

## Corso “Trasformazione e conservazione dei prodotti alimentari”

### Esercitazioni di analisi degli oli

(1) - determinazione dell'Acidità

#### **Determinazione dell'acidità di un olio**

**Premessa** Per acidità di una sostanza grassa si intende il contenuto percentuale di acidi grassi liberi.

In dipendenza dalla natura della sostanza grassa in esame, l'acidità potrà essere espressa in acido laurico (P.M. 200) per gli oli di cocco, palmisti e simili, in acido palmitico (P.M. 256) per gli oli di palma, in acido oleico (P.M. 282) per tutti gli altri tipi di oli. Qualora si voglia il reale contenuto percentuale in acidi grassi liberi, occorre introdurre il peso molecolare medio degli acidi grassi della sostanza grassa considerata.

L'acidità di una sostanza grassa può essere espressa anche come “numero di acidità”, definito come mg di KOH necessari per neutralizzare un grammo di sostanza grassa.

**Principio del metodo** La sostanza grassa in esame, disciolta in miscela alcool/etere, viene titolata con una soluzione di NaOH, utilizzando come indicatore la fenoftaleina.

**Reagenti** Miscela alcool/etere 1:2. Si miscelano 1 volume di alcool etilico 95% e due volumi di etere etilico; prima dell'uso si aggiungono alcune gocce di fenoftaleina e si titola accuratamente con soluzione alcalina a titolo noto (KOH o NaOH, 0,5 o 0,1 N). Indicatore: fenoftaleina (soluzione etanolica 1%).

**Procedimento** La determinazione si effettua:

- Sul campione tal quale quando la somma di umidità e sostanze volatili – impurità non è superiore all'1%;
- Sul campione secco e filtrato quando supera tale valore.

In una beuta da 200 ml si pesa esattamente una aliquota di campione tal quale o di campione secco e filtrato, di massa conforme a quanto indicati in tabella 1. Si aggiungono 100 ml di miscela alcool/etere e si agita fino a soluzione completa. Si aggiungono 5 gocce dell'indicatore fenoftaleina e si titola fino a viraggio con la soluzione di idrossido alcalino 0,5 o 0,1 N secondo quanto indicato in tabella 1.

Acidità (presunta) %	Massa di campione, grammi	N (soluz. titolante)
< 0.5	20	0.1
0.5-3.0	10	0.1
3.1-10	5	0.5
> 10	3 o meno	0.5

$$\text{Acidità: espressa in \% di acido oleico} = \frac{V \cdot N \cdot 282}{m \cdot 10}$$

$$\text{Acidità: espressa in n° di acidità} = \frac{V \cdot N \cdot \text{p.e.}}{m}$$

Dove :

V = volume di soluzione di idrossido alcalino consumato, millilitri.

N = normalità della soluzione di idrossido alcalino.

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

p.e.= peso equivalente idrossido alcalino.

(2) - determinazione dell'Indice di Rifrazione

### CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE DELL'OLIO D'OLIVA

Parametro	VALORE
Densità a 15°C	0,915 – 0,919
Indice di rifrazione a 20 °C	1,4665 – 1,4675
Numero di perossidi	inferiore a 20
Numero di saponificazione	184 - 196

#### (2) Determinazione dell'indice di rifrazione

E' noto che un raggio di luce viene deviato dalla sua direzione quando attraversa un liquido trasparente. Tale fenomeno segue la legge della rifrazione: il rapporto tra il seno dell'angolo di incidenza (i) ed il seno dell'angolo di rifrazione (r) è una costante per un determinato mezzo. Da questo rapporto deriva l'indice di rifrazione (I.R.) così rappresentato:

$$\text{I.R.} = \frac{\sin i}{\sin r}$$

Così, ad esempio, in rapporto all'aria, l'I.R. dell'acqua è 1,333 se ad essa si aggiunge un soluto (es. saccarosio) tale indice aumenterà di un valore tanto maggiore quanto più alta è la concentrazione molare della sostanza addizionata.

L'I.R. varia in funzione della temperatura e della lunghezza d'onda della luce incidente ed è strettamente legato con il grado di insaturazione dell'olio; infatti per gli oli alimentari a 20°C è di:

1,468-1,470 per i non siccativi

1,470-1,476 per i semisiccativi

1,480-1,523 per i siccativi

L'I.R. si può determinare mediante apparecchi detti rifrattometri: una piccola porzione di soluzione da esaminare viene posta tra due prismi di cristallo e ciò farà deviare il raggio incidente in misura maggiore o minore a seconda della natura, e della concentrazione, della sostanza indagata.

