
- Quantità di sostanza iniettata: da 0,5 a 1 µl di soluzione TMSE.

Tali condizioni possono essere modificate in funzione delle caratteristiche della colonna e del gascromatografo, in modo da ottenere cromatogrammi che soddisfino le condizioni seguenti:

- Il tempo di ritenzione del picco di β -sitosterolo deve essere di 20 ± 5 min.
- Il picco del campesterolo deve essere: per l'olio di oliva $20 \pm 5\%$ del fondo scala (contenuto medio 3%), mentre per l'olio di soia $80 \pm 10\%$ del fondo scala (contenuto medio 20%).

- Si deve osservare separazione di tutti gli steroli presenti. Oltre che essere separati, i picchi devono anche essere completamente risolti, ovvero il tracciato del picco deve raggiungere la linea di base prima risalire per il picco successivo. È tuttavia tollerata anche la risoluzione incompleta, purché il picco TRR 1.02 (sitostanolo) sia quantificabile secondo la perpendicolare.

5.4.3. Esecuzione dell'analisi

5.4.3.1 Con la microsiringa da 10 μl si preleva 1 μl di esano, si aspirano 0,5 μl di aria e successivamente da 0,5 a 1 μl della soluzione del campione, si alza ancora lo stantuffo della siringa in modo che l'ago sia vuoto, quindi si introduce l'ago attraverso la membrana dell'iniettore e dopo 1-2 secondi si inietta rapidamente, si estrae quindi lentamente l'ago dopo circa 5 secondi.

È possibile utilizzare anche un iniettore automatico.

5.4.3.2. Si effettua la registrazione fino a completa eluizione dei TMSE dei dialcoli triterpenici presenti. La linea di base deve essere sempre corrispondente ai requisiti (5.4.1.2).

5.4.4. Identificazione dei picchi

L'identificazione dei singoli picchi viene effettuata in base ai tempi di ritenzione e per paragone con miscele di TMSE dei dialcoli triterpenici, analizzate nelle medesime condizioni.

Gli steroli e i dialcoli triterpenici vengono eluiti secondo il seguente ordine: colesterolo, brassicasterolo, ergosterolo, 24-metilcolesterolo, campesterolo, campestanolo, stigmasterolo, $\Delta 7$ -campesterolo, $\Delta 5,23$ -stigmastadienolo, clerosterolo, β -sistosterolo, sitostanolo, $\Delta 5$ -avenasterolo, $\Delta 5,24$ -stigmastadienolo, $\Delta 7$ -stigmastenolo, $\Delta 7$ -avenasterolo, eritrodiolo e uvaolo.

Nella Tabella 1 sono riportati i tempi di ritenzione relativi al β -sitosterolo per le colonne SE-52 e SE-54.

Le figure 1 e 2 illustrano cromatogrammi tipici di alcuni oli.

5.4.5. Valutazione quantitativa.

5.4.5.1 Si procede al calcolo delle aree dei picchi di α -colestano, steroli e dialcoli triterpenici mediante l'integratore. Non vengono considerati i picchi di eventuali componenti non compresi fra quelli elencati nella Tabella 1 (non si deve calcolare l'ergosterolo). Il coefficiente di risposta dell' α -colestano si deve intendere unitario.

5.4.5.2 Si calcola la concentrazione dei singoli steroli, in mg/kg di sostanza grassa, come segue:

$$\text{sterolo } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

dove:

A_x = area del picco dello sterolo x, in unità di calcolo dell'integratore

A_s = area del picco dell' α -colestanolo, in unità di calcolo dell'integratore

m_s = massa di α -colestanolo in aggiunta, in milligrammi

m = massa di campione prelevato per la determinazione, in grammi.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

6.1. Si riportano le concentrazioni dei singoli steroli, in mg/kg di sostanza grassa, e come steroli totali, ovvero calcolandone la somma.

Il contenuto dei singoli steroli, dell'eritrodiolo e dell'uvaolo devono essere espressi con un decimale.

Il contenuto totale di steroli deve essere espresso senza decimali.

