

DATI COPERTINA E PREMESSA DEL PROGETTO

UNI1612573

Lingua

Italiana

Titolo Italiano

Determinazione dello stato di ossidazione degli oli vergini di oliva mediante HPLC

Titolo Inglese

Determination of the oxidation state of virgin olive oils by HPLC

Commissione Tecnica

Organo Competente

UNI/CT 003/GL 18 - Oli, grassi animali e vegetali e loro sottoprodotti, semi e frutti oleaginosi

Coautore

Sommario

La norma descrive un procedimento per la determinazione quantitativa dei principali acidi grassi ossidati presenti nei trigliceridi degli oli vergini di oliva utilizzando la tecnica HPLC. Tale metodo quantifica solo gli acidi grassi ossidati esterificati.

I destinatari di questo documento sono invitati a presentare, insieme ai loro commenti, la notifica di eventuali diritti di brevetto di cui sono a conoscenza e a fornire la relativa documentazione.

Questo testo NON è una norma UNI, ma è un progetto di norma sottoposto alla fase di inchiesta pubblica, da utilizzare solo ed esclusivamente per fini informativi e per la formulazione di commenti. Il processo di elaborazione delle norme UNI prevede che i progetti vengano sottoposti all'inchiesta pubblica per raccogliere i commenti degli operatori: la norma UNI definitiva potrebbe quindi presentare differenze -anche sostanziali- rispetto al documento messo in inchiesta.

Questo documento perde qualsiasi valore al termine dell'inchiesta pubblica, cioè il:

2024-02-13

UNI non è responsabile delle conseguenze che possono derivare dall'uso improprio del testo dei progetti in inchiesta pubblica.

Relazioni Nazionali

Relazioni Internazionali

Premessa

La presente norma è stata elaborata sotto la competenza della Commissione Tecnica UNI Agroalimentare

© UNI - Milano. Riproduzione vietata.

Tutti i diritti sono riservati. Nessuna parte di questo documento può essere riprodotta o diffusa con un mezzo qualsiasi, fotocopie, microfilm o altro, senza il consenso scritto di UNI.

1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente norma descrive un procedimento per la determinazione quantitativa dei principali acidi grassi ossidati presenti nei trigliceridi degli oli vergini di oliva utilizzando la tecnica HPLC. Tale metodo quantifica solo gli acidi grassi ossidati esterificati.

AVVERTENZA L'utilizzo del presente metodo può richiedere l'impiego di apparecchiature e sostanze pericolose o l'esecuzione di operazioni che comportano un certo rischio. Il presente metodo non ha lo scopo di affrontare tutti i problemi di sicurezza connessi col suo impiego, perciò l'utilizzatore è responsabile della definizione di procedure di sicurezza appropriate e del rispetto della legislazione vigente.

2 Riferimenti normativi

La presente norma rimanda, mediante riferimenti datati e non, a disposizioni contenute in altre pubblicazioni. Tali riferimenti normativi sono citati nei punti appropriati del testo e sono di seguito elencati. Per quanto riguarda i riferimenti datati, successive modifiche o revisioni apportate a dette pubblicazioni valgono unicamente se introdotte nella presente norma come aggiornamento o revisione.

Per i riferimenti non datati vale l'ultima edizione della pubblicazione alla quale si fa riferimento (compresi gli aggiornamenti).

UNI EN ISO 5555 Oli e grassi animali e vegetali – Campionamento

UNI ISO 5725-1 Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione – Parte 1: Principi generali e definizione

UNI ISO 5725-2 Accuratezza (giustezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione – Parte 2: Metodo base per la determinazione della ripetibilità e riproducibilità di un metodo di misurazione normalizzato

UNI ISO 5725-5 Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione – Parte 5: Metodi alternativi per la determinazione della precisione di un metodo di misurazione normalizzato

UNI ISO 5725-6 Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione – Parte 6: Uso nella pratica dei valori di accuratezza

