

REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2019/1604 DELLA COMMISSIONE**del 27 settembre 2019****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 EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (UE) n. 1308/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 17 dicembre 2013, recante organizzazione comune dei mercati dei prodotti agricoli e che abroga i regolamenti (CEE) n. 922/72, (CEE) n. 234/79, (CE) n. 1037/2001 e (CE) n. 1234/2007 del Consiglio ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 91, primo comma, lettera d),

considerando quanto segue:

- (1) Il regolamento (CEE) n. 2568/91 della Commissione ⁽²⁾ definisce le caratteristiche fisico-chimiche e organolettiche degli oli di oliva e degli oli di sansa di oliva e stabilisce i metodi di valutazione di tali caratteristiche.
- (2) I metodi e i valori limite relativi alle caratteristiche degli oli vengono aggiornati periodicamente in base al parere degli esperti nel settore chimico e conformemente all'attività svolta in sede di Consiglio oleicolo internazionale (COI).
- (3) Per garantire l'applicazione a livello dell'Unione delle più recenti norme internazionali stabilite dal COI, è opportuno aggiornare taluni metodi di analisi stabiliti nel regolamento (CEE) n. 2568/91.
- (4) La norma commerciale del COI è stata modificata per quanto riguarda l'espressione del limite dell'acidità libera, l'indice di perossidi, la valutazione organolettica (mediana del difetto e mediana del fruttato) e la differenza tra ECN42 (HPLC) e ECN42 (calcolo teorico) a fini di coerenza con i margini di precisione del metodo analitico.
- (5) A norma dell'articolo 2 bis, paragrafo 5, del regolamento (CEE) n. 2568/91, gli Stati membri devono verificare se un campione di olio di oliva è conforme alla categoria dichiarata controllando le caratteristiche di cui all'allegato I del medesimo regolamento in un ordine qualsiasi oppure nell'ordine previsto da uno degli schemi decisionali di cui all'allegato I ter dello stesso regolamento.
- (6) Alla luce dei recenti sviluppi è opportuno aggiornare le tabelle dell'allegato I ter del regolamento (CEE) n. 2568/91 e la relativa appendice. Inoltre, il termine «diagramma di flusso» risulta più appropriato di «schema decisionale», visto il contenuto del citato allegato I ter.
- (7) Il punto 9.4 dell'allegato XII del regolamento (CEE) n. 2568/91 definisce la mediana dei difetti come la mediana del difetto percepito con l'intensità più alta. Nell'ambito delle controanalisi e dato che la conformità dell'olio deve essere valutata da più panel, è opportuno chiarire che la decisione relativa alla conformità delle caratteristiche di un olio alla categoria dichiarata è legata soltanto al valore della mediana del difetto principale, a prescindere dalla sua natura.
- (8) È quindi opportuno modificare di conseguenza il regolamento (CEE) n. 2568/91.
- (9) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del comitato per l'organizzazione comune dei mercati agricoli,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

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

- (1) l'articolo 2 è così modificato:
 - a) al paragrafo 1, la lettera l) è sostituita dalla seguente:
 - «l) per la determinazione della composizione e del contenuto di steroli e per la determinazione dei composti alcolici mediante gascromatografia con colonna capillare, il metodo di cui all'allegato XIX»;

⁽¹⁾ GUL 347 del 20.12.2013, pag. 671.

⁽²⁾ 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 (GUL 248 del 5.9.1991, pag. 1).

b) al paragrafo 2, il terzo comma è sostituito dal seguente:

«Qualora il panel non confermi la categoria dichiarata, sotto il profilo delle sue caratteristiche organolettiche, a richiesta dell'interessato le autorità nazionali o i loro rappresentanti incaricano altri panel riconosciuti di effettuare quanto prima due controanalisi. Almeno uno dei panel è un panel riconosciuto dallo Stato membro di produzione dell'olio. Le caratteristiche in questione sono considerate conformi a quelle dichiarate se le due controanalisi confermano la classificazione dichiarata. In caso contrario, a prescindere dal tipo di difetti constatati durante le controanalisi, la classificazione è dichiarata incoerente con le caratteristiche e il costo delle controanalisi è a carico dell'interessato.»;

(2) all'articolo 2 bis, paragrafo 5, la lettera b) è sostituita dalla seguente:

«b) nell'ordine previsto dal diagramma di flusso di cui all'allegato I ter, fino a raggiungere una delle decisioni figuranti nel suddetto diagramma.»;

(3) la tabella «ALLEGATI Sommario» è sostituita dalla tabella dell'allegato I del presente regolamento;

(4) l'allegato I è sostituito dal testo dell'allegato II del presente regolamento;

(5) all'allegato I bis, il punto 2.1 è sostituito dal seguente:

«2.1. Ciascun campione elementare deve essere suddiviso in campioni di laboratorio, conformemente al punto 2.5 della norma EN ISO 5555, e sottoposto alle analisi nell'ordine indicato nel diagramma di flusso di cui all'allegato I ter o in qualunque altro ordine casuale.»;

(6) l'allegato I ter è sostituito dal testo dell'allegato III del presente regolamento;

(7) l'allegato V è soppresso;

(8) all'allegato VII, il punto 4.2 è sostituito dal seguente:

«4.2. n-esano (qualità per cromatografia). L'esano può essere sostituito da isoottano (2,2,4 trimetilpentano di qualità per cromatografia), a condizione che vengano raggiunti margini di precisione comparabili.»;

(9) l'allegato XII è modificato in conformità all'allegato IV del presente regolamento;

(10) l'allegato XVII è modificato in conformità all'allegato V del presente regolamento;

(11) l'allegato XVIII è modificato in conformità all'allegato VI del presente regolamento;

(12) l'allegato XIX è sostituito dal testo dell'allegato VII del presente regolamento;

(13) all'allegato XX, il punto 4.2 è sostituito dal seguente:

«4.2. n-esano per cromatografia o analisi dei residui. L'esano può essere sostituito da isoottano (2,2,4 trimetilpentano di qualità per cromatografia), a condizione che vengano raggiunti margini di precisione comparabili. I solventi con punto di ebollizione superiore a quello dell'n-esano hanno tempi di evaporazione più lunghi. Tuttavia, vengono preferiti a causa della tossicità dell'esano. Verificare la purezza, ad esempio controllando il residuo d'evaporazione di 100 ml di solvente.»

AVVERTENZA: i vapori possono incendiarsi. Tenere lontano da sorgenti di calore, scintille o fiamme libere. Tenere i contenitori ben chiusi. Usare con ventilazione adeguata. Evitare l'accumulo di vapori ed eliminare ogni possibile causa di incendio, quali riscaldatori o apparecchi elettrici non antideflagranti. Nocivo per inalazione: può causare danni alle cellule del sistema nervoso. Evitare di respirare i vapori, usare se necessario un apparecchio respiratorio adatto. Evitare il contatto con gli occhi e la pelle.

L'isoottano è un liquido infiammabile che presenta un rischio di incendio. I limiti di esplosività nell'aria sono compresi tra 1,1 % e 6,0 % (frazione volumetrica). È tossico per ingestione e per inalazione. Utilizzare una cappa ventilata in buone condizioni di funzionamento per lavorare con questo solvente.»

Articolo 2

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

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

Fatto a Bruxelles, il 27 settembre 2019

Per la Commissione
Il presidente
Jean-Claude JUNCKER

ALLEGATO I

«ALLEGATI

SOMMARIO

Allegato I	Caratteristiche degli oli di oliva
Allegato I bis	Campionatura delle partite di olio di oliva o di olio di sansa di oliva consegnate in imballaggi immediati
Allegato I ter	Diagramma di flusso per la verifica della conformità di un campione di olio di oliva alla categoria dichiarata
Allegato II	Determinazione degli acidi grassi liberi, metodo a freddo
Allegato III	Determinazione dell'indice di perossidi
Allegato IV	Determinazione del contenuto di cere mediante gascromatografia con colonna capillare
Allegato VII	Determinazione della percentuale di 2-gliceril monopalmitato
Allegato IX	Analisi spettrofotometrica nell'ultravioletto
Allegato X	Determinazione degli esteri metilici degli acidi grassi mediante gascromatografia
Allegato XI	Determinazione del tenore dei solventi alogenati nell'olio di oliva
Allegato XII	Metodo del consiglio oleicolo internazionale per la valutazione organolettica degli oli di oliva vergini
Allegato XV	Metodo di determinazione del tenore in olio di oliva delle sanse
Allegato XVI	Determinazione del numero di iodio
Allegato XVII	Metodo di determinazione degli stigmastadieni negli oli vegetali
Allegato XVIII	Determinazione della differenza tra il contenuto effettivo e il contenuto teorico di triacilgliceroli con ECN 42
Allegato XIX	Determinazione della composizione e del contenuto di steroli e del contenuto di composti alcolici mediante gascromatografia con colonna capillare
Allegato XX	Metodo per la determinazione del contenuto di cere e metil ed etil esteri degli acidi grassi mediante gascromatografia con colonna capillare
Allegato XXI	Risultati dei controlli di conformità eseguiti sugli oli di oliva di cui al paragrafo 2 dell'articolo 8»

CARATTERISTICHE DEGLI OLI DI OLIVA

Caratteristiche di qualità

Categoria	Acidità (%) (*)	Indice di perossidi (mEq O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₆₈ o K ₂₇₀	Delta-K	Valutazione organolettica		Esteri etilici di acidi grassi (mg/kg)
						Mediana del difetto (Md) (*)	Mediana del fruttato (Mf)	
1. Olio extra vergine di oliva	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Olio di oliva vergine	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Olio di oliva lampante	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 ⁽¹⁾	—	—
4. Olio di oliva raffinato	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Olio di oliva composto di oli di oliva raffinati e di oli di oliva vergini	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Olio di sansa di oliva greggio	—	—	—	—	—		—	—
7. Olio di sansa di oliva raffinato	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Olio di sansa di oliva	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

⁽¹⁾ La mediana del difetto può essere inferiore o pari a 3,5 quando la mediana del fruttato è pari a 0,0.

Caratteristiche di purezza

Categoria	Composizione in acidi grassi ⁽¹⁾						Somma degli isomeri transoleici (%)	Somma degli isomeri translinoleici + translinolenici (%)	Stigmastadieni (mg/kg) ⁽²⁾	Differenza: ECN42 (HPLC) e ECN42 (calcolo teorico)	2-gliceril monopalmitato (%)
	Miristico (%)	Linolenico (%)	Arachidico (%)	Eicosenoico (%)	Beenico (%)	Lignocericico (%)					
1. Olio extra vergine di oliva	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14,00
											≤ 1,0 se % acido palmitico totale > 14,00
2. Olio di oliva vergine	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14,00
											≤ 1,0 se % acido palmitico totale > 14,00
3. Olio di oliva lampante	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14,00
											≤ 1,1 se % acido palmitico totale > 14,00
4. Olio di oliva raffinato	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14,00
											≤ 1,1 se % acido palmitico totale > 14,00
5. Olio di oliva composto di oli di oliva raffinati e di oli di oliva vergini	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14,00
											≤ 1,0 se % acido palmitico totale > 14,00
6. Olio di sansa di oliva greggio	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ 0,60	≤ 1,4
7. Olio di sansa di oliva raffinato	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,4
8. Olio di sansa di oliva	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,2

⁽¹⁾ Tenore di altri acidi grassi (%): palmitico: 7,50-20,00; palmitoleico: 0,30-3,50; eptadecanoico: ≤ 0,40; eptadecenoico: ≤ 0,60; stearico: 0,50-5,00; oleico: 55,00- 83,00; linoleico: 2,50-21,00.

⁽²⁾ Somma degli isomeri che potrebbero (o non potrebbero) essere separati mediante colonna capillare.

Categoria	Composizione in steroli						Steroli totali (mg/kg)	Eritrodiolo e uvaolo (%) (**)	Cere (mg/kg) (**)
	Colesterolo (%)	Brassicasterolo (%)	Campesterolo ⁽¹⁾ (%)	Stigmasterolo (%)	β-sitosterolo apparente ⁽²⁾ (%)	Delta-7-stigmasterolo ⁽¹⁾ (%)			
1. Olio extra vergine di oliva	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Olio di oliva vergine	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Olio di oliva lampante	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 300$ ⁽³⁾
4. Olio di oliva raffinato	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
5. Olio di oliva composto di oli di oliva raffinati e di oli di oliva vergini	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Olio di sansa di oliva greggio	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ ⁽⁴⁾
7. Olio di sansa di oliva raffinato	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Olio di sansa di oliva	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

⁽¹⁾ Si veda l'appendice al presente allegato.

