REGOLAMENTO (CEE) N. 1058/77 DELLA COMMISSIONE

del 18 maggio 1977

relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e di taluni prodotti contenenti olio d'oliva e recante modifica della nomenclatura della tariffa doganale comune per quanto riguarda l'olio d'oliva

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea,

visto il regolamento n. 136/66/CEE del Consiglio, del 22 settembre 1966, relativo all'attuazione di un'organizzazione comune dei mercati nel settore dei grassi [1], modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 1707/73 [2], in particolare l'articolo 13, paragrafo 4, e l'articolo 18, paragrafo 3,

visto il regolamento n. 162/66/CEE del Consiglio, del 27 ottobre 1966, relativo agli scambi di grassi tra la Comunità e la Grecia [3], in particolare l'articolo 3, paragrafo 4, e l'articolo 9,

visto il regolamento (CEE) n. 443/72 del Consiglio, del 29 febbraio 1972, relativo ai prelievi applicabili all'olio d'oliva che ha subito un processo di raffinazione e ad alcuni prodotti contenenti olio d'oliva [4], in particolare l'articolo 8,

considerando che attualmente tutti gli oli d'oliva vergini sono inclusi nella sottovoce 15.07 A II a) della tariffa doganale comune ; che per tutti questi prodotti viene quindi fissato un unico prelievo ; che, per conseguire l'obiettivo prefisso del prelievo all'importazione, occorre fissare il medesimo per i diversi tipi di olio vergine, distinguendo a tal fine gli oli d'oliva secondo le loro caratteristiche fisico-chimiche ; che occorre pertanto ritoccare la nomenclatura della tariffa doganale comune ;

considerando che la nomenclatura tariffaria risultante dall'applicazione del regolamento n. 136/66/CEE è riprodotta nella tariffa doganale comune allegata al regolamento (CEE) n. 950/68 [5], modificato da ultimo dal regolamento (CEE) n. 874/77 [6] ;

considerando che, ai fini di un corretto funzionamento del regime di prelievi applicabile all'importazione delle sanse di olive, è opportuno prevedere un metodo unico per la determinazione del relativo tenore d'olio ;

considerando che il regolamento (CEE) n. 618/72 della Commissione, del 29 marzo 1972, relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e di alcuni prodotti contenenti olio d'oliva [7], è stato ripetutamente modificato, in particolare dal regolamento (CEE) n. 3366/75 [8] ; che, date le nuove modifiche da introdurre nel regolamento (CEE) n. 618/72, si è ritenuto opportuno abrogarlo e inserire in un nuovo regolamento il complesso delle disposizioni ;

considerando che le misure previste dal presente regolamento sono conformi al parere del comitato di gestione per i grassi,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO :

Articolo 1

1. È considerato olio d'oliva ai sensi della sottovoce 15.07 A della tariffa doganale comune unicamente l'olio proveniente dal trattamento delle olive, escluso l'olio d'oliva riesterificato e qualsiasi miscuglio di olio d'oliva con degli oli di altra natura.

La presenza di olio d'oliva riesterificato o di oli di altra natura viene accertata con i metodi indicati rispettivamente negli allegati VII e VIII.

2. Appartengono alle sottovoci 15.07 A I a), 15.07 A I b) e 15.07 A I c) della tariffa doganale comune gli oli che presentano le caratteristiche di cui all'allegato I, punti 1, 2 e 3. Per la determinazione di tali caratteristiche si applicano i metodi indicati negli allegati IV, V e VI.

3. Appartengono alla sottovoce 15.07 A II a) della tariffa doganale comune gli oli che presentano le caratteristiche di cui all'allegato I, punto 4.

4. Non appartengono alla sottovoce 15.17 A della tariffa doganale comune i prodotti della voce 15.17 aventi le caratteristiche riportate nell'allegato II.

Articolo 2

1. Il metodo di determinazione del tenore d'olio d'oliva delle sanse e degli altri residui dell'estrazione dell'olio d'oliva della sottovoce 23.04 A figura nell'allegato IX.

[1] GU n. 172 del 30. 9. 1966, pag. 3025/66.
[2] GU n. L 175 del 29. 6. 1973, pag. 5.
[3] GU n. 197 del 29. 10. 1966, pag. 3393/66.
[4] GU n. L 54 del 3. 3. 1972, pag. 3.
[5] GU n. L 172 del 22. 7. 1968, pag. 1.
[6] GU n. L 106 del 29. 4. 1977, pag. 20.
[7] GU n. L 78 del 31. 3. 1972, pag. 5.
[8] GU n. L 333 del 30. 12. 1975, pag. 13.

2. Il tenore di olio d'oliva di cui al paragrafo 1 è espresso in percentuale del suo peso rispetto a quello della materia secca.

Articolo 3

La tariffa doganale comune allegata al regolamento (CEE) n. 950/68 è modificata come segue :

1. Nella nota complementare 1 del capitolo 15, la voce « 15.07 » è modificata in « sottovoce 15.07 D ».
2. Le note complementari 2, 3 e 4 del capitolo 15 sono sostituite dalle note complementari 2, 3 e 4 contenute nell'allegato III del presente regolamento.
3. Il testo della sottovoce 15.07 A è modificato come segue :

N. della tariffa	Designazione delle merci	Aliquota dei dazi	
		autonomi % o prelievi (P)	convenzionali %
1	2	3	4
15.07	A. Olio d'oliva :		
	I. non trattato :		
	a) Olio d'oliva vergine	20 (P)	—
	b) Olio d'oliva vergine lampante	20 (P)	—
	c) altro	20 (P)	—
	II. altro :		
	a) ottenuto dal trattamento degli oli delle sottovoci 15.07 A I a) o 15.07 A I b), anche tagliato con olio d'oliva vergine	20 (P)	—
	b) non nominato	20 (P)	—

Articolo 4

In tutti gli atti comunitari, ogni eventuale richiamo alle sottovoci 15.07 A II o 15.07 A I a) e b) della tariffa doganale comune è da intendersi riferito, secondo le caratteristiche del prodotto in questione, rispettivamente alle sottovoci 15.07 A I a), b) e c) e 15.07 A II a) e b) della tariffa doganale comune.

Articolo 5

Il regolamento (CEE) n. 618/72 della Commissione, del 29 marzo 1972, è abrogato.

Articolo 6

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

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

Fatto a Bruxelles, il 18 maggio 1977.

Per la Commissione

Il Vicepresidente

Finn GUNDELACH

ALLEGATO

Sommario

		Pagine
ALLEGATO I :	Caratteristiche degli oli d'oliva	9
ALLEGATO II :	Prodotti della sottovoce 15.17 A	10
ALLEGATO III :	Note complementari 2, 3 e 4 al capitolo 15 della tariffa doganale comune	10
ALLEGATO IV :	I. Trattamento del campione con allumina attivata	12
	II. Neutralizzazione e decolorazione dell'olio d'oliva in laboratorio	12
ALLEGATO V :	Ricerca della presenza di olio di sansa negli oli d'oliva	14
	A. Metodo detto « di Bellier »	14
	B. Metodo di Vizern modificato	14
ALLEGATO VI :	Ricerca dei saponi, intesa ad evidenziare l'alcalinità	16
ALLEGATO VII :	Ricerca della presenza degli oli riesterificati	16
ALLEGATO VIII :	Ricerca della presenza di altri oli nell'olio d'oliva : analisi della frazione sterolica delle sostanze grasse	20
ALLEGATO IX :	Metodo di determinazione del tenore in olio d'oliva delle sanse	24

ALLEGATO I

CARATTERISTICHE DEGLI OLI D'OLIVA

1. È considerato « olio d'oliva vergine », ai sensi della sottovoce 15.07 A I a) della tariffa doganale comune, l'olio d'oliva naturale ottenuto unicamente mediante processi meccanici, ivi compresa la pressione, ad esclusione di qualsiasi miscela con olio d'oliva ottenuto in modo diverso, che presenti le seguenti caratteristiche :

   a) un tenore in acidi grassi liberi, espresso in acido oleico, non superiore al 3 % ;

   b) un coefficiente di estinzione K_{270} [coefficiente di assorbimento sotto uno spessore di 1 cm di una soluzione costituita da 1 g di olio in 100 ml di isottano (2,2,4-trimetilpentano) misurata alla lunghezza d'onda di 270 nm] non superiore a 0,25 e, dopo trattamento del campione d'olio su allumina attivata, non superiore a 0,11 ;

   c) una variazione del coefficiente di estinzione, in prossimità di 270 nm, non superiore a 0,01.

