

Trattandosi di un semplice strumento di documentazione, esso non impegna la responsabilità delle istituzioni

► **B**

REGOLAMENTO (UE) N. 61/2011 DELLA COMMISSIONE

del 24 gennaio 2011

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 di analisi ad essi attinenti

(GU L 23 del 27.1.2011, pag. 1)

Rettificato da:

► **C1** Rettifica, GU L 48 del 23.2.2011, pag. 19 (61/2011)

► **C2** Rettifica, GU L 78 del 24.3.2011, pag. 69 (61/2011)



REGOLAMENTO (UE) N. 61/2011 DELLA COMMISSIONE

del 24 gennaio 2011

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 di analisi ad essi attinenti

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (CE) n. 1234/2007 del Consiglio, del 22 ottobre 2007, recante organizzazione comune dei mercati agricoli e disposizioni specifiche per taluni prodotti agricoli (regolamento unico OCM) ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 113, paragrafo 1, lettera a), e l'articolo 121, lettera h), in combinato disposto con l'articolo 4,

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) In particolare, poiché gli esperti chimici hanno ritenuto che il contenuto di etil esteri degli acidi grassi (EEAG) e di metil esteri degli acidi grassi (MEAG) costituisca un utile parametro di qualità per gli oli extra vergini d'oliva, è opportuno includere valori limite per questi esteri nonché un metodo per la determinazione del loro contenuto.
- (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 che le modifiche introdotte dal presente regolamento si applichino a partire dal 1º aprile 2011. Per gli stessi motivi è opportuno disporre che gli oli d'oliva e gli oli di sansa d'oliva legalmente fabbricati ed etichettati nell'Unione o legalmente importati nell'Unione e immessi in libera pratica anteriormente a tale data possano essere commercializzati fino ad esaurimento delle scorte.
- (4) Occorre pertanto modificare di conseguenza il regolamento (CEE) n. 2568/91.
- (5) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del comitato di gestione per l'organizzazione comune dei mercati agricoli,

⁽¹⁾ GU L 299 del 16.11.2007, pag. 1.

⁽²⁾ GU L 248 del 5.9.1991, pag. 1.

▼B

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

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

1) All'articolo 2, paragrafo 1, è aggiunto il seguente trattino:

«— per la determinazione del contenuto di cere e metil ed etil esteri degli acidi grassi mediante gascromatografia con colonna capillare, il metodo di cui all'allegato XX.»

2) Nel sommario degli allegati viene aggiunto quanto segue:

«Allegato XX: Metodo per la determinazione del contenuto di cere e metil ed etil esteri degli acidi grassi mediante gascromatografia con colonna capillare».

3) L'allegato I è sostituito dal testo riportato nell'allegato I del presente regolamento.

4) È aggiunto l'allegato XX, quale riportato nell'allegato II del presente regolamento.

Articolo 2

I prodotti legalmente fabbricati ed etichettati nell'Unione o legalmente importati nell'Unione e immessi in libera pratica anteriormente al 1° aprile 2011 possono essere commercializzati fino ad esaurimento delle scorte.

Articolo 3

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° aprile 2011.

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

ALLEGATO I

«ALLEGATO I

CARATTERISTICHE DEGLI OLI DI OLIVA

Categoria	Metil esteri degli acidi grassi (MEAG) ed etil esteri degli acidi grassi (EEAG)	Acidità (%) (*)	Numero dei perossidi mEq O ₂ /kg (*)	Cere mg/kg (**)	2 gliceril monopalmitato (%)	Stigmastadiene mg/kg ⁽¹⁾	Differenza: ECN42 (HPLC) e ECN42 (calcolo teorico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	►C1 Valutazione organolettica Mediana del difetto (Md) (*) ◀	Valutazione organolettica Mediana del fruttato (Mf) (*)
1. Olio extra vergine di oliva	►C2 Σ MEAG + EEAG ≤ 75 mg/kg o 75 mg/kg <Σ MEAG + EEAG ≤ 150 mg/kg e (EEAG/MEAG) ≤ 1,5 ◀	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 % ≤ 1,0 se % acido palmitico totale > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 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	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	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 > 3,5 ⁽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	—	—