⁽²⁾ β-sitosterolo apparente: Delta-5,23-stigmastadienolo+clerosterolo+beta-sitosterolo+sitostanolo+delta-5-avenasterolo+delta-5,24-stigmastadienolo.

⁽³⁾ Gli oli con un tenore di cere compreso fra 300 mg/kg e 350 mg/kg sono considerati oli di oliva lampanti se gli alcoli alifatici totali sono inferiori o pari a 350 mg/kg o se la percentuale di eritrodiolo e uvaolo è inferiore o pari a 3,5 %.

⁽⁴⁾ Gli oli con un tenore di cere 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 %.

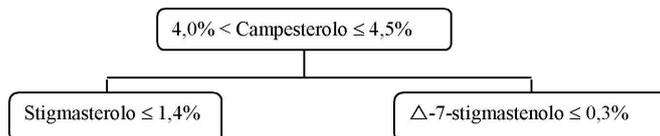
Note:

- 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.
- È sufficiente che una sola caratteristica non corrisponda ai valori indicati perché l'olio venga cambiato di categoria o dichiarato non conforme ai fini del presente regolamento.
- Per l'olio di oliva lampante, entrambe le caratteristiche di qualità contrassegnate da un asterisco (*) possono simultaneamente non rispettare i valori limite stabiliti per tale categoria.
- Le caratteristiche contrassegnate con due asterischi (**) implicano che per l'olio di sansa di oliva greggio entrambi i corrispondenti valori limite possono non essere rispettati simultaneamente. Per l'olio di sansa di oliva e l'olio di sansa di oliva raffinato, uno dei corrispondenti valori limite può non essere rispettato.

Appendice

Schema decisionale

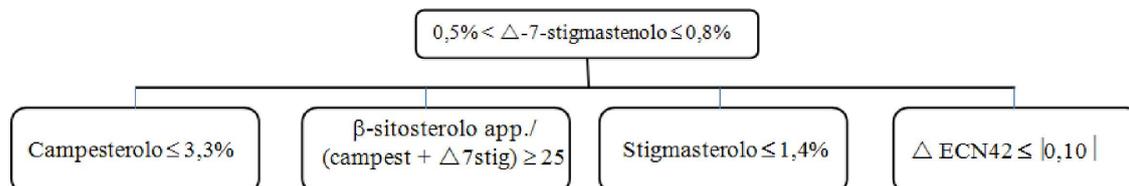
Schema decisionale per il **campesterolo** nell'olio di oliva vergine e nell'olio extra vergine di oliva.



Gli altri parametri devono rispettare i limiti fissati dal presente regolamento.

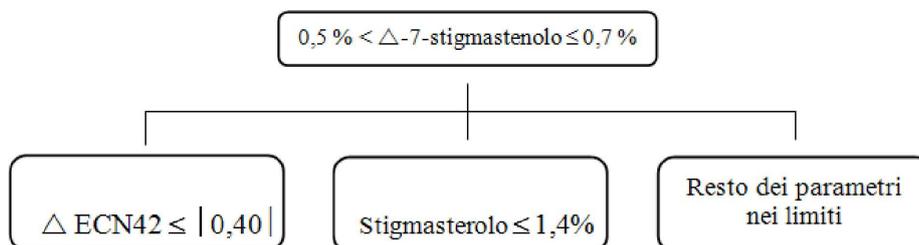
Schema decisionale per il **Delta-7-stigmasterolo**.

— Nell'olio di oliva vergine e nell'olio extra vergine di oliva



Gli altri parametri devono rispettare i limiti fissati dal presente regolamento.

— Negli oli di sansa di oliva (greggi e raffinati)



Gli altri parametri devono rispettare i limiti fissati dal presente regolamento.»

ALLEGATO III

«ALLEGATO I ter

DIAGRAMMA DI FLUSSO PER LA VERIFICA DELLA CONFORMITÀ DI UN CAMPIONE DI OLIO DI OLIVA
ALLA CATEGORIA DICHIARATA

Tabella generale

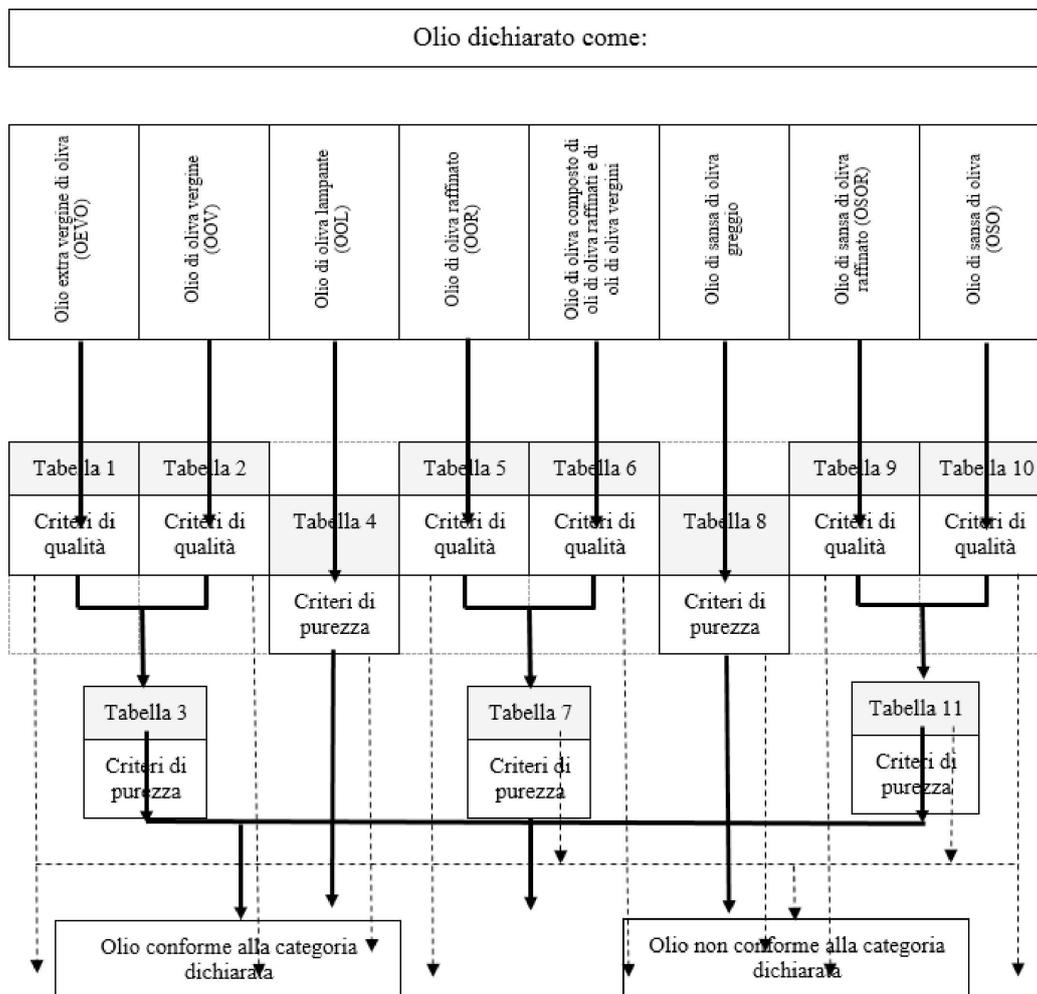


Tabella 1 – Olio extra vergine di oliva – Criteri di qualità

1	Acidità %	$\leq 0,80$	$> 0,80$	Olio non conforme alla categoria dichiarata	V. OOV (Tabella 2)
2	Indice di perossidi (mEq O ₂ /kg)	$\leq 20,0$	$> 20,0$		V. OOL (Tabella 4)
3	Spettrofotometria UV (K 270268)	$\leq 0,22$	$> 0,22$		V. OOV (Tabella 2)
4	Spettrofotometria UV (ΔK)	$\leq 0,01$	$> 0,01$		V. OOL (Tabella 4)
5	Spettrofotometria UV (K 132)	$\leq 2,50$	$> 2,50$		V. OOV (Tabella 2)
6	Valutazione organolettica	Mediana del fruttato $> 0,0$ • Mediana del difetto = 0,0	Mediana del fruttato = 0,0		V. OOL (Tabella 4)
			Mediana del fruttato $> 0,0$ • Mediana del difetto $> 0,0$		V. OOV (Tabella 2)
7	Etil esteri degli acidi grassi (mg/kg)	≤ 35	> 35	V. OOV (Tabella 2)	

↓

Olio conforme a quanto dichiarato riguardo ai criteri di qualità

Andare alla Tabella 3 (criteri di purezza)

Tabella 2 – Olio di oliva vergine – Criteri di qualità

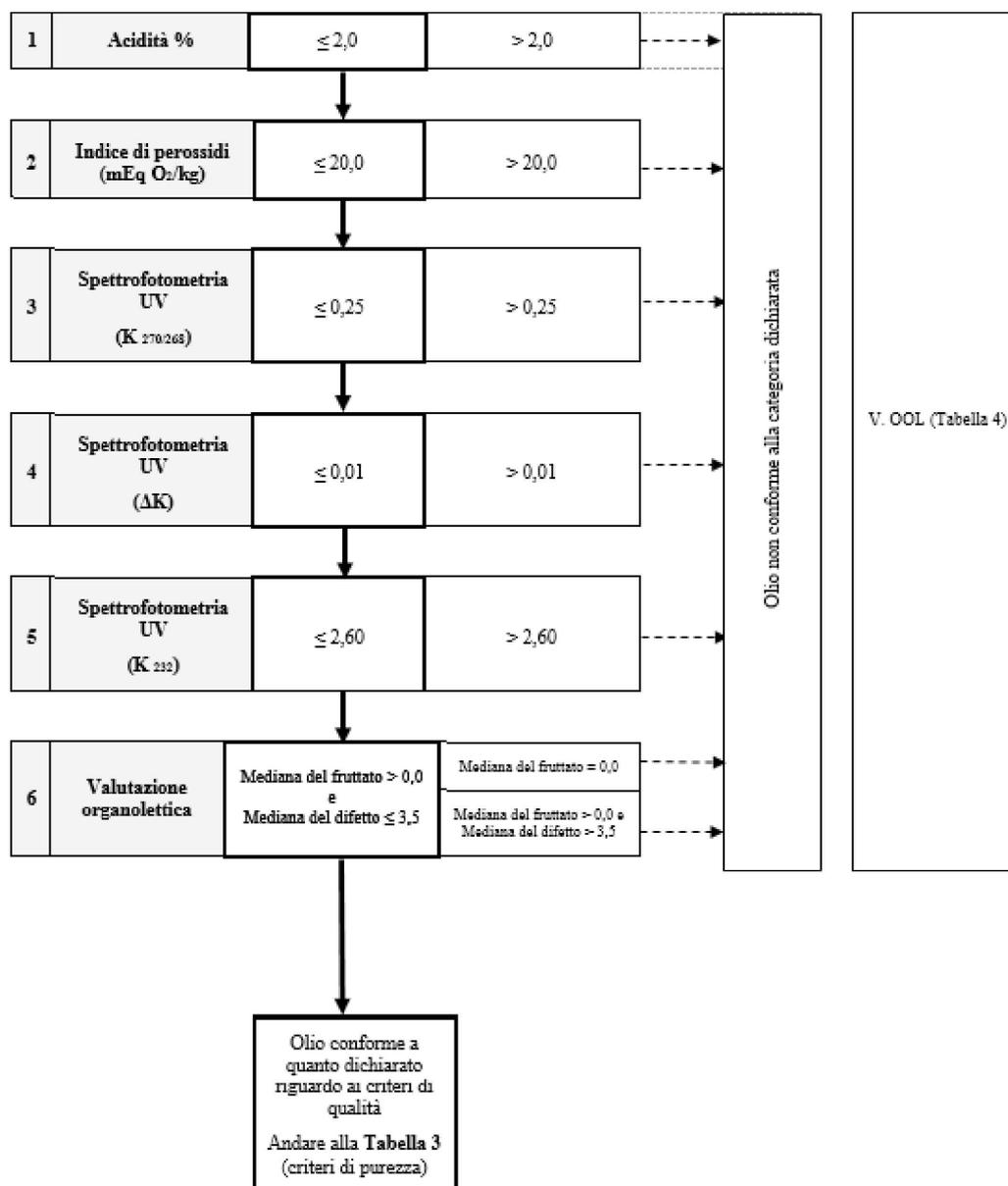


Tabella 3 – Olio extra vergine di oliva e olio di oliva vergine – Criteri di purezza