   Tale variazione è definita dall'espressione seguente :

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$$

   nella quale :

   K_m designa il coefficiente di estinzione alla lunghezza d'onda del massimo della curva di assorbimento in prossimità di 270 nm,

   K_{m-4} e K_{m+4} designano i coefficienti di estinzione alle lunghezze d'onda rispettivamente inferiori o superiori di 4 nm a quella di K_m ;

   d) esito negativo delle reazioni di Bellier e di Vizern modificata, eseguite conformemente ai metodi riportati all'allegato V, punti A e B ;

   e) esito negativo della ricerca dei saponi effettuata conformemente al metodo riportato all' allegato VI.

2. Viene considerato « olio d'oliva vergine lampante », ai sensi della sottovoce 15.07 A I b) della tariffa doganale comune, indipendentemente dalla sua acidità, l'olio di oliva che presenti le caratteristiche seguenti :

   a) un coefficiente di estinzione K_{270} superiore a 0,25 e, dopo trattamento del campione su allumina attivata, non superiore a 0,11.

   Alcuni oli aventi un tenore in acidi grassi liberi, espresso in acido oleico, superiore al 3 %, dopo passaggio su allumina attivata possono avere un coefficiente di estinzione K_{270} superiore a 0,11. In tal caso, dopo neutralizzazione e decolorazione, effettuata in laboratorio, conformemente al metodo riportato all'allegato IV, essi debbono presentare le caratteristiche seguenti :

   — un coefficiente di estinzione K_{270} non superiore ad 1,10,

   — una variazione del coefficiente di estinzione in prossimità di 270 nm, superiore a 0,01 e non superiore a 0,16 ;

   b) esito negativo delle reazioni di Bellier e di Vizern modificata, eseguite conformemente ai metodi riportati all'allegato V, punti A e B ;

   c) esito negativo della ricerca dei saponi, effettuata conformemente al metodo riportato all' allegato VI.

3. Sono considerati come rientranti nella sottovoce 15.07 A I c) della tariffa doganale comune gli oli, e particolarmente gli oli di sansa, che presentino le caratteristiche seguenti :

   a) tenore in acidi grassi liberi, espresso in acido oleico, superiore al 3 % ;

   b) esito positivo della reazione di Bellier e/o di Vizern modificata, eseguite conformemente ai metodi riportati all'allegato V, punti A e B ;

   c) esito negativo della ricerca dei saponi effettuata conformemente al metodo riportato all' allegato VI.

4. È considerato come rientrante nella sottovoce 15.07 A II a) della tariffa doganale comune l'olio d'oliva ottenuto dal trattamento degli oli delle sottovoci 15.07 A I a) e 15.07 A I b), anche se tagliato con olio d'oliva vergine, che presenti le seguenti caratteristiche :

   a) un tenore in acidi grassi liberi, espresso in acido oleico, non superiore al 3 % ;

   b) esito positivo della ricerca dei saponi, effettuata conformemente al metodo riportato all' allegato VI,

oppure :

— un coefficiente di estinzione K_{270} superiore a 0,25 e non superiore ad 1,10 e, dopo trattamento del campione d'olio su allumina attivata, superiore a 0,11

ed

— una variazione del coefficiente d'estinzione in prossimità dei 270 nm non superiore a 0,01 e non superiore a 0,16.

Tale variazione è definita dall'espressione seguente :

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$$

nella quale :

K_m designa il coefficiente di estinzione alla lunghezza d'onda del massimo della curva di assorbimento in prossimità di 270 nm,

K_{m-4} e K_{m+4} designano i coefficienti di estinzione alle lunghezze d'onda rispettivamente inferiori e superiori di 4 nm a quella di K_m ;

c) esito negativo delle reazioni di Bellier e di Vizern modificata, eseguite conformemente ai metodi riportati all'allegato V, punti A e B.

ALLEGATO II

PRODOTTI DELLA SOTTOVOCE 15.17 A

Sono esclusi dalla sottovoce 15.17 A :

a) i residui provenienti dalla lavorazione delle sostanze grasse contenenti dell'olio per il quale l'indice di iodio, determinato secondo il metodo di Vijs senza catalizzatore, è inferiore a 70 o superiore a 100 ;

b) i residui provenienti dalla lavorazione delle sostanze grasse contenenti dell'olio per il quale l'indice di iodio è compreso tra 70 e 100, ma la cui superficie del picco corrispondente al volume di ritenzione del β-sitosterolo determinata conformemente alle disposizioni dell'allegato VIII del regolamento di cui alla seguente nota complementare 4 rappresenta meno del 93 % della superficie totale dei picchi degli steroli.

ALLEGATO III

NOTE COMPLEMENTARI 2, 3 E 4 DEL CAPITOLO 15 DELLA TARIFFA DOGANALE COMUNE

2. A. È considerato olio d'oliva ai sensi della sottovoce 15.07 A solo l'olio proveniente esclusivamente dal trattamento delle olive, escluso l'olio d'oliva riesterificato e qualsiasi miscela di olio d'oliva con oli di altra natura.

B. Sono considerati oli di oliva non trattati gli oli definiti qui di seguito ai punti I, II e III :

I. È considerato « olio di oliva vergine », ai sensi della sottovoce 15.07 A I a) della tariffa doganale comune, l'olio d'oliva naturale ottenuto unicamente mediante processi meccanici, ivi compresa la pressione, ad esclusione di qualsiasi miscela con olio d'oliva ottenuto in modo diverso, che presenti le seguenti caratteristiche :

a) un tenore in acidi grassi liberi, espresso in acido oleico, non superiore al 3 % ;

b) un coefficiente di estinzione K_{270} [coefficiente di assorbimento sotto uno spessore di 1 cm di una soluzione costituita da 1 g di olio in 100 ml di isottano (2,2,4-trimetilpentano) misurata alla lunghezza l'onda di 270 nm] non superiore a 0,25 e, dopo trattamento del campione d'olio su allumina attivata, non superiore a 0,11 ;

c) una variazione del coefficiente di estinzione, in prossimità di 270 nm, non superiore a 0,01.

Tale variazione è definita dall'espressione seguente :

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$$

nella quale :

K_m designa il coefficiente di estinzione alla lunghezza d'onda del massimo della curva di assorbimento in prossimità di 270 nm,

K_{m-4} e K_{m+4} designano i coefficienti di estinzione alle lunghezze d'onda rispettivamente inferiori o superiori di 4 nm a quella di K_m ;

d) esito negativo delle reazioni di Bellier e di Vizern modificata ;

e) esito negativo della ricerca dei saponi.

II. Viene considerato « olio d'oliva lampante », ai sensi della sottovoce 15.07 A I b) della tariffa doganale comune, indipendentemente dalla sua acidità, l'olio d'oliva che presenti le caratteristiche seguenti :

a) un coefficiente di estinzione K_{270} superiore a 0,25 e, dopo trattamento del campione su allumina attivata, non superiore a 0,11.

Alcuni oli aventi un tenore in acidi grassi liberi, espresso in acido oleico, superiore al 3 % dopo passaggio su allumina attivata possono avere un coefficiente di estinzione K_{270} superiore a 0,11. In tal caso, dopo neutralizzazione e decolorazione effettuata in laboratorio, essi debbono presentare le caratteristiche seguenti :

— un coefficiente di estinzione K_{270} non superiore ad 1,10,

— una variazione del coefficiente di estinzione, in prossimità di 270 nm, superiore a 0,01 e non superiore a 0,16 ;

b) esito negativo delle reazioni di Bellier e di Vizern modificata ;

c) esito negativo della ricerca dei saponi.

III. Sono considerati come rientranti nella sottovoce 15.07 A I c) gli oli, e particolarmente gli oli di sansa, che presentano le caratteristiche seguenti :

a) tenore in acidi grassi liberi, espresso in acido oleico, superiore al 3 % ;

b) esito positivo della reazione di Bellier e/o di Vizern modificata ;

c) esito negativo della ricerca dei saponi.

