

**REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) N. 299/2013 DELLA COMMISSIONE****del 26 marzo 2013****recante modifica del 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 (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) <sup>(1)</sup>, in particolare l'articolo 113, paragrafo 1, lettera a), e l'articolo 121, paragrafo 1, lettera a), in combinato disposto con l'articolo 4,

considerando quanto segue:

- (1) Il 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 <sup>(2)</sup>, definisce le caratteristiche chimiche ed organolettiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva e stabilisce metodi di valutazione di tali caratteristiche. Occorre aggiornare detti metodi in base al parere degli esperti di chimica e conformemente all'operato svolto nell'ambito del Consiglio oleicolo internazionale (in appresso «COI»).
- (2) Ai sensi dell'articolo 113, paragrafo 3, del regolamento (CE) n. 1234/2007, gli Stati membri si accertano della conformità degli oli d'oliva e degli oli di sansa alle norme stabilite nel regolamento (CEE) n. 2568/91 e comminano le sanzioni opportune. Gli articoli 2 e 2 bis del regolamento (CEE) n. 2568/91 definiscono norme particolareggiate relative a tali controlli di conformità. Dette norme devono garantire che l'olio d'oliva per il quale è stata stabilita una norma di qualità sia effettivamente conforme alla norma stessa. Occorre precisare ulteriormente le norme di cui trattasi e prevedere, in particolare, un'analisi del rischio. Per procedere a tali controlli, è necessario definire il termine «olio d'oliva commercializzato».
- (3) L'esperienza ha insegnato che alcuni rischi di frode hanno fatto sì che la tutela dei consumatori non abbia potuto essere pienamente garantita dal regolamento (CEE) n. 2568/91. I detentori di olio d'oliva devono quindi iscrivere in un apposito registro le entrate e le uscite per ogni singola categoria di oli. Onde evitare eccessivi oneri amministrativi senza compromettere le finalità del registro degli oli d'oliva, la raccolta di informazioni va limitata fino alla fase dell'imbottigliamento dell'olio d'oliva.
- (4) Al fine di garantire il follow-up e di valutare le misure previste dal regolamento (CEE) n. 2568/91, gli Stati membri comunicano alla Commissione non soltanto le misure nazionali di recepimento bensì anche i risultati dei controlli di conformità.
- (5) Al fine di proseguire il processo di armonizzazione con le norme internazionali stabilite dal COI è necessario aggiornare alcuni metodi di analisi stabiliti dal regolamento (CEE) n. 2568/91. Di conseguenza, il metodo di analisi previsto all'allegato XVIII del suddetto regolamento deve essere sostituito da un metodo più efficace. È opportuno altresì ovviare ad alcune incongruenze ed imperfezioni dei metodi di analisi di cui all'allegato IX del regolamento in parola.
- (6) Gli Stati membri hanno bisogno di un periodo di transizione per applicare la nuova normativa prevista dal presente regolamento.
- (7) La Commissione ha messo a punto un sistema informativo che consente di gestire i documenti e le procedure elettronicamente nell'ambito del proprio funzionamento interno e delle relazioni con le autorità interessate dalla politica agricola comune. Si ritiene che gli obblighi di notifica previsti dal regolamento (CEE) n. 2568/91 possano essere rispettati mediante tale sistema, conformemente al regolamento (CE) n. 792/2009 della Commissione, del 31 agosto 2009, che stabilisce le modalità con le quali gli Stati membri notificano alla Commissione le informazioni e i documenti necessari nell'ambito dell'attuazione dell'organizzazione comune dei mercati, del regime dei pagamenti diretti, della promozione dei prodotti agricoli e dei regimi applicabili alle regioni ultraperiferiche e alle isole minori del Mar Egeo <sup>(3)</sup>.
- (8) Il regolamento (CEE) n. 2568/91 va modificato in conseguenza.
- (9) Il Comitato di gestione per l'organizzazione comune dei mercati agricoli non si è espresso entro i termini stabiliti dal suo presidente,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

*Articolo 1*

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

1) l'articolo 2 bis è sostituito dal seguente testo:

*«Articolo 2 bis*

1. Ai fini del presente articolo, si intende per «olio d'oliva commercializzato» il quantitativo totale di olio d'oliva e di olio di sansa di uno Stato membro che è consumato in tale Stato membro oppure esportato da tale Stato membro.

<sup>(1)</sup> GU L 299 del 16.11.2007, pag. 1.<sup>(2)</sup> GU L 248 del 5.9.1991, pag. 1.<sup>(3)</sup> GU L 228 dell'1.9.2009, pag. 3.

2. Gli Stati membri fanno in modo che i controlli di conformità siano effettuati selettivamente, in base ad un'analisi di rischio e con adeguata frequenza, onde garantire che l'olio d'oliva immesso in commercio corrisponda alla categoria dichiarata.

3. I criteri di valutazione del rischio possono includere:

- a) la categoria dell'olio, il periodo di produzione, il prezzo degli oli rispetto a quello di altri oli vegetali, le operazioni di miscelazione e confezionamento, gli impianti e le condizioni di stoccaggio, il paese d'origine, il paese di destinazione, il mezzo di trasporto o il volume della partita;
- b) la posizione degli operatori nella catena di commercializzazione, il volume e/o il valore nonché la gamma di categorie di oli che commercializzano, il tipo di attività economica svolta quali la molitura, l'immagazzinamento, la raffinazione, la miscelazione, il confezionamento e la vendita al minuto;
- c) le risultanze che emergono da controlli precedenti, segnatamente per quanto riguarda il numero e il tipo di carenze accertate, la qualità abituale degli oli commercializzati e il livello di prestazione delle attrezzature tecniche adoperate;
- d) l'affidabilità dei sistemi di assicurazione della qualità degli operatori o dei loro sistemi di autocontrollo rispetto alla conformità alle norme di commercializzazione;
- e) il luogo in cui il controllo viene effettuato, in particolare se si tratta del primo punto di ingresso nell'Unione, dell'ultimo punto di uscita dall'Unione o del luogo in cui gli oli sono prodotti, confezionati, caricati o venduti al consumatore finale;
- f) qualsiasi altra informazione da cui si possa evincere un rischio di non conformità.

4. Gli Stati membri stabiliscono in anticipo:

- a) i criteri di valutazione del rischio di non conformità delle partite;
- b) sulla base di un'analisi del rischio per ogni singola categoria di rischio, il numero minimo di operatori o di partite e/o di quantitativi minimi che saranno soggetti ad un controllo di conformità.

Almeno un controllo annuale di conformità è effettuato per mille tonnellate di olio d'oliva commercializzato annualmente nello Stato membro.

5. Gli Stati membri verificano la conformità:

- a) procedendo, in un ordine qualsiasi, alle analisi di cui all'allegato I; o
- b) nell'ordine previsto dall'albero decisionale di cui all'allegato I *ter*, fino a raggiungere una delle decisioni figuranti nel suddetto albero decisionale.»

2) l'articolo 3 è sostituito dal seguente testo:

«Articolo 3

Qualora si constati che un olio non corrisponde alla descrizione della sua categoria, lo Stato membro interessato

applica sanzioni effettive, proporzionate e dissuasive stabilite in base alla gravità dell'irregolarità accertata, ferme restando altre sanzioni eventuali.

Se dai controlli emergono irregolarità sostanziali, gli Stati membri aumentano la frequenza dei controlli relativi alla fase di commercializzazione, alla categoria dell'olio, all'origine o ad altri criteri.»