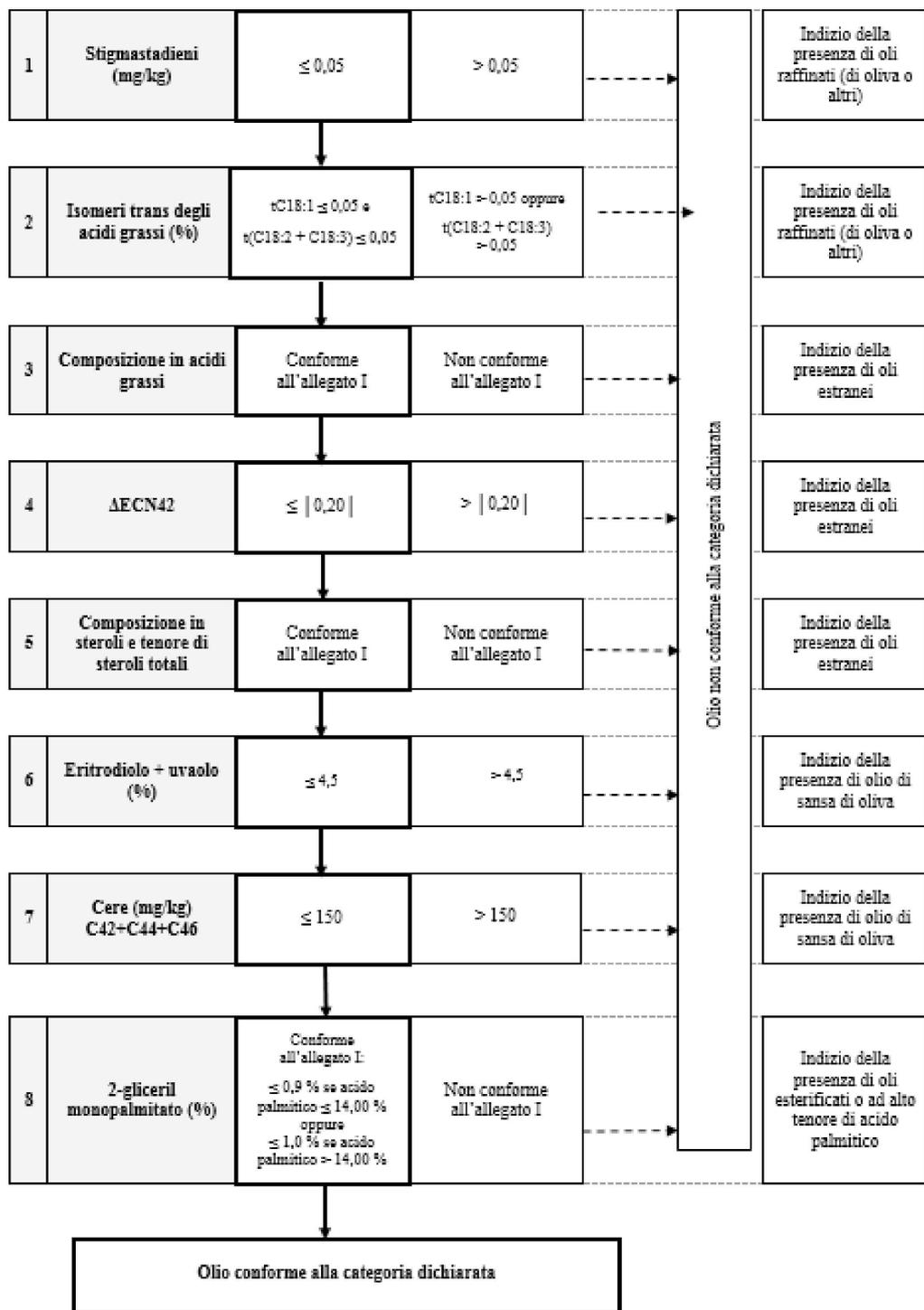


Tabella 4 – Olio di oliva lampante – Criteri di qualità

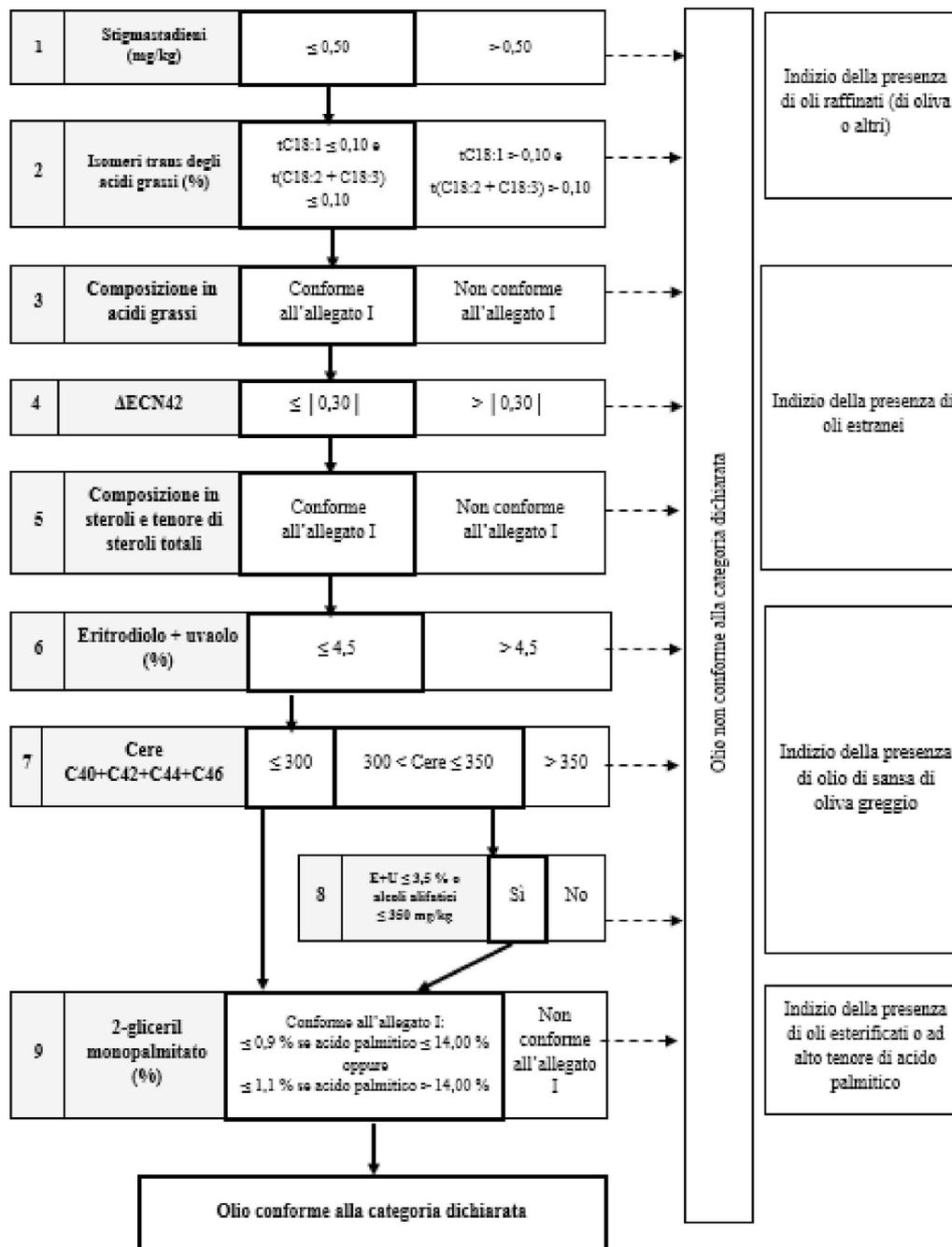


Tabella 5 – Olio di oliva raffinato – Criteri di qualità

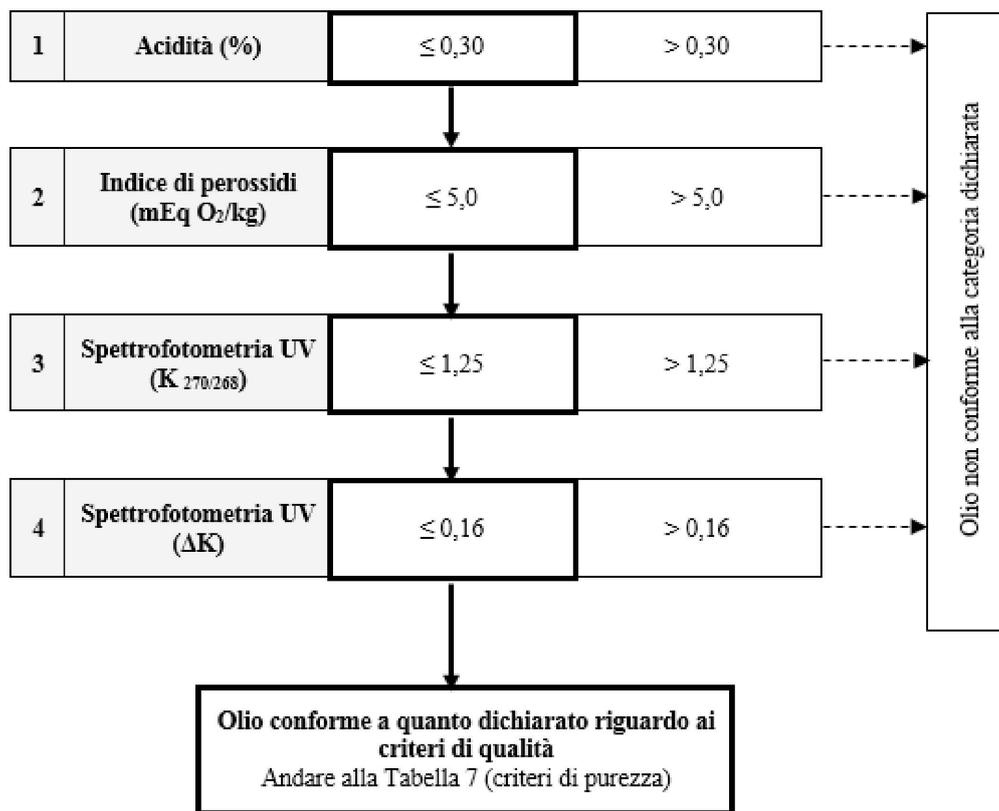


Tabella 6 – Olio di oliva (composto di oli di oliva raffinati e di oli di oliva vergini) – Criteri di qualità

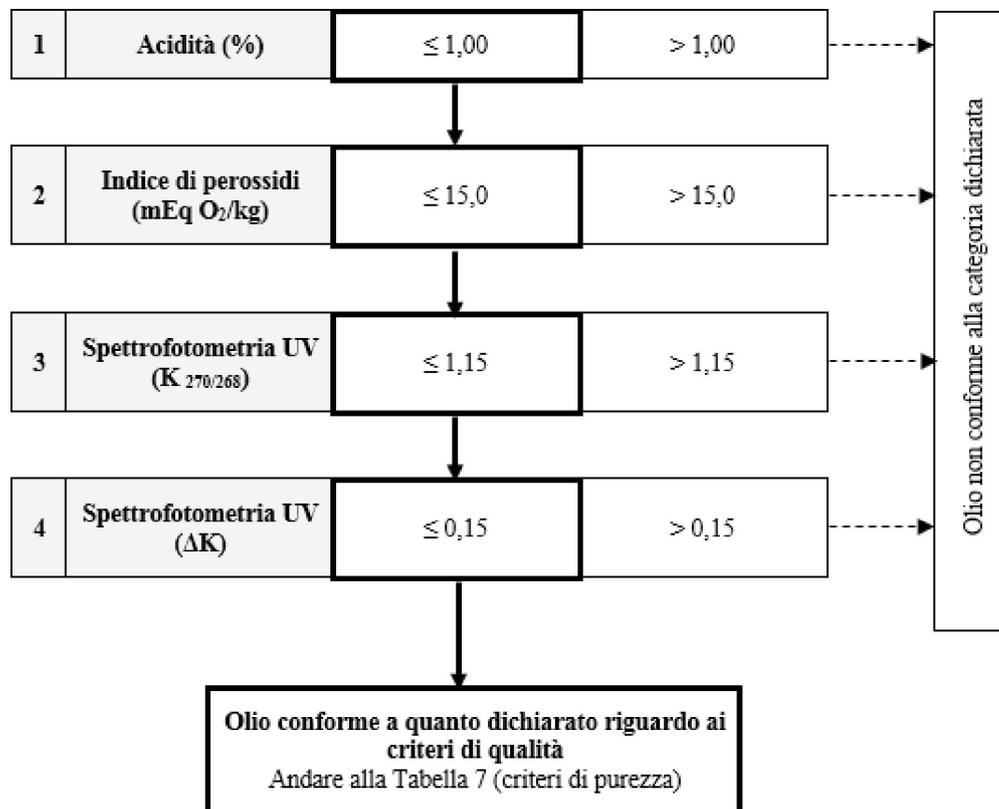


Tabella 7 – Olio di oliva raffinato e olio di oliva composto di oli di oliva raffinati e di oli di oliva vergini – Criteri di purezza