C. È considerato come rientrante nella sottovoce 15.07 A II a) l'olio d'oliva ottenuto dal trattamento degli oli delle sottovoci 15.07 A I a) e 15.07 A I b), anche se tagliato con olio d'oliva vergine, che presenti le seguenti caratteristiche :

a) un tenore in acidi grassi liberi, espresso in acido oleico, non superiore al 3 % ;

b) esito positivo della ricerca dei saponi,

oppure :

— un coefficiente di estinzione K_{270} superiore a 0,25 e non superiore ad 1,10 e, dopo trattamento del campione d'olio su allumina attivata, superiore a 0,11

ed

— una variazione del coefficiente d'estinzione in prossimità dei 270 nm superiore a 0,01 e non superiore a 0,16.

Tale variazione è definita dall'espressione seguente :

$$\Delta K = K_m - 0{,}5\ (K_{m-4} + K_{m+4})$$

nella quale :

K_m designa il coefficiente di estinzione alla lunghezza d'onda del massimo della curva di assorbimento in prossimità di 270 nm,

K_{m-4} e K_{m+4} designano i coefficienti di estinzione alle lunghezza d'onda rispettivamente inferiori e superiori di 4 nm a quella di K_m ;

c) esito negativo delle reazioni di Bellier e di Vizern modificata.

3. Sono esclusi dalla sottovoce 15.17 A :

   a) i residui provenienti dalla lavorazione delle sostanze grasse contenenti dell'olio per il quale l'indice di iodio, determinato secondo il metodo di Wijs senza catalizzatore, è inferiore a 70 o superiore a 100 ;

   b) i residui provenienti dalla lavorazione delle sostanze grasse contenenti dell'olio per il quale l'indice di iodio è compreso tra 70 e 100, ma la cui superficie del picco corrispondente al volume di ritenzione del beta-sitosterolo determinata conformemente alle disposizioni dell'allegato VIII del regolamento di cui alla seguente nota complementare 4 rappresenta meno del 93 % della superficie totale dei picchi degli steroli.

4. I metodi di analisi per la determinazione delle caratteristiche dei prodotti di cui sopra sono quelli previsti agli allegati del regolamento (CEE) n. 1058/77.

ALLEGATO IV

I. TRATTAMENTO DEL CAMPIONE CON ALLUMINA ATTIVATA

1. Introdurre 30 g di allumina basica, ottenuta mediante il procedimento descritto al paragrafo 2, in una colonna da cromatografia del diametro di circa 35 mm e della lunghezza di 450 mm, munita di un tubo di deflusso del diametro di circa 10 mm.

   Pigiare meccanicamente l'allumina, lasciando cadere adagio la colonna mantenuta in posizione verticale, ripetutamente, su una superficie di legno. Introdurre nella colonna così preparata 100 ml di una soluzione al 10 % di olio nell'esano.

   Raccogliere l'eluato ed evaporare il solvente sotto vuoto a una temperatura inferiore ai 25°.

   Sull'olio così ottenuto la determinazione del coefficiente di estinzione a 270 nm deve essere effettuata immediatamente.

2. L'allumina basica di attività Brockmann I (0 % di acqua) si ottiene riscaldando per tre ore a 380-400° allumina basica (per cromatografia) di granulometria compresa tra 30 e 130 µm (80µm di media). Aggiungere a 100 g del prodotto suddetto 5 ml di acqua distillata per ottenere allumina basica di una attività Brockmann compresa tra II e III. Agitare con frequenza e lasciare riposare per una notte in un recipiente chiuso ermeticamente.

   Verifica dell'attività dell'allumina

   Introdurre 30 g di allumina basica (ottenuta nella maniera sopraindicata) in una colonna per cromatografia del diametro di circa 35 mm e della lunghezza di 450 mm ; far passare attraverso questa colonna, alle condizioni specificate dal metodo, una miscela di 95 % di olio vergine con coefficiente di estinzione K_{270} inferiore a 0,18 e di 5 % di un olio d'arachide trattato durante la raffinazione con terre decoloranti e avente un coefficiente di estinzione K_{270} eguale o superiore a 4. Se la miscela presenta un coefficiente di estinzione superiore a 0,11, l'allumina è accettabile. Se l'eluzione dei trieni coniugati non si è prodotta su questa allumina, bisogna utilizzare un'allumina più idratata, dopo aver verificato che essa soddisfi le esigenze del testo precedente.

II. NEUTRALIZZAZIONE E DECOLORAZIONE DELL'OLIO D'OLIVA IN LABORATORIO

A. NEUTRALIZZAZIONE DELL'OLIO

1. **Apparecchiatura**

   — bicchiere da 300 ml a forma alta,
   — centrifuga da laboratorio con provette da 100 ml,
   — bicchiere da 250 ml,
   — palloncini da 100 ml,
   — imbuto separatore da 1 litro.

2. **Reattivi**

— soluzione acquosa di idrossido di sodio al 12 %,
— soluzione etilalcolica all'1 % di fenolftaleina,
— esano puro per analisi,
— alcool isopropilico per analisi.

3. **Modo di operare**

a) *Olio con acidità, espressa in acido oleico, inferiore al 30 %*

In un bicchiere da 300 ml a forma alta si pongono 50 g di olio greggio e si riscalda a 65° su bagnomaria. Sotto lenta agitazione si aggiunge una quantità di soluzione di idrossido di sodio al 12 % corrispondente all'acidità libera dell'olio, con un eccesso del 5 %. Si prosegue l'agitazione per 5 minuti, mantenendo la temperatura a 65°.

Si trasferisce il tutto in provette da centrifuga aventi capacità di 100 ml e si separano le paste saponose per centrifugazione. Si versa l'olio decantato in un bicchiere da 250 ml e si lava con 50-60 ml di acqua distillata bollente eliminando per sifonamento lo strato acquoso. Si ripetono i lavaggi sino alla completa rimozione delle tracce di saponi residui (scomparsa della colorazione rosea alla fenolftaleina).

Si centrifuga l'olio per eliminare le piccole quantità di acqua residua.

b) *Oli con acidità, espressa in acido oleico, superiore al 30 %*

In un imbuto separatore da 1 litro si pongono 50 g di olio greggio, 200 ml di esano, 100 ml di alcool isopropilico e una quantità della soluzione di idrossido di sodio al 12 %, corrispondente all'acidità libera dell'olio, con un eccesso dello 0,3 %.

Si agita energicamente per 1 minuto. Si aggiungono 100 ml di acqua distillata, si agita nuovamente e si lascia a riposo. Dopo stratificazione, si allontana lo strato inferiore contenente i saponi. In molti casi fra i due strati (oleoso superiore, acquoso inferiore), si forma uno strato intermedio, costituito da mucillagini e di sostanze insolubili che devono parimenti essere allontanate.

Si procede quindi al lavaggio della soluzione esanica dell'olio neutro con porzioni di 50-60 ml di una soluzione di alcool isopropilico/acqua distillata 1/1 (v/v) fino a scomparsa della colorazione rosea alla fenolftaleina.

Si allontana quindi completamente l'esano per distillazione sotto vuoto (ad esempio in evaporatore rotavivo).

B. DECOLORAZIONE DELL'OLIO NEUTRALIZZATO

1. **Apparecchiatura**

— pallone da 250 ml a 3 colli, con attacchi a smeriglio per l'inserimento di :
  a) un termometro con divisioni in gradi, permettente misure fino a 90° ;
  b) un agitatore meccanico con velocità di rotazione di 250-300 giri/minuto equipaggiato per funzionare sotto vuoto ;
  c) un raccordo per la pompa a vuoto ;
— pompa a vuoto, in grado di dare pressioni residue di 15-30 millibar e relativo manometro.

2. **Modo di operare**

Nel pallone a 3 colli si pesano circa 100 g dell'olio neutralizzato. Si inseriscono il termometro e l'agitatore ; si opera il collegamento con la pompa per vuoto e si riscalda fino a 90° agitando, si mantiene tale temperatura, sempre agitando, sino a quando l'olio in esame non risulti completamente deacquificato (30 minuti circa).

Si interrompe quindi il vuoto e si aggiungono 2-3 g di terra attivata. Si stabilisce il collegamento con il vuoto fino a raggiungere una pressione residua di 15-30 millibar, sempre mantenendo la temperatura a 90°, si agita per 30 minuti intorno ai 250 giri/minuto.

Si filtra poi a caldo in stufa termostatica (50—60°).

