

REGOLAMENTO (CE) N. 796/2002 DELLA COMMISSIONE

del 6 maggio 2002

recante modifica del regolamento (CEE) n. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva, nonché ai metodi ad essi attinenti e le note complementari di cui all'allegato del regolamento (CEE) n. 2658/87 del Consiglio relativo alla nomenclatura tariffaria e statistica ed alla tariffa doganale comune

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

2568/91 oltre ad alcuni errori contenuti nel testo dello stesso regolamento.

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

visto il regolamento n. 136/66/CEE del Consiglio, del 22 settembre 1966, relativo all'attuazione di un'organizzazione comune dei mercati nel settore dei grassi ⁽¹⁾, modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 1513/2001 ⁽²⁾, in particolare l'articolo 35,

(4) Al fine di armonizzare le procedure di preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi destinati all'analisi della composizione in acidi grassi degli oli, l'evoluzione tecnica dei metodi di analisi permette, in funzione dell'acidità libera degli oli, di ridurre a due il numero dei metodi indicati nell'allegato X.B attualmente in vigore.

visto il regolamento (CEE) n. 2658/87 del Consiglio, del 23 luglio 1987, relativo alla nomenclatura tariffaria e statistica ed alla tariffa doganale comune ⁽³⁾, modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 578/2002 della Commissione ⁽⁴⁾, in particolare l'articolo 9,

(5) In base alle esperienze maturate, il Consiglio oleicolo internazionale ha elaborato un nuovo metodo per la valutazione delle caratteristiche organolettiche degli oli di oliva vergini. Questo metodo si è rivelato più attendibile e semplice di quello attualmente previsto dall'allegato XII del regolamento (CEE) n. 2568/91. È opportuno quindi sostituire il metodo previsto all'allegato XII con il nuovo metodo per la valutazione delle caratteristiche organolettiche degli oli di oliva vergini.

considerando quanto segue:

(1) Il regolamento (CEE) n. 2568/91 della Commissione, dell'11 luglio 1991, relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti ⁽⁵⁾, modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 2042/2001 ⁽⁶⁾, ha definito le caratteristiche fisiche, chimiche e organolettiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva, nonché i relativi metodi di valutazione di tali caratteristiche. A partire dal 1° novembre 2001, la definizione della categoria dell'olio di sansa di oliva greggio, di cui al punto 4 dell'allegato del regolamento n. 136/66/CEE stabilisce che taluni oli di oliva ottenuti a partire dalla sansa di oliva corrispondono, fatta eccezione per determinate caratteristiche, agli oli di oliva lampanti.

(6) Ai fini dell'applicazione del nuovo metodo di valutazione organolettica è necessario prevedere una procedura di arbitrato in caso di contrasto tra la categoria dichiarata e quella attribuita dal panel riconosciuto che esegue la valutazione.

(2) Al fine di distinguere gli oli ottenuti per centrifugazione della sansa di oliva e gli oli di oliva lampanti, e in assenza di un parametro analitico, è opportuno fissare dei valori limite relativi alla composizione in cere, in eritrodiole e uvaolo o in alcoli alifatici totali, per differenziare tra loro tali oli, indipendentemente dal metodo di ottenimento. A tal fine è opportuno definire un metodo per la determinazione del tenore in alcoli alifatici totali.

(7) Al fine di garantire le condizioni per la realizzazione delle analisi e data la dispersione geografica di certe regioni, è necessario fissare termini differenti per l'invio dei campioni al laboratorio dopo il loro prelievo, tenendo conto delle condizioni climatiche di ciascuna stagione. Per quanto riguarda la classificazione degli oli è opportuno precisare che i risultati delle analisi sono confrontati con i limiti fissati dal regolamento (CEE) n. 2568/91, che tengono già conto dei margini di ripetibilità e di riproducibilità dei metodi di analisi utilizzati.

(3) Questi nuovi limiti impongono di modificare la nota complementare 2 del capitolo 15 della nomenclatura combinata di cui all'allegato I del regolamento (CEE) n. 2658/87. In questa occasione è opportuno sopprimere l'articolo 5 e l'allegato XIV del regolamento (CEE) n.

(8) Per consentire un periodo di adeguamento alle nuove norme e la predisposizione degli strumenti necessari per la loro applicazione, nonché evitare turbative nelle transazioni commerciali, è opportuno rinviare l'applicabilità delle modifiche previste dal presente regolamento fino al 1° settembre 2002 e prevedere un'eccezione per gli oli d'oliva e gli oli di sansa d'oliva condizionati per il commercio al dettaglio anteriormente a tale data.

⁽¹⁾ GU L 172 del 30.9.1966, pag. 3025/66.

⁽²⁾ GU L 201 del 26.7.2001, pag. 4.

⁽³⁾ GU L 256 del 7.9.1987, pag. 1.

⁽⁴⁾ GU L 97 del 13.4.2002, pag. 1.

⁽⁵⁾ GU L 248 del 5.9.1991, pag. 1.

⁽⁶⁾ GU L 276 del 19.10.2001, pag. 8.

(9) Le misure che rientrano nelle loro rispettive competenze previste dal presente regolamento sono conformi al parere del comitato di gestione per i grassi e del comitato del codice doganale,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

Il regolamento (CEE) n. 2568/91 è modificato come segue:

1) all'articolo 2, paragrafo 1:

a) il terzo trattino è sostituito dal testo seguente:

«— per la determinazione del tenore di cere, il metodo di cui all'allegato IV,»;

b) è aggiunto il trattino seguente:

«— per la determinazione del tenore in alcoli alifatici, il metodo di cui all'allegato XIX,»;

2) all'articolo 2, il paragrafo 2 è sostituito dal seguente:

«2. La verifica delle caratteristiche organolettiche degli oli di oliva vergini da parte delle autorità nazionali o dei loro rappresentanti è compiuta da panel di assaggiatori riconosciuti dagli Stati membri.

Le caratteristiche organolettiche di un olio d'oliva vergine, di cui al primo comma, si considerano conformi alla categoria di olio di oliva dichiarata qualora il panel di assaggiatori riconosciuto dallo Stato membro ne confermi la classificazione.