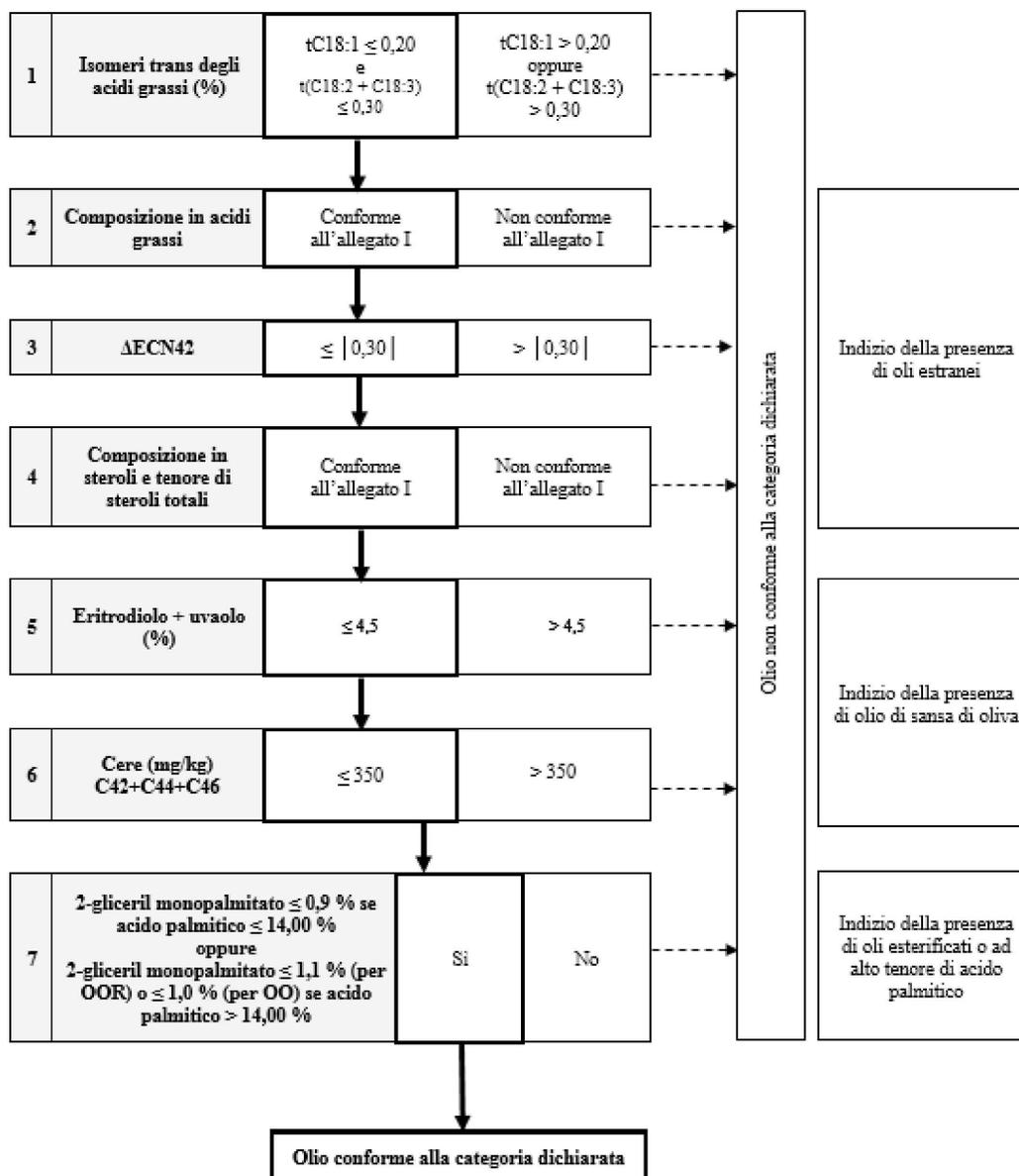


Tabella 8 – Olio di sansa di oliva – Criteri di purezza

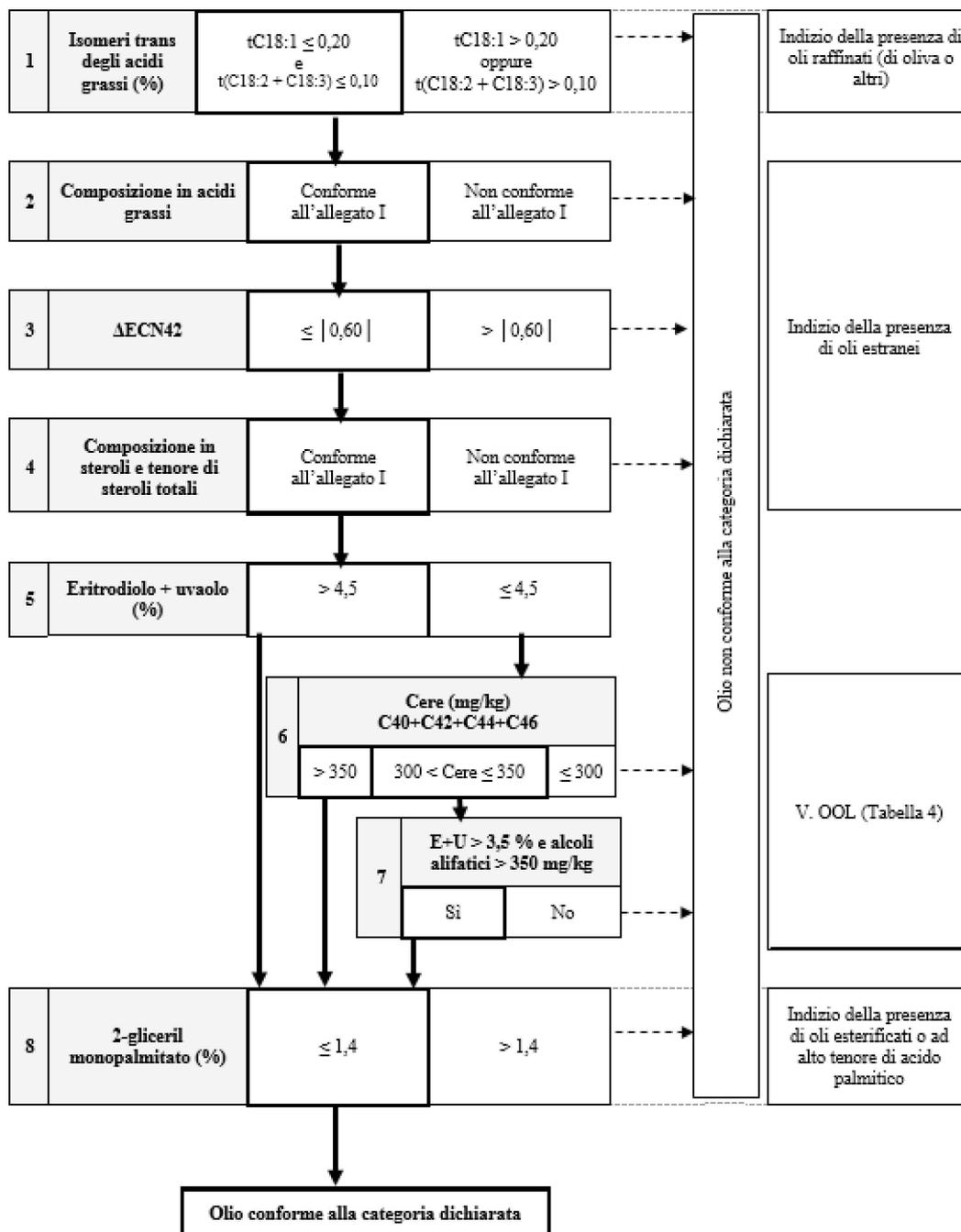


Tabella 9 – Olio di sansa di oliva raffinato – Criteri di qualità

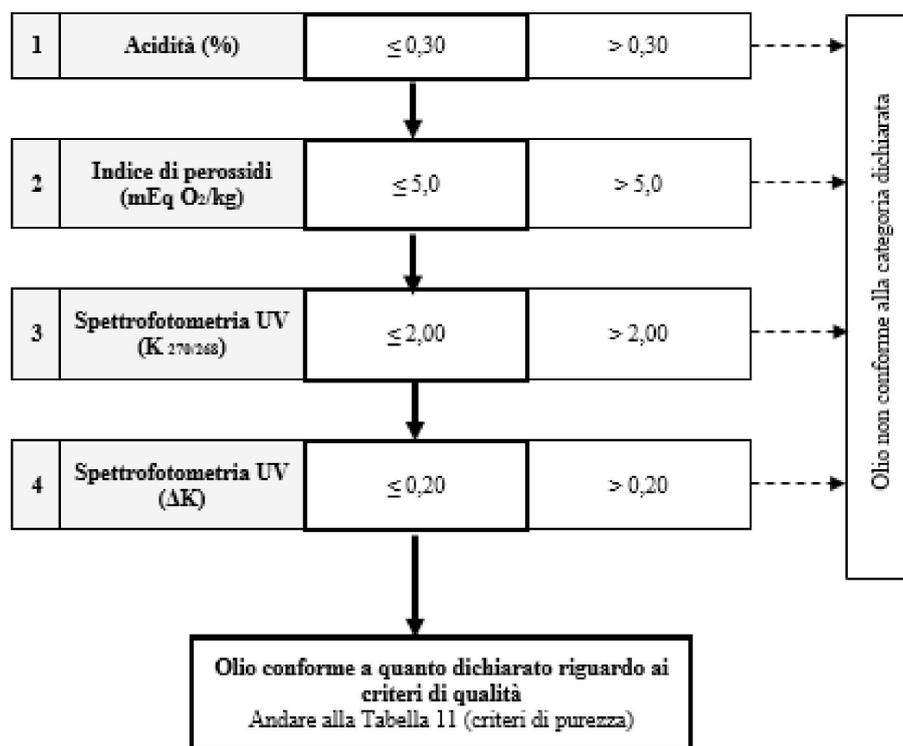
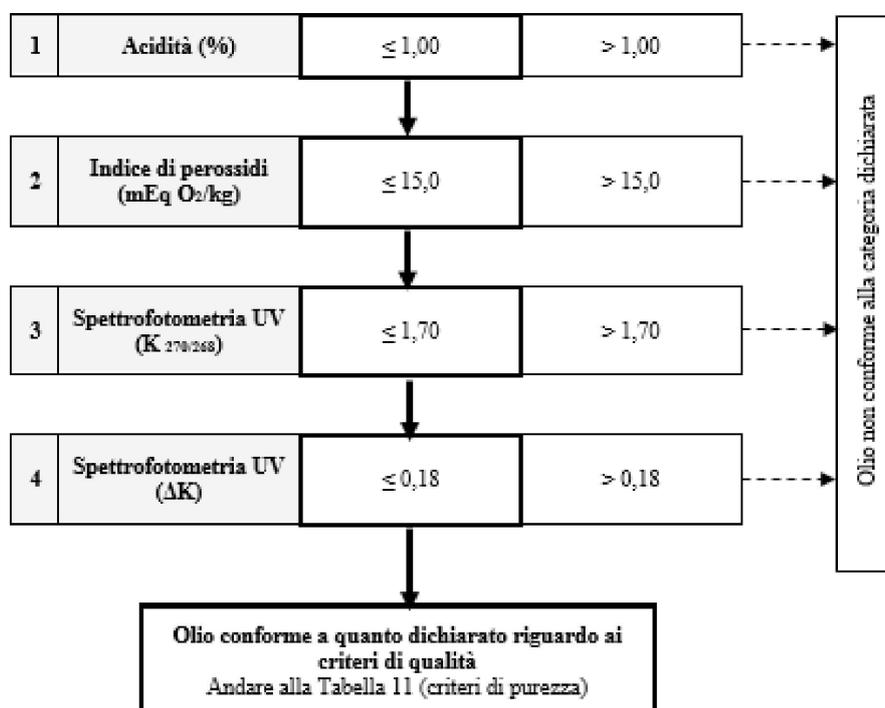


Tabella 10 – Olio di sansa di oliva – Criteri di qualità



ALLEGATO IV

L'allegato XII è così modificato:

1) il punto 3.3 è sostituito dal seguente:

«3.3. **Terminologia facoltativa ai fini dell'etichettatura**

Su richiesta, il capo panel può certificare che gli oli valutati corrispondono alle definizioni e agli intervalli relativi esclusivamente alle diciture di seguito elencate, in funzione dell'intensità e della percezione degli attributi.