▼B

Categoria	Metil esteri degli acidi grassi (MEAG) ed etil esteri degli acidi grassi (EEAG)	Acidità (%) (*)	Numero dei perossidi mEq O ₂ /kg (*)	Cere mg/kg (**)	2 gliceril monopalmitato (%)	Stigmastadiene mg/kg ⁽¹⁾	Differenza: ECN42 (HPLC) e ECN42 (calcolo teorico)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	►C1 Valutazione organolettica Mediana del difetto (Md) (*) ◀	Valutazione organolettica Mediana del fruttato (Mf) (*)
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 (o meno) essere separati mediante colonna capillare.

⁽²⁾ O quando la mediana del difetto è inferiore o uguale a 3,5 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 eritrodiole 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 eritrodiole e uvaolo è superiore a 3,5 %.

Categoria	Composizione acidica ⁽¹⁾						Somma degli isomeri transoleici (%)	Somma degli isomeri translinoleici + translinolenici (%)	Composizione in steroli						Steroli totali (mg/kg)	Eritrodiolo e uvaolo (%) (**)
	Miristico (%)	Linoleico (%)	Arachidico (%)	Eicosenoico (%)	Behenico (%)	Lignoceric (%)			Cholesterol (%)	Brassicasterolo (%)	Campesterolo (%)	Stigmasterolo (%)	Betasitosterolo (%) ⁽²⁾	Delta-7-stigmasterenolo (%)		
1. Olio extra vergine di oliva	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Olio di oliva vergine	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Olio di oliva lampante	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾
4. Olio di oliva raffinato	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
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	≤ 0,5	≤ 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	≤ 0,5	≤ 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	≤ 0,5	≤ 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	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ ►C1 Tenore di altri acidi grassi (%): palmitico: 7,5-20,0; palmitoleico: 0,3-3,5; eptadecanoico: ≤ 0,3; eptadecenoico: ≤ 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 le 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'inosservanza 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 (**) e riguardanti la qualità dell'olio implicano che per tutti gli oli di sansa di oliva i corrispondenti valori limite possono non essere rispettati simultaneamente.»



ALLEGATO II

«ALLEGATO XX

Metodo per la determinazione del contenuto di cere e metil ed etil esteri degli acidi grassi mediante gascromatografia con colonna capillare

1. OGGETTO

Il presente metodo permette di determinare il contenuto di cere e metil ed etil esteri degli acidi grassi negli oli di oliva. Le singole cere e gli alchil esteri sono separati in funzione del numero di atomi di carbonio. L'impiego del metodo viene consigliato come mezzo atto a differenziare l'olio di oliva dall'olio di sansa di oliva e come parametro di qualità per gli oli extra vergini, in quanto permette di individuare false miscele di oli extra vergini di oliva e oli di bassa qualità e di capire se si tratta di oli vergini, lampanti o deodorati.

2. PRINCIPIO

La sostanza grassa, addizionata di opportuni standard interni, viene frazionata mediante cromatografia su colonna di gel di silice idratato; la frazione eluita nelle condizioni di prova (con polarità minore di quella dei trigliceridi) viene recuperata e analizzata direttamente mediante gascromatografia in colonna capillare.

3. APPARECCHIATURA

3.1. **Beuta da 25 ml.**

3.2. **Colonna in vetro** per cromatografia liquida avente diametro interno di 15 mm e altezza da 30 a 40 cm con opportuno rubinetto.

3.3. **Gascromatografo** idoneo per il funzionamento con colonna capillare, dotato di sistema di introduzione diretta in colonna costituito da:

3.3.1. **Camera termostatica per le colonne con programmatore di temperatura**

3.3.2. **Iniettore a freddo** per iniezione diretta in colonna

3.3.3. **Rivelatore a ionizzazione di fiamma e convertitore-amplificatore**

3.3.4. **Registratore-integratore** (Nota 1) idoneo per il funzionamento con il convertitore-amplificatore (3.3.3), con tempo di risposta non maggiore di 1 secondo e con velocità della carta variabile.