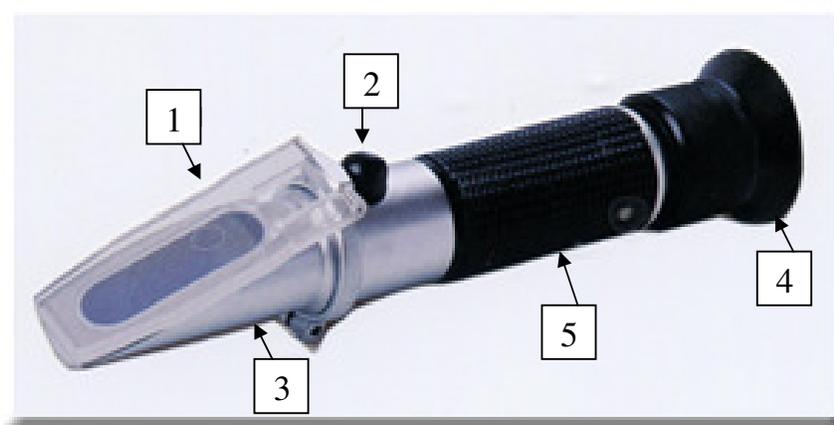
Il rifrattometro è composto da un sistema ottico, con oculare ed obiettivo, in cui è inserita una scala rifrattometrica e, nel caso specifico degli oli e dei grassi prende il nome di burrorifrattometro: il valore letto sulla scala sarà compreso tra 1,44 e 1,54. Spesso in sostituzione dell'I.R. si fa ricorso al grado rifrattometrico e la tabella seguente permette di trasformare il grado rifrattometrico rilevato nell'I.R. corrispondente e viceversa.

I.R.	G.R.	I.R.	G.R.	I.R.	G.R.
1,4659	60,0	1,4670	61,7	1,4681	63,4
1,4660	60,2	1,4671	61,8	1,4682	63,5
1,4661	60,3	1,4672	62,0	1,4683	63,7
1,4662	60,5	1,4673	62,2	1,4684	63,8
1,4663	60,6	1,4674	62,4	1,4685	64,0
1,4664	60,8	1,4675	62,5	1,4686	64,2
1,4665	60,9	1,4676	62,6	1,4687	64,3

1,4666	61,1	1,4677	62,8	1,4688	64,5
1,4667	61,2	1,4678	62,9	1,4689	64,7
1,4668	61,4	1,4679	63,1	1,4690	64,8
1,4669	61,5	1,4680	63,2		

In letteratura, l'I.R., riferito ad una data temperatura  $t$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) e alla luce di lunghezza d'onda corrispondente a quella della linea D del sodio ( $5893 \text{ \AA}$ ), si indica con la notazione:  $n_D^t$

Fig.1 - Rifrattometro portatile



- 1- Coperchio del prisma
- 2- Vite per la taratura della scala
- 3- Prisma
- 4- Oculare con la ghiera di regolazione diottrica (messa a fuoco)
- 5- Corpo del rifrattometro

**Procedimento** Rivolgere la parte frontale del rifrattometro verso un'intensa fonte luminosa e regolare la ghiera di compensazione diottrica (4) fino ad ottenere nitida l'immagine della scala di misura. Taratauara: sollevare il coperchio (1) e distribuire sulla superficie del prisma (3) 1-2 gocce di soluzione standard, richiudere e leggere sulla scala il valore corrispondente alla linea di confine tra la zona chiara, superiore, e quella scura, inferiore. Come soluzione standard possiamo usare p.es. il glicerolo che ha i seguenti I.R.: 1,4758 a  $15^{\circ}\text{C}$ , 1,4746 a  $20^{\circ}\text{C}$  e 1,4730 a  $25^{\circ}\text{C}$ . Se il valore letto è diverso da quello teorico, dovremo agire ,con l'apposito cacciavite, sulla vite (2) fino a quando i due valori non coincidano. Per letture eseguite a valori di temperatura diversi da quelli standards si applica la formula [1] per la dovuta correzione.