Attributi positivi (fruttato, amaro e piccante): in funzione dell'intensità della percezione:

- *intenso*, quando la mediana dell'attributo è superiore a 6,0;
- *medio*, quando la mediana dell'attributo è superiore a 3,0 e inferiore o pari a 6,0;
- *leggero*, quando la mediana dell'attributo è inferiore o pari a 3,0.

<i>Fruttato</i>	Insieme delle sensazioni olfattive, che dipendono dalla varietà delle olive, caratteristiche dell'olio ottenuto da frutti sani e freschi senza predominanza del fruttato verde o del fruttato maturo, percepite per via diretta e/o retronasale.
<i>Fruttato verde</i>	Insieme delle sensazioni olfattive che ricordano i frutti verdi, dipendono dalla varietà delle olive e sono caratteristiche dell'olio ottenuto da frutti verdi, sani e freschi, percepite per via diretta e/o retronasale.
<i>Fruttato maturo</i>	Insieme delle sensazioni olfattive che ricordano i frutti maturi, dipendono dalla varietà delle olive e sono caratteristiche dell'olio ottenuto da frutti sani e freschi, percepite per via diretta e/o retronasale.
<i>Equilibrato</i>	Olio che non presenta squilibrio. Per squilibrio si intende la sensazione olfatto-gustativa e tattile dell'olio in cui la mediana dell'attributo amaro e quella dell'attributo piccante non superano di più di 2,0 punti la mediana del fruttato.
<i>Olio dolce</i>	Olio in cui la mediana dell'attributo amaro e quella dell'attributo piccante sono inferiori o uguali a 2,0.

Elenco delle diciture in funzione dell'intensità della percezione:

Diciture soggette alla presentazione di un certificato delle prove organolettiche	Mediana dell'attributo
Fruttato	—
Fruttato maturo	—
Fruttato verde	—
Fruttato leggero	$\leq 3,0$
Fruttato medio	$3,0 < Me \leq 6,0$
Fruttato intenso	$> 6,0$
Fruttato maturo leggero	$\leq 3,0$
Fruttato maturo medio	$3,0 < Me \leq 6,0$
Fruttato maturo intenso	$> 6,0$
Fruttato verde leggero	$\leq 3,0$
Fruttato verde medio	$3,0 < Me \leq 6,0$
Fruttato verde intenso	$> 6,0$

Diciture soggette alla presentazione di un certificato delle prove organolettiche	Mediana dell'attributo
Amaro leggero	$\leq 3,0$
Amaro medio	$3,0 < Me \leq 6,0$
Amaro intenso	$> 6,0$
Piccante leggero	$\leq 3,0$
Piccante medio	$3,0 < Me \leq 6,0$
Piccante intenso	$> 6,0$
Olio equilibrato	La mediana dell'attributo amaro e quella dell'attributo piccante non superano di più di 2,0 punti la mediana del fruttato.
Olio dolce	La mediana dell'attributo amaro e quella dell'attributo piccante sono inferiori o uguali a 2,0.»

(2) il punto 9.4 è sostituito dal seguente:

«9.4. Classificazione dell'olio di oliva

L'olio è classificato nelle categorie sotto riportate in funzione della mediana dei difetti e della mediana dell'attributo fruttato. Per mediana dei difetti si intende la mediana del difetto percepito con l'intensità più alta. La mediana dei difetti e la mediana del fruttato sono espresse con una sola cifra decimale.

La classificazione dell'olio avviene confrontando il valore della mediana dei difetti e della mediana del fruttato con gli intervalli di riferimento indicati di seguito. Poiché i limiti di questi intervalli sono stati stabiliti tenendo conto del margine di errore del metodo, sono considerati assoluti. I programmi informatici consentono di visualizzare la classificazione su una tabella di dati statistici o un grafico.

- a) Olio extravergine di oliva: la mediana dei difetti è pari a 0,0 e la mediana del fruttato è superiore a 0,0;
- b) olio di oliva vergine: la mediana dei difetti è superiore a 0,0 e inferiore o pari a 3,5 e la mediana del fruttato è superiore a 0,0;
- c) olio di oliva vergine lampante: la mediana dei difetti è superiore a 3,5 oppure la mediana dei difetti è inferiore o pari a 3,5 e la mediana del fruttato è pari a 0,0.

Nota 1: quando la mediana dell'amaro e/o piccante è superiore a 5,0 il capo panel lo segnalerà nel certificato di analisi dell'olio.

Per le analisi eseguite ai fini del controllo di conformità, si effettua un'unica prova. Nel caso di analisi contraddittorie dev'essere effettuata l'analisi in doppio in sessioni di assaggio distinte. I risultati dell'analisi in doppio devono essere statisticamente omogenei. (Cfr. punto 9.5.) In caso negativo, il campione deve essere analizzato ancora due volte. Il valore finale della mediana degli attributi di classificazione sarà calcolato sulla base della media di entrambe le mediane.»

ALLEGATO V

L'allegato XVII è così modificato:

(1) il punto 5.1 è sostituito dal seguente:

«5.1. Esano o miscela di alcani con intervallo di ebollizione a 65-70 °C, distillato su colonna di rettificazione. L'esano può essere sostituito da isoottano (2,2,4 trimetilpentano di qualità per cromatografia), a condizione che vengano raggiunti margini di precisione comparabili. Può essere controllato il residuo d'evaporazione di 100 ml di solvente. I solventi con punto di ebollizione superiore a quello dell'n-esano hanno tempi di evaporazione più lunghi. Tuttavia, vengono preferiti a causa della tossicità dell'esano.»;

(2) al punto 6.3.3, è aggiunto il seguente testo:

«Nota 10. Quando gli stigmastadieni appaiono in concentrazioni superiori a 4 mg/kg, se ne è richiesta la quantificazione, deve essere applicato il metodo del Consiglio oleicolo internazionale per la determinazione degli stereni negli oli raffinati.»

—

ALLEGATO VI

L'allegato XVIII è così modificato:

(1) il punto 4.2.1 è sostituito dal seguente:

«4.2.1. Etere di petrolio 40-60 °C, qualità per cromatografia o esano. L'esano può essere sostituito da isoottano (2,2,4 trimetilpentano di qualità per cromatografia), a condizione che vengano raggiunti margini di precisione comparabili. I solventi con punto di ebollizione superiore a quello dell'n-esano hanno tempi di evaporazione più lunghi. Tuttavia, vengono preferiti a causa della tossicità dell'esano.»;

(2) è aggiunto il seguente punto 4.2.12:

«4.2.12. Eptano per cromatografia. L'eptano può essere sostituito da isoottano (2,2,4 trimetilpentano di qualità per cromatografia).»

ALLEGATO VII

«ALLEGATO XIX

DETERMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE E DEL CONTENUTO DI STEROLI E DEL CONTENUTO DI COMPOSTI ALCOLICI MEDIANTE GASCROMATOGRAFIA CON COLONNA CAPILLARE

1. OGGETTO

Il metodo descrive un procedimento per la determinazione del contenuto di composti alcolici, singoli e totali, degli oli di oliva e degli oli di sansa di oliva nonché di miscele di tali oli.

I composti alcolici degli oli di oliva e degli oli di sansa di oliva comprendono alcoli alifatici, steroli e dialcoli triterpenici.

2. PRINCIPIO

Gli oli, addizionati di α -colestano e di 1-eicosano quali standard interni, sono saponificati con idrossido di potassio in soluzione etanolica, quindi l'insaponificabile viene estratto con etere etilico.

Le diverse frazioni costituite da composti alcolici sono separate dall'insaponificabile mediante cromatografia su strato sottile su una placca di gel di silice basica (metodo di riferimento) oppure mediante HPLC con colonna di gel di silice. La frazione recuperata dalla separazione su gel di silice viene trasformata in trimetilsilileteri e quindi analizzata mediante gascromatografia in colonna capillare.

PARTE 1**PREPARAZIONE DELL'INSAPONIFICABILE**

1. OGGETTO

La presente parte descrive la preparazione e l'estrazione dell'insaponificabile, compresa la preparazione e l'estrazione dell'insaponificabile dagli oli di oliva e dagli oli di sansa di oliva.

2. PRINCIPIO

Una porzione di prova viene saponificata mediante ebollizione a ricadere con una soluzione etanolica di idrossido di potassio. L'insaponificabile viene estratto con etere etilico.

3. APPARECCHIATURA

La normale apparecchiatura di laboratorio e in particolare quanto segue.

3.1. Matraccio a fondo arrotondato (pallone) da 250 ml, munito di refrigerante a ricadere con giunti smerigliati.

3.2. Imbuto separatore da 500 ml.

3.3. Matracci da 250 ml.

3.4. Microsiringhe da 100 μ l e 500 μ l.

3.5. Imbuto cilindrico filtrante a setto poroso G 3 (porosità 15-40 μ m) di diametro circa 2 cm e altezza circa 5 cm, idoneo per filtrazione sotto vuoto con giunto smerigliato maschio.

3.6. Beuta da 50 ml con giunto femmina smerigliato, adattabile all'imbuto filtrante (3.5).

3.7. Provetta da 10 ml a fondo conico con tappo di vetro a tenuta.

3.8. Essiccatore a cloruro di calcio.

4. REAGENTI

4.1. Idrossido di potassio, titolo minimo 85 %.

- 4.2. Idrossido di potassio, soluzione etanolica circa 2 M:
si sciolgono, sotto raffreddamento, 130 g di idrossido di potassio (4.1) in 200 ml di acqua distillata, quindi si porta ad 1 litro con etanolo (4.7). Si conserva la soluzione in bottiglie di vetro scuro ben tappate, per un massimo di due giorni.
- 4.3. Etere etilico, per analisi.
- 4.4. Sodio solfato anidro, per analisi.
- 4.5. Acetone, per cromatografia.
- 4.6. Etere etilico, per cromatografia.
- 4.7. Etanolo per analisi.
- 4.8. Acetato di etile per analisi.
- 4.9. Quale standard interno, α -colestano puro a oltre il 99 % (la purezza deve essere verificata mediante analisi gascromatografica).
- 4.10. α -colestano, soluzione di standard interno allo 0,2 % (m/V) in acetato di etile (4.8).
- 4.11. Fenoltaleina, soluzione di 10 g/L in etanolo (4.7).
- 4.12. 1-eicosano, soluzione allo 0,1 % (m/v) in acetato di etile (standard interno).

5. PROCEDIMENTO

Nel matraccio da 250 ml (3.1) si introduce, impiegando la microsiringa da 500 μ l (3.4), un volume di soluzione di standard interno α -colestano (4.10) e un volume di 1-eicosano (4.12) che contenga una quantità di colestano e di eicosano corrispondente a circa il 10 % del contenuto di steroli e di alcoli del campione. Ad esempio, per 5 g di campione di un olio di oliva si aggiungano 500 μ l della soluzione di α -colestano (4.10) e 250 μ l della soluzione di 1-eicosano (4.12). Per gli oli di sansa di oliva si aggiungano 1 500 μ l della soluzione di α -colestano (4.10) e altrettanti della soluzione di 1-eicosano (4.12). Si fa evaporare fino a secchezza in leggera corrente di azoto su bagnomaria caldo. Dopo il raffreddamento, nello stesso matraccio si pesano $5,00 \pm 0,01$ g di campione secco filtrato.