6.2. Si calcola il contenuto percentuale di ogni singolo sterolo dal rapporto fra l'area del picco corrispondente e la somma delle aree dei picchi degli steroli:

$$\text{sterolo } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \cdot 100$$

dove:

A_x = Area del picco di x

ΣA = Somma delle aree di tutti i picchi degli steroli

6.3. b-sitosterolo apparente: Δ^5 -23-stigmastadienolo + clerosterolo + β -sitosterolo + sitostanolo + Δ^5 -avenasterolo + Δ^5 -24-stigmastadienolo.

6.4. Si calcola la percentuale di eritrodiolo e uvaolo:

$$\text{Eritrodiolo + uvaolo} = \frac{\text{Er.} + \text{Uv.}}{\text{Er.} + \text{Uv.} + \Sigma A} \cdot 100$$

dove:

ΣA = somma delle aree degli steroli in unità di calcolo dell'integratore

Er = area dell'eritrodiolo in unità di calcolo dell'integratore

Uv = area dell'uvaolo in unità di calcolo dell'integratore.

APPENDICE

Determinazione della velocità lineare dei gas

Nel gascromatografo, regolato alle normali condizioni operative, si iniettano da 1 a 3 μ l di metano (o propano) e si cronometra il tempo che il gas impiega a percorrere la colonna, dal momento dell'iniezione al momento della comparsa del picco (tM).

La velocità lineare in cm/s è data da L/tM in cui L è la lunghezza della colonna in centimetri e tM è il tempo cronometrato in secondi.

TABELLA I

TEMPI DI RITENZIONE RELATIVI DEGLI STEROLI

Picco	Identificazione		Tempo di ritenzione relativo	
			Colonna SE 54	Colonna SE 52
1	Colesterolo	Δ -5-colesten-3 β -olo	0,67	0,63
2	Colestanolo	5 α -colestan-3 β -olo	0,68	0,64
3	Brassicasterolo	[24S]-24-metil- Δ -5,22-colestadien-3 β -olo	0,73	0,71
*	Ergosterolo	[24S] 24 metil Δ 5-7-22 colestatrien 3 β -olo	0,78	0,76
4	24-metilencolesterolo	24-metilen- Δ -5,24-colestadien-3 β -olo	0,82	0,80
5	Campesterolo	(24R)-24-metil- Δ -5-colesten-3 β -olo	0,83	0,81
6	Campestanolo	(24R)-24-metil-colestan-3 β -olo	0,85	0,82
7	Stigmasterolo	(24S)-24-etil- Δ -5,22-colestadien-3 β -olo	0,88	0,87
8	Δ -7-campesterolo	(24R)-24-metil- Δ -7-colesten-3 β -olo	0,93	0,92
9	Δ -5,23-stigmastadienolo	(24R,S)-24-etil- Δ -5,23-colestadien-3 β -olo	0,95	0,95
10	Clerosterolo	(24S)-24-etil- Δ -5,25-colestadien-3 β -olo	0,96	0,96
11	β -sitosterolo	(24R)-24-etil- Δ -5-colesten-3 β -olo	1,00	1,00
12	Sitostanolo	24-etil-colestan-3 β -olo	1,02	1,02
13	Δ -5-avenasterolo	(24Z)-24-etilidene- Δ -colesten-3 β -olo	1,03	1,03
14	Δ -5-24-stigmastadienolo	(24R,S)-24-etil- Δ -5,24-colestadien-3 β -olo	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastadienolo	(24R,S)-24-etil- Δ -7-colesten-3 β -olo	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasterolo	(24Z)-24-etilidene- Δ -7-colesten-3 β -olo	1,16	1,16
17	Eritrodiolo	5 α olean-12en-3 β 28 diolo	1,41	1,41
18	Uvaolo	Δ 12-ursen-3 β 28 diolo	1,52	1,52

FIGURA 1

**GASCROMATOGRAMMA DELLA FRAZIONE COSTITUITA DA STEROLI E DIALCOLI
TRITERPENICI DI UN OLIO DI OLIVA LAMPANTE
(addizionato di standard interno)**