ALLEGATO V

RICERCA DELLA PRESENZA DI OLIO DI SANSA NEGLI OLI D'OLIVA

A. METODO DETTO « DI BELLIER »

1. Apparecchiatura

— matraccio da 100 ml munito di refrigeratore a riflusso,

— pipetta, graduata in decimi, da 5 ml,

— sistema per riscaldare, che consenta di raggiungere la temperatura di circa 80°,

— termometro da 15 a 60°.

2. Reattivi

— soluzione di idrossido di potassio (42,5 g di KOH sciolti in 72 ml di acqua distillata il tutto portato a 500 ml con alcool etilico a 95°),

— soluzione di alcool etilico, titolo 70°,

— soluzione acquosa di acido acetico, all'1 + 2 (in volume), dosata in modo che 1,5 ml neutralizzino esattamente 5 ml della soluzione idroalcolica di idrossido di potassio in presenza di fenolftaleina.

3. Preparazione del campione

L'olio è privato dell'acqua mediante decantazione e filtrazione su filtro di carta effettuate a una temperatura lievemente superiore al punto di fusione di alcuni costituenti concreti che avrebbero potuto separarsi dalla sostanza grassa fluida.

4. Modo di operare

Introdurre nel matraccio 1 ml circa di olio preparato come indicato al paragrafo 3. Aggiungere 5 ml di soluzione di idrossido di potassio. Adattare il refrigerante a riflusso e portare ad ebollizione per 10 minuti agitando ogni tanto, lasciare raffreddare sino a temperatura ambiente. Aggiungere 1,5 ml di soluzione acquosa di acido acetico e 50 ml di soluzione di alcool etilico, precedentemente portata alla temperatura di 50°. Mescolare agitando, introdurre il termometro e lasciar raffreddare, osservando l'aspetto della soluzione non appena questa raggiunge la temperatura di 45°. La formazione di un precipitato fioccoso a una temperatura superiore a 40° indica che la reazione è positiva. In assenza del precipitato fioccoso caratteristico, mantenere il liquido a temperatura ambiente, che deve essere compresa tra i 20° e i 22°, per almeno 24 ore o, se necessario, per 48 ore. Osservare nuovamente la soluzione : la formazione di un precipitato fioccoso che galleggia nel mezzo del liquido indica egualmente che la reazione è positiva.

Espressione dei risultati

Ricerca dell'olio di sansa (metodo di Bellier) : positiva o negativa.

B. METODO DI VIZERN MODIFICATO

Si isola l'insaponificabile dell'olio da analizzare e si studia il suo comportamento in soluzione nell'alcool ad 85° in determinate condizioni.

1. Materiale

— palloni da 300 ml, in vetro resistente agli alcali, muniti di refrigerante a riflusso,

— imbuti separatori da 500 ml o da 1000 ml,

— becher da 300 ml e da 250 ml,

— cilindro in vetro.

2. Reattivi

— soluzione alcoolica di idrossido di potassio 2N,

— etere di petrolio,

— alcool etilico al 50 %,

— alcool etilico a 96°, misurato all'alcoolometro,

— acqua ossigenata a 10 volumi,

— alcool etilico ad 85°, misurato all'alcoolometro.

3. Modo di operare

Pesare circa 5 g del campione da analizzare in un pallone da 300 ml. Aggiungere 50 ml della soluzione alcoolica di idrossido di potassio 2N. Montare il refrigerante a riflusso e portare a leggera ebollizione. Agitare dopo un'ora di riscaldamento, raffreddare a 30-35 °C e travasare in un imbuto separatore utilizzando 50 ml d'acqua distillata.

Lavare accuratamente il pallone con 50 ml di etere di petrolio ; ripetere più volte l'operazione. Travasare l'etere di petrolio in un imbuto separatore. Agitare energicamente il contenuto per poco più di un minuto. Dopo decantazione, eliminare la fase acquosa travasandola in un secondo imbuto separatore. Aggiungere ancora 50 ml di etere di petrolio, agitare energicamente il contenuto un po' più di un minuto e lasciar decantare. La fase acquosa è travasata in un terzo imbuto separatore, nel quale si aggiungono ancora 50 ml di etere di petrolio. Successivamente, agitare energicamente e lasciar decantare.

Raccogliere in un imbuto separatore gli estratti eterei provenienti dalle diverse estrazioni dell'insaponificabile e lavare almeno tre volte con alcool al 50 % (50 ml per volta), finché il liquido di lavaggio non manifesti più reazione basica alla fenolftaleina.

Filtrare la soluzione dell'insaponificabile in un pallone da 300 ml, lavare il filtro con etere di petrolio ed eliminare il solvente per distillazione. Aggiungere 10 ml di alcool a 96° e, dopo riscaldamento moderato (circa 40 °C), filtrare in un becher da 100 ml. Lavare il pallone da 300 ml con 10 ml di alcool a 96° e filtrare poi nel secondo becher.

Nel becher da 100 ml, contenente gli estratti alcoolici dell'insaponificabile, aggiungere 5 ml di acqua ossigenata a 10 volumi ; riscaldare a bagnomaria fino ad evaporazione completa. Aggiungere ancora 20 ml di alcool a 96 °C e 5 ml d'acqua ossigenata ; lasciar di nuovo evaporare completamente.

Ritirare il becher dal bagnomaria ed aggiungere 20 ml di alcool ad 85°. Riscaldare prudentemente a bagnomaria, facendo molta attenzione a non provocare perdite di alcool per non diminuire la concentrazione. Si tratta di un fattore molto importante, che non va trascurato.

Filtrare su carta, raffreddare ed esaminare il comportamento della soluzione in capo ad un'ora, e poi a quattro ore. Se, dopo un'ora, la soluzione è assolutamente trasparente, l'analisi è negativa, vale a dire non vi è olio di sansa.

Se dopo un'ora la soluzione è torbida, ripetere l'osservazione quattro ore dopo.

Se in capo a quattro ore la soluzione è ancora torbida, ma non presenta fiocchi, l'analisi è ancora negativa. Al contrario, se si osserva la formazione di fiocchi, l'analisi è positiva e si è in presenza di olio di sansa.

Espressione dei risultati

Ricerca dell'olio di sansa (metodo Vizern modificato) : positiva o negativa.

Osservazioni

Gli oli d'oliva danno una soluzione trasparente o al massimo leggermente opalina durante tutto il saggio. Gli oli di sansa, puri o miscelati, presentano dei fiocchi caratteristici che restano in sospensione come piccole nuvole e che finiscono per depositarsi in capo a parecchie ore di riposo.

ALLEGATO VI

RICERCA DEI SAPONI, INTESA AD EVIDENZIARE L'ALCALINITÀ

Principio del metodo

Evidenziamento dei saponi alcalini attraverso l'azione sul blu di bromofenolo.

Reattivi

— soluzione all'1 % di blu di bromofenolo nell'etanolo al 96 % (v/v);

— acetone distillato di recente, addizionato del 2 % d'acqua (v/v).

L'acetone contenente il 2 % d'acqua deve presentare una colorazione gialla o giallo-verdastra in presenza di qualche goccia della soluzione di blu di bromofenolo.

Materiale

provetta da 150 mm × 15 mm.

Modo di operare

Introdurre nella provetta 10 ml di acetone ed una goccia di soluzione di bromofenolo ; la soluzione dovrebbe virare al giallo. Altrimenti, sciacquare la provetta ed il tappo con acetone, fino a scomparsa della colorazione azzurra. Introdurre 10 g d'olio nella provetta, tapparla con un tappo pulito, agitare e lasciar riposare. Un viraggio verso l'azzurro nello strato superiore d'acetone indica la presenza di sapone.

Espressione dei risultati

I risultati sono espressi come positivi o negativi.

ALLEGATO VII

RICERCA DELLA PRESENZA DEGLI OLI RIESTERIFICATI

Il metodo ha lo scopo di determinare negli oli e grassi la composizione della frazione di acidi grassi esterificati in posizione 2 (posizione β, o posizione interna) del glicerolo ; gli oli d'oliva riesterificati contengono una maggiore quantità di acido palmitico in posizione β rispetto agli oli di oliva non riesterificati.

Principio

Questo metodo è fondato sull'idrolisi parziale e specifica dei trigliceridi per opera della lipasi pancreatica, con formazione preferenziale di mono-2 gliceridi. Detta idrolisi conduce ad una miscela che racchiude, accanto ai trigliceridi non idrolizzati, dei digliceridi, dei mono-2 gliceridi e degli acidi grassi liberi. Tale miscela viene frazionata per cromatografia su strato sottile, ed i monogliceridi vengono isolati. Questi monogliceridi sono metanolizzati, e gli esteri metilici ottenuti sono analizzati per via gascromatografica.