3 Termini e definizioni

Ai fini della presente norma si applicano i termini e le definizioni seguenti

- 3.1** acidi grassi ossidati: Composti liposolubili formati da catene di atomi di carbonio dotate di un gruppo terminale carbossilico sulle quali è avvenuto l'attacco di una molecola di ossigeno con la formazione di idroperossiacidi, idrossiacidi, chetoacidi e altre specie ossidate

4 PRINCIPIO

Gli acidi grassi ossidati, presenti nelle forme primarie (idroperossiacidi) e secondarie (idrossiacidi, e chetoacidi), nei trigliceridi degli oli vergini di oliva vengono transesterificati con benzilato sodico, estratti e determinati quantitativamente come derivati benzilesteri mediante HPLC con rivelatore UV a 255 nm.

5 APPARECCHIATURA

- 5.1 **Cromatografo liquido ad alta prestazione** (HPLC), munito di colonna (4,6 mm x 25 cm) a fase inversa RP18, del tipo Spherisorb ODS-2 5µm, 100 Å, corredato di rivelatore spettrofotometrico UV a 255 nm e di integratore. Temperatura ambiente.
L'eventuale esigenza di registrare gli spettri per un tentativo di identificazione è facilitata dall'uso di un rivelatore a fotodiodi con range di acquisizione da 200 nm a 400 nm.
- 5.2 **Matracci** da 25 ml e 50 ml Classe A.
- 5.3 **Pipette a doppia tacca** da 1 ml.
- 5.4 **Provette** con tappo a vite da 5 ml.
- 5.5 **Provette** coniche da 10 ml.
- 5.6 **Imbuti in vetro** per filtrazione del diametro di circa 4 cm.
- 5.7 **Carta da filtro**.
- 5.8 **Microsiringa** da 1000 µl a tenuta di gas e microsiringa da 10 µl ad ago piatto.
- 5.9 **Centrifuga** in grado di assicurare una velocità di 5000 g/min.
- 5.10 **Bilancia** in grado di garantire una accuratezza di $\pm 0,001$ g.
- 5.11 **Bagnomaria** termostato a 40°C e dispositivo per evaporazione in corrente di azoto.
- 5.12 **Agitatore** per provette¹.
- 5.13 Normale vetreria da laboratorio.

6 REAGENTI

I reagenti devono essere puri per analisi cromatografiche HPLC.

- 6.1 **Esano** per cromatografia.
- 6.2 **Isopropanolo** per cromatografia.
- 6.3 **Acido acetico glaciale**
- 6.4 **Sodio solfato anidro**
- 6.5 **Benzilato sodico 1,0 M in alcool benzilico**
- 6.6 **Solventi di eluizione: acqua e acetonitrile** per cromatografia. I solventi di eluizione devono essere degasati. Gradiente binario lineare con flusso di 1,00 ml/min.
- t = 0 min acqua/acetonitrile 40/60 (V/V)
t = 50 min acqua/acetonitrile 0/100 (V/V)
t = 70 min acqua/acetonitrile 0/100 (V/V)
t = 71 min acqua/acetonitrile 40/60 (V/V)
t = 85 min acqua/acetonitrile 40/60 (V/V)

¹ tipo Vortex

6.7 **Tricaproina 99%.**

6.8 **Triptadecanoina 99%.**

6.9 **Preparazione della soluzione per l'ottenimento degli standard interni**

Pesare accuratamente 0,010 g di tricaproina (6.7) e 0,020 g di triptadecanoina (6.8) in un matraccio da 50 ml. Portare a volume con esano (6.1).

7 PROCEDIMENTO

Preparare un imbuto (5.6) con carta da filtro (5.7) e aggiungere circa 20 g di sodio solfato (6.4). Far passare circa 40 ml di olio di oliva sulla fase adsorbente di sodio solfato.

Pesare (5.10) accuratamente 0,5 g al più vicino 0,01 g di olio di oliva anidrificato in un matraccio da 25 ml (5.2) e portare a volume con esano (6.1).

Trasferire 1 ml della soluzione campione in provetta (5.5) e aggiungere 1 ml della soluzione (6.9) (corrispondenti a circa 200 µg di tricaproina e 400 µg di triptadecanoina in relazione alla pesata del punto 6.9).