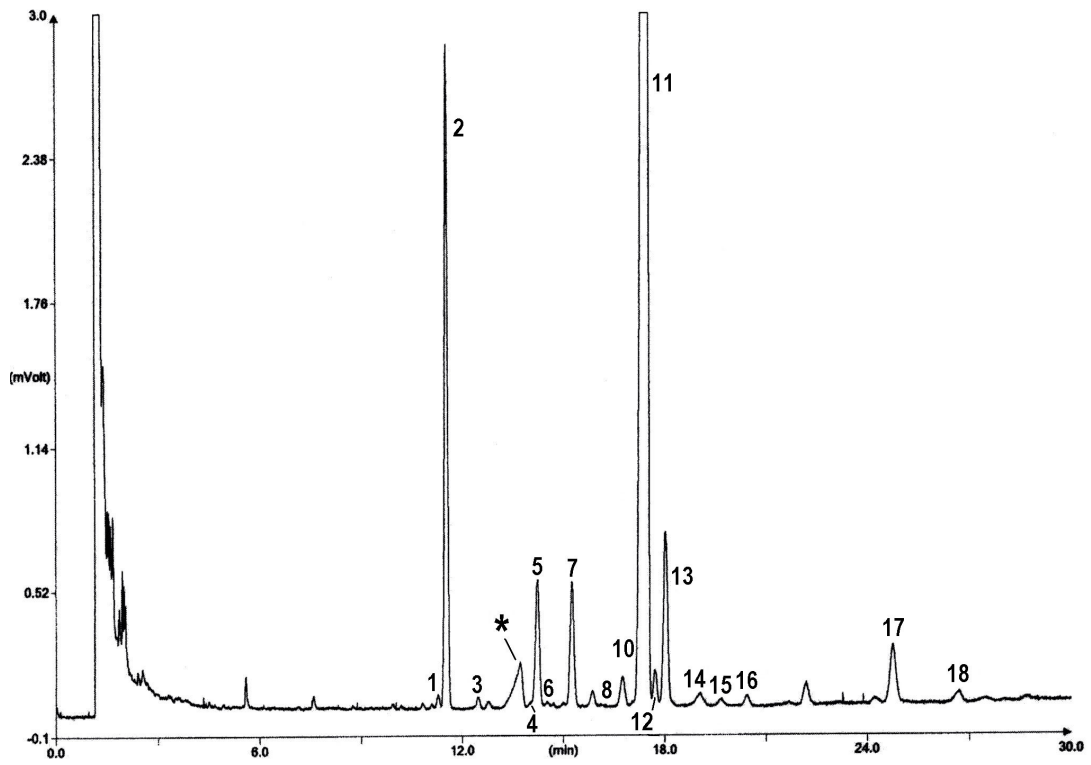


FIGURA 2

**GASCROMATOGRAMMA DELLA FRAZIONE COSTITUITA DA STEROLI E DIALCOLI
TRITERPENICI DI UN OLIO DI OLIVA RAFFINATO**
(addizionato di standard interno)