Qualora il panel non confermi la dichiarazione della categoria di olio di oliva, sotto il profilo delle sue caratteristiche organolettiche, a richiesta dell'interessato le autorità nazionali o i loro rappresentanti incaricano altri panel riconosciuti di effettuare due controanalisi, di cui almeno una deve essere effettuata da un panel riconosciuto dallo Stato membro di produzione dell'olio. Le caratteristiche in questione sono considerate conformi a quelle dichiarate se le due controanalisi ne confermano la classificazione. Nel caso contrario il costo delle controanalisi, e fatte salve le sanzioni comminate, sono a carico dell'interessato.»;

3) all'articolo 2, il secondo comma del paragrafo 3 è sostituito dal testo seguente:

«Fatte salve le disposizioni della norma EN ISO 5555 e del capitolo 6 della norma EN ISO 661, i campioni prelevati sono messi immediatamente al riparo dalla luce e da fonti di calore elevato e sono inviati al laboratorio per le analisi entro al più tardi:

— il decimo giorno lavorativo successivo a quello del prelievo nei mesi da ottobre a maggio, e

— il quinto giorno lavorativo successivo a quello del prelievo nei mesi da giugno a settembre.»;

4) all'articolo 2, è aggiunto il seguente paragrafo 5:

«5. Quando le caratteristiche degli oli d'oliva sono determinate secondo i metodi di cui al paragrafo 1, i risultati delle analisi sono direttamente confrontati con i limiti fissati dal presente regolamento.»;

5) gli articoli 3 e 3 bis sono soppressi;

6) l'articolo 3 ter diventa articolo 3;

7) all'articolo 4, il paragrafo 1 è sostituito dal seguente:

«1. Ai fini della valutazione e del controllo delle caratteristiche organolettiche da parte delle autorità nazionali o dei loro rappresentanti, gli Stati membri possono procedere al riconoscimento di panel di assaggiatori.

Le condizioni del riconoscimento sono stabilite dallo Stato membro in particolare in modo da:

- rispondere alle condizioni di cui all'allegato XII, punto 4,
- garantire che la formazione del capo del panel si compia presso un organismo riconosciuto e alle condizioni a tal fine stabilite dallo Stato membro,
- subordinare la validità del riconoscimento ai risultati ottenuti nell'ambito di un sistema di controllo annuale istituito dallo Stato membro.

Ogni Stato membro comunica alla Commissione l'elenco dei panel riconosciuti e le misure adottate conformemente al presente paragrafo.»;

8) l'articolo 5 è soppresso;

9) gli allegati sono modificati conformemente all'allegato del presente regolamento.

Articolo 2

La nota complementare 2 del capitolo 15 della nomenclatura combinata riportata nell'allegato I del regolamento (CEE) n. 2658/87 è modificata come segue:

1) al punto B I, la lettera a) è sostituita dal testo seguente:

«a) un tenore in cere non superiore a 300 mg/kg;»

2) al punto B I, la lettera g), punto 4, è sostituita dal testo seguente:

«4. caratteristiche organolettiche che presentino una mediana dei difetti superiore a 6, conformemente all'allegato XII del regolamento (CEE) n. 2568/91;»

3) al punto B II, la lettera g) è sostituita dal testo seguente:

«g) caratteristiche organolettiche che presentino una mediana dei difetti pari o inferiore a 6, conformemente all'allegato XII del regolamento (CEE) n. 2568/91;»

4) al punto D, la lettera b) è sostituita dal testo seguente:

«b) un tenore in eritrodiole e uvaolo superiore a 4,5 %;».

Articolo 3

Il presente regolamento entra in vigore il settimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*.

Per gli oli d'oliva e gli oli di sansa d'oliva condizionati per il commercio al dettaglio si applica a partire dal 1° settembre 2002.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 6 maggio 2002.

Per la Commissione
Franz FISCHLER
Membro della Commissione

ALLEGATO

1. Al sommario degli allegati del regolamento (CEE) n. 2568/91:
 - a) l'allegato XIV: Note complementari 2, 3 e 4 del capitolo 15 della nomenclatura combinata è soppresso;
 - b) è aggiunto il seguente titolo: «Allegato XIX: Metodo per la determinazione del tenore in alcoli alifatici».
2. L'allegato I è sostituito dalle tabelle e dal testo seguenti:

CARATTERISTICHE DEGLI OLI D'OLIVA

Categoria	Acidità (%) (*)	Indice di perossidi mEq O ₂ /kg (*)	Solventi alogenati mg/kg (*) (1)	Cere mg/kg (**)	Acidi saturi in posizione 2 del trigliceride (%)	Stigmastadieni mg/kg (2)	Differenza ECN42 — HPLC e calcolo teorico di ECN42	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	K ₂₇₀ con allumina (3)	Delta-K (*)	Valutazione organolettica Mediana del difetto (Md) (*)	Valutazione organolettica Mediana de fruttato (Mf) (*)
1. Olio extra vergine di oliva	≤ 1,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Olio di oliva vergine	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Olio di oliva vergine corrente	≤ 3,3	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Md ≤ 6,0 (4)	—
4. Olio di oliva vergine lampante	> 3,3	> 20	> 0,20	≤ 300 (5)	≤ 1,3	≤ 0,50	≤ 0,3	≤ 3,70	> 0,25	≤ 0,11	—	Md > 6	—
5. Olio di oliva raffinato	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,40	≤ 1,20	—	≤ 0,16	—	—
6. Olio di oliva	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,30	≤ 1,00	—	≤ 0,13	—	—
7. Olio di sansa di oliva greggio	> 0,5 (**)	—	—	> 350 (6)	≤ 1,8	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—	—
8. Olio di sansa di oliva raffinato	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,50	≤ 2,50	—	≤ 0,25	—	—
9. Olio di sansa di oliva	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,30	≤ 2,00	—	≤ 0,20	—	—

(1) Limite massimo per i composti totali alogenati rivelati dal rivelatore a cattura di elettroni.

Per i componenti accertati singolarmente il limite massimo è 0,10 mg/kg.

(2) Somma degli siomeri che potrebbero (o meno) essere separati mediante colonna capillare.

(3) Per la verifica della presenza di oli raffinati, se il K₂₇₀ supera il limite della categoria corrispondente, si deve procedere alla determinazione del K₂₇₀ dopo passaggio su allumina.

(4) Se la mediana del fruttato è uguale a 0, la mediana del difetto deve essere inferiore o uguale a 2,5.

(5) Gli oli con un tenore in cera compreso tra 300 mg/kg e 350 mg/kg sono considerati olio di oliva lampante se gli alcoli alifatici totali sono pari o inferiori a 350 mg/kg o se la percentuale di eritrodiole e uvaolo è pari o inferiore a 3,5.

(6) Gli oli con un tenore in cera compreso tra 300 mg/kg e 350 mg/kg sono considerati olio di sansa di oliva greggio se gli alcoli alifatici totali sono superiori a 350 mg/kg e se la percentuale di eritrodiole e uvaolo è superiore a 3,5.

Categoria	Composizione acidica						Somma degli isomeri transoleici (%)	Somma degli isomeri translinoleici e translinolenici (%)	Colesterolo (%)	Brassicasterolo (%)	Campesterolo (%)	Stigmasterolo (%)	Betasitosterolo (%) ⁽¹⁾	Delta-7-Stigmasteronolo (%)	Steroli totali (mg/kg)	Eritrodiole e uvaolo (%) ^(**)
	Miristico (%)	Linolenico (%)	Arachido (%)	Eicosanoico (%)	Beenico (%)	Lignocericico (%)										
1. Olio extra vergine di oliva	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Olio di oliva vergine	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Olio di oliva vergine corrente	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
4. Olio di oliva vergine lampante	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽²⁾
5. Olio di oliva raffinato	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Olio di oliva	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
7. Olio di sansa di oliva greggio	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽³⁾
8. Olio di sansa di oliva raffinato	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
9. Olio di sansa di oliva	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Somma di: Delta-5,23-Stigmastadienolo + Clerosterolo + Beta-Sitosterolo + Sitostanolo + Delta-5-Avenasterolo + Delta-5,24-Stigmastadienolo.