Aggiungere 50 µl della soluzione di benzilato sodico (6.5) (utilizzando la microsiringa (5.8) da 1000 µl a tenuta di gas a causa della elevata viscosità di tale reattivo).

Agitare (5.12) per 1 min esatto.

Lasciare reagire per 15 min a temperatura ambiente. Lo sviluppo della reazione è indicato da un graduale aumento di torbidità della soluzione.

Aggiungere 10 µl di acido acetico glaciale (6.3) utilizzando la microsiringa da 10 µl (5.8) per bloccare la reazione che dà luogo alla formazione di benzilcaproina (I.S. 1) e benzileptadecanoina (I.S. 2) e di tutti gli altri benzilesteri.

Agitare (5.12) per qualche secondo.

Centrifugare (5.9) a 3000 g/min per 10 min.

Trasferire immediatamente tutto il surnatante in provetta (5.5) ed eliminare il solvente per evaporazione, su bagnomaria (5.11) riscaldato a 40°C, in corrente di azoto.

Riprendere il residuo con 1 ml di isopropanolo (6.2) e iniettare 20 µl di questa soluzione nel sistema HPLC, registrando il cromatogramma a 255 nm.

L'accensione dello spettrofotometro UV deve avvenire almeno 1 h prima dell'analisi. La colonna cromatografica deve essere condizionata per almeno 15 min con il solvente di eluzione di composizione iniziale (acqua/acetonitrile 40/60 (V/V)).

Eseguire due diverse determinazioni indipendenti sullo stesso campione.

Nelle figure 1 e 2 viene riportato un tracciato cromatografico tipico dei benzilesteri di un olio extra vergine di oliva per l'identificazione della zona di eluzione dei benzilesteri degli acidi grassi ossidati e dei benzilesteri degli acidi grassi naturali.

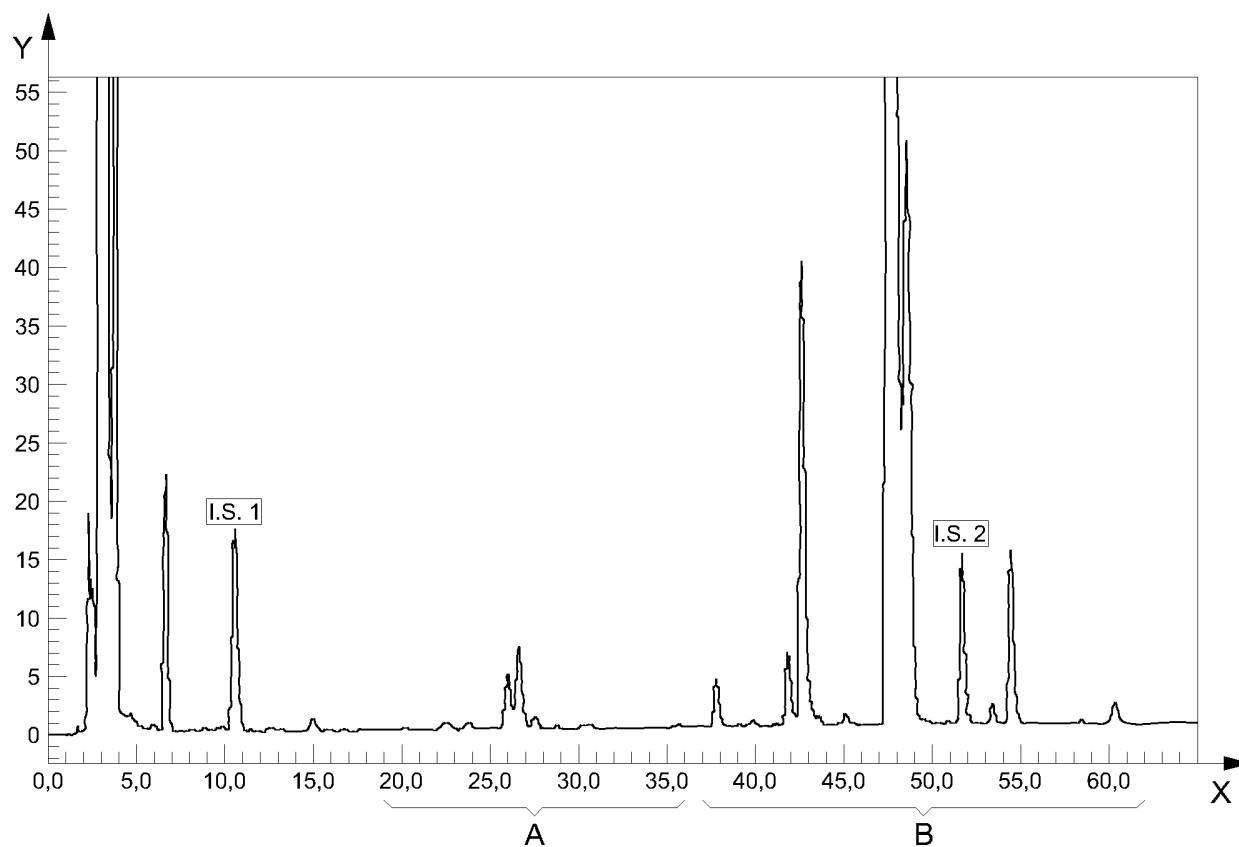
E' necessario effettuare sempre una corsa cromatografica definita "gradiente a vuoto" per essere sicuri che non ci siano picchi interferenti di coeluizione, costituita dall'iniezione di 20 µl di isopropanolo nel sistema HPLC.

