

REGOLAMENTO (CE) N. 702/2007 DELLA COMMISSIONE

del 21 giugno 2007

che modifica il 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

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

visto il regolamento (CE) n. 865/2004 del Consiglio, del 29 aprile 2004, relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dell'olio d'oliva e delle olive da tavola e recante modifica del regolamento (CEE) n. 827/68 ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 5, paragrafo 3,

considerando quanto segue:

- (1) Il regolamento (CEE) n. 2568/91 della Commissione ⁽²⁾ definisce le caratteristiche fisiche e chimiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva, nonché i relativi metodi di valutazione. Tali metodi, come pure i valori limite relativi alle caratteristiche degli oli, devono essere aggiornati in base al parere degli esperti chimici e in conformità dei lavori svolti nell'ambito del Consiglio oleicolo internazionale.
- (2) Gli esperti chimici hanno ritenuto, in particolare, che la quantificazione della percentuale di 2-gliceril monopalmitato sia un metodo più preciso per la rivelazione degli oli esterificati. Parimenti, riducendo il valore limite per lo stigmastadiene negli oli d'oliva vergini si ottiene una migliore separazione degli oli d'oliva vergini da quelli raffinati.
- (3) Per consentire un periodo di adeguamento alle nuove norme e l'apprestamento degli strumenti necessari per la loro applicazione, nonché per evitare turbative nel commercio, è opportuno rinviare l'applicazione del presente regolamento al 1° gennaio 2008. Per gli stessi motivi è opportuno disporre che gli oli d'oliva e gli oli

di sansa d'oliva legalmente fabbricati ed etichettati nella Comunità o legalmente importati nella Comunità e immessi in libera pratica anteriormente a tale data possano essere commercializzati fino ad esaurimento delle scorte.

- (4) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del comitato di gestione per l'olio d'oliva e le olive da tavola,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

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

- 1) all'articolo 2, paragrafo 1, il sesto trattino è sostituito dal seguente:
«— per la determinazione della percentuale di 2-gliceril monopalmitato, il metodo di cui all'allegato VII,»;
- 2) gli allegati sono modificati secondo l'allegato del presente regolamento.

*Articolo 2*Il presente regolamento entra in vigore il terzo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Esso si applica a decorrere dal 1° gennaio 2008.

Tuttavia, i prodotti legalmente fabbricati ed etichettati nella Comunità o legalmente importati nella Comunità e immessi in libera pratica anteriormente al 1° gennaio 2008 possono essere commercializzati fino ad esaurimento delle scorte.

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

Fatto a Bruxelles, il 21 giugno 2007.

Per la Commissione

Mariann FISCHER BOEL

Membro della Commissione

⁽¹⁾ GU L 161 del 30.4.2004, pag. 97; rettifica nella GU L 206 del 9.6.2004, pag. 37.

⁽²⁾ GU L 248 del 5.9.1991, pag. 1. Regolamento modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 1989/2003 (GU L 295 del 13.11.2003, pag. 57).

ALLEGATO

Gli allegati del regolamento (CEE) n. 2568/91 sono modificati come segue.

1) Il sommario è modificato come segue:

a) il titolo dell'allegato II è sostituito dal seguente:

«Determinazione degli acidi grassi liberi, metodo a freddo»;

b) il titolo dell'allegato VII è sostituito dal seguente:

«Determinazione della percentuale di 2-gliceril monopalmitato».

2) L'allegato I è sostituito dal seguente:

«ALLEGATO I

CARATTERISTICHE DEGLI OLI DI OLIVA

Categoria	Acidità (%) (*)	Numero dei perossidi mEq O ₂ /kg (*)	Cere mg/kg (**)	2-gliceril monopalmitato (%)	Stigma-stadiene mg/kg (1)	Differenza ECN42 HPLC e ECN42 (calcolo teorico)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Valutazione organolettica mediana del difetto (Md) (*)	Valutazione organolettica mediana del fruttato (Mf) (*)
1. Olio extra vergine di oliva	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 % ≤ 1,0 se % acido palmitico totale > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Olio di oliva vergine	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 % ≤ 1,0 se % acido palmitico totale > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Olio di oliva lampante	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 % ≤ 1,1 se % acido palmitico totale > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	Md > 2,5 (2)	—
4. Olio di oliva raffinato	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 % ≤ 1,1 se % acido palmitico totale > 14 %	—	≤ 0,3	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Olio di oliva composto di oli di oliva raffinati e di oli di oliva vergini	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 % ≤ 1,0 se % acido palmitico totale > 14 %	—	≤ 0,3	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Olio di sansa di oliva greggio	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—
7. Olio di sansa di oliva raffinato	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Olio di sansa di oliva	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Somma degli isomeri che potrebbero essere separati mediante colonna capillare.

(2) O quando la mediana del difetto è inferiore o uguale a 2,5 e la mediana del fruttato è uguale a 0.

(3) Gli oli con un tenore di 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 eritriolo e uvaolo è pari o inferiore a 3,5.

(4) Gli oli con un tenore di 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 eritriolo e uvaolo è superiore a 3,5.