Nota 1: È possibile utilizzare anche sistemi computerizzati che prevedono l'acquisizione dei dati gascromatografici attraverso Personal Computer.

3.3.5. **Colonna capillare di silice fusa (per analisi di cere e metil ed etil esteri)**, lunga da 8 a 12 m, diametro interno da 0,25 a 0,32 mm, internamente ricoperta con liquido di ripartizione (Nota 2) con spessore uniforme compreso fra 0,10 e 0,30 µm.

Nota 2: Liquidi di ripartizione idonei allo scopo reperibili in commercio sono per es. il SE52, il SE54, ecc.

3.4. **Microsiringa** da 10 µl con ago cementato, idonea per iniezione diretta in colonna.

3.5. **Vibratore elettrico**

3.6. **Evaporatore rotante**

▼B3.7. **Muffola**

3.8. **Bilancia analitica** in grado di garantire un'accuratezza della misura di $\pm 0,1$ mg

3.9. Normale vetreria da laboratorio

4. **REAGENTI**

4.1. **Gel di silice** con granulometria compresa tra 60 e 200 μm . Porre il gel di silice in muffola a 500 °C per almeno 4 h. Dopo il raffreddamento aggiungere il 2 % di acqua riferito alla quantità di gel di silice prelevata. Agitare bene allo scopo di omogeneizzare la massa e conservare nell'essiccatore almeno per 12 h prima dell'impiego.

4.2. **n-Esano** per cromatografia o analisi dei residui (verificare la purezza).

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.

4.3. **Etere etilico, per cromatografia**

AVVERTENZA: prodotto altamente infiammabile. Moderatamente tossico. Irritante per la pelle. Nocivo per inalazione. Può causare danni agli occhi. Gli effetti possono essere differiti. Può formare perossidi esplosivi. 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. Non evaporare a secchezza o quasi-secchezza. L'aggiunta di acqua o di un agente riducente appropriato può ridurre la formazione di perossidi. Non ingerire. Evitare di respirare i vapori. Evitare il contatto prolungato o ripetuto con la pelle.

4.4. **n-Eptano** per cromatografia o **Isottano**

AVVERTENZA: prodotto infiammabile. Nocivo per inalazione. Tenere lontano da sorgenti di calore, scintille o fiamme libere. Tenere i contenitori ben chiusi. Usare con ventilazione adeguata. Evitare di respirare i vapori. Evitare il contatto prolungato o ripetuto con la pelle.

4.5. **Soluzione campione di lauril arachidato** (*Nota 3*), allo 0,05 % (m/V) in eptano (standard interno per cere).

Nota 3: È possibile utilizzare anche palmitil palmitato o miristil stearato o arachidil laurato.

4.6. **Soluzione campione di metileptadecanoato**, allo 0,02 % (m/V) in eptano (standard interno metil ed etil esteri).

4.7. **Sudan 1 (1-fenilazo-2-naftolo)**

▼B**4.8. Gas vettore: idrogeno o elio puri per gascromatografia****AVVERTENZA**

Idrogeno. Altamente infiammabile, sotto pressione. Tenere lontano da fonti di calore, scintille o fiamme libere o apparecchi elettrici non anti-deflagranti. Tenere sempre la valvola della bombola chiusa quando non si usa. Usare sempre un regolatore di pressione. Togliere la tensione alla molla del riduttore prima di aprire la valvola della bombola. Non sostare davanti al foro di uscita della bombola quando si apre la valvola. Usare con ventilazione adeguata. Non trasferire l'idrogeno da una bombola a un'altra. Non miscelare gas nella bombola. Tenere sempre ben assicurate le bombole affinché non possano cadere. Tenere le bombole lontane dal sole o da sorgenti di calore. Non tenere in ambienti corrosivi. Non usare bombole danneggiate o senza etichetta.