Registrare per ogni campione i valori dei fattori di risposta relativi alla benzilcaproina e alla benzileptadecanoina in un apposito quaderno.

A fine giornata far fluire nella colonna cromatografica acetonitrile (6.6) a flusso 1,0 ml/min per almeno 15 min e mantenere la colonna in acetonitrile.

Figura 1

Cromatogramma HPLC registrato a 255 nm dei benzilesteri degli acidigrassi di un olio extra vergine di oliva



Legenda

X= min

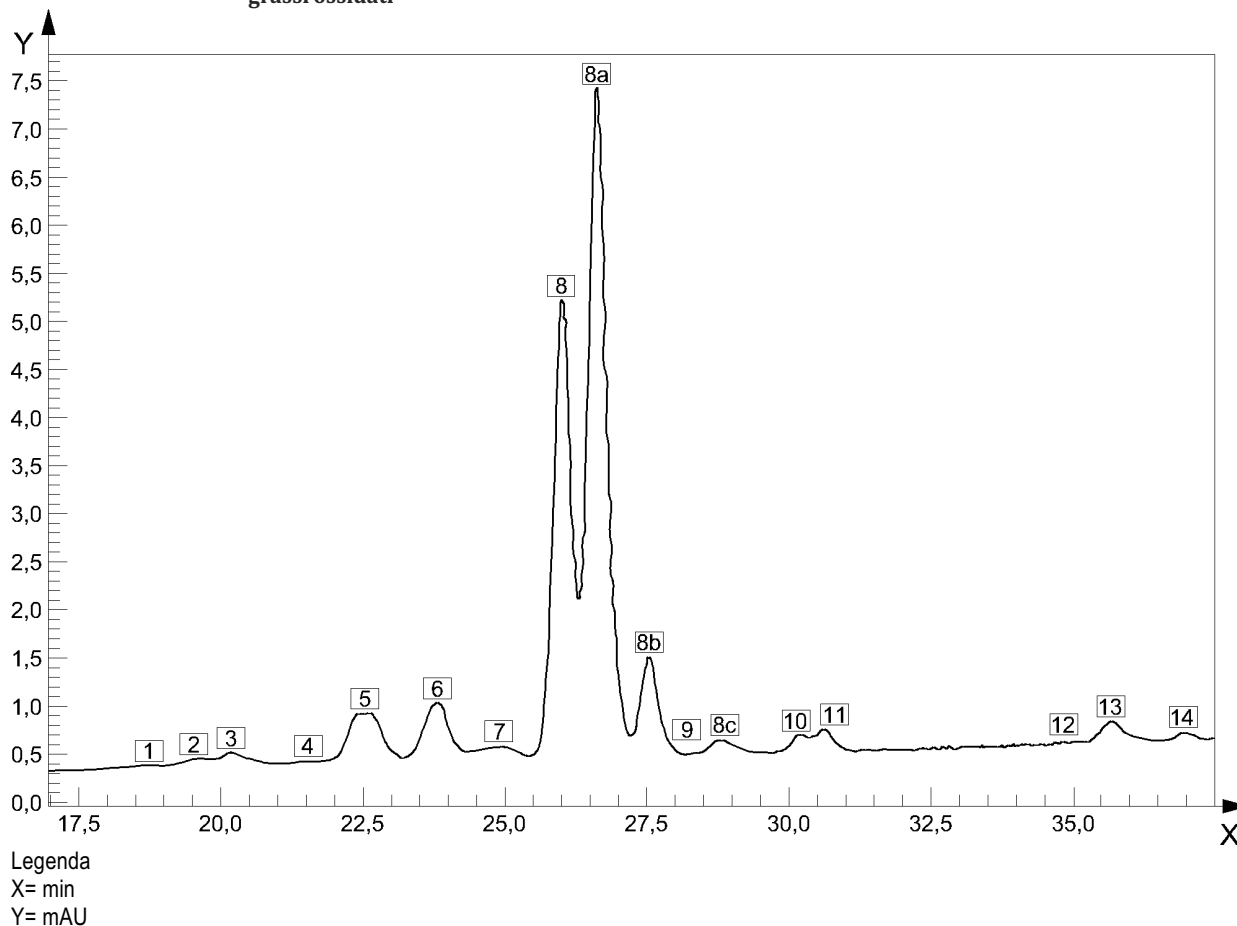
Y= mAU

A Benzilesteri Acidi Grassi Ossidati

B Benzilesteri Acidi Grassi Naturali

Figura 2

Ingrandimento del cromatogramma HPLC di figura 1 effettuato sulla zona di eluizione degli acidi grassi ossidati


8

ESPRESSIONE DEI RISULTATI

8.1

Controllo della reazione. Calcolo del valore RRF

Il controllo della completa reazione di transesterificazione avviene calcolando il rapporto RRF tra i fattori di risposta della benzilcaproina RF (I.S. 1) e della benzileptadecanoina RF (I.S. 2) calcolati come nell'esempio sottoriportato:

A)