Categoria	Composizione acidica (1)						Somma degli isomeri trans-oleici (%)	Somma degli isomeri trans-linolenici (%)	Composizione in steroli						Steroli totali (mg/kg)	Eritrodiolo e uvaolo (%) (**)
	Miristico (%)	Lino lenico (%)	Arachidico (%)	Eicosenoico (%)	Behenico (%)	Lignocericico (%)			Colosterolo (%)	Brassicasterolo (%)	Campesterolo (%)	Stigma sterolo (%)	Betasitosterolo (%) (2)	Delta-7-stigma sterolo (%)		
1. Olio extra vergine di oliva	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	
2. Olio di oliva vergine	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	
3. Olio di oliva lampante	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (3)	
4. Olio di oliva raffinato	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	
5. Olio di oliva composto di oli di oliva raffinati e di oli di oliva vergini	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	
6. Olio di sansa di oliva greggio	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (4)	
7. Olio di sansa di oliva raffinato	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5	
8. Olio di sansa di oliva	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	

(1) Tenore di altri acidi grassi (%): palmitico: 7,5-20,0; palmitoleico: 0,3-3,5; eptadecanoico: ≤ 0,3; eptadecanoico: ≤ 0,3; stearico: 0,5-5,0; oleico: 55,0-83,0; linoleico: 3,5-21,0.

(2) Somma di: delta-5-23-stigmastadienolo + clerosterolo + beta-sitosterolo + sitostanolo + delta-5-avenasterolo + delta-5-24-stigmastadienolo.

(3) Gli oli con un tenore di 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 eritrodiolo e uvaolo è pari o inferiore a 3,5.

(4) Gli oli con un tenore di 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 eritrodiolo e uvaolo è superiore a 3,5.

Note:

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 un asterisco (*) e riguardanti la qualità dell'olio implicano che:

— per l'olio di oliva lampante, i corrispondenti valori limite possono non essere rispettati simultaneamente,

— per gli oli di oliva vergini, l'osservanza di almeno uno di questi valori limite comporta il cambiamento di categoria, pur rimanendo classificati in una delle categorie degli oli di oliva vergini.

d) Le caratteristiche contrassegnate con due asterischi (**) implicano che per tutti gli oli di sansa di oliva i corrispondenti valori limite possono non essere rispettati simultaneamente.*

- 3.5. Vibratore elettrico.
- 3.6. Evaporatore rotante.
- 3.7. Forno a muffola.
- 3.8. Bilancia analitica in grado di garantire una precisione di misura di + 0,1 mg.
- 3.9. Normale vetreria da laboratorio.

4. REAGENTI

- 4.1. Gel di silice di granulometria compresa tra 60 e 200 µm.

Il gel di silice è posto in muffola a 500 °C per almeno 4 ore. Dopo raffreddamento è addizionato del 2 % di acqua rispetto alla quantità di gel di silice prelevata. Si agita bene allo scopo di omogeneizzare la massa. Si conserva al buio per almeno 12 ore prima dell'uso.

- 4.2. n-esano per cromatografia.
- 4.3. Etere etilico per cromatografia.
- 4.4. n-eptano per cromatografia.
- 4.5. Soluzione campione di lauril arachidato, allo 0,1 % (v/m) in esano (standard interno). (Si può utilizzare anche *palmitil palmitato* o *miristol stearato*).
- 4.5.1. *Sudan 1 (1-fenilazo-2-naftolo)*.
- 4.6. Gas vettore: idrogeno o elio puro per gascromatografia.
- 4.7. Gas ausiliari:
 - idrogeno puro per gascromatografia,
 - aria pura per gascromatografia.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Preparazione della colonna cromatografica

Mettere in sospensione 15 g di gel di silice (4.1) in n-esano (4.2) e introdurla in colonna (3.2). Dopo assestamento spontaneo, completare lo stesso con l'ausilio di un vibratore elettrico per rendere più omogeneo il letto cromatografico. Percolare 30 ml di n-esano allo scopo di allontanare le eventuali impurezze. Pesare esattamente, nella beuta da 25 ml (3.1), circa 500 mg di campione con la bilancia (3.8), aggiungere l'opportuna quantità di standard interno (4.5) in funzione del presunto contenuto di cere. Ad esempio aggiungere 0,1 mg di lauril arachidato nel caso di olio di oliva, e da 0,25 a 0,50 mg nel caso di olio di sansa. Immettere il campione così preparato nella colonna cromatografica con l'ausilio di due porzioni da 2 ml ciascuna di n-esano (4.2).

Lasciar fluire il solvente fino a 1 mm sopra l'assorbente, quindi percolare altri 70 ml di n-esano allo scopo di eliminare gli n-alcani naturalmente presenti. Iniziare quindi l'eluizione cromatografica raccogliendo 180 ml di miscela n-esano/etere etilico in rapporto 99:1, rispettando un flusso di circa 15 gocce ogni 10 secondi. L'eluizione del campione deve essere effettuata a una temperatura ambiente di 22 °C ± 4.

NB:

- La miscela n-esano/etere etilico (99:1) deve essere preparata ogni giorno.
- Per controllare visivamente la corretta eluizione delle cere, è possibile aggiungere al campione in soluzione 100 µl di sudan 1 all'1 % nella miscela di eluizione. Il colorante ha una ritenzione intermedia tra le cere e i trigliceridi, pertanto quando la colorazione raggiunge il fondo della colonna cromatografica bisogna sospendere l'eluizione, in quanto tutte le cere sono state eluite.

Essiccare la frazione così ottenuta mediante evaporatore rotante (3.6) fino ad eliminazione quasi completa del solvente. Eliminare gli ultimi 2 ml di solvente mediante un debole flusso di azoto; aggiungere quindi 2-4 ml di n-eptano.