Elio. Gas compresso sotto alta pressione. Riduce l'ossigeno disponibile per la respirazione, tenere il contenitore chiuso. Usare con ventilazione adeguata. Non entrare nei locali di conservazione se non sono adeguatamente ventilati. Usare sempre un regolatore di pressione. Togliere la tensione alla molla del riduttore prima di aprire la valvola della bombola. Non trasferire il gas da una bombola a un'altra. Tenere sempre ben assicurate le bombole affinché non possano cadere. Non sostare davanti al foro di uscita della bombola quando si apre la valvola. Tenere le bombole lontane dal sole o da sorgenti di calore. Non tenere in ambienti corrosivi. Non usare bombole danneggiate o senza etichetta. Non usare per inalazione e farne solo uso tecnico.

4.9. Gas ausiliari:

— idrogeno, puro per gascromatografia

— aria, pura per gascromatografia

AVVERTENZA

Aria. Gas compresso sotto alta pressione. Usare con cautela in presenza di sostanze combustibili in quanto la temperatura di autoaccensione della maggior parte dei composti organici nell'aria si abbassa notevolmente ad alta pressione. Tenere sempre la valvola della bombola chiusa quando non si usa. Usare sempre un regolatore di pressione. Togliere la tensione alla molla del riduttore prima di aprire la valvola della bombola. Non sostare davanti al foro di uscita della bombola quando si apre la valvola. Non trasferire il gas da una bombola a un'altra. Non miscelare gas nella bombola. Tenere sempre ben assicurate le bombole affinché non possano cadere. Tenere le bombole lontane dal sole o da sorgenti di calore. Non tenere in ambienti corrosivi. Non usare bombole danneggiate o senza etichetta. Non usare per inalazione o per apparecchi respiratori l'aria destinata a usi tecnici.

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). A sedimentazione avvenuta completare l'as-sestamento mediante l'uso di un vibratore elettrico al fine di 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 analitica (3.8). Aggiungere l'opportuna quantità di campione di riferimento (4.5) in funzione del presunto contenuto di cere. Ad esempio aggiungere 0,1 mg di lauril arachidato nel caso di olio di oliva, da 0,25 a 0,50 mg nel caso di olio di sansa e 0,05 mg di metileptadecanoato per gli oli di oliva (4.6).

▼B

Trasferire il campione così preparato nella colonna cromatografica aiutandosi con due porzioni da 2 ml ciascuna di n-esano (4.2).

Lasciare fluire il solvente fino a un battente di 1 mm, quindi far percolare altro n-esano/etere etilico (99:1) e raccogliere 220 ml, rispettando un flusso di circa 15 gocce ogni 10 secondi. **(Questa frazione contiene i metil ed etil esteri e le cere).** (Nota 4) (Nota 5).

Nota 4: La miscela n-esano/etere etilico (99:1) dovrà essere preparata ogni giorno.

Nota 5: Onde controllare visivamente la corretta eluizione delle cere, è possibile aggiungere al campione in soluzione 100 µl di Sudan I all'1 % nella miscela di eluizione.

Il colorante ha un tempo di ritenzione intermedio 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.

Evaporare la frazione così ottenuta mediante evaporatore rotante fino ad allontanamento quasi completo del solvente, eliminare gli ultimi 2 ml con l'aiuto di un debole flusso di azoto e riprendere la frazione che contiene i metil ed etil esteri e che va diluita con 2-4 ml di n-eptano o isottano.

5.2. **Analisi gascromatografica**

5.2.1. *Operazioni preliminari*

Installare nel gascromatografo (3.3) la colonna, collegando il terminale di ingresso connesso al sistema in colonna 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 e iniziare un riscaldamento graduale fino a raggiungere, dopo circa 4 h, la temperatura di 350 °C.

Mantenere tale temperatura per almeno 2 h, quindi portare il complesso alle condizioni di funzionamento (regolazione del flusso del 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 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, una deriva positiva indica un insufficiente condizionamento della colonna.

5.2.2. *Scelta delle condizioni operative per le cere ed i metil ed etil esteri (Nota 6)*

Le condizioni operative di massima sono le seguenti:

— Temperatura della colonna:

20 °C/min 5 °C/min

inizio a 80 °C (1') ————— 140 °C ————— 335 °C (20)

— Temperatura del rivelatore: 350 °C.