$$\begin{aligned} \text{benzilcaproina } \mu\text{g iniettati} &= \frac{\mu\text{g/ml tricaproina} \times 3 \times \text{P.M. benzilcaproina} \times 20 \mu\text{l}}{\text{P.M. tricaproina} \times 1000 \mu\text{l/ml}} \\ &= \frac{200^* \times 3 \times 206 \times 20}{386 \times 1000} = 6,40 \mu\text{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{benzileptadecanoina } \mu\text{g iniettati} &= \frac{\mu\text{g/ml trieptadecanoina} \times 3 \times \text{P.M. benzileptadecanoina} \times 20 \mu\text{l}}{\text{P.M. trieptadecanoina} \times 1000 \mu\text{l/ml}} \\ &= \frac{400^* \times 3 \times 360 \times 20}{850 \times 1000} = 10,17 \mu\text{g} \end{aligned}$$

dove:

P.M. benzilcaproina è il peso molecolare della benzilcaproina pari a 206 u.m.a.
P.M. tricaproina è il peso molecolare della tricaproina pari a 386 u.m.a.

P.M. benzileptadecanoina è il peso molecolare della benzileptadecanoina pari a 360 u.m.a.
P.M. trieptadecanoina è il peso molecolare della trieptadecanoina pari a 850 u.m.a. 20*
sono i microlitri della soluzione iniettati in HPLC.