5.2. Analisi gascromatografica

5.2.1. Operazioni preliminari

Installare la colonna nel gascromatografo (3.3), collegando il terminale di ingresso al sistema "on column" e il terminale di uscita al rivelatore. Eseguire i controlli generali del complesso gascromatografico (tenuta dei circuiti dei gas, efficienza del rivelatore e del sistema di registrazione, ecc.).

Se la colonna è messa in uso per la prima volta è consigliabile procedere al suo condizionamento. Far fluire un leggero flusso di gas attraverso la colonna, quindi avviare il complesso gascromatografico. Riscaldare gradualmente fino a raggiungere, dopo circa 4 ore, la temperatura di 350 °C. Mantenere tale temperatura per almeno 2 ore, quindi portare il complesso alle condizioni di funzionamento (regolazione del flusso dei gas, accensione della fiamma, collegamento con il registratore elettronico (3.3.4), regolazione della temperatura della camera per colonna, del rivelatore, ecc.) e registrare il segnale ad 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 imperfetta tenuta delle connessioni della colonna, una deriva positiva indica un insufficiente condizionamento della colonna.

5.2.2. Scelta delle condizioni operative

Le condizioni operative di massima sono le seguenti:

— temperatura della colonna:

	20 °C/min		5 °C/min		20 °C/min	
inizio a 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10')

— temperatura del rivelatore: 350 °C,

— quantità di sostanza iniettata: 1 µl della soluzione (2-4 ml) di n-eptano,

— gas vettore: elio o idrogeno alla velocità lineare ottimale per il gas prescelto (cfr. appendice),

— sensibilità strumentale: idonea a soddisfare le sottostanti condizioni.

Tali condizioni possono essere variate in funzione delle caratteristiche della colonna e del gascromatografo in modo da avere una separazione di tutte le cere, una risoluzione soddisfacente dei picchi (cfr. figura) e una ritenzione dello standard interno C₃₂ di 18 ± 3 minuti. Il picco delle cere più rappresentativo deve avere un'altezza superiore al 60 % del fondo scala.

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

NB: Vista l'elevata temperatura finale, è ammessa una deriva positiva che non deve superare il 10 % del fondo scala.

5.3. Esecuzione dell'analisi

Prelevare 1 µl di soluzione con la microsiringa da 10 µl; estrarre lo stantuffo della siringa in modo che l'ago resti vuoto. Introdurre l'ago attraverso il dispositivo di iniezione e, dopo 1-2 secondi, iniettare rapidamente; estrarre quindi lentamente l'ago dopo circa 5 secondi.

Effettuare la registrazione fino a completa eluizione delle cere.

La linea di base deve rispondere sempre ai requisiti richiesti.

5.4. Identificazione dei picchi

L'identificazione dei singoli picchi viene effettuata in base ai tempi di ritenzione e in confronto a miscele di cere a tempi di ritenzione noti, analizzate nelle medesime condizioni.

Nella figura è riportato un cromatogramma delle cere di un olio di oliva vergine.

5.5. Valutazione quantitativa

Procedere al calcolo delle aree dei picchi dello standard interno e degli esteri alifatici da C₄₀ a C₄₆ per mezzo dell'integratore.

Calcolare il contenuto di cere in ogni singolo estere, in mg/kg di sostanza grassa, secondo la formula seguente:

$$\text{estere, mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1\,000}{A_s \times m}$$

in cui:

A_x = area del picco del singolo estere, in millimetri quadrati

A_s = area del picco dello standard interno, in millimetri quadrati

m_s = massa di standard interno aggiunta, in milligrammi

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

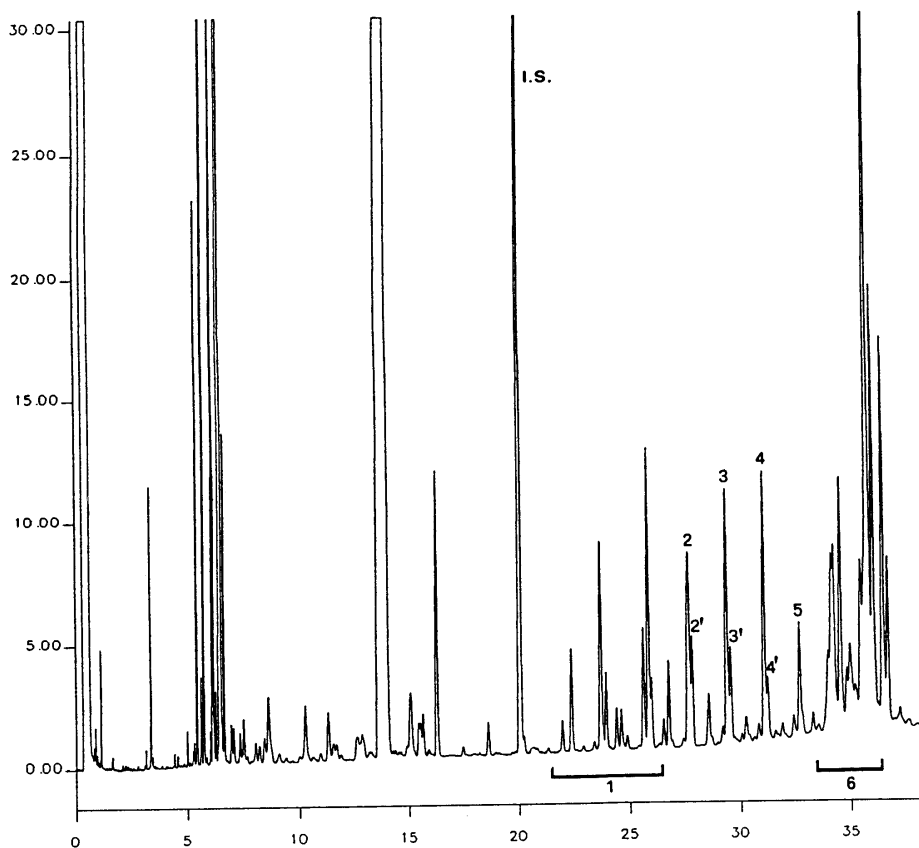
6. ESPRESSIONE DI RISULTATI

Riportare la somma dei contenuti delle singole cere da C₄₀ a C₄₆ in mg/kg di sostanza grassa (ppm).

NB: I componenti da quantificare si riferiscono ai picchi a numero di carbonio pari compresi tra gli esteri C₄₀ e C₄₆, secondo l'esempio di cromatogramma delle cere dell'olio di oliva riportato nella figura seguente. Se l'estere C₄₆ risulta sdoppiato, si consiglia, ai fini della sua identificazione, di analizzare la frazione cerosa di un olio di sansa dove il picco C₄₆ risulta facilmente individuabile in quanto nettamente maggioritario.

I risultati si esprimono con due cifre decimali.

Figura
Cromatogramma delle cere di un olio d'oliva (*)



Legenda:

- I.S. = Lauril arachidato
- 1. = Esteri diterpenici
- 2 + 2' = Esteri C₄₀
- 3 + 3' = Esteri C₄₂
- 4 + 4' = Esteri C₄₄
- 5. = Esteri C₄₆
- 6. = Esteri steroli e alcoli triterpenici.

(*) Dopo l'eluizione degli esteri degli steroli, il tracciato cromatografico non deve presentare picchi significativi (trigliceridi).

Appendice

Determinazione della velocità lineare del gas

Iniettare nel gascromatografo, regolato alle normali condizioni operative, da 1 a 3 µl di metano (o propano). Cronometrare 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.»

6) L'allegato VII è sostituito dal seguente:

«ALLEGATO VII

DETERMINAZIONE DELLA PERCENTUALE DI 2 GLICERIL MONOPALMITATO

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo descrive il procedimento analitico per la determinazione della percentuale di acido palmitico in posizione 2 nei trigliceridi mediante valutazione del 2-gliceril monopalmitato.

Esso si applica agli oli vegetali liquidi a temperatura ambiente (20 °C).

2. PRINCIPIO

Una volta preparato, il campione di olio è sottoposto all'azione della lipasi pancreatica: un'idrolisi parziale e specifica nelle posizioni 1 e 3 della molecola di trigliceride determina la comparsa dei monogliceridi in posizione 2. La percentuale di 2-gliceril monopalmitato nella frazione monogliceridica è determinata, previa sililazione, mediante gascromatografia in colonna capillare.

3. APPARECCHIATURA E MATERIALE

- 3.1. Beuta da 25 ml.
- 3.2. Beakers da 100, 250 e 300 ml.
- 3.3. Colonna di vetro per cromatografia, con diametro interno 21-23 mm e lunghezza 400 mm, provvista di disco di vetro sinterizzato e di rubinetto.
- 3.4. Provette tarate da 10, 50, 100 e 200 ml.
- 3.5. Matracci da 100 e 250 ml.
- 3.6. Evaporatore rotante.
- 3.7. Provette da centrifuga a fondo conico da 10 ml con tappo smerigliato.
- 3.8. Centrifuga per provette da 10 e 100 ml.
- 3.9. Termostato in grado di mantenere una temperatura di 40 °C + 0,5 °C.
- 3.10. Pipette tarate da 1 e 2 ml.
- 3.11. Siringa ipodermica da 1 ml.
- 3.12. Microsiringa da 100 µl.
- 3.13. Imbutto da 1 000 ml.
- 3.14. Gascromatografo idoneo per il funzionamento con colonna capillare, dotato di dispositivo di iniezione "on column" a freddo per l'introduzione diretta del campione nella colonna e di stufa in grado di mantenere la temperatura desiderata con l'approssimazione di 1 °C.
- 3.15. Iniettore a freddo "on column" per introduzione diretta in colonna.
- 3.16. Rivelatore a ionizzazione di fiamma ed elettrometro.
- 3.17. Registratore-integratore adatto all'elettrometro, con tempo di risposta non superiore a 1 secondo e con velocità della carta variabile.
- 3.18. Colonna capillare in vetro o silice fusa, lunga 8-12 m, diametro interno 0,25-0,32 mm, ricoperta di metilpolisilossano o di fenilmetilpolisilossano al 5 %, di spessore compreso fra 0,10 e 0,30 µm, resistente a una temperatura di 370 °C.
- 3.19. Microsiringa da 10 µl con ago cementato lungo almeno 7,5 cm, per iniezione diretta in colonna.