⁽²⁾ Gli oli con un tenore in cera compreso tra 300 mg/kg e 350 mg/kg sono considerati olio di oliva lampante se gli alcoli alifatici totali sono pari o inferiori a 350 mg/kg o se la percentuale di citrodiole e uvaolo è pari o inferiore a 3,5.

⁽³⁾ Gli oli con un tenore in cera compreso tra 300 mg/kg e 350 mg/kg sono considerati olio di sansa di oliva greggio se gli alcoli alifatici totali sono superiori a 350 mg/kg e se la percentuale di eritrodiole e uvaolo è superiore a 3,5.

Nota:

- a) I risultati delle analisi devono essere espressi con un numero di decimali uguale a quello previsto per ogni caratteristica. L'ultima cifra deve essere aumentata di una unità se la cifra successiva è superiore a 4.
- b) È sufficiente che una sola caratteristica non sia conforme ai valori indicati perché l'olio venga cambiato di categoria o dichiarato non conforme riguardo la sua purezza.
- c) Le caratteristiche contrassegnate con (*) e riguardanti la qualità dell'olio implicano che:
— per l'olio d'oliva vergine lampante, corrispondenti valori limite (eccetto il K_{232}) possono non essere rispettati simultaneamente,
— per gli altri oli d'oliva vergini, l'inosservanza di almeno uno di questi valori limite comporta il cambiamento di categoria, pur rimanendo classificati in una delle categorie degli oli d'oliva vergini.
- d) Le caratteristiche contrassegnate con (**) implicano che per tutti gli oli di sansa di oliva i corrispondenti valori limite possono non essere rispettati simultaneamente.»

3. L'allegato X.B è sostituito dall'allegato seguente:

«ALLEGATO X.B

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 sanso 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 ECN42 (differenza tra il valore teorico e sperimentale dei trigliceridi ECN42):
 - 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 applicherà direttamente ai campioni di olio delle seguenti categorie:
 - oli di oliva vergini di acidità inferiore a 3,3 %,
 - olio di oliva raffinato,
 - olio di oliva (miscela di oli di oliva vergini e olio di oliva raffinato),
 - olio di sanso di oliva raffinato,
 - olio di sanso di oliva (miscela di oli di oliva vergini e olio di sanso 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 sanso di oliva grezzo;
- c) determinazione degli isomeri trans degli acidi grassi:
 - il metodo A si applicherà direttamente ai campioni di olio delle seguenti categorie:
 - oli di oliva vergini di acidità inferiore a 3,3 %,
 - olio di oliva raffinato,
 - olio di oliva (miscela di oli di oliva vergini e olio di oliva raffinato),
 - olio di sanso di oliva raffinato,
 - olio di sanso di oliva (miscela di oli di oliva vergini e olio di sanso di oliva raffinato),
 - il metodo B 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 sanso 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 diossido di etilene (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 di esano/ossido di diossido di etilene (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 sanso 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 metilato di sodio 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 metanoli 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).

— Fenoltaleina, 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.

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

— Granuli ebullioscopici.

— Imbutto 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 imbutto 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 fenoltaleina. Si aggiungono pochi ml di acido solforico 1 N 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 metalizzazione 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.

Nota 1: Si possono impiegare le soluzioni di cloruro di idrogeno in metanolo disponibili in commercio. È possibile preparare facilmente in laboratorio piccole quantità d'acido cloridrico gassoso, modificando la soluzione disponibile in commercio ($p = 1,18$) aggiungendo qualche goccia d'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.

2.6.1.4. 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.

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.
- Imbutto 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 ($p = 1,84$) 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 a 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 etero 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 dal consiglio oleicolo internazionale nel suo metodo COI/T.20/DOC n. 24.

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 Δ ECN42 devono essere 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 (cfr. COI/T.20/Doc. n. 17).