Il prodotto analizzato dev'essere considerato addizionato di olio riesterificato allorché la percentuale di acido palmitico riscontrato nella posizione 2 dei trigliceridi è superiore al 2 %.

1. **Materiale**

— imbuto separatore da 500 ml,

— colonna di vetro per cromatografia, avente 13 mm di diametro interno e 400 mm di lunghezza, provvista di lastra in vetro sinterizzato e di rubinetto,

— pallone da 250 ml a collo largo,

— pallone da 100 ml,

— provetta da centrifuga da 10 ml con tappo smerigliato,

— siringa ipodermica da 1 ml, provvista di ago sottile,

— pallone da 25 ml, con refrigerazione ad aria di circa 1 m di lunghezza, con raccordo smerigliato,
— bicchiere da 50 ml,
— buretta da 5 ml graduata in 1/20 ml,
— stratificatore per cromatografia su strato sottile, con lastre di vetto di 20 × 20 cm,
— microsiringa che eroga gocce di 3-4 µl,
— vasca per cromatografia su strato sottile,
— evaporatore rotante,
— stufa regolabile a 103 °C ± 2 °C,
— termostato regolabile tra 30 °C e 45 °C a ± 0,5 °C,
— agitatore elettrico vibrante che consenta una agitazione energica della provetta da centrifuga,
— polverizzatore per cromatografia su strato sottile,
— lampada a raggi ultravioletti per l'esame delle lastre cromatografiche,
— agitatore da laboratorio, di tipo opportuno per la dispersione e la miscelazione di materiali eterogenei,
— pH metro,
— agitatore ad elica,
— cronometro.

2. **Reattivi**

— soluzione acquosa di idrossido di sodio al 12 % (m/v),
— soluzione all'1 % (m/v) di fenolftaleina in etanolo al 95 % (v/v),
— etere etilico, esente da perossidi,
— alcole isopropilico oppure alcole etilico al 95 % (v/v), per analisi,
— allumina attivata per cromatografia, neutra, con grado di attività Brockmann I, di recente attività per due ore a 260 °C e conservata in un essiccatore,
— esano, o in mancanza, etere di petrolio (Eb = 30-50 °C), per cromatografia,
— acido formico almeno al 98 % (m/m),
— lipasi pancreatica di attività adeguata (nota 1, nota 2),
— soluzione tampone : soluzione acquosa 1 M di tris-idrossimetilamminometano portata a pH 8 con acido cloridrico 6 N (controllo potenziometrico),
— soluzione acquosa all'0,1 % (m/v) di colato di sodio (qualità enzimatica),
— soluzione di acido cloridrico 6 N,
— solvente di sviluppo : esano (o, in sua mancanza, etere di petrolio)/etere etilico/acido formico 70/30/1 (v/v/v),
— soluzione acquosa di gomma arabica al 10 % (m/v),
— soluzione acquosa di cloruro di calcio ($CaCl_2$) al 22 % (m/v),
— soluzione alcoolica allo 0,2 % (m/v) di dicloro-2'-7'-fluoresceina, leggermente alcalinizzata per aggiunta di una goccia di idrossido di sodio 1 N per 100 ml,
— silice in polvere con legante di qualità per cromatografia su strato sottile,
— soluzione acquosa di colato di sodio al 20 % (m/v),
— soluzione acquosa di idrossido di sodio 0,1 N,
— olio vegetale neutralizzato.

3. **Preparazione del campione**

Campione di acidità inferiore al 3 % : neutralizzazione diretta su allumina secondo il paragrafo 3.2.

Campione di acidità superiore al 3 % : neutralizzazione con alcali in presenza di solvente secondo il paragrafo 3.1, poi passaggio su allumina secondo il paragrafo 3.2.

3.1. *Neutralizzazione con alcali in presenza di solvente*

Versare in un matraccio di decantazione da 500 ml circa 10 g di olio grezzo, 100 ml di esano o, in mancanza, di etere di petrolio, 50 ml di alcole isopropilico o di alcole etilico al 95 %, qualche goccia della soluzione di fenolftaleina e una quantità della soluzione di idrossido di sodio al 12 % corrispondente all'acidità libera dell'olio, più un eccesso dello 0,3 %. Agitare energicamente per un minuto ; aggiungere 50 ml di acqua distillata, agitare nuovamente e lasciar riposare.

Dopo decantazione, eliminare lo strato inferiore contenente i saponi. Eliminare gli eventuali strati intermedi (mucillagini e sostanze insolubili). Lavare la soluzione esanica dell'olio neutralizzato con porzioni successive di 25 o 30 ml di una soluzione di alcole isopropilico o etilico e di acqua distillata 1/1 (v/v) fino a scomparsa della colorazione rosa della fenolftaleina.

Eliminare la massima parte dell'esano mediante distillazione sotto vuoto ed essiccare l'olio a 30-40 °C sotto vuoto in corrente d'azoto puro fino alla eliminazione totale del solvente.

3.2. *Passaggio su allumina*

Preparare una sospensione di 15 g di allumina attivata in 50 ml di esano, o, in mancanza, di etere di petrolio, e versare agitando in una colonna di vetro per cromatografia. Regolarizzare la ripartizione dell'allumina e lasciar defluire il solvente fino ad 1-2 mm al di sopra del livello superiore dell'assorbente. Versare cautamente nella colonna una soluzione preparata circa 15 minuti prima disciogliendo 5 g di olio in 25 ml di esano, o, in mancanza, di etere di petrolio, e raccogliere in un pallone da 100 ml la totalità del liquido che esce dalla colonna.

Eliminare per distillazione sotto vuoto la maggior parte del solvente, poi essiccare l'olio a 30-40 °C sotto vuoto, in corrente di azoto puro, fino ad eliminazione totale del solvente.

4. **Preparazione delle lastre cromatografiche**

In un pallone di 250 ml a collo largo mettere 30 g di silice in polvere con legante e 60 ml di acqua distillata ed agitare fino ad ottenimento di una poltiglia ben omogenea. Degassare mantenendo sotto il vuoto della pompa per 1 minuto.

Stratificare nelle condizioni usuali la poltiglia sulle lastre per mezzo dell'apparecchio stratificatore, regolando lo spessore dello strato a 0,25 mm.

La quantità della suddetta poltiglia è sufficiente per la preparazione di 5 lastre di 20 × 20 cm.

Lasciare asciugare le lastre all'aria per circa 15 minuti, quindi essiccarle in una stufa a 103 °C ± 2 °C per due ore.

Conservare le lastre così preparate in un essiccatore.

5. **Metodo operativo**

5.1. *Idrolisi ad opera della lipasi pancreatica*

In una provetta da centrifuga da 10 ml pesare circa 0,1 g del campione preparato.

Aggiungere 20 mg di lipasi e 2 ml di soluzione tampone. Agitare accuratamente e con cautela, poi aggiungere 0,5 ml della soluzione di colato di sodio allo 0,1 % e 0,2 ml della soluzione di cloruro di calcio. Chiudere la provetta con il tappo smerigliato, agitare con cautela (evitando di bagnare il tappo) e mettere immediatamente la provetta nel termostato regolato a 40 °C ± 0,5 °C, agitando esattamente per un minuto.

Prelevare la provetta del termostato ed agitare energicamente per due minuti esatti.

Raffreddare immediatamente in corrente d'acqua ; aggiungere 1 ml di acido cloridrico 6 N ed 1 ml di etere etilico. Tappare ed agitare energicamente. Lasciar riposare e prelevare la fase organica superiore con la siringa.

5.2. *Separazione dei monogliceridi mediante cromatografia su strato sottile*

Deporre l'estratto sulla lastra cromatografica a circa 1,5 cm dal bordo inferiore, in linea continua ed uniforme, per ottenere la linea di partenza più sottile possibile.

Introdurre la lastra nella camera di sviluppo ben satura e sviluppare con l'apposito solvente fino ad 1 cm dal bordo superiore. Lo sviluppo della lastra deve avvenire alla temperatura di circa 20 °C.