4. REAGENTI

- 4.1. Gel di silice di granulometria compresa tra 0,063 e 0,200 mm (70/280 mesh), preparato nel modo seguente: mettere il gel di silice in una capsula di porcellana, essiccare nella stufa a 160 °C per 4 ore, quindi lasciar raffreddare a temperatura ambiente in essiccatore. Aggiungere un volume d'acqua equivalente al 5 % del peso del gel di silice, procedendo come segue: in una beuta da 500 ml pesare 152 g di gel di silice e aggiungere 8 g di acqua distillata, tappare e agitare delicatamente per ottenere una ripartizione uniforme dell'acqua. Lasciare a riposo per almeno 12 ore prima dell'uso.
- 4.2. n-esano per cromatografia.
- 4.3. Isopropanolo.
- 4.4. Isopropanolo in soluzione acquosa 1:1 (v/v).
- 4.5. Lipasi pancreatica avente un'attività compresa tra 2,0 e 10 unità di lipasi per mg (*esistono in commercio lipasi pancreatiche con attività compresa tra 2 e 10 unità per mg di enzima*).
- 4.6. Soluzione tampone di tris-idrossimetilamminometano: soluzione acquosa 1 M portata a pH 8 (controllare con il potenziometro) mediante aggiunta di acido cloridrico concentrato (1:1 v/v).
- 4.7. Colato di sodio (qualità enzimatica), soluzione acquosa allo 0,1 % (la soluzione deve essere utilizzata entro i 15 giorni successivi alla preparazione).
- 4.8. Cloruro di calcio, soluzione acquosa al 22 %.
- 4.9. Etere etilico per cromatografia.
- 4.10. Solvente di sviluppo: miscela n-esano/etere etilico (87/13) (v/v).
- 4.11. Idrossido di sodio, soluzione al 12 % in peso.
- 4.12. Fenoltaleina, soluzione etanolica all'1 %.
- 4.13. Gas vettore: idrogeno o elio per gascromatografia.
- 4.14. Gas ausiliari: idrogeno (minimo 99 %), esente da umidità e sostanze organiche, e aria per gascromatografia della stessa purezza.
- 4.15. Reagente di silanizzazione: miscela di piridina-esametildisilazano-trimetilclorosilano 9/3/1 (v/v/v) (Esistono in commercio soluzioni pronte per l'uso. Possono essere utilizzati anche altri reagenti silanizzanti, quali ad esempio il bis-trimetiltrifluoroacetammide + 1 % trimetilclorosilano da diluire con uno stesso volume di piridina anidra).
- 4.16. Campioni di riferimento: monogliceridi puri o miscele di monogliceridi a composizione percentuale nota, simile a quella del campione.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Preparazione del campione

- 5.1.1. Gli oli la cui acidità libera è inferiore al 3 % non devono essere neutralizzati prima della cromatografia su colonna di gel di silice. Gli oli la cui acidità libera è superiore al 3 % devono essere sottoposti a neutralizzazione secondo il procedimento descritto al punto 5.1.1.1.
- 5.1.1.1. Versare nell'imbuto da 1 000 ml (3.13) 50 g di olio e 200 ml di n-esano. Aggiungere 100 ml di isopropanolo e una quantità di soluzione di idrossido di sodio al 12 % (4.11) corrispondente all'acidità libera dell'olio maggiorata del 5 %. Agitare energicamente per un minuto. Aggiungere 100 ml di acqua distillata, agitare nuovamente e lasciare a riposo.

A decantazione avvenuta, eliminare lo strato inferiore contenente i saponi. Eliminare eventuali strati intermedi (mucillagine e sostanze insolubili). Lavare la soluzione esanica dell'olio neutralizzato con porzioni consecutive di 50-60 ml della soluzione di isopropanolo/acqua 1:1 (v/v) (4.4), fino alla scomparsa della colorazione rosea dovuta alla fenoltaleina.

Eliminare la maggior parte dell'esano mediante distillazione sotto vuoto (utilizzando per esempio l'evaporatore rotante) e travasare l'olio in un matraccio da 100 ml (3.5). Essiccare l'olio sotto vuoto fino ad eliminazione completa del solvente.

Ultimata questa operazione, l'acidità dell'olio deve risultare inferiore allo 0,5 %.

- 5.1.2. Introdurre nella beuta da 25 ml (3.1) 1,0 g di olio preparato nel modo sopra indicato e scioglierlo in 10 ml di solvente di sviluppo (4.10). Lasciare a riposo la soluzione per almeno 15 minuti prima di procedere alla cromatografia su colonna di gel di silice.

Se la soluzione è torbida, centrifugarla per garantire condizioni ottimali per la cromatografia. (Si possono utilizzare cartucce di gel di silice SPE da 500 mg pronte per l'uso).

- 5.1.3. *Preparazione della colonna cromatografica*

Versare nella colonna (3.3) circa 30 ml di solvente di sviluppo (4.10); introdurre un batuffolo di cotone nella parte inferiore della colonna con l'ausilio di una bacchetta di vetro; comprimere per far uscire l'aria.

Preparare in un beaker una sospensione di 25 g di gel di silice (4.1) in circa 80 ml di solvente di sviluppo e versarla nella colonna attraverso un imbuto.

Verificare che tutto il gel di silice sia stato immerso nella colonna; lavare con solvente di sviluppo (4.8), aprire il rubinetto e lasciar fluire il liquido fino a circa 2 mm sopra il livello superiore del gel di silice.