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

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

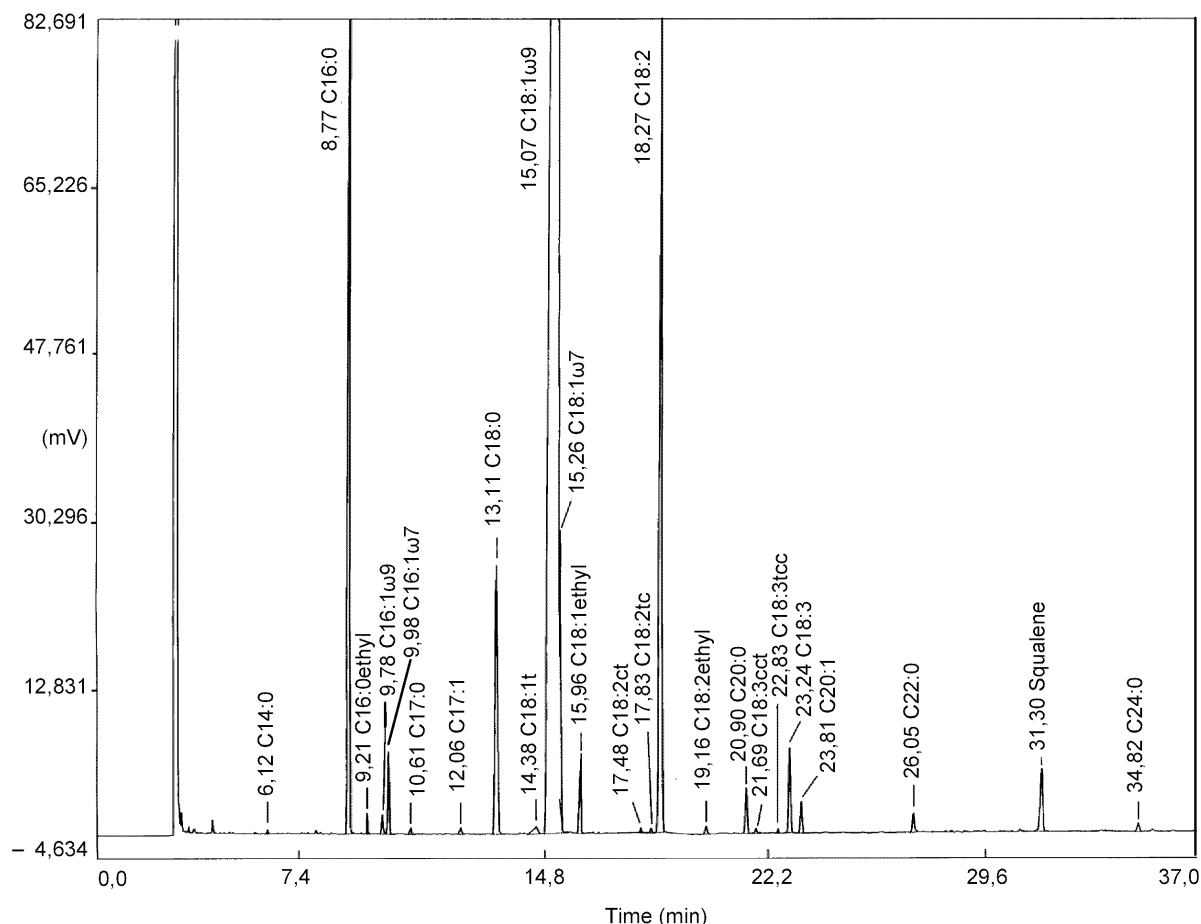


Figura 1: Profilo gascromatografico di un olio di sansa di oliva, ottenuto con il metodo della metilazione a freddo. I picchi cromatografici corrispondono agli esteri metilici, salvo altre indicazioni.»

4. L'allegato XII è sostituito dall'allegato seguente:

«ALLEGATO XII

VALUTAZIONE ORGANOLETTICA DEGLI OLI DI OLIVA VERGINI

1. FINALITÀ E CAMPO D'APPLICAZIONE

Lo scopo del presente metodo è quello di stabilire i criteri necessari per la valutazione delle caratteristiche organolettiche degli oli d'oliva vergini ai sensi del punto 1 dell'allegato del regolamento n. 136/66/CEE e di descrivere il metodo per la loro classificazione.

Il metodo descritto è applicabile soltanto alla classificazione degli oli d'oliva vergini in funzione dell'esistenza del flavor fruttato e dell'intensità dei difetti, determinati da un gruppo di assaggiatori selezionati e addestrati, costituito in panel, conformemente al punto 4.

2. ASPETTI GENERALI

Per il vocabolario generale di base, la sala di degustazione, la metodologia generale e il bicchiere di degustazione dell'olio, si raccomanda di conformarsi alle prescrizioni del consiglio oleicolo internazionale.

3. VOCABOLARIO SPECIFICO

3.1. **Attributi positivi**

Fruttato: insieme delle sensazioni olfattive, dipendenti dalla varietà delle olive, e caratteristiche dell'olio ottenuto da frutti sani e freschi, verdi o maturi, percepite per via diretta o retronasale.

Amaro: sapore caratteristico dell'olio ottenuto da olive verdi o invaiate.

Piccante: sensazione tattile pungente caratteristica di oli prodotti all'inizio della campagna, principalmente da olive ancora verdi.

3.2. **Attributi negativi**

Riscaldo: flavor caratteristico dell'olio ottenuto da olive ammassate che hanno sofferto un avanzato grado di fermentazione anaerobica.

Muffa-umidità: flavor caratteristico dell'olio ottenuto da frutti nei quali si sono sviluppati abbondanti funghi e lieviti per essere rimasti ammassati per molti giorni e in ambienti umidi.

Morchia: flavor caratteristico dell'olio rimasto in contatto con i fanghi di decantazione in depositi sotterranei e aerei.

Avvinato-inacetito: flavor caratteristico di alcuni oli che ricorda quella del vino o dell'aceto. È dovuta fondamentalmente a un processo fermentativo delle olive che porta alla formazione di acido acetico, acetato di etile ed etanolo.

Metallico: flavor che ricorda il metallo. È caratteristico dell'olio mantenuto a lungo in contatto con superfici metalliche durante i procedimenti di macinatura, gramolatura, pressione o stoccaggio.

Ranciò: flavor degli oli che hanno subito un processo ossidativo.

Cotto o stracotto: flavor caratteristico dell'olio, dovuta ad eccessivo e/o prolungato riscaldamento durante l'ottenimento, specialmente durante la termo-impastatura, se avviene in condizioni termiche inadatte.

Fieno-legno: flavor caratteristico di alcuni oli provenienti da olive secche.

Grossolano: sensazione orale/tattile densa e pastosa prodotta da alcuni oli.

Lubrificanti: flavor dell'olio che ricorda il gasolio, il grasso o l'olio minerale.

Acqua di vegetazione: flavor acquisito dall'olio a causa di un contatto prolungato con le acque di vegetazione.

Salamoia: flavor dell'olio estratto da olive conservate in salamoia.

Sparto: flavor caratteristico dell'olio ottenuto da olive pressate in fiscoli nuovi di sparto. Essa può essere diversa se il fiscolo è fatto con sparto verde o con sparto secco.

Terra: flavor dell'olio ottenuto da olive raccolte con terra o infangate e non lavate.

Verme: flavor dell'olio ottenuto da olive fortemente colpite da larve di mosca dell'olivo (*Bactrocera oleae*).

Cetriolo: flavor che si produce caratteristicamente nell'olio durante un condizionamento ermetico eccessivamente prolungato, particolarmente in lattine, che è attribuita alla formazione di 2-6 nonadienale.

4. **PANEL DI ASSAGGIATORI**

Il panel è nominato dallo Stato membro ed è composto da un capo e da otto a dodici assaggiatori. Tuttavia, per la campagna 2001/02 il numero di assaggiatori può essere inferiore a otto.

Il capo del panel deve possedere una solida formazione ed essere un esperto nei vari tipi di olio. Egli è responsabile del panel, della sua organizzazione, del funzionamento, della preparazione, della codificazione e della presentazione dei campioni agli assaggiatori nonché del compendio dei dati e del loro trattamento statistico.

Il capo panel seleziona gli assaggiatori e provvede al loro addestramento e al controllo del loro operato in modo da garantire il mantenimento di un adeguato livello attitudinale.

Gli assaggiatori per le prove organolettiche dell'olio di oliva devono essere prescelti e addestrati in funzione della loro abilità a distinguere tra campioni simili, conformemente alla guida del consiglio oleicolo internazionale per la selezione, l'addestramento e il controllo degli assaggiatori qualificati di olio di oliva vergine.

I panel devono impegnarsi a partecipare alle valutazioni organolettiche previste a livello nazionale, comunitario o internazionale per il controllo periodico e l'armonizzazione dei criteri percettivi. Essi devono inoltre inviare ogni anno allo Stato membro interessato tutte le informazioni in merito alla loro composizione e al numero di valutazioni realizzate in quanto panel riconosciuto.

5. **PROCEDURA DA SEGUIRE PER LA VALUTAZIONE ORGANOLETTICA E LA CLASSIFICAZIONE**

5.1. **Uso del foglio di profilo da parte dell'assaggiatore**

Il foglio di profilo che deve utilizzare l'assaggiatore figura nell'appendice A del presente metodo.