(*) Vedere punto 7 -Procedimento-

B)

$RF_{1\mu g}(I.S. 1) = \text{Area benzilcaproina} / \mu g \text{ benzilcaproina iniettati} = \text{Area} / 6,40 \mu g$

$RF_{1\mu g}(I.S. 2) = \text{Area benzileptadecanoina} / \mu g \text{ benzileptadecanoina iniettati} = \text{Area} / 10,17 \mu g$

C)

$RRF = RF_{1\mu g}(I.S. 1) / RF_{1\mu g}(I.S. 2)$

Tale valore deve essere costante sia nel bianco (transesterificazione dei due standard interni) sia nel campione, ed essere compreso nei parametri di precisione riportati al 9 (prospetto 3).

Esso permette di valutare che sia stata eseguita una buona conduzione della reazione di transesterificazione.

8.2

Calcolo della percentuale in peso degli acidi grassi ossidati

La percentuale in peso (mg/100 mg) degli acidi grassi ossidati viene espressa utilizzando il fattore di risposta dello standard interno della benzileptadecanoina ($RF_{1\mu g}$ I.S. 2).

La percentuale in peso degli acidi grassi ossidati totali viene calcolata misurando la somma delle aree dei relativi picchi cromatografici (identificati nel prospetto 1) corrispondenti ai prodotti di ossidazione dell'acido linolenico, linoleico e oleico nelle varie forme, registrate a 255 nm, secondo la seguente formula:

$$\% \text{ acidi grassi ossidati totali} = \frac{(\Sigma A)}{(RF_{1\mu g}(I.S. 2)) \times (m) \times 20} \times 100$$

dove:

(ΣA) è la somma di tutte le aree dei picchi degli acidi grassi ossidati.

m è la massa del campione prelevato per la determinazione, in milligrammi.

20 è il volume in microlitri della soluzione iniettata in HPLC.

Riportare la percentuale totale in peso espressa in mg/100 mg degli acidi grassi ossidati. Il risultato deve essere espresso con due cifre decimali.

Prospetto 1

Identificazione dei picchi relativi alla zona di eluizione dei benzilesteri degli acidi grassi ossidati: assorbimento UV (max UV abs.), RRT* (tempo di ritenzione relativo).

Picco N.	Benzilesteri derivati		RRT*	Max UV abs (nm)
1	Acido diepossioleico	di Epoxy-18:1	0,31	256
2	Acido idrossilinoilenico	OH -18:3	0,40	225
3	Acido diepossistearico	di Epoxy -18:0	0,42	256
4	Acido idroperossilinoilenico	OOH -18:3	0,43	210-240
5	Acido chetolinoilenico	C=O-18:3	0,44	279
6	Acido idrossilinoileico	OH -18:2	0,46	225
7	Acido idroperossilinoileico	OOH-18:2	0,48	210-240
8	Acido chetolinoileico	C=O-18:2	0,51	277
8a	Acido chetolinoileico	C=O-18:2	0,52	277
8b	Acido chetolinoileico	C=O-18:2	0,53	277
9	Acido idrossioleico	OH -18:1	0,54	256
8c	Acido chetolinoileico	C=O-18:2	0,56	279
10	Acido idroperossioleico	OOH -18:1	0,57	210-203
11	Acido chetooleico	C=O-18:1	0,58	210-224
12	Acido epossioleico	Epidioxy -18:1	0,62	256
13	Acido epossistearico	Epidioxy -18:0	0,69	256
14	Acido epidiossioleico	Epidioxy -18:1	0,70	256
(*) Il valore del tempo di ritenzione relativo è calcolato rispetto al tempo di ritenzione della benzilepta- decanoina. L' identificazione è stata eseguita mediante HPLC-MS.				

Precisione

La prova collaborativa è stata effettuata da 15 laboratori. La sperimentazione si è svolta su cinque campioni di olio:

- Campione 1 - Olio extra vergine di oliva
- Campione 2 - Olio extra vergine di oliva
- Campione 3 - Olio extra vergine di oliva
- Campione 4 - Olio vergine di oliva
- Campione 5 - Olio vergine di oliva

L'analisi statistica dei risultati della prova in collaborazione è stata condotta secondo UNI ISO 5725-1, 5725-2, 5725-5, 5725-6; l'esame dei valori aberranti (*outliers*) è stato condotto applicando il test di Cochran e il test di Grubbs sui risultati dei laboratori per tutte le determinazioni e tutti i campioni.