- 5.1.4. *Cromatografia su colonna*

Nella beuta da 25 ml (3.1) pesare esattamente 1,0 g di campione preparato secondo il procedimento descritto al punto 5.1.

Sciogliere il campione in 10 ml di solvente di sviluppo (4.10). Versare la soluzione nella colonna cromatografica preparata nel modo indicato al punto 5.1.3. Evitare di agitare la superficie della colonna.

Aprire il rubinetto e lasciar fluire la soluzione campione fino al livello del gel di silice. Sviluppare con 150 ml di solvente di sviluppo. Regolare il flusso a 2 ml/min (in modo che i 150 ml passino attraverso la colonna in 60-70 minuti circa).

Recuperare l'eluato in un matraccio da 250 ml previamente tarato. Far evaporare il solvente sotto vuoto ed eliminarne le ultime tracce con una corrente di azoto.

Pesare il matraccio e calcolare l'estratto raccolto.

[Se si utilizzano cartucce di silice SPE pronte per l'uso, procedere come segue: introdurre 1 ml di soluzione (5.1.2) nelle cartucce previamente preparate con 3 ml di n-esano.

Una volta percolata la soluzione, sviluppare con 4 ml di n-esano/etere etilico 9:1 (v/v).

Recuperare l'eluato in una provetta da 10 ml e sottoporlo a evaporazione in corrente di azoto fino a essiccazione completa.

Sottoporre il residuo secco all'azione della lipasi pancreatica (5.2). È essenziale che la composizione in acidi grassi sia verificata prima e dopo passaggio su cartuccia SPE].

- 5.2. **Idrolisi con lipasi pancreatica**

- 5.2.1. Pesare nella provetta della centrifuga 0,1 g di olio preparato nel modo descritto al punto 5.1. Aggiungere 2 ml di soluzione tampone (4.6), 0,5 ml della soluzione di colato di sodio (4.7) e 0,2 ml della soluzione di cloruro di calcio, agitando bene dopo ogni aggiunta. Chiudere la provetta con il tappo smerigliato e inserirla nel termostato a $40 \pm 0,5$ °C.

- 5.2.2. Aggiungere 20 mg di lipasi, agitare accuratamente (evitando di bagnare il tappo), mettere la provetta nel termostato per esattamente 2 minuti, quindi ritirla, agitare vigorosamente per esattamente 1 minuto e lasciar raffreddare.

- 5.2.3. Aggiungere 1 ml di etere etilico, tappare e agitare vigorosamente, quindi centrifugare e travasare la soluzione in una provetta pulita e asciutta con la microsiringa.

- 5.3. **Preparazione dei derivati silanizzati e della gascromatografia**

- 5.3.1. Introdurre con la microsiringa 100 µl di soluzione (5.2.3) in una provetta da 10 ml a fondo conico.

- 5.3.2. Eliminare il solvente con una leggera corrente di azoto, aggiungere 200 µl di reagente di silanizzazione (4.15), tappare la provetta e lasciare a riposo per 20 minuti.

- 5.3.3. Dopo 20 minuti, aggiungere da 1 a 5 ml di n-esano (in funzione delle condizioni cromatografiche): la soluzione così ottenuta è pronta per la gascromatografia.

5.4. Gascromatografia

Le condizioni operative sono le seguenti:

- temperatura dell'iniettore (iniettore "on column") inferiore alla temperatura di ebollizione del solvente (68 °C),
- temperatura del rivelatore: 350 °C,
- temperatura della colonna: temperatura della stufa programmata a 60 °C per 1 minuto, quindi incrementata di 15 °C al minuto fino a 180 °C, poi di 5 °C al minuto fino a 340 °C e mantenuta a 340 °C per 13 minuti,
- gas vettore: idrogeno o elio regolato alla velocità lineare adeguata per ottenere la risoluzione rappresentata nella figura 1; il tempo di ritenzione del trigliceride C₅₄ deve essere di 40 + 5 minuti (cfr. figura 2). (Le condizioni operative sopra indicate sono proposte a titolo indicativo. L'operatore provvederà ad ottimizzarle per ottenere la risoluzione desiderata. Il picco corrispondente al 2-gliceril monopalmitato deve avere un'altezza minima pari al 10 % della scala del registratore.),
- quantità di sostanza iniettata: 0,5-1 µl della soluzione (5 ml) di n-esano (5.3.3).

5.4.1. Identificazione dei picchi

I singoli monogliceridi sono identificati in base ai tempi di ritenzione, in confronto a quelli ottenuti con miscele standard di monogliceridi analizzate nelle medesime condizioni.

5.4.2. Valutazione quantitativa

L'area dei picchi è calcolata mediante un integratore elettronico.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La percentuale di 2-gliceril monopalmitato è calcolata in base al rapporto tra l'area del picco corrispondente e la somma delle aree dei picchi di tutti i monogliceridi (cfr. figura 2), applicando la seguente formula:

$$\text{gliceril monopalmitato (\%)} = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

in cui:

A_x = area del picco corrispondente al gliceril monopalmitato

ΣA = somma delle aree di tutti i picchi dei monogliceridi.

Il risultato si esprime con una cifra decimale.