Ogni assaggiatore facente parte del panel deve odorare, poi assaggiare⁽¹⁾ l'olio sottoposto ad esame, contenuto nel bicchiere di assaggio, per analizzarne le percezioni olfattive, gustative, tattili e cinestetiche. Deve poi appuntare nel foglio di profilo a sua disposizione l'intensità alla quale percepisce ciascuno degli attributi negativi e positivi.

Nel caso in cui fossero percepiti attributi negativi non enumerati, questi devono essere indicati alla voce "altri" impiegando il o i termini che li descrivono con la maggior precisione possibile, tra quelli definiti al punto 3.2 del presente metodo.

5.2. **Uso dei dati da parte del capo panel**

Il capo panel deve raccogliere i fogli di profilo riempiti da ciascuno degli assaggiatori; deve controllare le intensità attribuite; nell'ipotesi di un'anomalia constatata chiederà all'assaggiatore di rivedere il suo foglio di profilo e, se necessario, di ripetere la prova.

Il responsabile del panel deve riprendere i dati di ogni giudice sul programma informatico allegato al metodo (appendice B) per il calcolo statistico della mediana. La ripresa dei dati per un campione deve essere fatta servendosi della matrice composta di dieci colonne corrispondenti ai dieci attributi sensoriali e n linee corrispondenti agli n giudici impiegati.

Quando un attributo negativo è riportato alla voce "altri" da almeno il 50 % del panel, il responsabile del panel deve procedere al calcolo della mediana di questo attributo e alla corrispondente classificazione.

Nel caso di analisi eseguite nel quadro di controlli di conformità alla norma o di controproverie, il capo panel deve far procedere alla valutazione organolettica dell'olio tre volte, ad almeno una giornata di intervallo; la mediana degli attributi sarà calcolata a partire dall'insieme dei dati dei fogli di profilo delle tre prove.

5.3. **Classificazione degli oli**

L'olio è classificato secondo le denominazioni sotto riportate, in funzione della mediana dei difetti e della mediana dell'attributo fruttato. Per mediana dei difetti si intende la mediana dell'attributo negativo percepito con l'intensità più alta. Il valore del coefficiente di variazione robusto per tale attributo negativo deve essere inferiore o pari al 20 %.

- a) *olio extra vergine di oliva*: la mediana dei difetti è pari a 0 e la mediana del fruttato è superiore a 0;
- b) *olio di oliva vergine*: la mediana dei difetti è superiore a 0 e inferiore o pari a 2,5 e la mediana del fruttato è superiore a 0;
- c) *olio di oliva vergine corrente*: la mediana dei difetti è superiore a 2,5 e inferiore o pari a 6,0; oppure la mediana dei difetti è inferiore o pari a 2,5 e la mediana del fruttato è pari a 0;
- d) *olio di oliva vergine lampante*: la mediana dei difetti è superiore a 6,0.

Tuttavia, a partire dal 1° novembre 2003 le categorie c) e d) sono sostituite dalla categoria:

- c) *olio di oliva lampante*: la mediana dei difetti è superiore a 2,5; oppure la mediana dei difetti è inferiore o pari a 2,5 e la mediana del fruttato è pari a 0.

5.4. **Caso particolare**


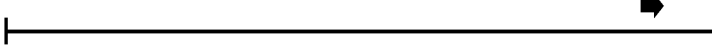
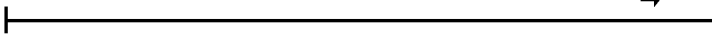
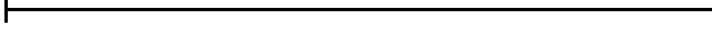



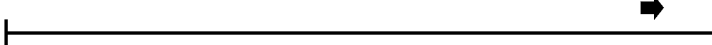

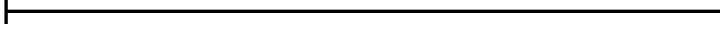
Quando la mediana di un attributo positivo diverso dal fruttato è superiore a 5,0, il capo panel lo deve segnalare nel certificato di analisi dell'olio.

⁽¹⁾ Potrà astenersi dall'assaggiare quando osservi qualche attributo negativo estremamente intenso e appunterà nel foglio di profilo questa circostanza eccezionale.

APPENDICE A

Foglio di profilo

(ad uso dell'assaggiatore)

PERCEZIONE DEI DIFETTI	INTENSITÀ
Riscaldo	
Muffa-umidità	
Avvinato-inacetito	
Morchia	
Metallico	
Rancido	
Altri (precisare)	
PERCEZIONE DEGLI ATTRIBUTI POSITIVI	
Fruttato	
Amaro	
Piccante	

Nome dell'assaggiatore:Codice del campione:Data:

APPENDICE B

METODO DI CALCOLO DELLA MEDIANA E DEGLI INTERVALLI DI CONFIDENZA

Mediana

$$Me = [P (X < X_m) \leq 1/2 \wedge P (X \leq X_m) \geq 1/2]$$

La mediana è quel numero reale X_m caratterizzato dal fatto che la probabilità (P) che i valori della distribuzione (X) siano minori a questo numero (X_m), è minore e uguale a 0,5 e che contemporaneamente la probabilità (P) che i valori della distribuzione (X) siano minori o uguali a X_m , è maggiore o uguale a 0,5. Una definizione più operativa è quella che definisce la mediana come il 50° percentile di una distribuzione di numeri ordinata in modo crescente. In altri termini, la mediana rappresenta il valore centrale di una serie ordinata di numeri dispari, oppure la media dei due valori centrali di una serie ordinata di numeri pari.

Deviazione standard robusta

$$S = \frac{1,25 \text{ IQR}}{1,35 \sqrt{N}}$$

Per avere una stima attendibile della variabilità intorno alla mediana ci si rifà alla stima della deviazione standard robusta secondo Stuart e Kendall. La formula della deviazione standard robusta S dipende da N e IQR. N è il numero dei casi e IQR l'intervallo interquartile ovvero la stima robusta della variabilità dei dati considerati (l'intervallo interquartile racchiude esattamente il 50 % dei casi di una qualsiasi distribuzione probabilistica). Il calcolo dell'intervallo interquartile si esegue calcolando la dimensione dello scarto tra il 75° e il 25° percentile.

$$\text{IQR} = 75^\circ \text{ percentile} - 25^\circ \text{ percentile}$$

Il percentile è quel valore X_{pc} caratterizzato dal fatto che la probabilità (P) che i valori della distribuzione siano minori a X_{pc} è minore e uguale a un determinato centesimo e che contemporaneamente la probabilità (P) che i valori della distribuzione siano minori o uguali a X_{pc} è maggiore e uguale a quel determinato centesimo. Il centesimo indica la frazione di distribuzione scelta. Nel caso della mediana questa è pari a 50/100.

$$\text{Percentile} = [P (X < X_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge P (X \leq X_{pc}) \geq \frac{n}{100}]$$

Operativamente il percentile è quel valore di distribuzione che corrisponde ad una determinata area sottesa dalla curva di distribuzione o di densità. Ad esempio il 25° percentile rappresenta il valore della distribuzione corrispondente a un'area pari a 0,25 o 25/100.