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

▼B

- Gas vettore: elio o idrogeno alla velocità lineare ottimale per il gas prescelto (vedere Appendice A).
- Sensibilità strumentale: idonea a soddisfare le condizioni di cui sopra.

Nota 6: Vista l'elevata temperatura finale è ammessa una deriva positiva che non deve superare il 10 % del fondo scala.

Tali condizioni possono essere modificate in funzione delle caratteristiche della colonna e del gascromatografo in modo da avere una separazione di tutte le cere e dei metil ed etil esteri degli acidi grassi e una risoluzione soddisfacente dei picchi (vedi figure 2, 3 e 4) e un tempo di ritenzione dello standard interno del lauril arachidato di 18 ± 3 minuti. Il picco delle cere più rappresentativo deve superare di oltre il 60 % il fondo scala, mentre lo standard interno del metileptadecanoato dei metil ed etil esteri deve raggiungere il valore del fondo scala.

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

5.3. Esecuzione dell'analisi

Con la microsiringa da 10 µl si prelevano 10 µl di soluzione; si alza lo stantuffo della siringa in modo che l'ago sia vuoto. Si introduce l'ago attraverso il dispositivo di iniezione e dopo 1-2 secondi si inietta rapidamente e si estrae quindi lentamente l'ago dopo circa 5 secondi.

Si effettua la registrazione fino a completa eluizione delle cere e degli stigmastadieni a seconda della frazione che viene analizzata.

La linea di base deve essere sempre corrispondente ai requisiti richiesti.

5.4. Identificazione dei picchi

L'identificazione dei singoli picchi viene effettuata in base ai tempi di ritenzione e per paragone con miscele di cere a tempi di ritenzione noti, analizzate nelle medesime condizioni. Per gli alchil esteri l'identificazione viene effettuata mediante miscele di metil ed etil esteri dei principali acidi grassi degli oli di oliva (palmitico e oleico).

Nella figura 1 è riportato un cromatogramma delle cere presenti in un olio di oliva vergine. Nelle figure 2 e 3 sono riportati i cromatogrammi di due oli extra vergini di oliva del commercio, uno con metil ed etil esteri e un altro senza. Nella figura 4 vengono riportati i cromatogrammi relativi a un olio extra vergine di ottima qualità e dello stesso olio addizionato del 20 % di olio deodorato.

5.5. Valutazione quantitativa delle cere

Si procede al calcolo delle aree dei picchi corrispondente allo standard interno del lauril arachidato e agli esteri alifatici da C₄₀ a C₄₆ mediante un integratore.

Si calcola il contenuto totale in cere aggiungendo ogni singola cera, in mg/kg di sostanza grassa, come segue:

$$\text{Cere, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

dove:

A_x = area del picco del singolo estere, in unità di calcolo dell'integratore

A_s = area del picco dello standard interno del lauril arachidato, in unità di calcolo dell'integratore

m_s = massa di standard interno del lauril arachidato aggiunto, in milligrammi

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

▼B5.5.1. *Valutazione quantitativa dei metil ed etil esteri*

Si procede al calcolo delle aree dei picchi corrispondenti allo standard interno del metileptadecanoato, ai metil esteri degli acidi grassi a C₁₆ e C₁₈ e agli etil esteri degli acidi grassi C₁₆ e C₁₈ mediante un integratore.

Si calcola il contenuto di ogni singolo alchil estere, in mg/kg di sostanza grassa, come segue:

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

dove:

A_x = area del picco del singolo estere C₁₆ e C₁₈, in unità di calcolo dell'integratore

A_s = area del picco dello standard interno del metileptadecanoato, in unità di calcolo dell'integratore

m_s = massa di standard interno del metileptadecanoato aggiunto, in milligrammi

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

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Riportare la somma dei contenuti delle singole cere da C₄₀ a C₄₆ (*Nota 7*) in milligrammi per chilogrammo di sostanza grassa.