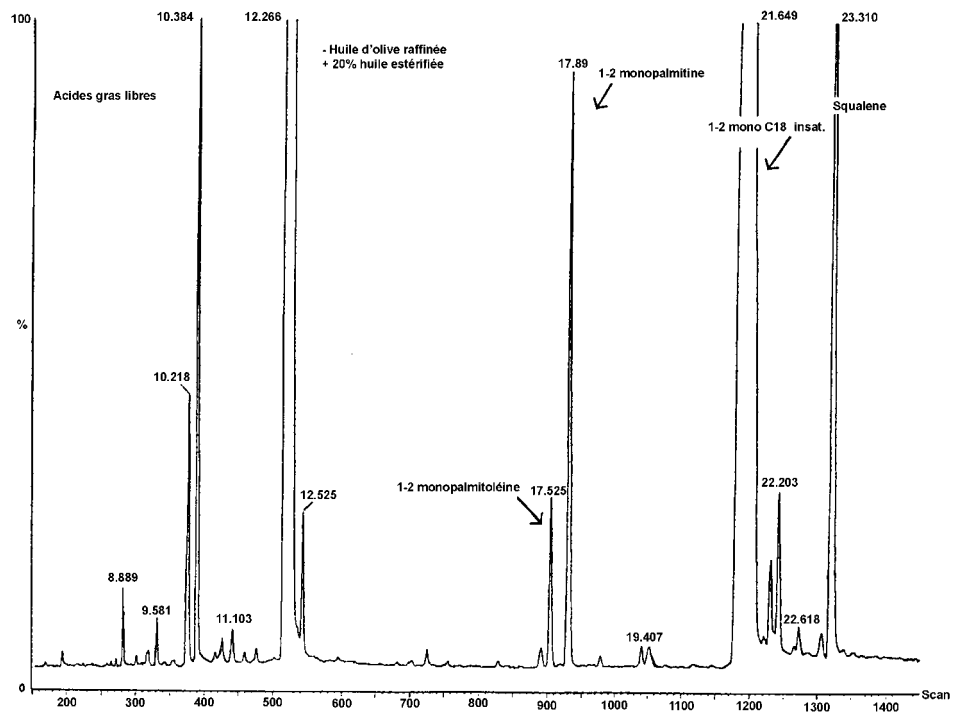
7. RAPPORTO DI ANALISI

Il rapporto di analisi deve recare:

- il riferimento al metodo descritto,
- ogni indicazione utile per la completa identificazione del campione,
- il risultato dell'analisi,
- ogni deviazione dal metodo indicato, sia essa dovuta ad una decisione delle parti interessate o a qualsiasi altro motivo,
- gli estremi per l'identificazione del laboratorio, la data dell'analisi e la firma dei responsabili.

Figura 1

Cromatogramma dei prodotti della reazione di silizzazione ottenuti dall'azione della lipasi su un olio d'oliva raffinato addizionato del 20 % di olio esterificato (100 %).



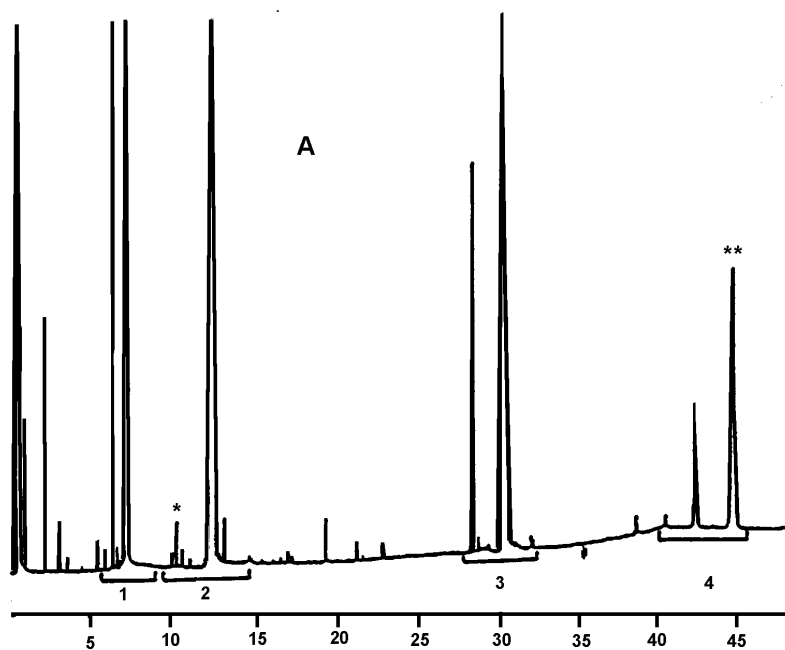
Legenda: "acides gras libres" = acidi grassi liberi; "Huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée" = olio d'oliva raffinato + 20 % olio esterificato; "1-2 monopalmitoléine" = 1-2 monopalmitoleina; "1-2 mono C₁₈ insat." = 1-2 mono C₁₈ insaturi

Figura 2

Cromatogramma di:

(A) olio d'oliva non esterificato dopo lipasi; dopo silanizzazione; in queste condizioni (colonna capillare 8-12 m), la frazione cerosa viene eluita contemporaneamente alla frazione di digliceride o poco dopo.

Dopo lipasi, il tenore di trigliceridi non dovrebbe superare il 15 %.