I margini di precisione riguardanti il contenuto totale % degli acidi grassi ossidati sono riportati nel prospetto 2 e rappresentati nella figura 3.

I margini di precisione riguardanti il fattore di controllo della reazione RRF sono riportati nel prospetto 3

Prospetto 2 Contenuto percentuale in peso (mg/100 mg) degli acidi grassi ossidati

	CAMPIONE 1	CAMPIONE 2	CAMPIONE 3	CAMPIONE 4	CAMPIONE 5
media	6,50	3,46	2,81	7,69	11,88
n	15	14	14	14	13
outliers	0	1	1	1	2
r	0,59	0,27	0,31	0,41	0,55
S_r	0,21	0,10	0,11	0,15	0,20
RSD_r (%)	3,23	2,80	3,97	1,89	1,65
R	2,41	1,42	1,23	2,59	3,03
S_R	0,86	0,51	0,44	0,93	1,08
RSD_R (%)	13,23	14,66	15,64	12,05	9,11
<p>n Numero dei laboratori che hanno partecipato alla prova, escludendo gli <i>outliers</i> (laboratori che presentano risultati aberranti).</p> <p><i>outliers</i> Numero di laboratori che presentano risultati aberranti.</p> <p>media Media dei risultati accettati.</p> <p>r Ripetibilità.</p> <p>S_r scarto tipo della ripetibilità.</p> <p>RSD_r Coefficiente di variazione della ripetibilità (S_r x 100 / media).</p> <p>R Riproducibilità.</p> <p>S_R scarto tipo della riproducibilità.</p> <p>RSD_R Coefficiente di variazione della riproducibilità (S_R x 100 / media).</p>					

Prospetto 3 Fattore di risposta per il controllo della reazione di transesterificazione (RRF)

	RRF
media	1,72
n	15
outliers	2
r	0,08
S_r	0,03
RSD_r (%)	1,65
R	0,19
S_R	0,07

RSD _R (%)		3,94
n	Numero dei laboratori che hanno partecipato alla prova, escludendo gli <i>outliers</i> (laboratori che presentano risultati aberranti).	
<i>outliers</i>	Numero di laboratori che presentano risultati aberranti. media Media dei risultati accettati.	
<i>r</i>	Ripetibilità.	
Sr	scarto tipo della ripetibilità.	
RSDr	Coefficiente di variazione della ripetibilità (Sr x 100 / media).	
<i>R</i>	Riproducibilità.	
SR	scarto tipo della riproducibilità.	
RSDR	Coefficiente di variazione della riproducibilità (SR x 100 / media).	

9.1

Ripetibilità r

La differenza fra due risultati di prova ottenuti da uno stesso operatore, con la stessa apparecchiatura ed in condizioni operative costanti, sullo stesso materiale di prova, nel normale e corretto uso di questo metodo, risulta maggiore dei valori indicati nel prospetto 2, solo in un caso su venti.

$$r = 0,19 \ln(x) + 0,09$$

dove:

x è la media dei due risultati da confrontare

9.2

Riproducibilità, R

La differenza fra due risultati singoli e indipendenti, ottenuti da operatori diversi, in laboratori diversi, sullo stesso materiale di prova, nel normale e corretto uso di questo metodo, risulta maggiore dei valori indicati nel prospetto 2 solo in un caso su venti.