3) si inserisce il seguente articolo 7 bis:

«Articolo 7 bis

Le persone e i gruppi di persone fisiche o giuridiche che detengono, ai fini dell'esercizio della loro professione o a fini commerciali, olio d'oliva ed olio di sansa, dalla fase dell'estrazione al frantoio fino all'imbottigliamento incluso, hanno l'obbligo di tenere registri di entrata e di uscita per ogni categoria di questi oli.

Gli Stati membri assicurano che l'obbligo di cui al primo paragrafo sia debitamente rispettato.»

4) l'articolo 8 è sostituito dal seguente testo:

«Articolo 8

1. Ogni Stato membro comunica alla Commissione le misure adottate per l'applicazione del presente regolamento. Lo Stato membro comunica alla Commissione qualsiasi ulteriore modifica di dette misure.

2. Entro il 31 maggio di ogni anno, lo Stato membro trasmette alla Commissione una relazione sull'applicazione del presente regolamento nel corso dell'anno civile precedente. La relazione contiene almeno i risultati dei controlli di conformità effettuati sugli oli d'oliva, presentati in base ai modelli figuranti nell'allegato XXI.

3. Le notifiche di cui al presente regolamento sono effettuate a norma del regolamento (CE) n. 792/2009 della Commissione (\*)

(\*) GU L 228 dell'1.9.2009, pag. 3.»

5) l'allegato IX è sostituito dal testo figurante nell'allegato I del presente regolamento;

6) l'allegato XVIII è sostituito dal testo figurante nell'allegato II del presente regolamento;

7) l'allegato XXI, il cui testo figura nell'allegato III del presente regolamento, è aggiunto.

Articolo 2

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

Esso si applica a decorrere dal 1° gennaio 2014. Tuttavia, l'articolo 8, paragrafo 2, si applica a decorrere dal 1° gennaio 2015.

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

Fatto a Bruxelles, il 26 marzo 2013

*Per la Commissione*

*Il presidente*

José Manuel BARROSO

---

## ALLEGATO I

## «ALLEGATO IX

## ANALISI SPETTROFOTOMETRICA NELL'ULTRAVIOLETTO

## PREMESSA

L'esame spettrofotometrico nell'ultravioletto può fornire informazioni sulla qualità di una sostanza grassa, sul suo stato di conservazione e sulle modificazioni indotte da processi tecnologici.

Gli assorbimenti alle lunghezze d'onda previste nel metodo sono dovuti alla presenza di sistemi dieni e trinci coniugati. I valori di tali assorbimenti sono espressi come estinzione specifica  $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$  (estinzione di una soluzione della sostanza grassa all'1 % nel solvente prescritto, in uno spessore di 1 cm) convenzionalmente indicata con K (detto anche "coefficiente di estinzione").

## 1. OGGETTO

Il metodo descrive il procedimento per l'esecuzione dell'esame spettrofotometrico dell'olio di oliva (secondo la descrizione riportata nell'Appendice).

## 2. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza grassa in esame viene disciolta nel solvente stabilito, quindi si determina l'estinzione della soluzione alle lunghezze d'onda prescritte, in riferimento al solvente puro. Dalle letture spettrofotometriche si calcolano le estinzioni specifiche. Si determina la specifica assorbanza alle lunghezze d'onda di 232 e 268 nm nell'isooctano o di 232 e 270 nm nel cicloesano, per una concentrazione di 1 g per 100 ml in una cuvetta di 10 mm.

## 3. APPARECCHIATURA

3.1. Spettrofotometro per misurare l'estinzione nell'ultravioletto fra 220 e 360 nm, con possibilità di lettura per ogni unità nanometrica. Prima dell'uso, si raccomanda di effettuare il controllo delle scale di lunghezza d'onda e di assorbanza secondo le modalità indicate qui di seguito.

3.1.1. *Scala delle lunghezze d'onda*: questo controllo può essere effettuato mediante materiale di riferimento costituito da un filtro di vetro ottico contenente ossido di olmio, che presenta bande di assorbanza separate. Il materiale di riferimento è destinato alla verifica e alla taratura della scala delle lunghezze d'onda dei spettrofotometri UV-visibile con ampiezza di banda spettrale nominale uguale o inferiore a 5 nm. Il filtro di vetro all'ossido di olmio è misurato in modalità di assorbanza rispetto ad una prova in bianco all'aria, su un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 640 e 240 nm. Per ogni ampiezza di banda spettrale (0,10 – 0,25 – 0,50 – 1,00 – 1,50 – 2,00 e 3,00), si esegue una correzione della linea di base con un porta-cuvette vuoto. Nella norma ISO 3656, le lunghezze d'onda della banda spettrale sono elencate nel certificato del materiale di riferimento.

3.1.2. *Scala di assorbanza*: tale controllo può essere eseguito utilizzando materiale di riferimento composto da quattro soluzioni di dicromato di potassio in acido perclorico, sigillate in quattro cuvette UV in quarzo utilizzate per misurare la linearità e la precisione fotometrica di riferimento nell'ultravioletto. Le cuvette contenenti dicromato di potassio (40 mg/ml, 60 mg/ml, 80 mg/ml e 100 mg/ml) sono misurate rispetto ad una prova in bianco con acido perclorico. Nella norma ISO 3656 i valori netti di assorbanza sono elencati nel certificato del materiale di riferimento.

3.2. Cuvette in quarzo rettangolari, con coperchio, di percorso ottico da 1 cm. Riempite di acqua o con altro solvente idoneo, non devono presentare fra di loro differenze superiori a 0,01 unità di estinzione.

3.3. Matracci tarati da 25 ml.

3.4. Bilancia analitica, idonea a fornire una lettura con l'approssimazione di 0,0001 g.

## 4. REAGENTI

Si raccomanda di utilizzare solo reagenti di qualità analitica riconosciuta, salvo indicazione contraria.

Solvente: Isoottano (2,2,4 trimetilpentano) per la misurazione a 232 nm e 268 nm o cicloesano per la misurazione a 232 nm e 270 nm, con assorbanza inferiore a 0,12 a 232 nm e a 0,05 a 250 nm in riferimento all'acqua distillata, misurata in una cuvetta di 10 mm.

## 5. PROCEDIMENTO

5.1. Il campione in esame deve essere perfettamente omogeneo ed esente da impurità in sospensione. Gli oli liquidi a temperatura ambiente sono filtrati su carta ad una temperatura di circa 30 °C, i grassi concreti devono essere omogeneizzati e filtrati a una temperatura al massimo superiore di 10 °C rispetto alla loro temperatura di fusione.

- 5.2. Del campione così preparato si versano circa 0,25 g (con un'approssimazione di 1 mg) in un matraccio tarato da 25 ml, si porta a volume con il solvente prescritto e si omogeneizza. La soluzione risultante deve essere perfettamente limpida. Qualora si riscontri opalescenza o torbidità si filtra rapidamente con carta.
- 5.3. Con la soluzione ottenuta si riempie una cuvetta di quarzo e si misurano le estinzioni, usando come riferimento il solvente impiegato, ad una lunghezza d'onda adeguata fra 232 e 276 nm.

I valori di estinzione registrati devono essere compresi tra a 0,1 a 0,8; in caso contrario è necessario ripetere le misure utilizzando soluzioni più concentrate o più diluite, a seconda del caso.

NOTA: non è sempre necessario misurare l'assorbanza sull'intero intervallo delle lunghezze d'onda.