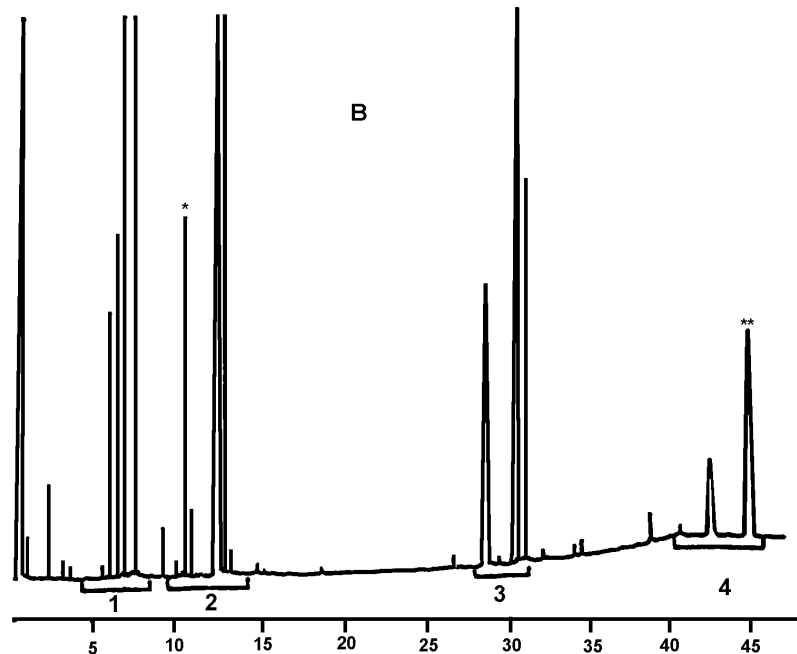
Legenda:

- 1 = Acidi grassi liberi
- 2 = Monogliceridi
- 3 = Digliceridi
- 4 = Trigliceridi
- * = 2-monopalmitina
- ** = Trigliceride C₅₄

Cromatogramma di:

(B) olio esterificato dopo lipasi; dopo silanizzazione; in queste condizioni (colonna capillare 8-12 m), la frazione cerosa viene eluita contemporaneamente alla frazione di digliceride o poco dopo.

Dopo lipasi, il tenore di trigliceridi non dovrebbe superare il 15 %.

*Legenda:*

- 1 = Acidi grassi liberi
- 2 = Monogliceridi
- 3 = Digliceridi
- 4 = Trigliceridi
- * = 2-monopalmitina
- ** = Trigliceride C₅₄

8. NOTE

Nota 1: PREPARAZIONE DELLA LIPASI

Esistono in commercio lipasi con attività soddisfacente. Si possono anche preparare in laboratorio con il seguente procedimento.

Raffreddare 5 kg di pancreas suino fresco a 0 °C. Rimuovere il grasso solido e il tessuto connettivo circostanti e tritare in un mescolatore in modo da ottenere un fluido pastoso. Agitare questa pasta per 4-6 ore con 2,5 l di acetone anidro e centrifugare. Estrarre il residuo altre tre volte con lo stesso volume di acetone, poi due volte con una miscela 1:1 (v/v) di acetone e di etere etilico e due volte con etere etilico.

Essiccare il residuo sotto vuoto per 48 ore in modo da ottenere una polvere stabile, da conservare in frigorifero al riparo dall'umidità.

Nota 2: CONTROLLO DELL'ATTIVITÀ LIPASICA

Preparare un'emulsione di olio d'oliva nel modo seguente:

Agitare per 10 minuti in un mescolatore una miscela di 165 ml di soluzione di gomma arabica a 100g/l, 15 g di ghiaccio tritato e 20 ml di un olio d'oliva neutralizzato.

In un beaker da 50 ml versare 10 ml di questa emulsione, quindi 0,3 ml di soluzione di colato di sodio a 0,2 g/ml e 20 ml di acqua distillata.

Mettere il beaker in un termostato regolato a 37 °C; introdurre gli elettrodi del pHmetro e l'agitatore ad elica.

Mediante una buretta aggiungere goccia a goccia una soluzione di idrossido di sodio 0,1 N fino ad ottenere un pH 8,3.

Aggiungere un volume di soluzione acquosa di polvere di lipasi (0,1 g/ml di lipasi). Non appena il pHmetro indica un pH 8,3, avviare il cronometro e aggiungere goccia a goccia la soluzione di idrossido di sodio in modo da mantenere il pH a 8,3. Annotare il volume di soluzione consumato ogni minuto.

Riportare i dati in un diagramma indicando le letture di tempo nelle ascisse e i millilitri di soluzione alcalina 0,1 N consumati per mantenere costante il pH nelle ordinate. Si deve ottenere un grafico lineare.

L'attività della lipasi, misurata in unità di lipasi per mg, è data dalla formula seguente:

$$A = \frac{V \times N \times 100}{m}$$

in cui:

A è l'attività in unità di lipasi/mg

V è il numero di ml di soluzione di idrossido di sodio 0,1 N/min, desunto dal diagramma

N è la normalità della soluzione di idrossido di sodio

m è la massa in mg della lipasi utilizzata per la prova.

L'unità di lipasi è definita come la quantità di enzima che libera 10 microequivalenti di acido al minuto.»

7) Nell'allegato X.A, il punto 6.2 è sostituito dal seguente:

«6.2. Gli esteri metilici vengono preparati con il procedimento B descritto nell'allegato X.B. Le sostanze grasse con acidità libera superiore al 3 % devono essere previamente neutralizzate come indicato al punto 5.1.1 dell'allegato VII.»