Coefficiente di variazione % robusto

$$\text{CVR} = \frac{S}{Me} 100$$

Le CVR rappresenta un numero puro, ovvero senza dimensione, che indica la percentuale di variabilità della serie di numeri analizzata rispetto al valore Me della mediana; per questo motivo risulta molto informativo sulla attendibilità dei giudizi del panel.

Intervalli di confidenza al 95 % sulla mediana

Gli intervalli di confidenza (I.C.) al 95 % (valore dell'errore del primo tipo pari a 0,05 o 5 %) rappresentano l'intervallo dove il valore della mediana potrebbe variare se fosse possibile ripetere infinite volte un esperimento. In pratica indica l'intervallo di variabilità della prova nelle condizioni operative adottate qualora si potesse ripeterla parecchie volte. L'intervallo aiuta a valutare, come con i CVR, l'attendibilità della prova.

$$\text{I.C. Sup.} = Me + (c.S)$$

$$\text{I.C. Inf.} = Me - (c.S)$$

Dove c nel caso della confidenza pari a 0,95 è uguale a 1,96.

La classificazione avviene confrontando i valori della mediana con gli intervalli determinati al punto 5.3 del metodo. Il programma informatico permette di visualizzare la classificazione sulla tabella dei dati statistici e sul grafico.»

5. L'allegato XIV è soppresso.
6. È aggiunto il seguente allegato XIX.

«ALLEGATO XIX

DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI ALCOLI ALIFATICI MEDIANTE GASCROMATOGRAFIA CON COLONNA CAPILLARE

1. PREMESSA

Il metodo descrive un procedimento per la determinazione del contenuto di alcoli alifatici, singoli e totali, delle sostanze grasse.

2. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza grassa, addizionata di 1-eicosanolo quale standard interno, è saponificata con idrossido di potassio in soluzione etanolica, quindi l'insaponificabile viene estratto con etere etilico. Dall'insaponificabile estratto è separata la frazione degli alcoli mediante cromatografia su placca di gel di silice basica; gli alcoli recuperati dal gel di silice vengono trasformati in trimetilsilileteri ed analizzati mediante gascromatografia in colonna capillare.

3. APPARECCHIATURA

- 3.1. Matraccio da 250 ml, munito di refrigerante a ricadere con giunti a smeriglio.
- 3.2. Imbutto separatore da 500 ml.
- 3.3. Matracci da 250 ml.
- 3.4. Attrezzatura completa per analisi cromatografica su strato sottile, per lastre di vetro 20 × 20 cm.
- 3.5. Lampada a luce ultravioletta, con lunghezza d'onda 366 o 254 nm.
- 3.6. Microsiringhe da 100 e 500 microlitri.
- 3.7. Imbutto cilindrico filtrante a setto poroso G 3 (porosità 15-40 micrometri) di diametro circa 2 cm e altezza circa 5 cm, con attacco idoneo per filtrazione sotto vuoto e giunto smerigliato maschio 12/21.
- 3.8. Beuta per vuoto da 50 ml con giunto femmina smerigliato 12/21 adattabile all'imbutto filtrante (3.7).
- 3.9. Provetta da 10 ml a fondo conico con tappo a tenuta.
- 3.10. Gascromatografo idoneo per il funzionamento con colonna capillare, dotato di sistema di splittaggio, costituito da:
 - 3.10.1. Camera termostatica per la colonna, idonea a mantenere la temperatura desiderata con la precisione di circa 1 °C.
 - 3.10.2. Complesso di iniezione termoregolabile con elemento vaporizzante in vetro persilanizzato.
 - 3.10.3. Rivelatore a ionizzazione di fiamma e convertitore-amplificatore.
 - 3.10.4. Registratore-integratore idoneo per il funzionamento con il convertitore-amplificatore (3.10.3), con tempo di risposta non superiore a 1 secondo e con velocità della carta variabile.
- 3.11. Colonna capillare in vetro o silice fusa, lunga 20 + 30 m, diametro interno 0,25 + 0,32 mm, internamente ricoperta con liquido SE-52 o SE-54 o equivalenti, con spessore uniforme compreso fra 0,10 e 0,30 micrometri.
- 3.12. Microsiringa per gascromatografia da 10 microlitri con ago cementato.
- 3.13. Bilancia di previsione con sensibilità di 1 mg (con indicazione 0,1 mg).

4. REATTIVI

- 4.1. Potassio idrossido, soluzione metanolica circa 2 N: si sciogliono, sotto raffreddamento, 130 g di idrossido di potassio (titolo minimo 85 %) in 200 ml di acqua distillata, quindi si porta ad 1 litro con etanolo. La soluzione si conserva in bottiglie di vetro scuro ben tappate.
- 4.2. Etere etilico, puro per analisi.
- 4.3. Sodio solfato anidro, puro per analisi.

- 4.4. Lastre di vetro stratificate con gel di silice, senza indicatore di fluorescenza, spessore 0,25 mm (sono reperibili in commercio già pronte per l'uso).
- 4.5. Potassio idrossido, soluzione etanolica circa 0,2 N: si sciolgono 13 g di idrossido di potassio in 20 ml di acqua distillata e si porta a 1 litro con etanolo.
- 4.6. Benzene, per cromatografia (cfr. 5.2.2).
- 4.7. Acetone, per cromatografia (5.2.2).
- 4.8. Esano, per cromatografia (cfr. 5.2.2).
- 4.9. Etere etilico, per cromatografia (cfr. 5.2.2).
- 4.10. Cloroformio, puro per analisi.
- 4.11. Soluzione di riferimento per la cromatografia su placca: colesterolo o fitosteroli, soluzione a 0,5 % in cloroformio.
- 4.12. 2,7-diclorofluoresceina, soluzione etanolica allo 0,2 %. Si rende leggermente basica aggiungendo qualche goccia di soluzione alcolica 2 N di idrossido di potassio.
- 4.13. Piridina anidra, per cromatografia.
- 4.14. Esametildisilazano.
- 4.15. Trimetilclorosilano.
- 4.16. Soluzione etanolo di trimetilsilileteri degli alcoli alifatici da C₂₀ a C₂₈. Si preparano al momento dell'impiego a partire da miscele di alcoli puri.
- 4.17. 1-eicosanolo, soluzione allo 0,1 % (m/v) in cloroformio (standard interno).
- 4.18. Gas vettore: idrogeno o elio, puri per gascromatografia.
- 4.19. Gas ausiliare: azoto puro per gascromatografia.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Preparazione dell'insaponificabile

- 5.1.1. Nel matraccio da 250 ml si introduce, impiegando la microsiringa da 500 microlitri, un volume di soluzione di 1-eicosanolo allo 0,1 % in cloroformio (4.17) che contenga una quantità di 1-eicosanolo corrispondente a circa il 10 % del contenuto di alcoli alifatici nell'aliquota di campione da prelevare per la determinazione. Ad esempio per 5 g di campione si aggiungano 250 microlitri della soluzione di 1-eicosanolo allo 0,1 % se trattasi di oli di oliva e 1 500 microlitri se trattasi di olio di sansa di oliva.