Sollevare il coperchio del prisma (1), pulire la superficie con un panno morbido di cotone, e distribuire in maniera omogenea sulla sua superficie 1-2 gocce di olio. Richiudere il coperchio, premere leggermente, quindi, puntando verso una fonte luminosa, leggere sulla scala il valore corrispondente alla linea di confine tra la zona chiara e quella scura. Dopo la misurazione ripulire la superficie del prisma e del suo coperchio.

Come già detto l'I.R. varia in funzione della temperatura ed è quindi fondamentale registrare il valore della temperatura del campione al momento dell'analisi. Nel caso dell'olio di oliva la temperatura di riferimento (standard) è  $25^{\circ}\text{C}$ , se la misura viene fatta ad una temperatura maggiore o minore di  $25^{\circ}\text{C}$  l'I.R. rilevato deve necessariamente essere corretto. Al valore letto ( $V_l$ ) sommiamo algebricamente il prodotto ottenuto moltiplicando un coefficiente ( $c$ , indice di compensazione riferito al grado centigrado) per la differenza tra la temperatura letta ( $t$ ) e quella standard di riferimento ( $25$ ). Otteniamo il valore corretto dell'I.R. ( $V_c$ ):

$$V_l + c * (t-25) = V_c \quad [1]$$

Se ad esempio abbiamo ottenuto un I.R.=1,476 (olio di soia) operando a  $19^{\circ}\text{C}$  avremo:

$$V_c = 1,476 + 0,00038 * (19-25) = 1,476 - 0,00228 = 1,47372$$

Quando la temperatura misurata è minore di quella standard, come nell'esempio visto, la compensazione è negativa. Quando invece la temperatura misurata è maggiore di quella standard, la compensazione sarà positiva. L'indice di compensazione (c) varia in funzione del tipo di olio esaminato, nel caso degli oli alimentari si applica il coefficiente 0,00038.

### **(3) Determinazione del numero di perossidi**

Il contenuto in perossidi, espresso come numero di milliequivalenti di ossigeno per chilo di olio (meq O<sub>2</sub>/kg), indica il grado di ossidazione primaria dell'olio, cioè la sua tendenza a irrancidire. In base all'attuale normativa il limite relativo al numero di perossidi è 20, al di sopra del quale l'olio è lampante. Valori favorevoli sono inferiori a 10-12. I perossidi si formano ad opera dell'ossigeno dell'aria e per azione di alcuni enzimi specifici presenti nel frutto, le lipossidasi, che, quando entrano in contatto con l'olio, a seguito di lesioni cellulari, vanno a ossidare gli acidi grassi. Anche durante la conservazione dell'olio, la semplice presenza dell'ossigeno può attivare l'ossidazione chimica a carico degli acidi grassi, con conseguente formazione di idroperossidi. La reazione, una volta avviata, procede irreversibilmente, favorita dalla luce, dal calore e dalla presenza di ossigeno. I perossidi sono inodori e insapori, per cui non percepibili a livello organolettico ma, essendo molto instabili, si decompongono facilmente dando luogo alla formazione di aldeidi e chetoni, responsabili del difetto di rancido. Un elevato numero di perossidi evidenzia un processo di ossidazione già avviato e irreversibile, mentre un basso numero di perossidi non è necessariamente legato a qualità elevata, in quanto l'ossidazione può essere passata alla fase secondaria, in cui i perossidi si decompongono in aldeidi e chetoni. È quindi necessario accompagnare l'analisi dei perossidi con l'esame spettrofotometrico e il saggio organolettico.

#### **1. OGGETTO**

Si tratta di un metodo per la determinazione del numero di perossidi in oli e grassi.

#### **2. CAMPO D'APPLICAZIONE**

Oli e grassi animali e vegetali.

#### **3. DEFINIZIONE**

Il numero di perossidi è il quantitativo delle sostanze presenti nel campione, espresse in milliequivalenti di ossigeno attivo per kg, che ossidano lo ioduro di potassio nelle condizioni che vengono descritte.

#### **4. PRINCIPIO**

Trattamento della sostanza in esame, sciolta in acido acetico e cloroformio, con una soluzione di ioduro di potassio. Titolazione dello iodio liberato con soluzione di tiosolfato di sodio standardizzata.

#### **5. APPARECCHIATURA**

Tutta l'apparecchiatura usata deve essere esente da sostanze riducenti o ossidanti.

Nota: Non ungere le superfici smerigliate.