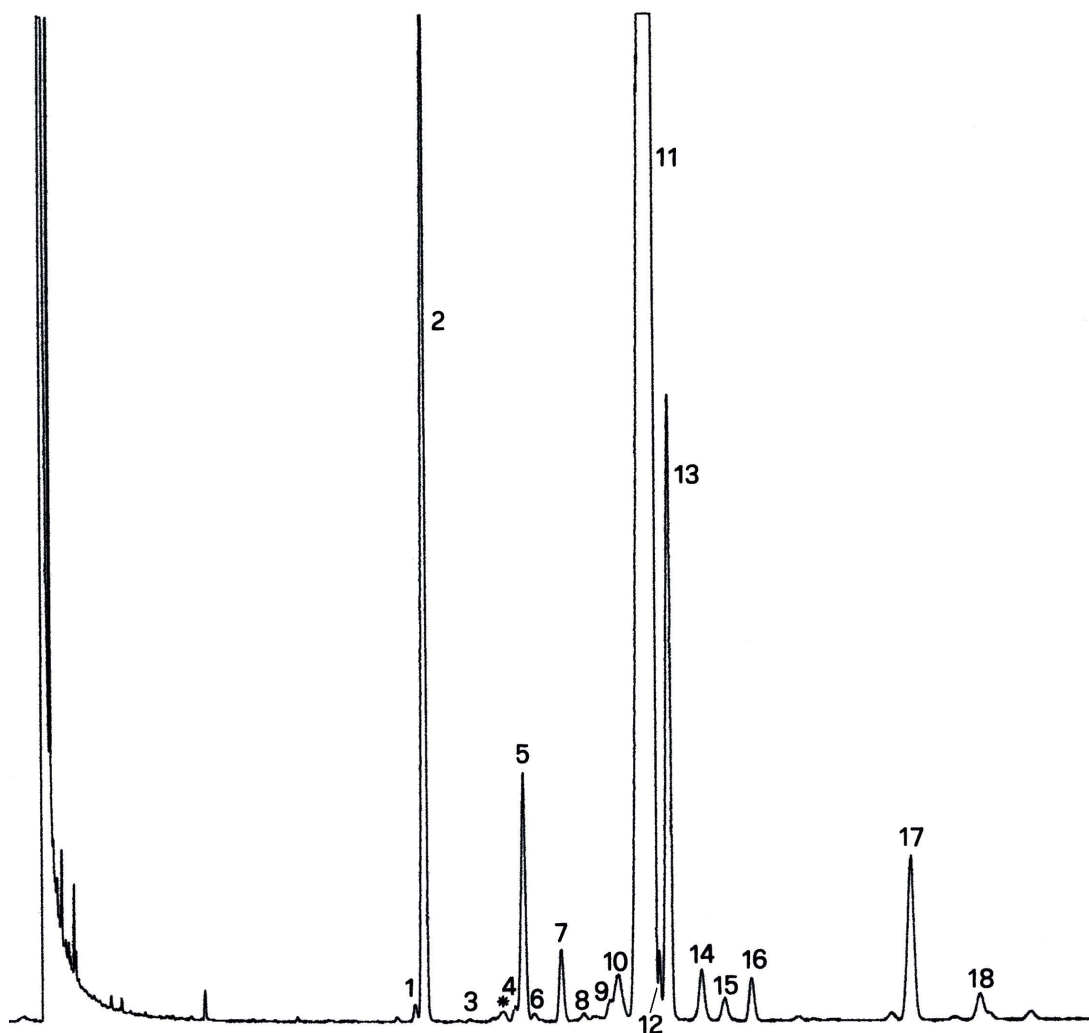
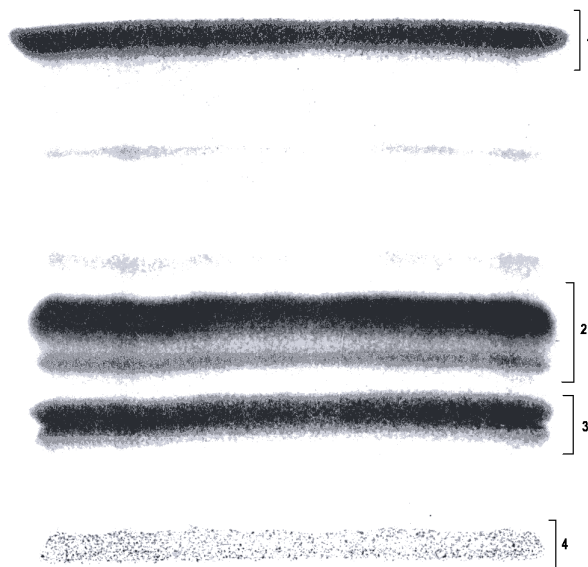


Figura 3

Placca cromatografica di un olio di sansa di oliva con la zona da raschiare per la determinazione degli steroli e dei dialcoli triterpenici.



Legenda:

- 1 – Squalene
- 2 – Alcoli triterpenici e alifatici
- 3 – Steroli e dialcoli triterpenici
- 4 – Acidi grassi iniziali e liberi

MARGINI DI PRECISIONE DEL METODO PER GLI STEROLI

1. Analisi dei risultati della prova interlaboratorio

I margini di precisione del metodo figurano nella tabella riportata oltre.

Diciannove laboratori hanno partecipato alla prova interlaboratorio organizzata dal Segretariato esecutivo nel 2009.

L'esperimento si è svolto su cinque campioni:

- ST-1 Olio di sansa di oliva grezzo.
- ST-2 Olio di sansa di oliva raffinato.
- ST-3 Olio extra vergine di oliva.
- ST-4 Miscela costituita al 20% da olio di girasole alto oleico, al 70% da olio extra vergine di oliva e al 10% da olio di ravizzone.
- ST-5 Miscela costituita al 15% da olio di soia e all'85% da olio di oliva.