## 6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- 6.1. Si rilevano le estinzioni specifiche (coefficienti di estinzione) alle varie lunghezze d'onda calcolate come segue:

$$K_{\lambda} = \left( \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s} \right)$$

in cui:

$K_{\lambda}$  = estinzione specifica alla lunghezza d'onda  $\lambda$ ,

$E_{\lambda}$  = estinzione misurata alla lunghezza d'onda  $\lambda$ ;

$c$  = concentrazione della soluzione in g/100 ml;

$s$  = spessore della cuvetta di quarzo in cm.

I risultati devono essere espressi con due cifre decimali.

### 6.2. Variazione dell'estinzione specifica ( $\Delta K$ )

L'esame spettrofotometrico dell'olio di oliva secondo il metodo ufficiale stabilito dalla legislazione dell'Unione prevede anche la determinazione della variazione del valore assoluto dell'estinzione specifica ( $\Delta K$ ), intesa come:

$$\Delta K = \left| K_m - \left( \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2} \right) \right|$$

in cui  $K_m$  è l'estinzione specifica alla lunghezza d'onda  $m$ : la lunghezza d'onda di massimo assorbimento dipende dal solvente utilizzato: 270 nm per il cicloesano e 268 nm per l'isooctano.

---

CARATTERISTICHE DELL'OLIO DI OLIVA

Categoria		Esteri metilici di acidi grassi (FAME) e esterilici di acidi grassi (FAEE)	Acidità (%) (*)	Indice di perossido mEq 02/kg (*)	Cere mg/kg (**)	2-gliceril monopalmitato (%)	Stigma-stadiene mg/kg (1)	Differenza: ECN 42 (HPLC) e ECN 42 (calcolo teorico)	K <sub>232</sub> (*)	K <sub>270</sub> (*) 'K 270 o K 268 (3)'	Delta-K (*) (5)	Valutazione organolettica Mediana del difetto (Md) (*)	Valutazione organolettica Mediana del fruttato (Mf) (*)
1.	Olio di oliva extravergine	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg/kg oppure 75 mg/kg < Σ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg e (FAEE/FAME) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≥ 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
						≤ 1,0 se % acido palmitico totale > 14 %							
2.	Olio di oliva vergine	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
						≤ 1,0 se % acido palmitico totale > 14 %							
3.	Olio di oliva lampante	—	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (2)	—
						≤ 1,1 se % acido palmitico totale > 14 %							
4.	Olio di oliva raffinato	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
						≤ 1,1 se % acido palmitico totale > 14 %							
5.	Olio di oliva composto da oli di oliva raffinati e oli di oliva vergini	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 se % acido palmitico totale ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
						≤ 1,0 se % acido palmitico totale > 14 %							
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 possono (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 contenuto 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 oppure se la percentuale di eritrodiole e uvaolo è pari o inferiore a 3,5.

(4) Gli oli con un contenuto 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.

(5) K 270 se il solvente è cicloesano, K 268 se il solvente è isoottano»

## ALLEGATO II

## «ALLEGATO XVIII

**DETERMINAZIONE DELLA DIFFERENZA TRA IL CONTENUTO EFFETTIVO E IL CONTENUTO TEORICO DI TRIACILGLICEROLI CON ECN 42**

## 1. OGGETTO

Determinazione della differenza assoluta tra i valori sperimentali dei triacilgliceroli (TAG) con numero di carbonio equivalente pari a 42 (ECN 42<sub>HPLC</sub>) ottenuti mediante determinazione nell'olio per cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e il valore teorico dei TAG con un numero di carbonio equivalente pari a 42 (ECN 42<sub>teorico</sub>), calcolato a partire dalla composizione degli acidi grassi.

## 2. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è applicabile agli oli d'oliva. Mira a individuare la presenza di piccole quantità di oli di semi (ricchi in acido linoleico) in qualunque categoria di olio d'oliva.

## 3. PRINCIPIO

Per gli oli puri, il contenuto in triacilgliceroli con ECN 42, determinato mediante HPLC, corrisponde all'incirca al contenuto teorico di triacilgliceroli con ECN 42 (calcolato in base alla determinazione mediante GLC (gascromatografia gas-liquido) della composizione in acidi grassi). Una differenza superiore ai valori adottati per ciascun tipo di olio indica che l'olio contiene oli di semi.

## 4. METODO

Il metodo per il calcolo del contenuto teorico di triacilgliceroli con ECN 42 e della differenza rispetto ai dati HPLC si basa essenzialmente sulla coordinazione dei dati analitici ottenuti mediante altri metodi. È possibile distinguere tre fasi: determinazione della composizione in acidi grassi per cromatografia in fase gassosa su colonna capillare, calcolo della composizione teorica dei triacilgliceroli con ECN 42 e determinazione HPLC dei triacilgliceroli con ECN 42.

4.1. **Apparecchiatura**

- 4.1.1. Matracci a fondo arrotondato (palloni) da 250 e 500 ml.
- 4.1.2. Becher da 100 ml.
- 4.1.3. Colonna cromatografica in vetro (diametro interno: 21 mm, lunghezza 450 mm), provvista di rubinetto e cono normalizzato (femmina) alla sommità.
- 4.1.4. Imbuti separatori da 250 ml con cono normalizzato (maschio) alla base, che si può adattare alla la sommità della colonna.
- 4.1.5. Bacchetta di vetro, lunghezza 600 mm.
- 4.1.6. Imbuto di vetro, diametro 80 mm.
- 4.1.7. Matracci volumetrici, 50 ml.
- 4.1.8. Matracci volumetrici, 20 ml.
- 4.1.9. Evaporatore rotante.
- 4.1.10. Cromatografo in fase liquida ad alta prestazione, con regolazione termostatica della temperatura della colonna.
- 4.1.11. Unità di iniezione di 10 µl.
- 4.1.12. Rivelatore: rifrattometro differenziale. La sensibilità su tutta la scala deve essere pari almeno a  $10^{-4}$  unità dell'indice refrattivo.
- 4.1.13. Colonna: tubo in acciaio inossidabile della lunghezza di 250 mm e del diametro interno di 4,5 mm, riempito con particelle di silice del diametro di 5 µm, contenente il 22-23 % di carbonio sotto forma di ottadecilsilano.
- 4.1.14. Software di elaborazione dati.
- 4.1.15. Fiale da circa 2 ml, con setti in teflon e cappucci a vite.

4.2. **Reagenti**

I reagenti devono evidenziare una purezza per analisi. I solventi di eluizione devono essere degassati e possono essere riciclati più volte senza ripercussioni sulle separazioni.

- 4.2.1. Etere di petrolio 40-60 °C, qualità per cromatografia o esano.
- 4.2.2. Etere etilico, esente da perossidi, distillato da poco.
- 4.2.3. Solvente per eluizione per purificare l'olio mediante cromatografia su colonna: miscela di etere di petrolio/etere etilico 87:13 (v/v).
- 4.2.4. Gel di silice, 70-230, tipo Merck 7734, con un tenore di acqua normalizzato al 5 % (m/m).
- 4.2.5. Lana di vetro.
- 4.2.6. Acetone per HPLC.
- 4.2.7. Acetonitrile o propionitrile per HPLC.
- 4.2.8. Solvente di eluizione per HPLC: acetonitrile + acetone (proporzioni da regolare in modo da ottenere la separazione desiderata: cominciare con una miscela 50:50), o propionitrile.
- 4.2.9. Solvente di solubilizzazione: acetone.
- 4.2.10. Trigliceridi di riferimento: si possono usare i trigliceridi che si trovano in commercio (tripalmitina, trioleina ecc.), riportando su un grafico i rispettivi tempi di ritenzione in funzione del numero di carbonio equivalente, oppure utilizzare cromatogrammi di riferimento ottenuti impiegando olio di soia, miscela 30:70 olio di soia - olio di oliva e olio di oliva puro (cfr. note 1 e 2 e figure 1, 2, 3 e 4).
- 4.2.11. Colonna di estrazione in fase solida (SPE) con gel di silice, 1 g, 6 ml.