**5.1.** Ditale di vetro da 3 ml.

**5.2.** Palloni a collo e tappo smerigliato, aventi una capacità di circa 250 ml, previamente asciugati e

riempiti di gas puro, secco inerte (azoto o, di preferenza, anidride carbonica).

**5.3.** Buretta da 25 o 50 ml, graduata in 0,1 ml.

## 6. REAGENTI

**6.1.** Cloroformio, di qualità per reagente analitico, liberato dall'ossigeno facendovi gorgogliare una corrente di gas inerte puro e secco.

**6.2.** Acido acetico glaciale, di qualità per analisi, liberato dall'ossigeno facendovi gorgogliare una corrente di gas puro e secco.

**6.3.** Ioduro di potassio, soluzione acquosa satura, di recente preparazione, esente da iodio e da iodati.

**6.4.** Tiosolfato di sodio, 0,01 o 0,02 N, soluzione acquosa accuratamente standardizzata immediatamente prima dell'uso.

**6.5.** Indicatore (salda d'amido).

## 7. CAMPIONE

Prelevare il campione e conservarlo al riparo dalla luce, tenendolo al fresco e mettendolo in contenitori di vetro completamente riempiti, sigillati ermeticamente con tappi a smeriglio o di sughero.

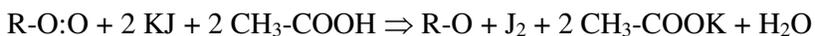
## 8. PROCEDIMENTO

La prova dev'essere effettuata alla luce del giorno diffusa oppure alla luce artificiale. Pesare in un ditale di vetro (5.1) oppure, in mancanza, in un pallone (5.2) con l'approssimazione di 0,001 g, una massa del campione conformemente alla seguente tabella e al numero di perossidi previsto:

Numero di perossidi previsto (meq)	Peso della sostanza da analizzare (in g)
0 - 12	5,0 - 2,0
12 - 20	2,0 - 1,2
20 - 30	1,2 - 0,8
30 - 50	0,8 - 0,5
50 - 90	0,5 - 0,3

Stappare un pallone (5.2) ed introdurre il ditale di vetro contenente la sostanza da analizzare. Aggiungere 10 ml di cloroformio (6.1). Sciogliere la sostanza da analizzare rapidamente, agitando. Aggiungere 15 ml di acido acetico (6.2), quindi 1 ml di soluzione di ioduro di potassio (6.3). Ritappare rapidamente, agitare per 1 minuto e lasciar riposare per 5 minuti esatti al riparo dalla luce, ad una temperatura compresa tra 15 e 25°C. Aggiungere circa 75 ml di acqua distillata.

Reazione di liberazione dello iodio:



Titolare lo iodio liberato con una soluzione di tiosolfato di sodio (6.4) (soluzione 0,002 N per valori previsti inferiori a 12 e soluzione 0,01 N per valori previsti superiori a 12) agitando vigorosamente, usando la salda d'amido (6.5) come indicatore.

Eseguire due determinazioni sullo stesso campione di sostanza.

Eseguire contemporaneamente una prova in bianco. Se il risultato del bianco supera 0,05 ml di soluzione 0,01 N di tiosolfato di sodio (6.4), sostituire i reagenti impuri.

## 9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il numero di perossidi (P.V.), espresso in milliequivalenti di ossigeno attivo per kg, viene dato dalla formula:

$$P.V. = (V * T / M) * 1000$$

dove:

V = è il numero di ml della soluzione standardizzata di tiosolfato di sodio (6.4) usata per la prova, corretto in modo da tener conto della prova in bianco.

T = è la normalità esatta della soluzione di tiosolfato di sodio (6.4) usata.

M = è il peso in g della sostanza da analizzare.

Considerare come risultato la media aritmetica delle due determinazioni eseguite.

## (4) Analisi spettrofotometrica nell'ultravioletto

### PREMESSA

L'esame spettrofotometrico nell'ultravioletto può fornire indicazioni 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 dienici e trienici coniugati. I valori di tali assorbimenti sono espressi come estinzione specifica di una soluzione della sostanza grassa all'1 % nel solvente prescritto, in cuvette dello spessore di 1 centimetro (E 1%, 1 cm) convenzionalmente indicata con K, (detto anche coefficiente di estinzione).

### 1. OGGETTO

Il metodo descrive il procedimento per l'esecuzione dell'esame spettrofotometrico nell'ultravioletto delle sostanze grasse.

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza grassa in esame viene disciolta nel solvente richiesto, 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.