Il Segretariato esecutivo del COI ha condotto l'analisi statistica dei risultati della prova interlaboratorio secondo le regole definite dalla norma ISO 5725 **Accuratezza (veridicità e precisione) dei metodi e dei risultati delle misurazioni**; l'analisi 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 i campioni.

La tabella riporta:

n_p	Numero dei laboratori che hanno partecipato alla prova
outlier	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
RDS_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
RDS_R (%)	Coefficiente di variazione della riproducibilità ($S_R \times 100/\text{mean}$)

Contenuto di steroli**Colesterolo**

Campione	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
N. laboratori partecipanti, n_p	19	19	19	19	19
N. laboratori mantenuti dopo l'eliminazione degli outlier, n_p	19	14	16	18	18
N. risultati dei test in tutti i laboratori, n_t	38	28	32	36	36
Mean (%)	0,13	0,13	0,13	0,16	0,21
Deviazione standard della ripetibilità, s_r	0,024	0,018	0,016	0,025	0,015
Coefficiente di variazione della ripetibilità, $CV(r)$, %	18,8	14,0	12,3	15,1	7,2
Limite di ripetibilità, r	0,07	0,05	0,04	0,07	0,04
Deviazione standard della riproducibilità, s_R	0,041	0,023	0,038	0,047	0,058
Coefficiente di variazione della riproducibilità, $CV(R)$, %	31,9	17,8	29,5	29,1	27,7
Limite di riproducibilità, R	0,12	0,07	0,11	0,13	0,16

Brassicasterolo

Campione	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
N. laboratori partecipanti, n_p	19	19	19	19	19
N. laboratori mantenuti dopo l'eliminazione degli outlier, n_p	19	15	17	19	18
N. risultati dei test in tutti i laboratori, n_t	38	30	34	38	36
Mean (%)	0,05	0,02	0,000	1,46	0,02
Deviazione standard della ripetibilità, s_r	0,013	0,004	----	0,039	0,007
Coefficiente di variazione della ripetibilità, $CV(r)$, %	25,9	21,1	----	2,7	32,7
Limite di ripetibilità, r	0,04	0,01	----	0,11	0,02
Deviazione standard della riproducibilità, s_R	0,039	0,020	----	0,052	0,024
Coefficiente di variazione della riproducibilità, $CV(R)$, %	75,1	115,2	----	3,6	107,2
Limite di riproducibilità, R	0,11	0,06	----	0,15	0,07

Campesterolo

Campione	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
N. laboratori partecipanti, n_p	19	19	19	19	19
N. laboratori mantenuti dopo l'eliminazione degli outlier, n_p	18	18	17	18	18
N. risultati dei test in tutti i laboratori, n_t	36	36	34	36	36
Mean (%)	3,22	3,13	2,98	10,74	6,99
Deviazione standard della ripetibilità, s_r	0,044	0,045	0,029	0,100	0,061
Coefficiente di variazione della ripetibilità, $CV(r)$, %	1,3	1,4	1,0	1,0	0,9
Limite di ripetibilità, r	0,12	0,13	0,08	0,28	0,17
Deviazione standard della riproducibilità, s_R	0,085	0,087	0,086	0,259	0,167
Coefficiente di variazione della riproducibilità, $CV(R)$, %	2,6	2,8	2,9	2,4	2,4
Limite di riproducibilità, R	0,24	0,24	0,24	0,73	0,47

Stigmasterolo

Campione	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
N. laboratori partecipanti, n_p	19	19	19	19	19
N. laboratori mantenuti dopo l'eliminazione degli outlier, n_p	17	16	18	18	19
N. risultati dei test in tutti i laboratori, n_t	34	32	36	36	38
Mean (%)	1,23	1,05	0,41	2,83	5,40
Deviazione standard della ripetibilità, s_r	0,027	0,040	0,046	0,043	0,087
Coefficiente di variazione della ripetibilità, $CV(r)$, %	2,2	3,8	11,1	1,5	1,6
Limite di ripetibilità, r	0,08	0,11	0,13	0,12	0,24
Deviazione standard della riproducibilità, s_R	0,039	0,059	0,064	0,111	0,158
Coefficiente di variazione della riproducibilità, $CV(R)$, %	3,2	5,7	15,6	3,9	2,9
Limite di riproducibilità, R	0,11	0,17	0,18	0,31	0,44