Essiccare la lastra all'aria, alla temperatura della vasca, e polverizzare la soluzione di dicloro-2'-7' fluorosceina. Delimitare la banda dei monogliceridi (Rf = 0,035 circa) alla luce U.V., recuperarli mediante una spatola metallica (evitando di prelevare i componenti che restano sulla linea di partenza) e raccogliere la silice nel pallone di metilazione da 25 ml.

Trasformare i monogliceridi in esteri metilici, trattando direttamente alle condizioni del metodo generale di preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi indicati al punto 7.3 la silice precedentemente raccolta, poi procedere alla cromatografia in fase gassosa degli esteri secondo il metodo indicato al punto 7.4.

6. **Espressione dei risultati**

Calcolare la composizione degli acidi grassi in posizione 2 in percentuale con una cifra decimale (nota 3).

7. **Note**

7.1. *Controllo dell'attività lipasica*

Preparare un'emulsione di olio agitando, in un miscelatore adeguato, per circa 10 minuti, una miscela costituita da 165 ml della soluzione di gomma arabica al 10 %, 15 g di ghiaccio tritato e 20 ml di un olio precedentemente neutralizzato.

In un bicchiere di 50 ml mettere successivamente 10 ml dell'emulsione precedentemente descritta, 0,3 ml di soluzione di colato di sodio al 20 % e 20 ml di acqua distillata.

Sistemare il bicchiere in un termostato regolato a 37 °C ± 0,5 °C ed introdurre nel bicchiere gli elettrodi di un pH metro ed un agitatore ad elica.

Mediante una buretta da 5 ml aggiungere goccia a goccia una soluzione di idrossido di sodio 0,1 N fino ad ottenimento di un pH di 8,5.

Aggiungere un volume opportuno di una sospensione di lipasi in polvere nell'acqua (vedi qui di seguito). Quando il pH indica un pH di 8,3 mettere in funzione il cronometro ed aggiungere la soluzione di idrossido di sodio 0,1 N al ritmo necessario per mantenere il pH al valore di 8,3. Prendere nota, ogni minuto, del volume di soluzione alcalina consumato.

Riportare i valori ottenuti su un sistema di assi coordinati, portando sulle ascisse i tempi e sulle ordinate i ml di soluzione alcalina consumata per mantenere il pH costante. Si deve ottenere un grafico lineare.

La sospensione di lipasi citata al paragrafo precedente è una sospensione all'1 % in peso nell'acqua. Per ciascuna prova prendere il quantitativo di tale sospensione necessario a che in 4-5 minuti si consumi 1 ml circa di soluzione alcalina. Normalmente questo risultato viene ottenuto con 1-5 mg di polvere.

L'unità lipasi viene definita come la quantità di enzima che libera 10 µ-equivalenti di acido per minuto.

Attività A della polvere usata, misurata in unità lipasi per mg :

$$A = \frac{V \times 10}{m}$$

dove :

V = numero di ml di soluzione di idrossido di sodio 0,1 N per minuto, calcolato al grafico,

m = massa della polvere da analizzare, in mg.

La lipasi usata deve avere un'attività compresa tra 0,8 e 2 unità lipasi per mg.

7.2. *Preparazione della lipasi*

In commercio esistono lipasi aventi un'attività lipasica soddisfacente. È possibile altresì prepararle in laboratorio nel modo seguente :

Raffreddare, a 0 °C 5 kg di pancreas fresco suino ; liberare dal grasso solido e dal tessuto connettivo che li circondano e triturare in un mulino a lame per ottenere una pasta fluida. Agitare questa pasta a freddo per 4-6 ore con 2,5 litri di acetone anidro, poi centrifugare. Estrarre il residuo altre tre volte con lo stesso volume di acetone, due volte con una miscela di acetone-etere etilico 1/1 (v/v) e due volte con etere etilico.

Essiccare il residuo sotto vuoto per 48 ore, allo scopo di ottenere una polvere stabile, che dev'essere conservata in frigorifero.

7.3. *Preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi*

Secondo il metodo definito all'allegato VI, titolo II, del regolamento (CEE) n. 72/77 della Commissione, del 13 gennaio 1977, recante modifica del regolamento (CEE) n. 1470/68 relativo al prelievo ed alla riduzione dei campioni nonché alla determinazione del tenore in olio, impurità ed umidità dei semi oleosi [1].

7.4. *Gascromatografia degli esteri metilici degli acidi grassi*

Secondo il metodo definito all'allegato VI, titolo III, del regolamento (CEE) n. 72/77.

---

[1] GU n. L 12 del 15. 1. 1977, pag. 11.

ALLEGATO VIII

RICERCA DELLA PRESENZA DI ALTRI OLI NELL'OLIO D'OLIVA : ANALISI DELLA FRAZIONE STEROLICA DELLE SOSTANZE GRASSE

Principio

Analisi per gascromatografia della frazione sterolica separata per cromatografia su strato sottile a partire dall'insaponificabile essiccato con precauzione per brevissimo tempo.

Apparecchiatura

1. apparecchiatura per la cromatografia su strato sottile, comprendente in particolare quattro placche di vetro 20 × 20 × 0,4 cm e due placche da 20 × 5 × 0,4 cm e una microsiringa da 0,1 ml,
2. beuta da 50 ml,
3. filtri porosi, porosità 3, diametro 15 mm,
4. pallone da 100 ml,
5. provetta da centrifuga, a fondo conico, da 10 ml, munita di tappo smerigliato,
6. pipette graduate, da 1 ml e da 5 ml,
7. gascromatografi con rivelatore a ionizzazione di fiamma e iniettatore d'argento o di vetro, oppure munito di un sistema di iniezione diretta nella colonna e raccordato ad un registratore,
8. colonna da gascromatografia di vetro o di acciaio inossidabile a forma di « U » o di spirale, della lunghezza di 1-2 m e del diametro interno di 3-4 mm — fase stazionaria di gomma di silicone [tipo metile (1)] stabile sino ad almeno 300° che impregni al tasso del 2-4 % una terra di diatomee calcinata, lavata con acidi e silanizzata, di granulometria 80/100 o 100/200 mesh.

   Nota : Poiché taluni tipi di acciaio inossidabile potrebbero condurre a risultati erronei a causa della deteriorazione degli steroli, si raccomanda di utilizzare il vetro,
9. microsiringa da 5 o 10 µl.

Reattivi

1. cloroformio per cromatografia,
2. benzolo per cromatografia,
3. eptano,
4. gel di silice (per esempio Kieselgel G),
5. soluzione di riferimento per la cromatografia su lastra, costituita da colesterolo al 5 % in cloroformio,
6. acetone per cromatografia,
7. soluzione allo 0,1 %, in alcool etilico assoluto, del sale sodico della 2'7'-diclorofluoresceina,
8. piridina,
9. esametildisilazano,
10. trimetilclorosilano,
11. soluzione per la prova di sensibilità : 1 mg di colesterolo in 1 ml di n-pentano ;
12. soluzione per la prova di risoluzione dei picchi : 0,9 mg di fitosteroli di olio di colza e 0,1 mg di colesterolo in 1 ml n-pentano. Gli steroli debbono essere di recente preparazione, secondo la procedura descritta al punto B del « modo di operare »,
13. soluzione per la prova di riferimento : 1 mg di fitosteroli di olio di girasole in 1 ml di n-pentano, di recente preparazione come descritto al punto B del « modo di operare ».

Preparazione delle placche per cromatografia

Collocare sullo stratificatore nell'ordine una placca 20 × 5 × 0,5 cm, quattro placche 20 × 20 × 0,4 cm e una placca 20 × 5 × 0,4 cm.

(1) Per esempio, SE 30.

In un pallone da 500 ml a collo largo mettere 40 g di gel di silicio e circa 80 ml di acqua. Agitare la bacchetta di vetro ed eventualmente con agitatore meccanico di vetro fino ad ottenere una sospensione omogenea.

Eliminare i gas eventualmente presenti facendo il vuoto con una pompa ad acqua per almeno 1 minuto. Si porta poi la sospensione regolando lo spessore a 0,5 mm e si ricoprono uniformemente le placche. Si lasciano asciugare le placche all'aria per quindici minuti circa e quindi si essiccano a 105 °C per 2 ore. Le placche così preparate si conservano in essiccatori a vuoto.