#### 4.3. Preparazione del campione

Poiché alcune sostanze interferenti possono dar luogo a risultati falsamente positivi, il campione deve essere sempre purificato secondo il metodo IUPAC 2.507, impiegato per la determinazione dei composti polari nei grassi di frittura.

##### 4.3.1. Preparazione della colonna cromatografica

Riempire la colonna (4.1.3) con 30 ml circa di solvente di eluizione (4.2.3), introducendo poi nella colonna un tampone di lana di vetro (4.2.5) spingendolo sul fondo della colonna con la bacchetta di vetro (4.1.5).

In un becher da 100 ml, sospendere 25 g di gel di silice (4.2.4) in 80 ml di miscela di eluizione (4.2.3), trasferendola quindi nella colonna mediante un imbuto di vetro (4.1.6).

Per assicurare il completo trasferimento del gel di silice nella colonna, lavare il becher con la miscela di eluizione e trasferire nella colonna anche le porzioni di lavaggio.

Aprire il rubinetto e lasciar eluire il solvente dalla colonna fin a quando il suo livello supera di circa 1 cm quello del gel di silice.

##### 4.3.2. Cromatografia su colonna

In un matraccio tarato da 50 ml (4.1.7), pesare, con la precisione di 0,001 g,  $2,5 \pm 0,1$  g di olio previamente filtrato, omogeneizzato e se necessario disidratato.

Diluirlo in 20 ml circa di solvente di eluizione (4.2.3), se necessario riscaldandolo leggermente per facilitare la dissoluzione. Raffreddare a temperatura ambiente e portare a volume con solvente di eluizione.

Con una pipetta volumetrica, introdurre 20 ml di soluzione all'interno della colonna preparata come indicato al punto 4.3.1, aprire il rubinetto e lasciar defluire il solvente fino al livello dello strato di gel di silice.

Eluire in seguito con 150 ml di solvente di eluizione (4.2.3), regolando il flusso del solvente a circa 2 ml/min (per passare attraverso la colonna, 150 ml impiegheranno circa 60-70 minuti).

Recuperare l'eluato in un matraccio a fondo arrotondato da 250 ml (4.1.1) precedentemente tarato in una stufa e pesato con accuratezza. Eliminare il solvente a pressione ridotta in un evaporatore rotante (4.1.9) e pesare il residuo che sarà impiegato per preparare la soluzione per l'analisi HPLC e per la preparazione dell'estere metilico.

Il campione deve essere recuperato almeno al 90 % per le categorie olio extra vergine, olio vergine, olio raffinato e olio d'oliva, e all'80 % per l'olio lampante e per l'olio di sansa.



4.3.3. *Purificazione mediante SPE*

Attivare la colonna SPE con assorbente siliceo eluendo 6 ml di esano (4.2.3) sotto vuoto, evitandone l'essiccazione.

Pesare con un'accuratezza dello 0,001 g, 0,12 g in una pipetta da 2 ml (4.1.15) e dissolvere in 0,5 ml di esano (4.2.3).

Versare nella colonna SPE la soluzione ed eluire con 10 ml di esano-etere dietilico (87:13 v/v) (4.2.3) sotto vuoto.

La frazione ottenuta è fatta evaporare completamente in un evaporatore rotante (4.1.9) a pressione ridotta e a temperatura ambiente. Il residuo è disciolto in 2 ml di acetone (4.2.6) per l'analisi dei triacilgliceroli (TAG).

4.4. **Analisi HPLC**4.4.1. *Preparazione dei campioni per l'analisi cromatografica*

Preparare una soluzione al 5 % del campione da analizzare pesando 0,5 g (con uno scarto massimo di  $\pm 0,001$  g) del campione in un matraccio tarato da 10 ml e portare a volume (10 ml) con il solvente di solubilizzazione (4.2.9).

4.4.2. *Procedimento*

Predisporre il sistema cromatografico. Far defluire il solvente di eluizione (4.2.8) ad un flusso di 1,5 ml/min, in modo da spurgare l'intero sistema. Attendere finché la linea di base è diventata stabile.

Iniettare 10  $\mu$ l del campione preparato come indicato al punto 4.3.

4.4.3. *Calcolo ed espressione dei risultati*

Impiegare il metodo della normalizzazione interna, ossia partendo dal presupposto che la somma delle aree dei picchi corrispondenti ai TAG da ECN 42 a ECN 52 è uguale al 100 %.

Calcolare la percentuale relativa di ciascun trigliceride applicando la formula:

% di trigliceride = area del picco  $\times$  100/somma delle aree dei picchi.

I risultati devono essere espressi con almeno due cifre decimali.

Vedere le note 1, 2, 3 e 4.

4.5. **Calcolo della composizione dei triacilgliceroli (% di moli) a partire dai dati relativi alla composizione in acidi grassi (% dell'area)**4.5.1. *Determinazione della composizione in acidi grassi*

La composizione in acidi grassi è determinata conformemente alla norma ISO 5508, mediante una colonna capillare. La preparazione degli esteri metilici è eseguita conformemente al metodo COI/T.20/Doc. n. 24.

4.5.2. *Acidi grassi considerati per il calcolo*

I gliceridi sono raggruppati secondo i loro numeri di carbonio equivalente (ECN), tenendo conto delle equivalenze fra ECN e acidi grassi riportate qui di seguito. Sono stati presi in considerazione soltanto gli acidi grassi con 16 e 18 atomi di carbonio, perché sono i soli ad avere importanza per l'olio di oliva. Gli acidi grassi devono essere riproporzionati al 100 %.

Acidi grassi (FA)	Abbreviazione	Peso molecolare (PM)	ECN
Acido palmitico	P	256,4	16
Acido palmitoleico	Po	254,4	14
Acido stearico	S	284,5	18
Acido oleico	O	282,5	16
Acido linoleico	L	280,4	14
Acido linolenico	Ln	278,4	12

4.5.3. *Trasformazione in moli della % dell'area per tutti gli acidi grassi (1)*

$$\text{moli P} = \frac{\text{area \% P}}{\text{PM P}}$$

$$\text{moli S} = \frac{\text{area \% S}}{\text{PM S}}$$

$$\text{moli Po} = \frac{\text{area \% Po}}{\text{PM Po}}$$

$$\text{moli O} = \frac{\text{area \% O}}{\text{PM O}}$$

$$\text{moli L} = \frac{\text{area \% L}}{\text{PM L}}$$

$$\text{moli Ln} = \frac{\text{area \% Ln}}{\text{PM Ln}}$$

## 4.5.4. Riproporzionamento degli acidi grassi al 100 % (2)

$$\text{moli \% P (1,2,3)} = \frac{\text{moli P} * 100}{\text{moli (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{moli \% S (1,2,3)} = \frac{\text{moli S} * 100}{\text{moli (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{moli \% Po (1,2,3)} = \frac{\text{moli Po} * 100}{\text{moli (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{moli \% O (1,2,3)} = \frac{\text{moli O} * 100}{\text{moli (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{moli \% L (1,2,3)} = \frac{\text{moli L} * 100}{\text{moli (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\text{moli \% Ln (1,2,3)} = \frac{\text{moli Ln} * 100}{\text{moli (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

Il risultato esprime la percentuale di ciascun acido grasso in moli % sulla posizione complessiva (1, 2, 3) dei TAG.