β -sitosterolo apparente

Campione	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
N. laboratori partecipanti, n_p	19	19	19	19	19
N. laboratori mantenuti dopo l'eliminazione degli outlier, n_p	16	17	17	18	17
N. risultati dei test in tutti i laboratori, n_t	32	34	34	36	34
Mean (%)	93,9	93,8	95,2	78,6	84,8
Deviazione standard della ripetibilità, s_r	0,141	0,223	0,091	0,195	0,220
Coefficiente di variazione della ripetibilità, $CV(r)$, %	0,15	0,24	0,10	0,25	0,26
Limite di ripetibilità, r	0,4	0,6	0,3	0,6	0,6
Deviazione standard della riproducibilità, s_R	0,355	0,471	0,340	1,372	0,819
Coefficiente di variazione della riproducibilità, $CV(R)$, %	0,38	0,50	0,36	1,75	1,00
Limite di riproducibilità, R	1,0	1,3	1,0	4,0	2,2

 $\Delta 7$ -stigmastenolo

Campione	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
N. laboratori partecipanti, n_p	19	19	19	19	19
N. laboratori mantenuti dopo l'eliminazione degli outlier, n_p	18	19	19	17	18
N. risultati dei test in tutti i laboratori, n_t	36	38	38	34	36
Mean (%)	0,70	0,94	0,27	3,52	1,10
Deviazione standard della ripetibilità, s_r	0,028	0,056	0,025	0,090	0,040
Coefficiente di variazione della ripetibilità, $CV(r)$, %	4,1	6,0	9,5	2,6	3,6
Limite di ripetibilità, r	0,08	0,16	0,07	0,25	0,11
Deviazione standard della riproducibilità, s_R	0,086	0,084	0,067	0,171	0,087
Coefficiente di variazione della riproducibilità, $CV(R)$, %	12,3	8,9	25,3	4,9	7,9
Limite di riproducibilità, R	0,24	0,24	0,19	0,48	0,24

Dialcoli triterpenici (eritrodiole + uvaolo)

Campione	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
N. laboratori partecipanti, n_p	19	19	19	19	19
N. laboratori mantenuti dopo l'eliminazione degli outlier, n_p	17	15	19	18	15
N. risultati dei test in tutti i laboratori, n_t	34	30	38	36	30
Mean (mg/kg)	22,38	27,17	1,80	1,06	2,9
Deviazione standard della ripetibilità, s_r	0,214	0,333	0,215	0,162	0,108
Coefficiente di variazione della ripetibilità, $CV(r)$, %	1,0	1,2	11,9	15,3	3,8
Limite di ripetibilità, r	0,60	0,93	0,60	0,46	0,30
Deviazione standard della riproducibilità, s_R	1,028	1,257	0,450	0,342	0,210
Coefficiente di variazione della riproducibilità, $CV(R)$, %	4,6	4,6	25,0	32,2	7,3
Limite di riproducibilità, R	2,88	3,52	1,26	0,96	0,59

Contenuto totale di steroli

Campione	ST-1	ST-2	ST-3	ST-4	ST-5
N. laboratori partecipanti, n_p	18	18	18	18	18
N. laboratori mantenuti dopo l'eliminazione degli outlier, n_p	17	18	18	17	17
N. risultati dei test in tutti i laboratori, n_t	34	36	36	34	34
Mean (mg/kg)	4487,0	3169,8	1359,8	2066,5	1552,1
Deviazione standard della ripetibilità, s_r	71,76	49,15	45,19	30,14	31,75
Coefficiente di variazione della ripetibilità, $CV(r)$, %	1,6	1,6	3,3	1,5	2,1
Limite di ripetibilità, r	200,9	137,6	126,5	84,4	88,9
Deviazione standard della riproducibilità, s_R	378,89	234,65	82,93	131,47	89,54
Coefficiente di variazione della riproducibilità, $CV(R)$, %	8,4	7,4	6,1	6,4	5,8
Limite di riproducibilità, R	1060,9	657,0	232,2	368,1	250,7

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: 1994 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