MODO DI OPERARE

A. **Preparazione dell'insaponificabile**

Introduzione

Si designano sotto il nome di « insaponificabile » le sostanze solubili nel grasso, le quali, dopo saponificazione, sono insolubili nell'acqua e solubili nel solvente adoperato per il dosaggio. L'insaponificabile comprende i costituenti naturali delle sostanze grasse (steroli, alcoli, idrocarburi), come pure le sostanze organiche non volatili a 100 °C (oli minerali), estranee alle sostanze grasse, ma che possono eventualmente essere contenute in esse. Quale solvente si adoperano l'etere di petrolio oppure l'etere etilico. Va tenuto presente che i risultati ottenuti con i due solventi sono diversi, nella maggioranza dei casi, e che con l'etere etilico si trovano dei tenori percentuali più elevati. Per l'olio d'oliva, tenuto conto delle condizioni climatiche nelle quali si trova la maggioranza dei laboratori di analisi, l'etere di petrolio è stato riconosciuto come il solvente da adoperarsi.

Metodo all'etere di petrolio

Materiale

— pallone da 150 ml circa, che possa essere adattato ad un refrigerante a riflusso,

— imbuto separatore da 500 ml circa,

— stufa regolata a 103 °C ± 2 °C.

Reattivi

— soluzione etanolica di KOH, 2N all'incirca, nell'etanolo al 95 % (v/v). Il reattivo non dovrà avere un colore più scuro del giallo paglierino,

— etere di petrolio con intervallo di distillazione 40-60 °C, con numero di bromo inferiore ad 1, esente da residuo.

Modo di operare

Pesare esattamente in un pallone, con l'approssimazione di 0,01 g, 5 g circa di sostanza grassa. Aggiungere 50 ml della soluzione etanolica circa 2N di KOH. Adattare al refrigerante a riflusso. Riscaldare per un'ora a leggera ebollizione. Sospendere il riscaldamento. Aggiungere dall'alto del refrigerante 50 ml circa di acqua distillata ed agitare.

Travasare dopo raffreddamento in un imbuto separatore e sciacquare a più riprese il pallone con un totale di 50 ml circa di etere di petrolio.

Agitare energicamente per un minuto.

Lasciar riposare fino a separazione completa delle due fasi e raccogliere la soluzione saponosa in un secondo imbuto separatore. Se, eccezionalmente, dovesse formarsi un'emulsione, romperla mediante addizione di piccole quantità di etanolo o di soluzione concentrata di idrossido di potassio.

Reiterare per altre due volte l'estrazione della soluzione saponosa, impiegando ogni volta circa 50 ml di etere di petrolio. Riunire in uno stesso imbuto separatore le tre frazioni ottenute con l'etere di petrolio e lavarle a tre riprese con circa 50 ml di etanolo al 50 % (v/v).

Dall'alto dell'imbuto, travasare quantitativamente la soluzione di etere di petrolio, in più riprese se necessario, entro un pallone di 250 ml, tarato (effettuando piccoli lavaggi dell'imbuto con etere di petrolio).

Il solvente viene eliminato riscaldandolo prudentemente sotto vuoto, i residui vengono asciugati ad una temperatura inferiore ai 50° sotto vuoto, allo scopo di evitare delle ossidazioni indesiderabili.

B. **Separazione della frazione sterolica per cromatografia su strato sottile**

Nella camera di sviluppo si introduce la miscela eptano/acetone 85/15 o benzolo/acetone 95/5 (v/v) fino all'altezza di circa 1 cm ; si chiude con il coperchio e si lascia a sé per almeno 3 ore, in modo che si stabilisca l'equilibrio liquido-vapore. È anche consigliabile fissare sulle superfici interne della camera delle striscie di carta da filtro che peschino nell'eluente. Questa precauzione offre il vantaggio di ridurre di circa 1/3 la durata di migrazione del fronte del liquido e di fare eluire i componenti in modo più uniforme.

Si prepara nel frattempo una soluzione al 5 % di insaponificabile estratto all'etere di petrolio nel cloroformio. Si prelevano circa 0,3 ml della soluzione così ottenuta e li si depositano con l'aiuto della microsiringa di 0,1 ml sulla placca cromatografica a circa 1,5 cm dal bordo inferiore, in banda continua ed uniforme in modo da ottenere una linea di partenza la più sottile possibile. Con la tecnica consueta si deposita ad una estremità della lastra qualche µl della soluzione di riferimento contenente colesterolo, allo scopo di identificare l'Rf della frazione sterolica.

Si pone la placca nella camera di sviluppo, preparata come sopra detto. La temperatura dell'ambiente deve essere intorno ai 20°.

Si chiude con il coperchio e si eluisce fino a che il fronte del solvente sia arrivato ad 1 cm circa dal bordo superiore della placca. Si rimuove la placca della camera di sviluppo e si lascia evaporare il solvente in corrente di aria calda.

La placca viene spruzzata uniformemente e con cautela mediante la soluzione alcolica del sale sodico della 2'7'-diclorofluoresceina. Esaminando la placca all'ultravioletto, si individua la posizione degli steroli, in base all'allineamento con la macchia di colesterolo, proveniente dalla soluzione di riferimento.

Recuperare la banda degli steroli raschiandola con una spatola metallica. Introdurre il gel di silice separato in un becher da 50 ml assieme a 15 ml di cloroformio caldo, agitare, trasferire la totalità del gel di silice sul filtro poroso e filtrare. Lavare tre volte il filtro, impiegando ogni volta una porzione da 15 ml di cloroformio caldo, raccogliendo il filtrato in un pallone da 100 ml.

Evaporare la soluzione cloroformica fino al volume di 4-5 ml e versare nel tubo da centrifuga a tappo smerigliato, tarato in precedenza. Portare a secco evaporando il solvente per leggero riscaldamento in corrente di azoto e pesare la frazione sterolica così ottenuta.

C. **Analisi gascromatografica degli steroli**

1. *Preparazione dei trimetilsilileteri (TMSE)*

Per ciascun mg di sterolo, aggiungere nella provetta 0,02 ml di reattivo per la silanizzazione, composto da una miscela di piridina-esametildisilazano-trimetilclorosilano 9/3/1 (v/v/v) avendo cura di evitare ogni traccia di umidità. Sistemare la provetta in un essiccatore per circa 30 minuti, poi chiudere e centrifugare per qualche minuto. Prelevare la soluzione restante per la successiva analisi.

2. *Condizioni dell'analisi per gascromatografia*

Temperatura della colonna : 220-250°.

Temperatura del sistema di iniezione, se riscaldato separatamente : 20-40° al di sotto della temperatura della colonna. Emissione di azoto : 30-60 ml/minuto. Disgiungere il rivelatore ed equilibrare le nuove colonne in queste condizioni durante 16-24 ore. Collegare il rivelatore, accendere la fiamma e regolare la portata di idrogeno, di ossigeno o di aria in modo da ottenere un'altezza della fiamma e una sensibilità idonee. Far funzionare il rivelatore, far svolgere la carta ad una velocità appropriata e azzerare l'attenuatore. Quando la linea di base è stabile, l'apparecchio è pronto per l'uso.

3. *Prova di sensibilità*

Prelevare 5 ml della soluzione per la prova di sensibilità, evaporare il solvente, trattare come indicato al punto 1 ; iniettare 0,1-0,2 µl della soluzione così preparata (TMSE). Sul cromatogramma deve apparire il solo picco del colesterolo.

Regolare l'attenuatore in modo da poter impiegare quasi tutta la scala del registratore.

4. *Prova di risoluzione dei picchi*

Prelevare 5 ml della soluzione così preparata.

Evaporare il solvente e trattare come indicato al punto 1.

Iniettare da 0,1 a 0,2 µl della soluzione del test di risoluzione (TMSE)

I picchi di colesterolo, brassicasterolo, campesterolo e di β-sitosterolo debbono apparire sul cromatogramma. Misurare le distanze di ritenzione (distanza dal punto d'iniezione al punto dell'altezza massima del picco) dei picchi, d_{CH} per il colesterolo, d_B per il brassicasterolo, d_C per il campesterolo e d_S per il β-sitosterolo e la larghezza alla base dei picchi (lunghezza di ritenzione tra le intersezioni con la linea di base delle tangenti ai punti di inflessione situate sui lati anteriore e posteriore del picco) ω_{CH} per il colesterolo e ω_B per il brassicasterolo. La risoluzione dei picchi, espressa con la formula :

$$PR = 2\,\frac{(d_B - d_{CH})}{\omega_B + \omega_{CH}}$$

deve essere almeno uguale a 1.