Si calcola quindi la somma degli acidi grassi saturi P e S (SFA) e degli acidi grassi insaturi Po, O, L e Ln (UFA) (3):

$$\text{moli \% SFA} = \text{moli \% P} + \text{moli \% S}$$

$$\text{moli \% UFA} = 100 - \text{moli \% SFA}$$

## 4.5.5. Calcolo della composizione degli acidi grassi nelle posizioni 2, e 1, 3 dei TAG:

Gli acidi grassi sono distribuiti in tre gruppi, nel modo seguente: uno per la posizione 2 e due identici per le posizioni 1 e 3, con coefficienti diversi per gli acidi saturi (P e S) e gli acidi insaturi (Po, O, L e Ln).

## 4.5.5.1. Acidi grassi saturi nella posizione 2 [P(2) e S(2)] (4)

$$\text{moli \% P(2)} = \text{moli \% P (1,2,3)} * 0,06$$

$$\text{moli \% S(2)} = \text{moli \% S (1,2,3)} * 0,06$$

## 4.5.5.2. Acidi grassi insaturi nella posizione 2 [Po(2), O(2), L(2) e Ln(2)] (5):

$$\text{moli \% Po(2)} = \frac{\text{moli \% Po(1,2,3)}}{\text{moli \% UFA}} * (100 - \text{moli \% P(2)} - \text{moli \% S(2)})$$

$$\text{moli \% O(2)} = \frac{\text{moli \% O(1,2,3)}}{\text{moli \% UFA}} * (100 - \text{moli \% P(2)} - \text{moli \% S(2)})$$

$$\text{moli \% L(2)} = \frac{\text{moli \% L(1,2,3)}}{\text{moli \% UFA}} * (100 - \text{moli \% P(2)} - \text{moli \% S(2)})$$

$$\text{moli \% Ln(2)} = \frac{\text{moli \% Ln(1,2,3)}}{\text{moli \% UFA}} * (100 - \text{moli \% P(2)} - \text{moli \% S(2)})$$

## 4.5.5.3. Acidi grassi nelle posizioni 1e 3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) e Ln(1,3)] (6):

$$\text{moli \% P(1,3)} = \frac{\text{moli \% P(1,2,3)} - \text{moli \% P(2)}}{2} + \text{moli \% P(1,2,3)}$$

$$\text{moli \% S(1,3)} = \frac{\text{moli \% S(1,2,3)} - \text{moli \% S(2)}}{2} + \text{moli \% S(1,2,3)}$$

$$\text{moli \% Po(1,3)} = \frac{\text{moli \% Po(1,2,3)} - \text{moli \% Po(2)}}{2} + \text{moli \% Po(1,2,3)}$$

$$\text{moli \% O(1,3)} = \frac{\text{moli \% O(1,2,3)} - \text{moli \% O(2)}}{2} + \text{moli \% O(1,2,3)}$$

$$\text{moli \% L(1,3)} = \frac{\text{moli \% L(1,2,3)} - \text{moli \% L(2)}}{2} + \text{moli \% L(1,2,3)}$$

$$\text{moli \% Ln(1,3)} = \frac{\text{moli \% Ln(1,2,3)} - \text{moli \% Ln(2)}}{2} + \text{moli \% Ln(1,2,3)}$$

#### 4.5.6. Calcolo dei triacilgliceroli

##### 4.5.6.1. TAG con un solo acido grasso (AAA, qui LLL, PoPoPo) (7)

$$\text{moli \% AAA} = \frac{\text{moli \% A(1,3)} * \text{moli \% A(2)} * \text{moli \% A(1,3)}}{10\ 000}$$

##### 4.5.6.2. TAG con due acidi grassi (AAB, qui PoPoL, PoLL) (8)

$$\text{moli \% AAB} = \frac{\text{moli \% A(1,3)} * \text{moli \% A(2)} * \text{moli \% B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{moli \% ABA} = \frac{\text{moli \% A(1,3)} * \text{moli \% B(2)} * \text{moli \% A(1,3)}}{10\ 000}$$

##### 4.5.6.3. TAG con tre diversi acidi grassi (ABC, qui OLLn, PLLn, PoOLn, PPOln) (9)

$$\text{moli \% ABC} = \frac{\text{moli \% A(1,3)} * \text{moli \% B(2)} * \text{moli \% C(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{moli \% BCA} = \frac{\text{moli \% B(1,3)} * \text{moli \% C(2)} * \text{moli \% A(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\text{moli \% CAB} = \frac{\text{moli \% C(1,3)} * \text{moli \% A(2)} * \text{moli \% B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

##### 4.5.6.4. Triacilgliceroli con ECN 42

I triacilgliceroli ECN 42 sono calcolati secondo le equazioni 7, 8 e 9 e sono espressi nell'ordine previsto di eluizione in HPLC (normalmente soltanto tre picchi).

LLL

PoLL e isomero di posizione LPOl

OLLn e isomeri di posizione OLnL e LnOL

PoPoL e isomero di posizione POLPo

PoOLn e isomeri di posizione OPOln e OLnPo

PLLn e isomeri di posizione LLnP e LnPL

PoPoPo

SLnLn e isomero di posizione LnSLn

PPoLn e isomeri di posizione PLnPo e PoPLn

I triacilgliceroli ECN 42 sono espressi dalla somma dei nove triacilgliceroli, compresi i loro isomeri di posizione. I risultati devono essere espressi con almeno due cifre decimali.

## 5. VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Si confrontano il contenuto teorico calcolato e il contenuto determinato mediante HPLC. Se la differenza nel valore assoluto tra i dati HPLC e i dati teorici è superiore ai valori riportati nella norma per la pertinente categoria di olio, il campione contiene olio di semi.

I risultati vanno espressi con due cifre decimali.

## 6. ESEMPIO (I NUMERI SI RIFERISCONO ALLE SEZIONI NEL TESTO DEL METODO)

— 4.5.1. Calcolo della % di moli degli acidi grassi a partire dai dati della GLC (% normalizzata dell'area)

Per la composizione in acidi grassi si ottengono mediante GLC i dati seguenti:

FA	P	S	Po	O	L	Ln
PM	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
Area %	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

— 4.5.3 Conversione, in moli, della % dell'area per tutti gli acidi grassi (cfr. formula (1))

$$\text{moli P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moli P}$$

$$\text{moli S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moli S}$$

$$\text{moli Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moli Po}$$

$$\text{moli O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moli O}$$

$$\text{moli L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moli L}$$

$$\text{moli Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ moli Ln}$$

$$\text{Somma} = 0,35821 \text{ moli TAG}$$

— 4.5.4 Normalizzazione al 100 % delle moli di acidi grassi (cfr. formula (2))

$$\text{moli \% P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ moli P} * 100}{0,35821 \text{ moli}} = 10,887 \%$$

$$\text{moli \% S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ moli S} * 100}{0,35821 \text{ moli}} = 2,942 \%$$

$$\text{moli \% Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ moli Po} * 100}{0,35821 \text{ moli}} = 1,097 \%$$

$$\text{moli \% O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ moli O} * 100}{0,35821 \text{ moli}} = 74,116 \%$$

$$\text{moli \% L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ moli L} * 100}{0,35821 \text{ moli}} = 9,955 \%$$

$$\text{moli \% Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ moli Ln} * 100}{0,35821 \text{ moli}} = 1,002 \%$$

$$\text{Totale moli \%} = 100 \%$$

Somma degli acidi grassi saturi e insaturi nella posizione 1,2,3- dei TAG (cfr. formula (3)):

$$\text{moli \% SFA} = 10,887 \% + 2,942 \% = \mathbf{13,829 \%}$$

$$\text{moli \% UFA} = 100,000 \% - 13,829 \% = \mathbf{86,171 \%}$$

— 4.5.5 *Calcolo della composizione di acidi grassi nelle posizioni 2 e 1, 3 dei TAG*