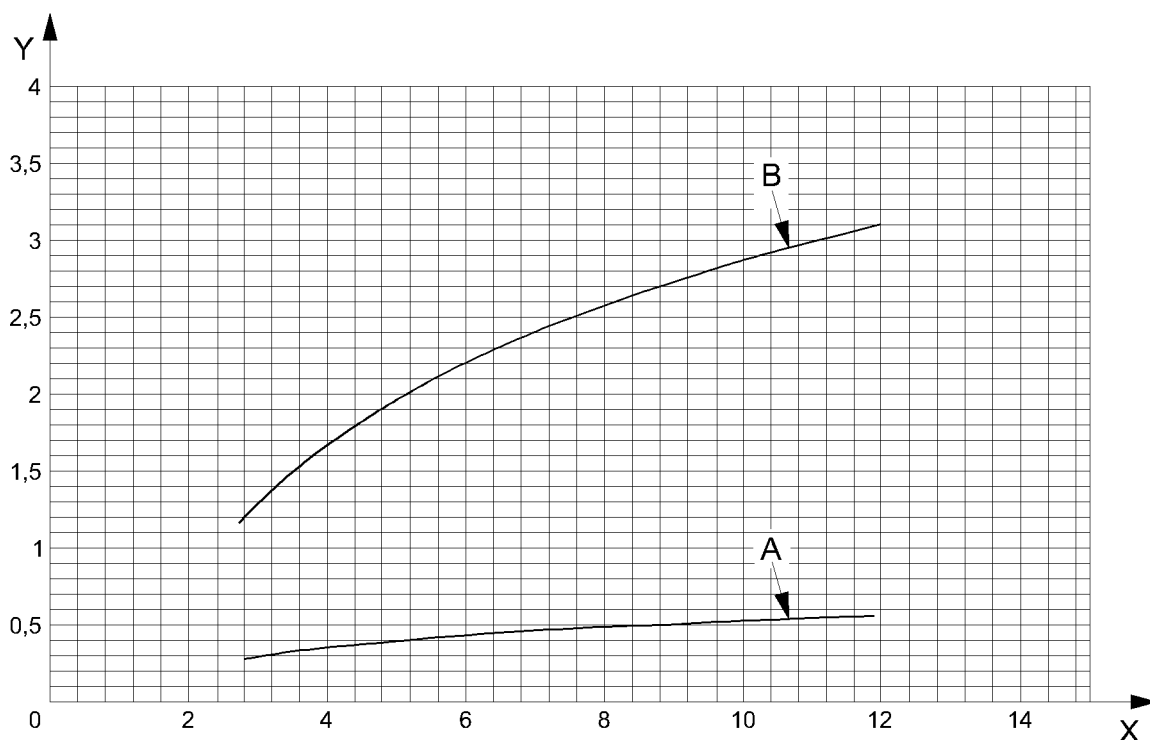
$$R = 1,31 \ln(x) - 0,13$$

dove:

x è la media dei due risultati da confrontare.

Figura 3

Rappresentazione grafica dei margini di precisione relativi al contenuto totale % degli acidi grassi ossidati (prospetto 2)



Legenda

- x è il contenuto % degli acidi grassi ossidati
- y è la differenza del contenuto % degli acidi grassi ossidati
- A è la Ripetibilità
- B è la Riproducibilità

10

RAPPORTO DI PROVA

Nel rapporto di prova dovranno essere riportate le informazioni seguenti:

- a) il riferimento alla presente norma;
- b) i risultati di prova espressi in mg/100 mg di olio con due cifre decimali;
- c) i valori di RRF, di $RF_{1\mu g}$ (I.S. 1) e di $RF_{1\mu g}$ (I.S. 2) utilizzati per il calcolo;

- d) qualsiasi deviazione dalla presente norma risultante da un accordo fra le parti o da altre circostanze;
- e) i dati di riconoscimento del laboratorio, la data di effettuazione e la firma del responsabile.

BIBLIOGRAFIA

Profilo ossidativo e struttura chimica dei prodotti di ossidazione dei trigliceridi mediante HPLC_ES-MS. P. Rovellini, N. Cortesi, E. Fedeli. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse Vol. LXXV Febbraio 1998 p. 57-70

Copyright

Riproduzione vietata. Tutti i diritti sono riservati. Nessuna parte del presente documento può essere riprodotta o diffusa con un mezzo qualsiasi, fotocopie, microfilm o altro, senza il consenso scritto dell'UNI.