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

Si aggiungono 50 ml di soluzione etanolica di idrossido di potassio 2 M (4.2) e della pomice, si applica il refrigerante a ricadere e si scalda a leggera ebollizione 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.

Si travasa il contenuto del matraccio quantitativamente, in un imbuto separatore da 500 ml (3.2), aiutandosi con acqua distillata, a più riprese (50 ml). Si aggiungono circa 80 ml di etere etilico (4.6), si agita energicamente per circa 60 secondi, smettendo periodicamente di applicare pressione mediante capovolgimento dell'imbuto separatore e apertura del rubinetto. Si lascia quindi riposare fino alla completa separazione delle due fasi (Nota 2). A questo punto si raccoglie la maggior quantità possibile di soluzione saponificata in un secondo imbuto separatore. Sulla fase acquosa-alcolica si effettuano ancora due estrazioni, con le stesse modalità, impiegando 60-70 ml di etere etilico (4.6).

Nota 2: Eventuali emulsioni possono essere eliminate aggiungendo piccole quantità di etanolo (4.7).

Si riuniscono i tre estratti eterici in un unico imbuto separatore contenente 50 ml di acqua e si continua il lavaggio con acqua (50 ml) finché quest'ultima non presenta più una colorazione rosa all'aggiunta di una goccia di soluzione di fenoltaleina (4.11). Eliminata l'acqua di lavaggio, si filtra su sodio solfato anidro (4.4) in un matraccio da 250 ml precedentemente pesato, lavando imbuto e filtro con piccole quantità di etere etilico (4.6).

Si distilla il solvente in un evaporatore rotante a 30 °C sotto vuoto. Si aggiungono 5 ml di acetone (4.5) e si rimuove completamente il solvente volatile in leggera corrente di azoto. Il residuo viene essiccato in stufa a 103 ± 2 °C per 15 minuti, raffreddato in essiccatori e pesato approssimando a 0,1 mg.

PARTE 2

SEPARAZIONE DELLE FRAZIONI DEI COMPOSTI ALCOLICI

1. OGGETTO

L'insaponificabile preparato come descritto nella parte 1 è frazionato nei diversi composti alcolici, alcoli alifatici, steroli e dialcoli triterpenici (eritrodiole e uvaolo).

2. PRINCIPIO

L'insaponificabile può essere frazionato per mezzo della cromatografia basica su strato sottile (metodo di riferimento), rivelato per poi raschiare ed estrarre le corrispondenti bande. Come metodo alternativo, la separazione può essere realizzata mediante HPLC con colonna di gel di silice e rivelatore UV raccogliendo le diverse frazioni. Gli alcoli alifatici e triterpenici nonché gli steroli e i dialcoli triterpenici sono isolati insieme.

3. APPARECCHIATURA

La normale apparecchiatura di laboratorio e in particolare quanto segue.

- 3.1. Attrezzatura completa per analisi cromatografica su strato sottile, per lastre di vetro 20 × 20 cm.
- 3.2. Lampada a luce ultravioletta, con lunghezza d'onda 366 o 254 nm.
- 3.3. Microsiringhe da 100 µl e 500 µl.
- 3.4. Imbuto cilindrico filtrante a setto poroso G 3 (porosità 15-40 µm) di diametro circa 2 cm e altezza circa 5 cm, idoneo per filtrazione sotto vuoto con giunto smerigliato maschio.
- 3.5. Beuta da 50 ml con giunto femmina smerigliato, adattabile all'imbuto filtrante (3.4).
- 3.6. Provetta da 10 ml a fondo conico con tappo di vetro a tenuta.
- 3.7. Essiccatore a cloruro di calcio.
- 3.8. Sistema HPLC costituito da:
 - 3.8.1. pompa binaria;
 - 3.8.2. iniettore manuale o automatico dotato di loop da 200 µl;
 - 3.8.3. degassificatore in linea;
 - 3.8.4. rivelatore UV-VIS o IR.
- 3.9. Colonna HPLC (25 cm × 4 mm d.i.) con gel di silice 60 (particelle da 5 µm).
- 3.10. Filtro per siringhe da 0,45 µm.
- 3.11. Beuta da 25 ml.

4. REAGENTI

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

si sciolgono, sotto raffreddamento, 130 g di idrossido di potassio (4.1) in 200 ml di acqua distillata, quindi si porta a 1 litro con etanolo (4.9). Si conserva la soluzione in bottiglie di vetro scuro ben tappate, per un massimo di due giorni.
- 4.3. Etere etilico, per analisi.
- 4.4. Idrossido di potassio, soluzione etanolica circa 0,2 M:

si sciolgono 13 g di idrossido di potassio (4.1) in 20 ml di acqua distillata e si porta a 1 litro con etanolo (4.9).
- 4.5. Lastre di vetro 20 × 20 cm stratificate con gel di silice, senza indicatore di fluorescenza, spessore 0,25 mm (sono reperibili in commercio già pronte per l'uso).
- 4.6. Acetone, per cromatografia.

- 4.7. n-esano, per cromatografia.
 - 4.8. Etere etilico, per cromatografia.
 - 4.9. Etanolo per analisi.
 - 4.10. Acetato di etile per analisi.
 - 4.11. Soluzione di riferimento per la cromatografia su strato sottile: colesterolo, fitosteroli, alcoli e soluzione di eritrodiole al 5 % in acetato di etile (4.10).
 - 4.12. Soluzione di 2,7-diclorofluoresceina, soluzione etanolica allo 0,2 %. Si rende leggermente basica aggiungendo qualche goccia di soluzione alcolica 2 M di idrossido di potassio (4.2).
 - 4.13. Miscela n-esano (4.7)/etere etilico (4.8) in rapporto 65:35 (V/V).
 - 4.14. Per la fase mobile HPLC, n-esano (4.7)/etere etilico (4.8) in rapporto 1:1 (V/V).
5. METODO DI RIFERIMENTO: SEPARAZIONE DEI COMPOSTI ALCOLICI MEDIANTE LASTRA BASICA PER LA CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE

Preparazione delle lastre basiche per la cromatografia su strato sottile: si immergono o intingono le lastre al gel di silice (4.5) per circa 4 cm nella soluzione etanolica 0,2 M di idrossido di potassio (4.4) per 10 secondi, si lasciano quindi asciugare sotto cappa per due ore e infine si pongono in stufa a 100 °C per un'ora.

Si tolgono dalla stufa e si conservano in essiccatore a cloruro di calcio (3.7) fino al momento dell'impiego (le lastre così trattate devono essere impiegate entro 15 giorni).

Nella camera di sviluppo delle lastre si introduce una miscela esano/etere etilico (4.13) (Nota 3) fino all'altezza di circa 1 cm. Si chiude la camera con l'apposito coperchio e si lascia così per almeno mezz'ora, in luogo fresco, in modo che si stabilisca l'equilibrio liquido-vapore. Sulle superfici interne della camera possono essere fissate delle strisce di carta da filtro che peschino nell'eluente: questo accorgimento permette di ridurre di circa 1/3 il tempo di sviluppo e di ottenere una più uniforme e regolare eluizione dei componenti.

Nota 3: Al fine di ottenere condizioni di eluizione perfettamente riproducibili, la miscela di sviluppo deve essere sostituita a ogni prova; in alternativa è possibile utilizzare un solvente costituito da n-esano/etere etilico 50:50 (V/V).

Si prepara una soluzione al 5 % circa di insaponificabile preparato come descritto nella parte 1 in acetato di etile (4.10) e, con la microsiringa da 100 µl (3.3), si depositano sulla placca cromatografica (4.5), a 2 cm dall'estremità inferiore, 0,3 ml della soluzione in una striscia sottile e uniforme. In allineamento con la linea di caricamento, si depositano 2-3 µl della soluzione di riferimento (4.11), allo scopo di identificare, a sviluppo ultimato, le bande degli steroli, dei dialcoli triterpenici e degli alcoli.

Si pone la placca nella camera di sviluppo (3.1). La temperatura ambiente dovrà essere mantenuta fra 15 e 20 °C (Nota 4). 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 fa evaporare il solvente in corrente di aria calda oppure lasciando la placca per un po' di tempo sotto cappa.

Nota 4: Una temperatura più elevata potrebbe peggiorare la separazione.

Si spruzza la placca debolmente e uniformemente con la soluzione di 2,7-diclorofluoresceina (4.12) e la si lascia asciugare. Osservando la placca alla lampada ultravioletta (3.2) si individuano le bande degli steroli, dei dialcoli triterpenici e degli alcoli per allineamento con la macchia ottenuta con la soluzione di riferimento (4.11); si delimitano con una matita nera i limiti delle bande lungo i margini di fluorescenza (v. placca cromatografica Figura 1).

Con una spatola metallica si raschia il gel di silice compreso nell'area delimitata. Il materiale asportato, finemente sminuzzato, viene introdotto nell'imbuto filtrante (3.4); si aggiungono 10 ml di acetato di etile caldo (4.10), si mescola accuratamente con la spatola metallica e si filtra (sotto vuoto se necessario), raccogliendo il filtrato nella beuta (3.5) collegata all'imbuto filtrante.

Si lava il residuo nella beuta per tre volte con etere etilico (4.3) (circa 10 ml per volta), raccogliendo sempre il filtrato nella stessa beuta attaccata all'imbuto; si fa evaporare il filtrato fino a un volume di circa 4-5 ml, si trasferisce la soluzione residua nella provetta da 10 ml precedentemente pesata (3.6), si porta a secco con blando riscaldamento in leggera corrente di azoto, si riprende con qualche goccia di acetone (4.6), si riporta ancora a secco mediante evaporazione. Il residuo contenuto nella provetta è costituito dalle frazioni di steroli e dialcoli triterpenici o dalle frazioni di alcoli e alcoli triterpenici.

6. SEPARAZIONE DELLA FRAZIONE ALCOLICA MEDIANTE HPLC

Si dissolve l'insaponificabile ottenuto come descritto nella parte 1 in 3 ml della fase mobile (4.14), si filtra la soluzione con un filtro per siringa (3.10) e si mette da parte.

Si iniettano 200 µl della soluzione di insaponificabile filtrata nel sistema HPLC (3.8).

Si effettua la separazione HPLC a 0,8 ml/min, si scartano i primi 5 minuti e si raccoglie in beute da 25 ml (3.11) tra i 5 e i 10 minuti per gli alcoli alifatici e triterpenici e tra 11 e 25 minuti per gli steroli, l'eritrodiole e l'uvaolo (Nota 5).

La separazione può essere controllata con un rivelatore UV a lunghezze d'onda 210 nm o un rivelatore dell'indice di rifrazione (v. Figura 6).

Le frazioni sono fatte evaporare fino a secchezza e preparate per l'analisi cromatografica.

Nota 5: Controllare attentamente la pressione della pompa HPLC, l'etere etilico può aumentare la pressione; regolare il flusso in modo da mantenere sotto controllo la pressione.

PARTE 3

ANALISI GASCROMATOGRAFICA DELLE FRAZIONI DEI COMPOSTI ALCOLICI

1. OGGETTO

La presente parte fornisce un orientamento generale per la determinazione mediante gascromatografia con colonna capillare della composizione qualitativa e quantitativa dei composti alcolici isolati con il procedimento specificato nella parte 2 del presente metodo.

2. PRINCIPIO

Le frazioni raccolte dall'insaponificabile mediante cromatografia su strato sottile o HPLC sono trasformate in trimetilsilileteri e analizzate mediante gascromatografia in colonna capillare con iniezione split e rivelatore a ionizzazione di fiamma.

3. APPARECCHIATURA

La normale apparecchiatura di laboratorio e in particolare quanto segue.

3.1. Provetta da 10 ml a fondo conico con tappo di vetro a tenuta.

3.2. Gascromatografo idoneo per il funzionamento con colonna capillare, dotato di dispositivo di iniezione di tipo split, costituito da:

3.2.1. camera termostatica per le colonne, in grado di mantenere la temperatura desiderata con la precisione di ± 1 °C;

3.2.2. complesso di iniezione termoregolabile con elemento vaporizzatore in vetro persilanizzato e sistema split;

3.2.3. rivelatore a ionizzazione di fiamma;

3.2.4. sistema di acquisizione di dati idoneo per il funzionamento con il rivelatore a ionizzazione di fiamma (3.10.3), integrabile manualmente.