Riportare la somma dei singoli contenuti dei metil ed etil esteri da C₁₆ a C₁₈ e la loro somma.

▼C2

I risultati vengono espressi arrotondando al mg/kg più vicino.

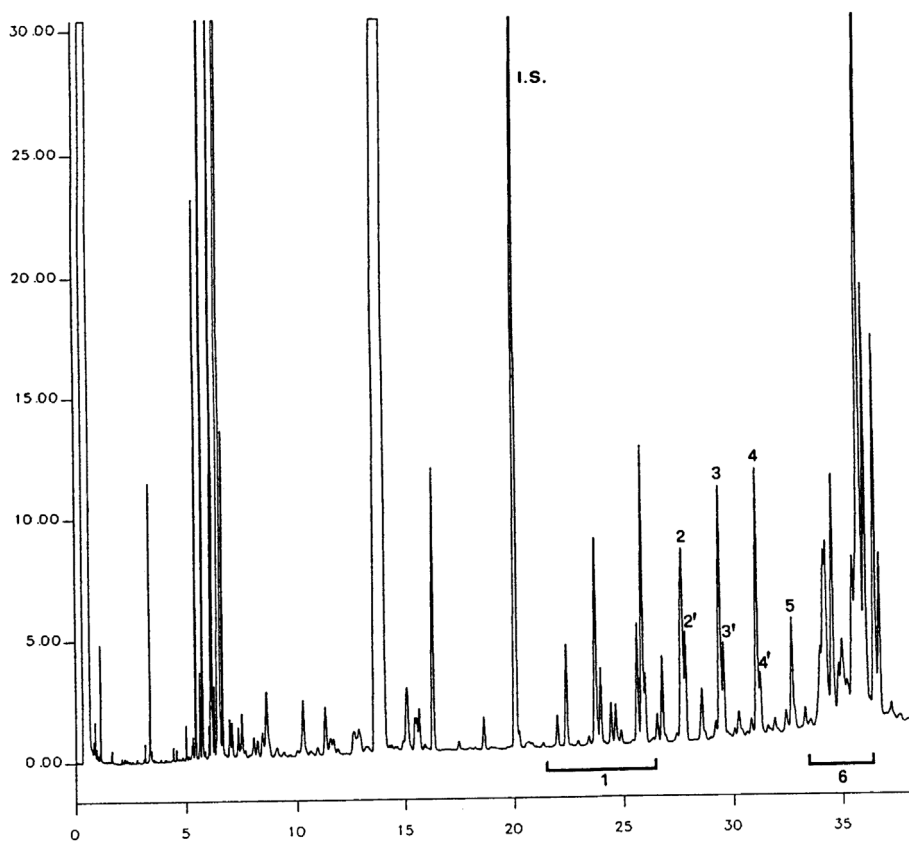
▼B

Nota 7: 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 allegata. Qualora l'estere C₄₆ risulti sdoppiato, si consiglia, ai fini della sua corretta identificazione, di analizzare la frazione cerosa di un olio di sansa dove il picco C₄₆ risulta individuabile in quanto nettamente maggioritario.

Riportare il rapporto tra etil esteri e metil esteri

▼ B

Figura 1

Esempio di cromatogramma della frazione cere di un olio di oliva ⁽¹⁾

Picchi con un tempo di ritenzione da 5 a 8 minuti dei metil ed etil esteri degli acidi grassi

Legenda:

Standard interno = lauril arachidato

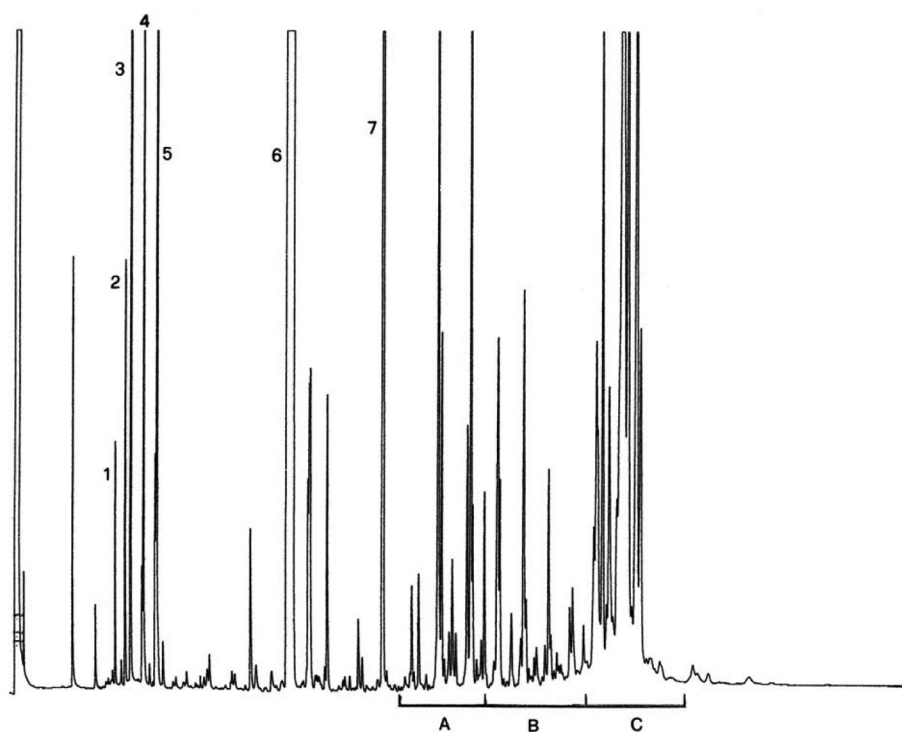
- 1 = Esteri diterpenici
- 2+2' = Esteri C₄₀
- 3+3' = Esteri C₄₂
- 4+4' = Esteri C₄₄
- 5 = Esteri C₄₆
- 6 = Esteri steroli e alcoli triterpenici

⁽¹⁾ Dopo l'eluzione degli esteri degli steroli il cromatogramma non deve presentare picchi significativi (trigliceridi).

▼ B

Figura 2

Metil ed etil esteri e cere di un olio vergine di oliva



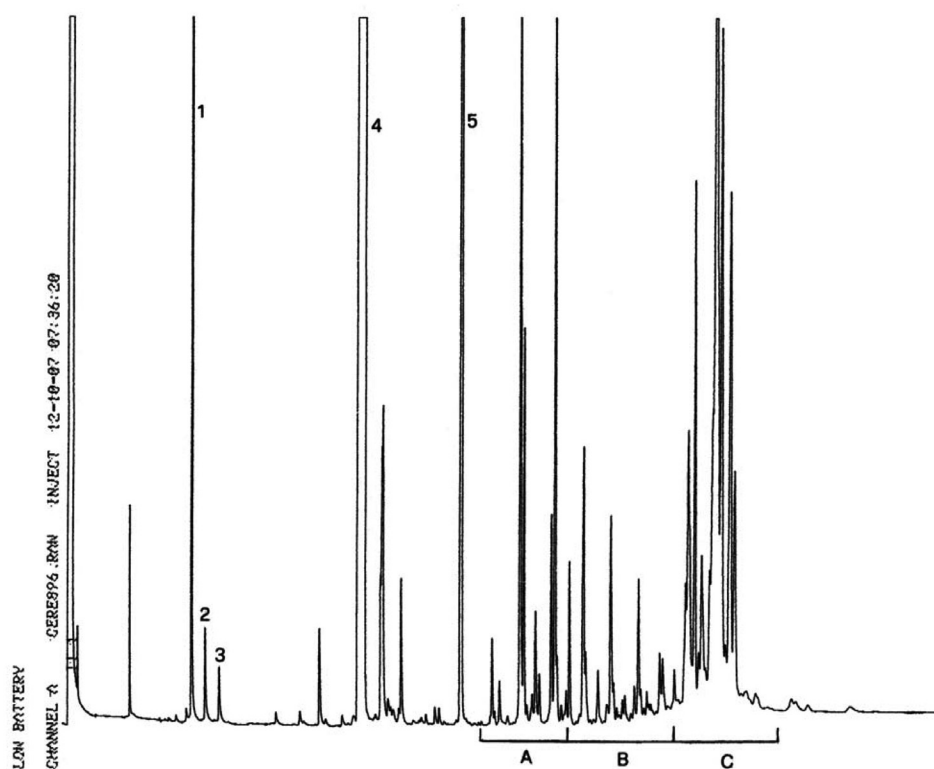
Legenda:

- 1 – Metile C_{16}
- 2 – Etile C_{16}
- 3 – Standard interno metileptadecanoato
- 4 – Metile C_{18}
- 5 – Etile C_{18}
- 6 – Squalene
- 7 – Standard interno lauril arachidato
- A – Esteri diterpenici
- B – Cere
- C – Esteri steroli e alcoli triterpenici

▼ B

Figura 3

Metil ed etil esteri e cere di un olio extra vergine di oliva



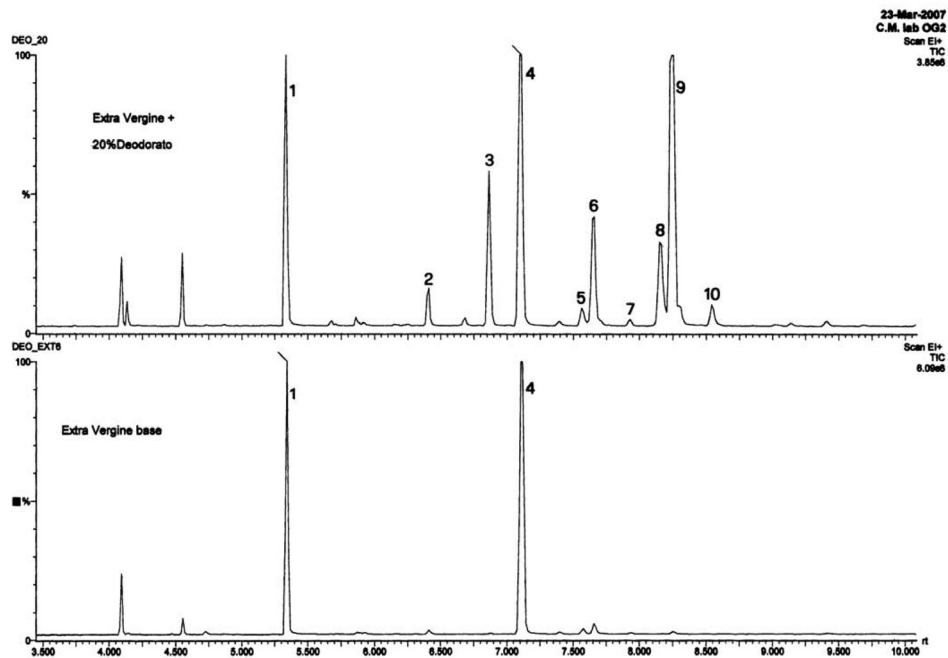
Legenda:

- 1 – Standard interno metileptadecanoato
- 2 – Metile C₁₈
- 3 – Etile C₁₈
- 4 – Squalene
- 5 – Standard interno lauril arachidato
- A – Esteri diterpenici
- B – Cere
- C – Esteri steroli e alcoli triterpenici

▼ B

Figura 4

Parte di cromatogramma relativa a un olio extra vergine di oliva e allo stesso olio addizionato di olio deodorato



Legenda:

- 1 – Standard interno metil miristato
- 2 – Metil palmitato
- 3 – Etil palmitato
- 4 – Standard interno metileptadecanoato
- 5 – Metil linoleato
- 6 – Metil oleato
- 7 – Metil stearato
- 8 – Etil linoleato
- 9 – Etil oleato
- 10 – Etil stearato

▼B*Appendice A***Determinazione della velocità lineare del gas**

Nel cromatografo, regolato alle normali condizioni operative, si iniettano 1:3 μ l di metano (o propano) e si cronometra il tempo che il gas impiega a percorrere la colonna, dal momento dell'iniezione al momento 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.»