Calcolare i tempi di ritenzione relativi (colesterolo = 1,00) per il brassicasterolo, il campesterolo e il β-sitosterolo.

5. *Prova di riferimento*

Prelevare 5 ml della soluzione della prova di riferimento, evaporare il solvente, trattare come indicato al punto 1, iniettare da 0,1 a 0,2 µl della soluzione così preparata (TMSE). I picchi di campesterolo, di stigmasterolo, di β-sitosterolo e di Δ 7 stigmastenolo debbono comparire sul cromatogramma.

Misurare le distanze di ritenzione dei picchi, d_C per il campesterolo, d_{ST} per lo stigmasterolo, d_S per il β-sitosterolo e $d_{ST.7}$ per il Δ 7 stigmastenolo.

Si calcolino i tempi di ritenzione relativa, che sono approssimativamente

colesterolo :	1,0,
brassicasterolo :	1,1,
campesterolo	1,3,
stigmasterolo :	1,4,
β-sitosterolo :	1,6 (1),
Δ 7 stigmastenolo :	1,8 (2).

6. *Analisi*

Iniettare da 0,1 a 0,2 µl della soluzione TMSE degli steroli da analizzare e registrare il cromatogramma.

C. **Espressioni dei risultati**

Ai fini dell'interpretazione della composizione della frazione sterolica analizzata, non sono da rilevare picchi aventi tempi di ritenzione diversi da quelli determinati sperimentalmente per i 6 steroli sopra elencati.

Il tenore in % di β-sitosterolo è dato dalla formula :

$$\frac{\text{Area del picco del β-sitosterolo}}{\text{Somma delle aree dei sei picchi degli steroli}} \times 100$$

Il contenuto in β-sitosterolo non dovrà essere inferiore al 93 % rispetto alla composizione in % degli steroli totali.

---

(1) Se altri steroli, come Δ 5 avenasterolo, hanno in queste condizioni lo stesso volume di ritenzione del β-sitosterolo, essi sono computati come β-sitosterolo.

(2) Se altri steroli hanno in queste condizioni lo stesso volume di ritenzione del Δ 7 stigmastenolo, essi sono computati come Δ 7 stigmastenolo.

ALLEGATO IX

METODO DI DETERMINAZIONE DEL TENORE IN OLIO D'OLIVA DELLE SANSE

Materiale

— apparecchio da estrazione appropriato, munito di un pallone da 200-250 ml,
— bagno a riscaldamento elettrico (bagno a sabbia, bagno ad acqua, ecc.) o piastra riscaldante,
— bilancia analitica,
— stufa regolata su un massimo di 80 °C,
— stufa a riscaldamento elettrico, provvista di un dispositivo di termoregolazione regolato su 103 ± 2 °C e tale da consentire una insufflazione d'aria o una depressione,
— frantoio meccanico facile da pulire, che permette la frantumazione dei noccioli senza riscaldamento e senza modificazione sensibile del loro tenore in acqua e in olio,
— ditale da estrazione e cotone idrofilo o carta da filtro, esenti da sostanze estraibili con esano,
— essiccatore,
— setaccio a maglie da 1 mm di diametro,
— pietra pomice in granuli, previamente essiccata.

Reattivo

n-esano tecnico, il cui residuo all'evaporazione completa dev'essere inferiore a 0,002 g/100 ml.

MODO DI OPERARE

Preparazione del campione per l'analisi

Frantumare il campione contrattuale, se necessario, nel frantoio meccanico ben pulito in precedenza, allo scopo di ridurlo in particelle che attraversino completamente il setaccio.

Utilizzare 1/20 circa del campione per completare la pulizia del frantoio, scartare il prodotto di questa macinazione, frantumare il resto, raccoglierlo, mescolarlo con cura e analizzarlo immediatamente.

Quantità di sostanza da analizzare

Immediatamente dopo la fine della frantumazione, pesare con l'approssimazione di 0,01 g circa 10 g del campione.

Preparazione del ditale da estrazione

Porre la sostanza destinata all'analisi nella cartuccia, che va tappata con il tampone di cotone idrofilo. Nel caso che si utilizzi una carta da filtro, impacchettare le sanse frantumate in tale carta.

Preessiccazione

Se la sansa è molto umida (tenore in acqua ed in sostanze volatili superiore al 10 %), effettuare un'essiccazione preliminare ponendo per un tempo conveniente il ditale riempito (o la carta da filtro) nella stufa riscaldata ad un massimo di 80 °C, per ricondurre il tenore in acqua ed in materie volatili al di sotto del 10 %.

Preparazione del pallone

Pesare con l'approssimazione di 1 mg il pallone contenente 1-2 granuli di pomice, previamente essiccato in stufa a 103 ± 2 °C e poi raffreddato per almeno un'ora in essiccatore.

Prima estrazione

Porre nell'apparecchio da estrazione il ditale (o la carta da filtro) contenente la sostanza da analizzare. Versare nel pallone la quantità necessaria di esano. Adattare il pallone all'apparecchio da estrazione e porre il tutto sul bagno a riscaldamento elettrico. Effettuare il riscaldamento in condizioni tali che la portata del riflusso sia di almeno tre gocce al secondo (ebollizione moderata, non tumultuosa).

Dopo quattro ore di estrazione, lasciar raffreddare. Togliere il ditale dall'apparecchio di estrazione e porlo in una corrente d'aria, al fine di eliminare la maggior parte del solvente che lo impregna.

Seconda estrazione

Vuotare il ditale nel microfrantoio e macinare il più finemente possibile. Reintrodurre quantitativamente la miscela nel ditale e rimettere questo nell'apparecchio da estrazione.

Ricominciare l'estrazione per altre due ore, utilizzando lo stesso pallone che contiene la prima sostanza estratta.

La soluzione ottenuta nel pallone da estrazione dev'essere limpida. Se così non fosse, filtrarla su carta, lavando più volte il primo pallone e la carta da filtro con esano. Raccogliere filtrato e solvente di lavaggio in un secondo pallone, previamente essiccato e tarato con l'approssimazione di 1 mg.

Eliminazione del solvente e pesata dell'estratto

Eliminare la maggior parte del solvente distillato su bagno a riscaldamento elettrico. Eliminare le ultime tracce di solvente riscaldando il pallone in stufa a 103 ± 2 °C per 20 minuti. Facilitare questa eliminazione sia insufflando ogni tanto dell'aria o, preferibilmente, del gas inerte, sia operando sotto pressione ridotta.

Lasciar raffreddare il pallone in essiccatore per almeno un'ora, poi pesarlo con l'approssimazione di 1 mg.

Riscaldare di nuovo per 10 minuti nelle stesse condizioni, poi raffreddare in essiccatore e pesare.

La differenza fra i risultati di queste due pesate dev'essere inferiore od uguale a 10 mg. In caso contrario, riscaldare di nuovo per periodi di 10 minuti, seguiti da raffreddamento e pesata, finché la differenza di massa sia uguale tutt'al più a 10 mg. Adottare per il calcolo il valore dato dall'ultima pesata.

Effettuare due determinazioni sullo stesso campione.

ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Modo di calcolo e formula

a) L'estratto, espresso come massa percentuale sul prodotto tal quale, è dato dalla formula :

$$S = m_1 \times \frac{100}{m_0}$$

nella quale :

S = percentuale in massa sul prodotto tal quale,

m_0 = massa in grammi della quantità di sostanza prelevata per l'analisi,

m_1 = massa in grammi dell'estratto dopo essiccazione.

Prendere come risultato la media aritmetica delle due determinazioni, se le condizioni di ripetibilità sono adempiute.

Esprimere il risultato con una sola cifra decimale.

b) L'estratto viene riferito alla sostanza secca utilizzando la formula seguente :

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{estratto in \% grasso/secco}$$

dove :

S = percentuale in massa di estratto sul prodotto tal quale (vedi lettera a),

U = suo tenore in acqua e in sostanze volatili.

Ripetibilità

La differenza fra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o in rapida successione dallo stesso analista non deve eccedere i 0,2 g di estratto ottenuto con l'esano per ogni 100 g di campione.

In caso contrario, ripetere l'analisi su due altri quantitativi di sostanza. Se ancora questa volta la differenza eccede gli 0,2 g, assumere come risultato la media aritmetica delle quattro determinazioni effettuate.