3.3. Colonna capillare in silice fusa, lunga 20 - 30 m, diametro interno 0,25 - 0,32 mm, internamente ricoperta di una miscela costituita da 5 % difenil - 95 % dimetilpolisilossano (fase stazionaria SE-52 o SE-54 o equivalenti), fino a uno spessore uniforme compreso fra 0,10 e 0,30 µm.

3.4. Microsiringa per gascromatografia da 10 µl con ago cementato idonea all'iniezione split.

4. REAGENTI

4.1. Piridina anidra, per cromatografia.

4.2. Esametildisilazano per analisi.

4.3. Trimetilclorosilano per analisi.

- 4.4. Soluzioni campione di trimetilsilileteri degli steroli: si preparano al momento dell'impiego partendo da steroli ed eritrodiolo ottenuti da oli che li contengano.
- 4.5. Soluzioni standard di trimetilsilileteri degli alcoli alifatici da C20 a C28: si preparano al momento dell'impiego a partire da miscele di alcoli puri.
- 4.6. Gas vettore: idrogeno o elio, puri per gascromatografia.
- 4.7. Gas ausiliari: idrogeno, elio, azoto e aria, puri per gascromatografia.
- 4.8. Reagente per la sililazione costituito da una miscela 9:3:1 (V/V/V) di piridina-esametildisilazano-trimetilclorosilano.
- 4.9. n-esano, per cromatografia.

5. PREPARAZIONE DEI TRIMETILSILETERI

Nella provetta (3.1) contenente la frazione di composto alcolico si aggiunge il reagente per la sililazione (4.8) (Nota 6), in ragione di 50 µl per ogni milligrammo di composto alcolico, evitando ogni assorbimento di umidità (Nota 7).

Nota 6: Esistono in commercio soluzioni già pronte per l'uso; sono inoltre disponibili altri reagenti per la sililazione, quali ad esempio il bis-trimetilsililtrifluoroacetammide + 1 % di trimetilclorosilano da diluire in uno stesso volume di piridina anidra. La piridina può essere sostituita dalla stessa quantità di acetoneitrile.

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

Si tappa la provetta (3.1), si agita cautamente (senza capovolgere) fino a completa solubilizzazione dei composti. 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.

6. ANALISI GASCROMATOGRAFICA

6.1. Operazioni preliminari, condizionamento della colonna capillare

Si installa la colonna (3.3) nel gascromatografo, collegando il terminale di ingresso all'iniettore del dispositivo split 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 split e del sistema di registrazione ecc.).

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

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

6.2. Condizioni operative

Ottimizzare il programma di temperatura e il flusso del gas vettore in modo da ottenere cromatogrammi simili alle Figure da 3 a 6.

Sono stati testati e sono risultati utili i seguenti parametri:

6.2.1. Alcoli alifatici

Programma della stufa	180 °C (8 min.) → 260 °C (a 5 °C/min.) → 260 °C (15 min.)
Temperatura dell'iniettore	280 °C
Temperatura del rivelatore	290 °C
Velocità lineare del gas vettore	elio (20 - 30 cm/s); idrogeno (30 - 50 cm/s)
Rapporto di split	da 1:50 a 1:100
Volume iniettato	0,5 - 1 µl di soluzione di TMSE.

6.2.2. Steroli e dialcoli triterpenici

Programma della stufa	260 ± 5 °C isotermica
Temperatura dell'iniettore	280 - 300 °C
Temperatura del rivelatore	280 - 300 °C
Velocità lineare del gas vettore	elio (20 - 30 cm/s); idrogeno (30 - 50 cm/s)
Rapporto di split	da 1:50 a 1:100
Volume iniettato	0,5 - 1 µl 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'alcole C26 deve essere 18 ± 5 minuti
- il picco dell'alcole C22 deve essere: per l'olio di oliva 80 ± 20 % del fondo scala, per l'olio di sansa di oliva 40 ± 20 % del fondo scala
- il tempo di ritenzione del picco di β -sitosterolo deve essere 20 ± 5 minuti
- il picco del campesterolo deve essere: per l'olio di oliva (contenuto medio 3 %) 20 ± 5 % del fondo scala
- si deve avere separazione di tutti gli steroli presenti; è necessario che i picchi oltre che separati siano anche completamente risolti, cioè che il tracciato del picco raggiunga la linea di base prima di risalire per il picco successivo. È tuttavia tollerata anche una risoluzione incompleta purché il picco TRR 1,02 (sitostanolo) sia quantificabile secondo la perpendicolare.

6.3. Esecuzione dell'analisi

Con la microsiringa da 10 µl (3.4) si preleva 1 µl di esano, si aspirano 0,5 µl di aria e successivamente 0,5 - 1 µl 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 dell'iniettore e dopo 1-2 secondi si inietta rapidamente e si estrae quindi lentamente l'ago dopo circa 5 secondi. È possibile utilizzare anche un iniettore automatico.

Si effettua la registrazione fino a completa eluizione dei TMSE dei corrispondenti composti alcolici presenti. La linea di base deve essere sempre corrispondente ai requisiti delle pertinenti condizioni operative (6.2.1 o 6.2.2).

6.4. 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 alifatici e triterpenici o degli steroli e dei dialcoli triterpenici, analizzate nelle medesime condizioni. La Figura 3 riporta un cromatogramma della frazione costituita da alcoli alifatici e triterpenici; la Figura 2 riporta i corrispondenti cromatogrammi degli steroli e dei dialcoli triterpenici.

Gli alcoli alifatici vengono eluiti secondo il seguente ordine: C20-olo (S.I.), C22-olo, C23-olo, C24-olo, C25-olo, C26-olo, C27-olo e C28-olo.

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

6.5. Valutazione quantitativa

Si procede al calcolo delle aree dei picchi di 1-eicosanolo e degli alcoli alifatici C22, C24, C26 e C28 mediante un sistema di acquisizione dei dati. Il coefficiente di risposta di 1-eicosanolo si deve intendere unitario.

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

Si calcola la concentrazione di ogni singolo composto alcolico, in mg/kg di sostanza grassa, come segue:

$$\text{Composto alcolico } x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1000$$

in cui:

A_x = area del picco del composto alcolico x, in unità di calcolo dell'elaboratore

A_s = area del picco di 1-eicosanolo/ α -colestano, in unità di calcolo dell'elaboratore

m_s = massa di 1-eicosanolo/ α -colestano aggiunta, in milligrammi

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

7. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Si riportano le concentrazioni dei singoli alcoli alifatici e triterpenici, in mg/kg di sostanza grassa e, come «tenore totale di alcoli alifatici», la loro somma. Il tenore totale è la somma di C22, C24, C26 e C28.

Il contenuto di ogni singolo composto alcolico deve essere espresso con una cifra decimale.

La concentrazione totale di steroli deve essere espressa senza decimali.

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

$$\text{Sterolo } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

in cui:

A_x = area del picco per lo sterolo x

ΣA = somma delle aree di tutti i picchi degli steroli.

β -sitosterolo apparente: Δ 5,23-stigmastadienolo + clerosterolo + β -sitosterolo + sitostanolo + Δ 5-avenasterolo + Δ 5,24-stigmastadienolo.

Si calcola il contenuto percentuale di eritrodiolo e uvaolo:

$$\text{Eritrodiolo} + \text{uvaolo} = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

in cui:

A_{Er} = area dell'eritrodiolo in unità di calcolo dell'elaboratore

A_{Uv} = area dell'uvaolo in unità di calcolo dell'elaboratore

ΣA_T = somma delle aree degli steroli + eritrodiolo + uvaolo in unità di calcolo dell'elaboratore.

Oltre a calcolare la percentuale relativa dei singoli steroli e diacoli triterpenici e la concentrazione totale di steroli, si deve calcolare anche la concentrazione di eritrodiolo e uvaolo e la relativa somma, in mg/kg di sostanza grassa, secondo le seguenti espressioni:

$$\text{Eritrodiolo} = \frac{A_{Er} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

$$\text{Uvaolo} = \frac{A_{Uv} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

in cui:

A_{Er} = area del picco di eritrodiolo, in unità di calcolo dell'elaboratore

A_{Uv} = area dell'uvaolo in unità di calcolo dell'elaboratore

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

m_s = massa di α -colestanolo aggiunta, in milligrammi

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

Appendice

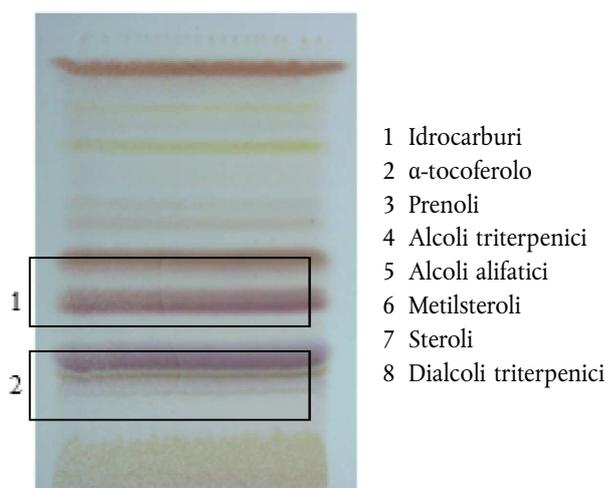


Figura 1 - Cromatografia su strato sottile della frazione insaponificabile dell'olio di sansa di oliva eluita due volte in esano:etere etilico (65:35), sviluppata con SO₄H₂ (50 %) e riscaldata. Le bande da raschiare sono quelle all'interno del rettangolo; 1 sono le bande degli alcoli alifatici e 2 quelle degli steroli e dei dialcoli triterpenici.

Tabella I - Tempi di ritenzione relativi degli steroli

Picco	Identificazione		Tempo di ritenzione relativo	
			Colonna SE 54	Colonna SE 52
1	Colesterolo	Δ -5-colesten-3 β -olo	0,67	0,63
2	Colestanolo	5 α -colestan-3 β -olo	0,68	0,64
3	Brassicasterolo	[24S]-24-metil- Δ -5,22-colestadien-3 β -olo	0,73	0,71
*	Ergosterolo	[24S]-24-metil- Δ -5,7,22 colestatrien-3 β -olo	0,78	0,76
4	24-metilcolesterolo	24-metilen- Δ -5,24-colestadien-3 β -olo	0,82	0,80
5	Campesterolo	(24R)-24-metil- Δ -5-colesten-3 β -olo	0,83	0,81
6	Campestanolo	(24R)-24-metil-colestan-3 β -olo	0,85	0,82
7	Stigmasterolo	(24S)-24-etil- Δ -5,22-colestadien-3 β -olo	0,88	0,87
8	Δ -7-campesterolo	(24R)-24-metil- Δ -7-colesten-3 β -olo	0,93	0,92
9	Δ -5,23-stigmastadienolo	(24R,S)-24-etil- Δ -5,23-colestadien-3 β -olo	0,95	0,95
10	Clerosterolo	(24S)-24-etil- Δ -5,25-colestadien-3 β -olo	0,96	0,96

Picco	Identificazione		Tempo di ritenzione relativo	
			Colonna SE 54	Colonna SE 52
11	β -sitosterolo	(24R)-24-etil- Δ -5-colesten-3 β -olo	1,00	1,00
12	Sitostanolo	24-etil-colestan-3 β -olo	1,02	1,02
13	Δ -5-avenasterolo	(24Z)-24-etiliden- Δ -colesten-3 β -olo	1,03	1,03
14	Δ -5,24-stigmastadienolo	(24R,S)-24-etil- Δ -5,24-colestadien-3 β -olo	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastenolo	(24R,S)-24-etil- Δ -7-colesten-3 β -olo	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasterolo	(24Z)-24-etiliden- Δ -7-colesten-3 β -olo	1,16	1,16
17	Eritrodiolo	5 α -olean-12-en-3 β ,28-diolo	1,41	1,41
18	Uvaolo	Δ 12-ursen-3 β ,28-diolo	1,52	1,52