Si evapora il cloroformio in corrente di azoto fino a secchezza, quindi nello stesso matraccio si pesano esattamente circa 5 g di campione secco e filtrato.

- 5.1.2. Si aggiungono 50 ml di soluzione etanolica di idrossido di potassio 2 N, si applica il refrigerante a ricadere e si scalda a leggera ebollizione su bagnomaria sotto continua energica agitazione, fino a saponificazione avvenuta (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, aiutandosi con acqua distillata, a più riprese, impiegandone complessivamente circa 50 ml. Si aggiungono circa 80 ml di etere etilico, si agita energicamente per circa 30 secondi e si lascia stratificare (nota 1).

Si separa la fase acquosa sottostante raccogliendola in un secondo imbuto separatore. Sulla fase acquosa si effettuano ancora due estrazioni, con le stesse modalità impiegando ogni volta 60-70 ml di etere etilico.

Nota 1: Eventuali emulsioni possono essere eliminate aggiungendo, mediante spruzzetta, piccole quantità di alcool etilico o metilico.

- 5.1.4. Si riuniscono gli estratti eteri in un unico imbuto separatore e si lavano con acqua distillata (50 ml per volta) fino a reazione neutra delle acque di lavaggio.

Eliminata l'acqua di lavaggio, si essicca con solfato di sodio anidro e si filtra, su solfato sodico anidro, in un matraccio da 250 ml previamente pesato, lavando imbuto e filtro con piccole quantità di etere etilico.

- 5.1.5. Si distilla l'etere fino a pochi ml, quindi si porta a secco sotto leggero vuoto o in corrente di azoto, si completa l'essiccamento in stufa a 100 °C per un quarto d'ora circa e, dopo raffreddamento in essiccatore, si pesa.

5.2. Separazione della frazione degli alcoli

- 5.2.1. Preparazione delle lastre basiche: si immergono le lastre al gel di silice (4.4), completamente, nella soluzione etanolica 0,2 N di idrossido di potassio (4.5) per 10 secondi, si lasciano quindi asciugare sotto cappa per 2 ore ed infine si pongono in stufa a 100 °C per 1 ora.

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

Nota 2: Impiegando per la separazione della frazione alcolica delle lastre di gel di silice basiche si elimina la necessità del trattamento dell'insaponificabile con allumina. In tal modo vengono trattenuti sulla linea di caricamento tutti i composti di natura acida (acidi grassi ed altro) ottenendosi così le bande degli alcoli alifatici e terpenici nettamente separate dalla banda degli steroli.

- 5.2.2. Nella camera di sviluppo delle lastre si introduce una miscela esano-etere etilico 65/35 (V/V) fino all'altezza di circa 1 cm (*).

Si chiude la camera con l'apposito coperchio e si lascia così per almeno mezz'ora 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 3: Al fine di ottenere condizioni di eluizione perfettamente riproducibili la miscela di sviluppo deve essere sostituita ad ogni prova.

- 5.2.3. Si prepara una soluzione al 5 % circa di insaponificabile (5.1.5) in cloroformio e, con la microsiringa da 100 microlitri si depositano su una placca cromatografica (5.2.1) a 2 cm circa da una estremità, 0,3 ml di detta soluzione, in striscia il più possibile sottile ed uniforme. In allineamento con la linea di caricamento, ad un'estremità della lastra si depositano 2-3 microlitri della soluzione di riferimento degli alcoli (4.11), allo scopo di identificare, a sviluppo ultimato, la banda degli alcoli alifatici.

- 5.2.4. Si pone la placca nella camera di sviluppo preparata come detto in 5.2.2. La temperatura dovrà essere mantenuta fra 15 e 20 °C. Si chiude subito la camera col coperchio e si lascia eluire fino a che il fronte del solvente 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 oppure lasciando la placca ad asciugare per un po' di tempo sotto cappa.

- 5.2.5. Si spruzza la placca debolmente ed uniformemente con la soluzione di 2,7-diclorofluoresceina. Osservando la lastra alla luce ultravioletta si individua la banda degli alcoli alifatici per allineamento con la macchia ottenuta con la soluzione di riferimento e si delimita con una matita nera l'insieme della banda degli alcoli alifatici e della banda immediatamente superiore corrispondente agli alcoli triterpenici.

Nota 4: La prescrizione di raccogliere insieme alla banda degli alcoli alifatici anche la banda degli alcoli triterpenici è dettata dal fatto che in questa, nelle condizioni del metodo, vengono inglobate significative quantità di alcoli alifatici.

- 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 cloroformio caldo, si mescola accuratamente con la spatola metallica e si filtra aiutandosi con il vuoto, raccogliendo il filtrato nella beuta (3.8), collegata all'imbuto filtrante.

Si lava il residuo nell'imbuto per tre volte con etere etilico (circa 10 ml per volta) raccogliendo sempre il filtrato nella stessa beuta adattata all'imbuto. Si evapora il filtrato fino ad un volume di circa 4-5 ml, si trasferisce la soluzione residua nella provetta da 10 ml (3.9) previamente pesata, si porta a secco con blando riscaldamento in leggera corrente di azoto, si riprende con qualche goccia di acetone, si riporta ancora a secco, si pone 10 minuti circa in stufa a 105 °C, indi si lascia raffreddare in essiccatore e si pesa.

Il residuo contenuto nella provetta è costituito dalla frazione alcolica.

5.3. Preparazione dei trimetilsilileteri

- 5.3.1. Nella provetta contenente la frazione alcolica si aggiunge il reattivo per la sililazione, costituito da una miscela di piridina-esametildisilazanotrimetilclorosilano 9:3:1 (v/v/v) (nota 5) in ragione di 50 microlitri per ogni milligrammo di alcoli alifatici, evitando ogni assorbimento di umidità (nota 6).

Nota 5: Esistono in commercio soluzioni già pronte per l'uso; sono inoltre disponibili altri reagenti silanizzanti, quali ad esempio il bis-trimetiltrifluoroacetammide + 1 % trimetilclorosilano da diluire con uno stesso volume di piridina anidra.

Nota 6: L'eventuale formazione di una leggera opalescenza è normale e non è causa di alcun disturbo. La formazione di un flocculato bianco o la comparsa di una colorazione rosa sono indizio della presenza di umidità o di alterazione del reattivo. In questo caso la prova dovrà essere ripetuta.

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

(*) In questi casi, in particolare, si deve utilizzare la miscela eluente benzene-acetone 95/5 (v/v) per ottenere una buona separazione delle bande.