— 4.5.5.1 *Acidi grassi saturi nella posizione 2 [P(2) e S(2)] (cfr. formula (4))*

$$\text{moli \% P(2)} = 10,887 \% * 0,06 = 0,653 \text{ moli \%}$$

$$\text{moli \% S(2)} = 2,942 \% * 0,06 = 0,177 \text{ moli \%}$$

— 4.5.5.2 *Acidi grassi insaturi nella posizione 2 [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) e Ln(1,3)] (cfr. formula (5))*

$$\text{moli \% Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,262 \text{ moli \%}$$

$$\text{moli \% O(2)} = \frac{74,116 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 85,296 \text{ moli \%}$$

$$\text{moli \% L(2)} = \frac{9,955 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 11,457 \text{ moli \%}$$

$$\text{moli \% Ln(2)} = \frac{1,002 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,153 \text{ moli \%}$$

— 4.5.5.3 *Acidi grassi nelle posizioni 1, 3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) e Ln(1,3)] (cfr. formula (6))*

$$\text{moli \% P(1,3)} = \frac{10,887 - 0,653}{2} + 10,887 = 16,004 \text{ moli \%}$$

$$\text{moli \% S(1,3)} = \frac{2,942 - 0,177}{2} + 2,942 = 4,325 \text{ moli \%}$$

$$\text{moli \% Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,262}{2} + 1,097 = 1,015 \text{ moli \%}$$

$$\text{moli \% O(1,3)} = \frac{74,116 - 85,296}{2} + 74,116 = 68,526 \text{ moli \%}$$

$$\text{moli \% L(1,3)} = \frac{9,955 - 11,457}{2} + 9,955 = 9,204 \text{ moli \%}$$

$$\text{moli \% Ln(1,3)} = \frac{1,002 - 1,153}{2} + 1,002 = 0,927 \text{ moli \%}$$

— 4.5.6. *Calcolo dei triacilgliceroli*

Dalla composizione calcolata di acidi grassi nelle posizioni 2 e 1e 3:

AG in	posiz.1,3-	posiz. 2-
P	16,004 %	0,653 %
S	4,325 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,262 %
O	68,526 %	85,296 %
L	9,204 %	11,457 %
Ln	0,927 %	1,153 %
Somma	100,0 %	100,0 %

si calcolano i seguenti triacilgliceroli:

LLL

PoPoPo

PoLL con 1 isomero di posizione

SLnLn con 1 isomero di posizione

PoPoL con 1 isomero di posizione

PPoLn con 2 isomeri di posizione

OLLn con 2 isomeri di posizione

PLLn con 2 isomeri di posizione

PoOLn con 2 isomeri di posizione

— 4.5.6.1. TAG con un unico acido grasso (LLL, PoPoPo) (cfr. formula (7))

$$\text{moli \% LLL} = \frac{9,204 \% * 11,457 \% * 9,204 \%}{10\ 000} = \mathbf{0,09706 \text{ moli LLL}}$$

$$\text{moli \% PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 1,015 \%}{10\ 000} = \mathbf{0,00013 \text{ moli PoPoPo}}$$

— 4.5.6.2 TAG con due acidi grassi (PoLL, SLnLn, PoPoL) (cfr. formula (8))

$$\text{moli \% PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,02141$$

$$\text{moli \% LPoL} = \frac{9,204 \% * 1,262 \% * 9,204 \%}{10\ 000} = 0,01069$$

**0,03210 moli PoLL**

$$\text{moli \% SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,325 \% * 1,153 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,00092$$

$$\text{moli \% LnSLn} = \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10\ 000} = 0,00002$$

**0,00094 moli SLnLn**

$$\text{moli \% PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,00236$$

$$\text{moli \% PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 1,015 \%}{10\ 000} = 0,00118$$

**0,00354 moli PoPoL**

— 4.5.6.3 TAG con tre diversi acidi grassi (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) Cfr. formula (9)

$$\text{moli \% PPOLn} = \frac{16,004 \% * 1,262 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,00374$$

$$\text{moli \% LnPPo} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10\ 000} = 0,00012$$

$$\text{moli \% PoLnP} = \frac{1,015 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\ 000} = 0,00375$$

**0,00761 moli PPOLn**

$$\text{moli \% OLLn} = \frac{68,526 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,14556$$

$$\text{moli \% LnOL} = \frac{0,927 \% * 85,296 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,14555$$

$$\text{moli \% LLnO} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 68,526 \% * 2}{10\ 000} = 0,14544$$

**0,43655 moli OLLn**

$$\text{moli \% PLLn} = \frac{16,004 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,03399$$

$$\text{moli \% LnPL} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,00111$$

$$\text{moli \% LLnP} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\ 000} = 0,03397$$

**0,06907 moli PLLn**

$$\text{moli \% PoOLn} = \frac{1,015 \% * 85,296 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,01605$$

$$\text{moli \% LnPoO} = \frac{0,927 \% * 1,262 \% * 68,526 \% * 2}{10\ 000} = 0,01603$$

$$\text{moli \% OLnPo} = \frac{68,526 \% * 1,153 \% * 1,015 \% * 2}{10\ 000} = 0,01604$$

**0,04812 di moli PoOLn**

**ECN42 = 0,69512 % di moli TAG**

*Nota 1:* L'ordine di eluizione può essere determinato calcolando i numeri di carbonio equivalente, spesso definiti dalla relazione  $ECN = CN - 2n$ , dove CN è il numero di carbonio ed n è il numero di doppi legami; esso può essere calcolato precisamente tenendo conto dell'origine del doppio legame. Se  $n_o$ ,  $n_l$  e  $n_{ln}$  sono i numeri di doppi legami attribuiti rispettivamente agli acidi oleico, linoleico e linolenico, il numero di carbonio equivalente può essere calcolato mediante la relazione data dalla formula:

$$EN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln}$$

dove i coefficienti  $d_o$ ,  $d_l$  e  $d_{ln}$  possono essere calcolati mediante i trigliceridi di riferimento. Nelle condizioni specificate nel presente metodo, la relazione ottenuta sarà vicina a:

$$ECN = CN - (2,60 n_o) - (2,35 n_l) - (2,17 n_{ln})$$

*Nota 2:* Con diversi trigliceridi di riferimento, è anche possibile calcolare la risoluzione rispetto alla trioleina:

$$\alpha = RT^1 / RT \text{ trioleina}$$

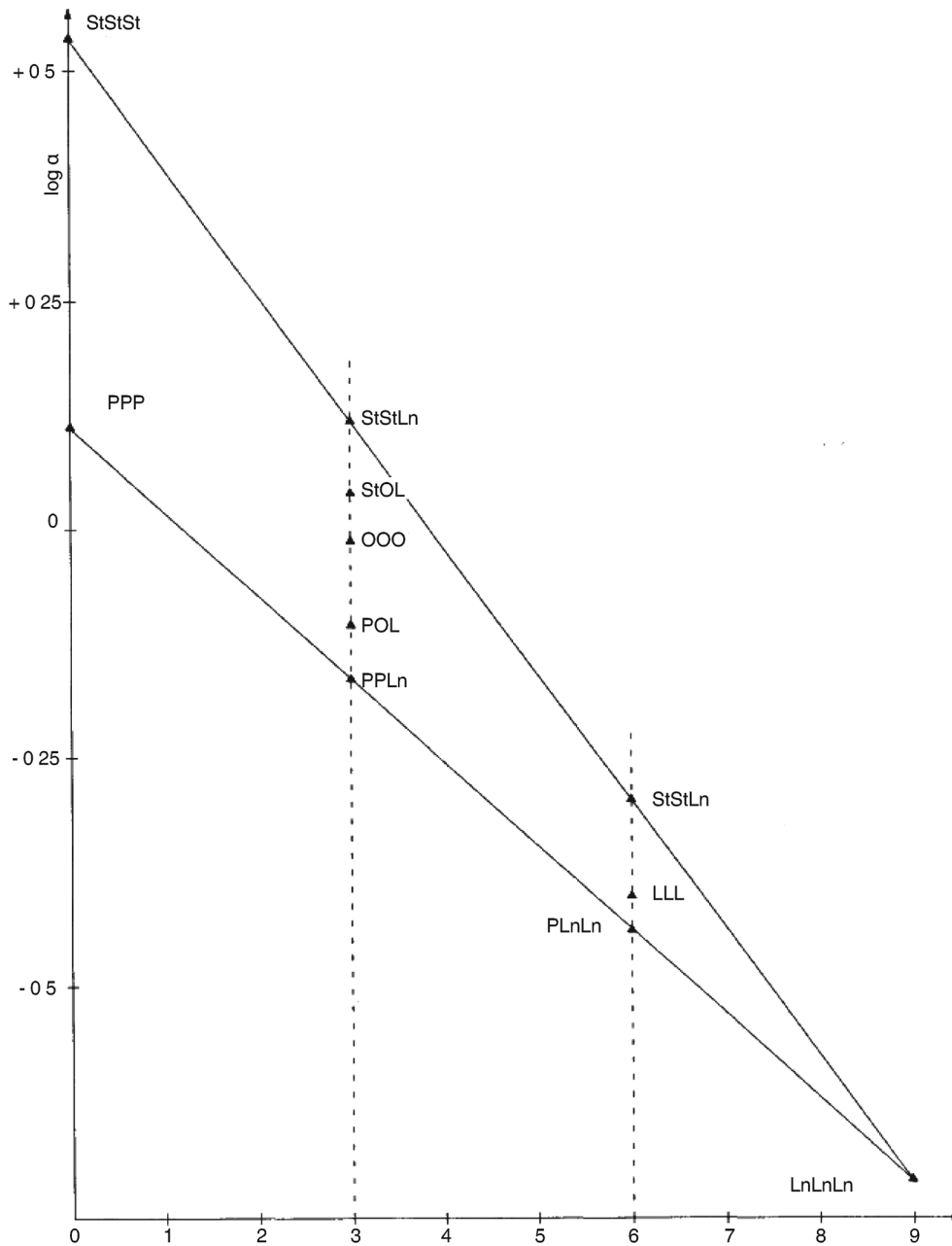
impiegando il tempo corretto di ritenzione  $RT \text{ RT}^1 = RT - RT \text{ solvente}$

Il grafico di  $\log \alpha$  in funzione di f (numero di doppi legami) consente di determinare i valori di ritenzione per tutti i trigliceridi degli acidi grassi contenuti nei trigliceridi di riferimento - cfr. figura 1.

*Nota 3:* l'efficienza della colonna dovrebbe permettere una chiara separazione del picco della trilineoleina dai picchi dei trigliceridi con un RT adiacente. L'eluizione viene effettuata fino al picco corrispondente a ECN 52.

*Nota 4:* una misura corretta delle aree di tutti i picchi rilevanti per la presente determinazione è garantita quando l'altezza del secondo picco della serie ECN 50 è pari al 50 % del massimo della scala di registrazione.

Figura 1

Grafico di  $\log \alpha$  in funzione di  $f$  (numero di doppi legami)

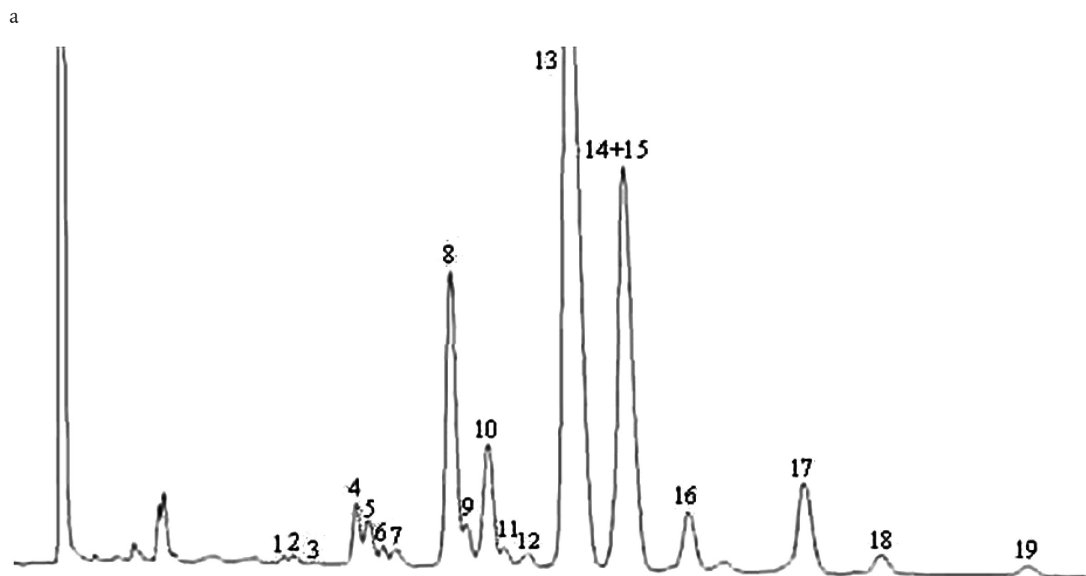
Numero di doppi legami

La: acido laurico; My: acido miristico; P: acido palmitico; S: acido stearico; O: acido oleico; L: acido linoleico; Ln: acido linolenico