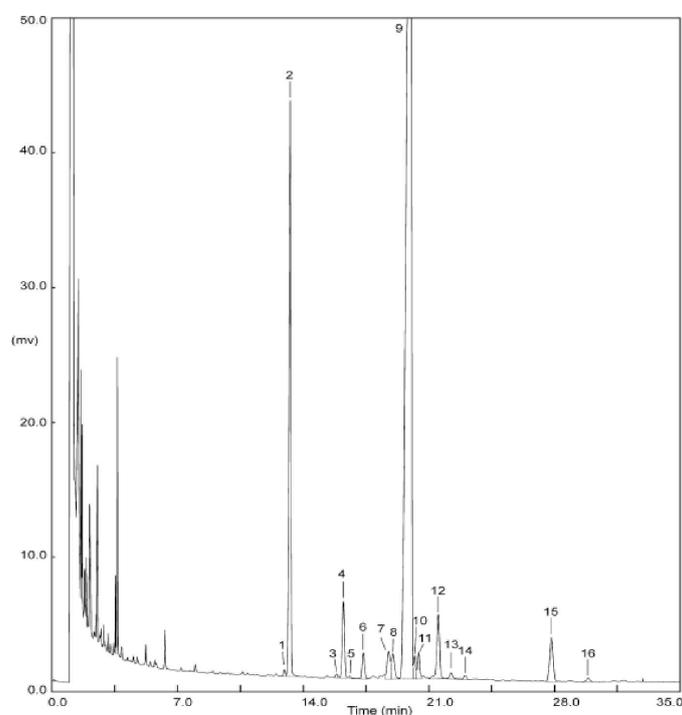


Figura 2 - Profilo cromatografico GC-FID degli steroli e dei dialcoli triterpenici di un olio di oliva raffinato. 1) colesterolo, 2) α -colestanolo (S.I.), 3) 24-metilcolesterolo, 4) campesterolo, 5) campestanolo, 6) stigmasterolo, 7) Δ 5,23-stigmastadienolo, 8) clerosterolo, 9) β -sitosterolo, 10) sitostanolo, 11) Δ 5-avenasterolo, 12) Δ 5,24-stigmastadienolo, 13) Δ 7-stigmastenolo, 14) Δ 7-avenasterolo, 15) eritrodiolo, 16) uvaolo.

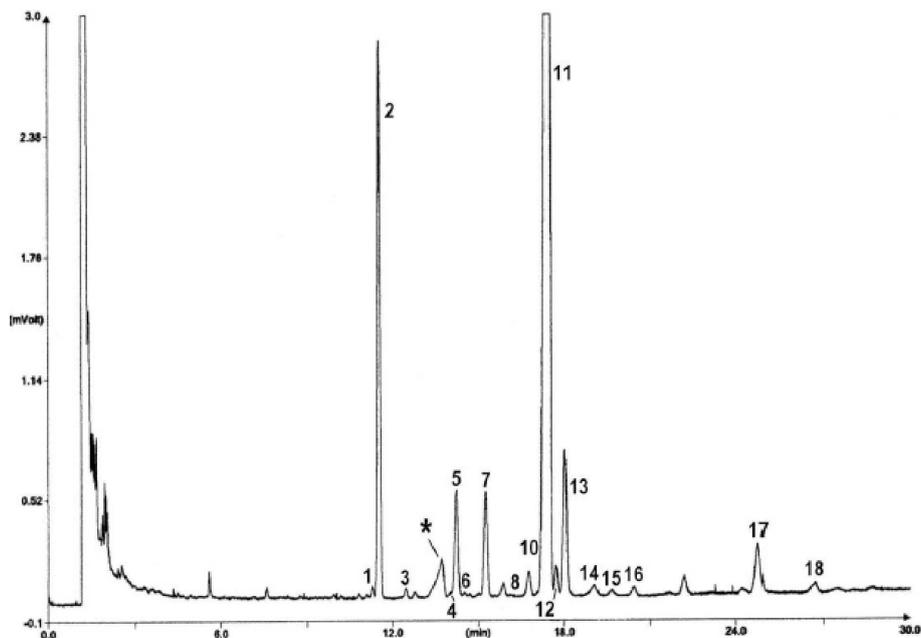


Figura 3 - Profilo cromatografico GC-FID degli steroli e dei dialcoli triterpenici di un olio di oliva lampante. 1) colesterolo, 2) α -coleanolo (S.I.), 3) brassicasterolo, 4) 24-metilcolesterolo, 5) campesterolo, 6) campestanolo, 7) stigmasterolo, 8) Δ^7 -campesterolo, 9) $\Delta^{5,23}$ -stigmastadienolo, 10) clerosterolo, 11) β -sitosterolo, 12) sitostanolo, 13) Δ^5 -avenasterolo, 14) $\Delta^{5,24}$ -stigmastadienolo, 15) Δ^7 -stigmastenolo, 16) Δ^7 -avenasterolo, 17) eritrodiolo, 18) uvaolo.

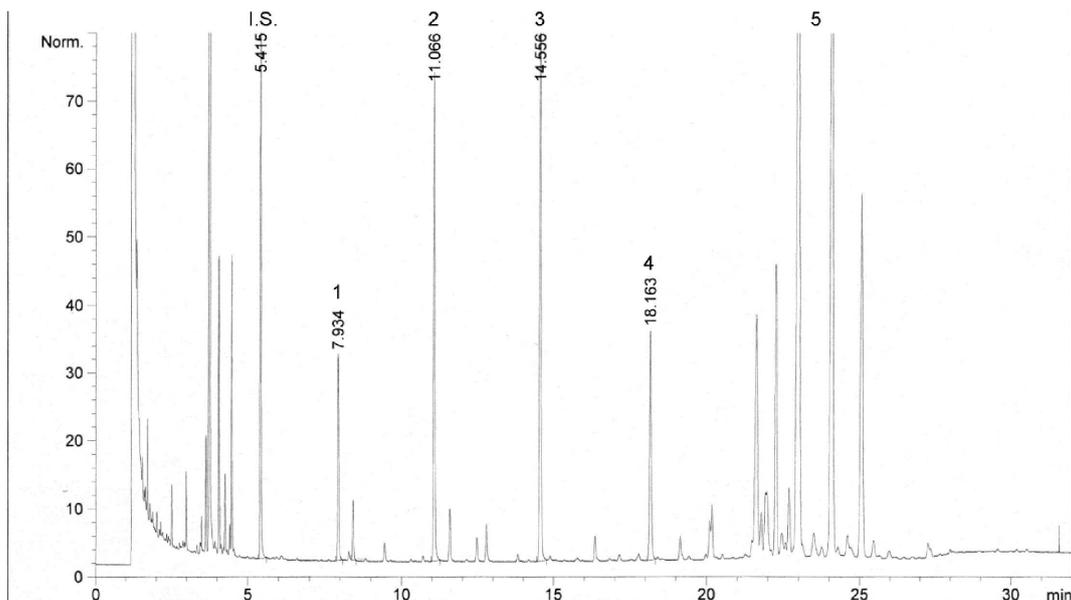


Figura 4 - Profilo cromatografico GC-FID degli alcoli alifatici e degli alcoli triterpenici dell'olio di oliva. (S.I.) C20-olo, 1) C22-olo, 2) C24-olo, 3) C26-olo, 4) C28-olo, 5) alcoli triterpenici.

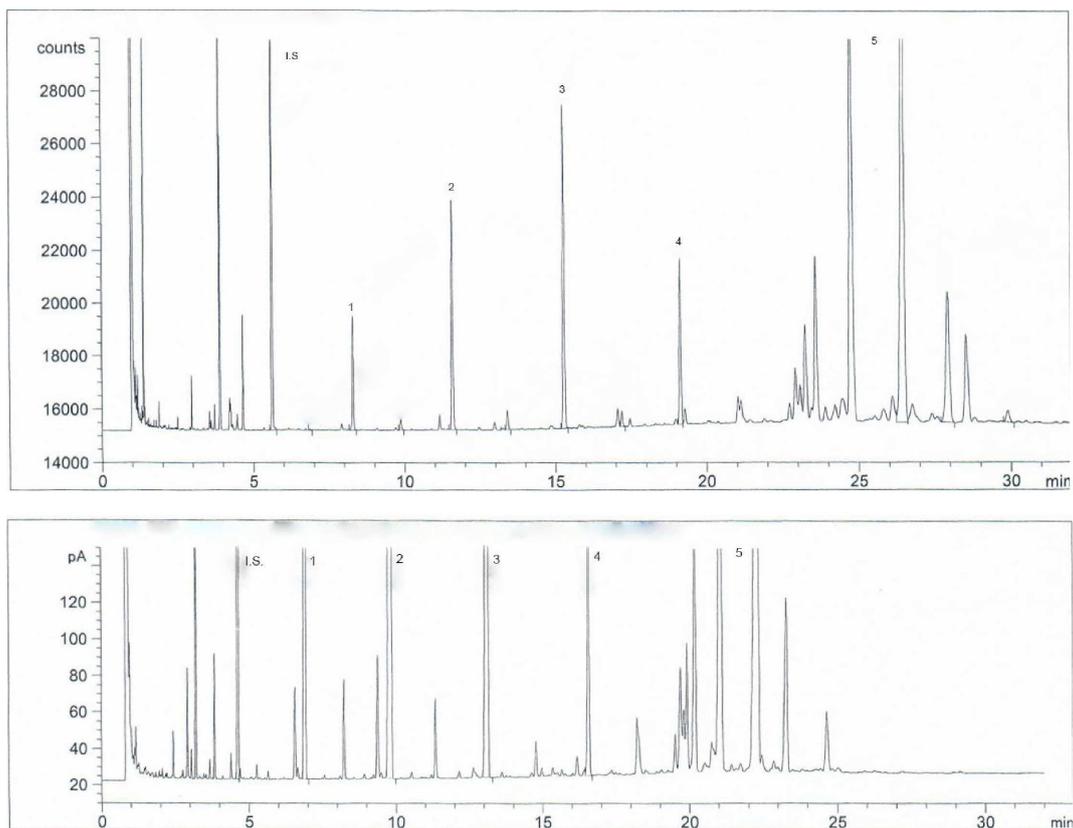


Figura 5 - Profilo cromatografico GC-FID degli alcoli alifatici e degli alcoli triterpenici di un olio di oliva raffinato e un olio di oliva di seconda centrifugazione. (S.I.) C20-olo, 1) C22-olo, 2) C24-olo, 3) C26-olo, 4) C28-olo, 5) alcoli triterpenici.

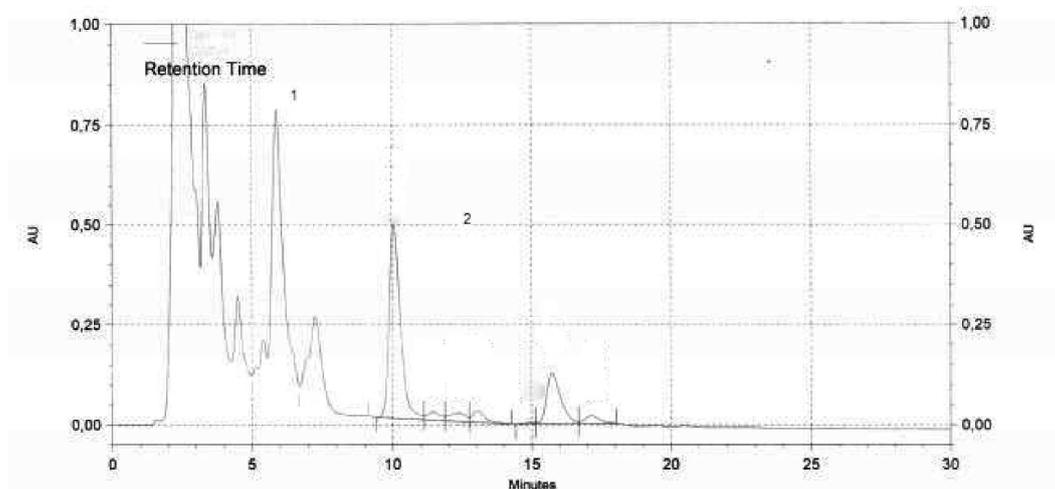


Figura 6 - Cromatogramma HPLC dell'insaponificabile di un olio di oliva separato mediante HPLC con rivelatore UV. 1) Alcoli alifatici e triterpenici 2) Steroli e dialcoli triterpenici»