5.4. Analisi gascromatografica

5.4.1. Operazioni preliminari, condizionamento della colonna

5.4.1.1. Si installa nel gascromatografo la colonna, collegando il terminale di ingresso all'iniettore connesso col sistema di splittaggio, e il terminale di uscita al rivelatore. Si eseguono i controlli generali del complesso gascromatografico (tenuta dei circuiti dei gas, efficienza del rivelatore, efficienza del sistema di splittaggio e del sistema di registrazione, ecc.).

5.4.1.2. Se la colonna è messa in uso per la prima volta è consigliabile procedere al suo condizionamento. Si fa fluire 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 7). Si mantiene tale temperatura per almeno 2 ore, quindi si porta il complesso alle condizioni di funzionamento (regolazione del flusso dei gas e dello splittaggio, accensione della fiamma, collegamento con il registratore elettronico, regolazione della temperatura della camera per la colonna, del rivelatore e dell'iniettore, ecc.) e si registra il segnale ad una sensibilità almeno 2 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 imperfetta tenuta delle connessioni della colonna, una deriva positiva indica un insufficiente condizionamento della colonna.

Nota 7: La temperatura di condizionamento deve in ogni caso essere inferiore di almeno 20 °C alla temperatura massima prevista per il liquido di ripartizione impiegato.

5.4.2. Scelta delle condizioni operative

5.4.2.1. Condizioni operative di massima sono le seguenti:

- temperatura della colonna: inizio isoterma 8 minuti a 180 °C, quindi programma 5 °C/minuto fino a 260 °C e ancora 15 minuti a 260 °C,
- temperatura dell'evaporatore: 280 °C,
- temperatura del rivelatore: 290 °C,
- velocità lineare del gas vettore: elio da 20 a 35 cm/s; idrogeno da 30 a 50 cm/s,
- rapporto di splittaggio: da 1/50 a 1/100,
- sensibilità strumentale: da 4 a 16 volte l'attenuazione minima,
- sensibilità di registrazione: da 1 a 2 mV su fondo scala,
- velocità della carta: da 30 a 60 cm/ora,
- quantità di sostanza iniettata: da 0,5 a 1 microlitri di soluzione di 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 dell'alcol C₂₆ deve essere di 18 ± 5 minuti,
- il picco dell'alcol C₂₂ deve essere per l'olio di oliva 80 ± 20 % del fondo scala e per gli oli di semi 40 ± 20 % del fondo scala.

5.4.2.2. Per verificare i suddetti requisiti si effettuano ripetute iniezioni con le miscele campione di TMSE degli alcoli e si ritoccano le condizioni operative fino a raggiungere i migliori risultati.

5.4.2.3. I parametri di integrazione dei picchi dovranno essere impostati in modo da ottenere una corretta valutazione delle aree dei picchi che vengono presi in considerazione.

5.4.3. Esecuzione dell'analisi

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

5.4.3.2. Si effettua la registrazione fino a completa eluizione dei TMSE degli alcoli presenti. La linea di base deve essere sempre corrispondente ai requisiti richiesti (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 degli alcoli, analizzate nelle medesime condizioni.

Nella figura 1 è riportato un cromatogramma della frazione alcolica di un olio di oliva vergine.

5.4.5. Valutazione quantitativa

5.4.5.1. Si procede al calcolo con l'integratore, delle aree dei picchi dell'1-eicosanolo e degli alcoli alifatici da C₂₂ C₂₄, C₂₆, C₂₈.

5.4.5.2. Si calcola il contenuto di ogni singolo alcool alifatico, in mg/1 000 g di sostanza grassa come segue:

$$\text{Alcool } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

in cui:

A_x = area del picco dell'alcool x

A_s = area del picco dell'1-eicosanolo

m_s = peso di 1-eicosanolo aggiunto, in milligrammi

m = peso del campione prelevato per la determinazione, in grammi.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Si riportano i contenuti dei singoli alcoli alifatici, in mg/1 000 g di sostanza grassa e, come "alcoli alifatici totali", la loro somma.

APPENDICE

Determinazione della velocità lineare dei gas

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

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

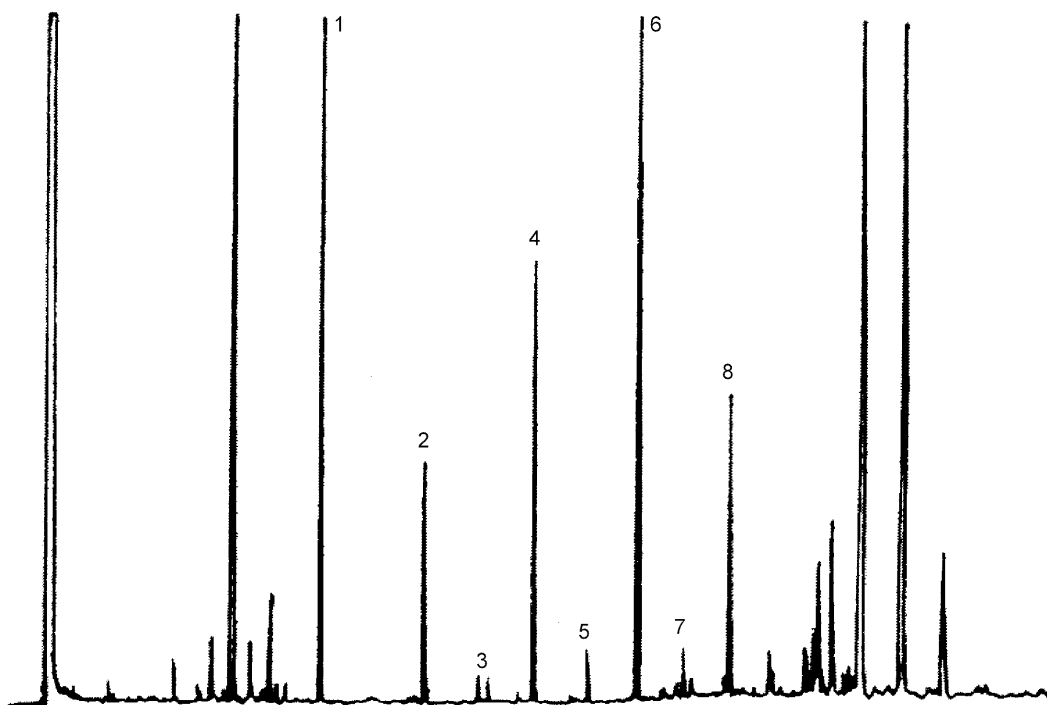


Figura 1 — Cromatogramma della frazione alcolica di un olio di oliva vergine

1 = Eicosanolo	5 = Pentacosanolo
2 = Docosanolo	6 = Esacosanolo
3 = Tricosanolo	7 = Eptacosanolo
4 = Tetracosanolo	8 = Octacosanolo