Figura 2

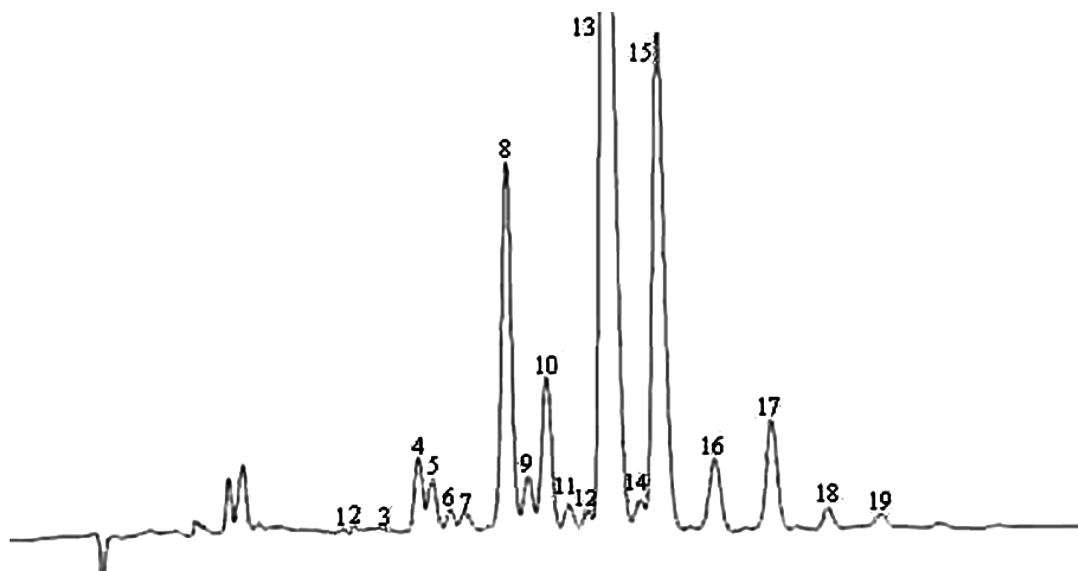
## Olio di oliva a basso tenore in acido linoleico



Con solvente: acetone/acetonitrile.

PROFILO a: componenti principali dei picchi cromatografici: **ECN42**: (1) LLL + PoLL; (2) OLLn + PoOLn; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL + PoOL; (5) OOLn + PLL; (6) POLn + PPoPo; (7) OOL + PoOO; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP; (14 + 15) SOL + POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS.

b

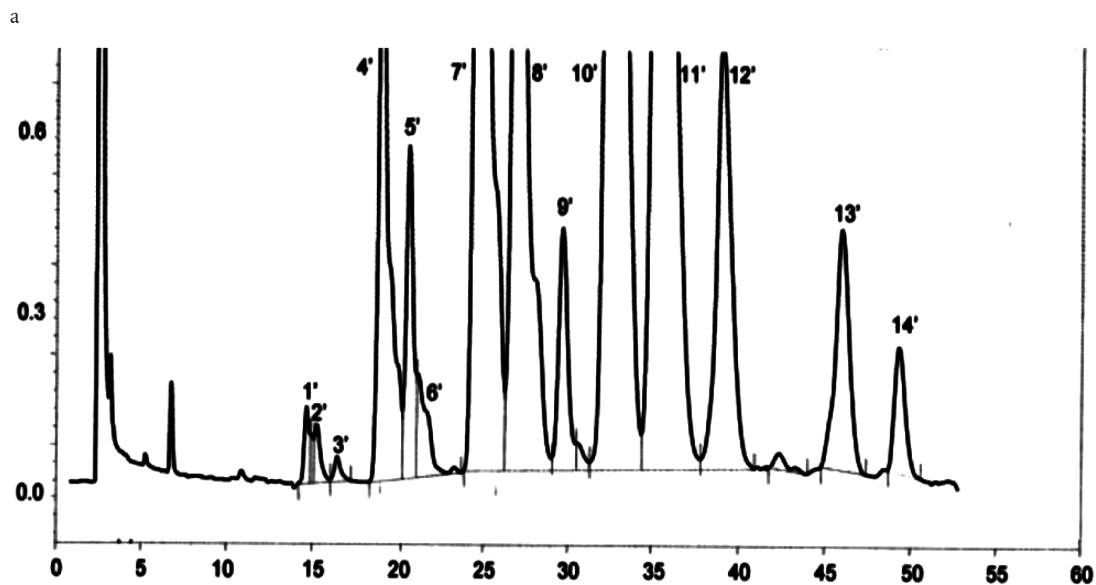


Con solvente: propionitrile

PROFILO b: componenti principali dei picchi cromatografici: **ECN42**: (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPoPo + PPoL; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS

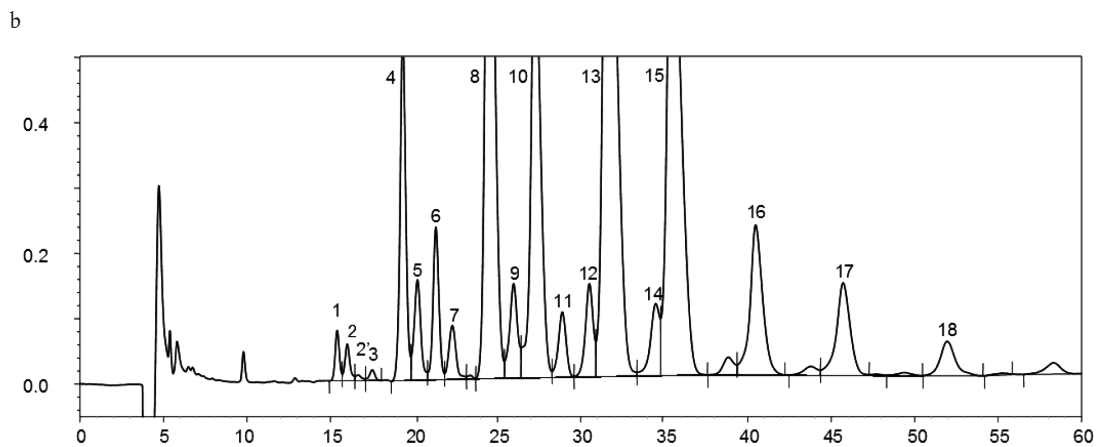
Figura 3

## Olio di oliva ad alto tenore in acido linoleico



Con solvente: Acetone/Acetonitrile (50:50).

Profilo a: componenti principali dei picchi cromatografici: **ECN42:** (1') LLL + PoLL; (2') OLLn + PoOLn; (3') PLLn; **ECN44:** (4') OLL + PoOL; (5') OOLn + PLL; (6') POLn + PPOPo; **ECN46:** (7') OOL + PoOO; (8') PLO + SLL + PoOP; (9') PLP + PoPP; **ECN48:** (10') OOO; (11') POO + SLL + PPOo; (12') POP + PLS; **ECN50:** (13') SOO; (14') POS + SLS



Con solvente: propionitrile.

Profilo b: componenti principali dei picchi cromatografici: **ECN42:** (1) LLL; (2 + 2') OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44:** (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPOPo + PPOl; **ECN46:** (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; **ECN48:** (12) PLP; (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50:** (17) SOO; (18) POS + SLS; **ECN52:** (19) AOO.»

ALLEGATO III

«ALLEGATO XXI

**Risultati dei controlli di conformità eseguiti sugli oli di oliva di cui al paragrafo 2 dell'articolo 8**

Campione	Categoria	Paese di origine	Luogo di ispezione <sup>(1)</sup>	Etichettatura						Parametri chimici			Caratteristiche organolettiche <sup>(4)</sup>			Conclusione finale		
				Denominazione legale	Denominazione di origine	Condizioni di conservazione	Informazione erronea	Leggibilità	C/NC <sup>(3)</sup>	Parametri fuori limite SÌ/NO	Se sì, indicare quale/quali <sup>(2)</sup>	C/NC <sup>(3)</sup>	Mediana dei difetti	MEDIA-na del fruttato	C/NC <sup>(3)</sup>	Azione richiesta	Sanzione	

<sup>(1)</sup> Mercato interno (frantoi, imbottiglieri, fase di vendita al dettaglio), esportazione, importazione

<sup>(2)</sup> Ciascuna caratteristica dell'olio di oliva di cui all'allegato I deve avere un codice

<sup>(3)</sup> Conforme/non conforme

<sup>(4)</sup> Non richieste per l'olio di oliva e per l'olio di sansa»