### 3. APPARECCHIATURA

**3.1.** Spettrofotometro per misure di estinzione nell'ultravioletto fra 220 e 360 nm, con possibilità di lettura per ogni unità nanometrica.

**3.2.** Vaschette di quarzo prismatiche, con coperchio, di percorso ottico da 1 cm. Le vaschette, riempite di acqua o 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.** Colonna per cromatografia, avente lunghezza 450 mm e diametro 35 mm, con tubo di deflusso del diametro di circa 10 mm.

#### 4. REAGENTI

**4.1.** Isoottano (2,2,4 trimetilpentano) spettrofotometricamente puro: deve avere, in riferimento all'acqua distillata, trasmittanza non inferiore al 60 % a 220 nm e non inferiore al 95 % a 250 nm; oppure

- Cicloesano spettrofotometricamente puro: deve avere, in riferimento all'acqua distillata, trasmittanza non inferiore al 40 % a 220 nm e non inferiore al 95 % a 250 nm

oppure

- altro solvente idoneo, atto ad ottenere la completa solubilizzazione della sostanza grassa (es. alcool etilico per l'olio di ricino).

**4.2.** Allumina basica per cromatografia su colonna, preparata e controllata come descritto in Appendice I.

**4.3.** n-esano, per cromatografia.

#### 5. PROCEDIMENTO

**5.1.** Il campione in esame deve essere perfettamente omogeneo ed esente da impurezze sospese. Gli oli liquidi a temperatura ambiente si filtrano su carta alla temperatura di circa 30°C, i grassi concreti vengono omogeneizzati e filtrati a temperatura superiore di non oltre 10°C alla temperatura di fusione.

**5.2.** Del campione così preparato si pesano esattamente circa 0,25 g in 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 su carta.

**5.3.** Con la soluzione ottenuta si riempie una vaschetta e si misurano le estinzioni, usando come riferimento il solvente impiegato, alle lunghezze d'onda significative comprese fra 232 e 276 nm. I valori di estinzione letti devono essere compresi nell'intervallo  $0,1 \pm 0,8$ ; in caso contrario è necessario ripetere le misure operando con soluzioni opportunamente più concentrate o più diluite.

**5.4.** Qualora sia richiesta la determinazione dell'estinzione specifica dopo passaggio su allumina si procede nel seguente modo: nella colonna cromatografica si introducono 30 g di allumina basica in sospensione in esano; dopo assestamento dell'adsorbente si elimina l'eccesso di esano, sino ad 1 cm circa al disopra del livello superiore dell'allumina.

Si sciogliono 10 g di sostanza grassa, omogeneizzata e filtrata come descritto in 5.1., in 100 ml di esano e si versa tale soluzione in colonna. Si raccoglie l'eluato e si evapora totalmente il solvente sotto vuoto ad una temperatura inferiore ai 25°C.

Sulla sostanza grassa così ottenuta si procede immediatamente come detto in 5.2.

#### 6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

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

$$K_1 = E_1 / (c \cdot s)$$

in cui:

$K_1$  = estinzione specifica alla lunghezza d'onda 1,

$E_1$  = estinzione misurata alla lunghezza d'onda,

c = concentrazione della soluzione in g/100 ml,

s = spessore della vaschetta in cm.

I risultati si esprimono con due cifre decimali.

**6.2.** L'esame spettrofotometrico dell'olio di oliva secondo il metodo ufficiale dei Regolamenti della CEE prevede la determinazione dell'estinzione specifica, in soluzione in isottano, alle lunghezze d'onda di 232 e 270 nm e la determinazione del  $\Delta K$  inteso come:

$$\Delta K = K_1 - (K_1 - 4 + K_1 + 4) / 2$$

in cui  $K_l$  è l'estinzione specifica alla lunghezza d'onda  $l$ , lunghezza d'onda di massimo assorbimento intorno a 270 nm.

## **APPENDICE I**

Preparazione dell'allumina e controllo dell'attività

### **A1.1.** Preparazione dell'allumina

In un recipiente a chiusura ermetica si pone l'allumina preventivamente essiccata in forno a 380-400°C per 3 ore, si aggiunge acqua distillata in ragione di 5 ml per 100 g di allumina, si chiude subito il recipiente, si agita ripetutamente, quindi si lascia a riposo per almeno 12 ore prima dell'uso.

### **A1.2.** Controllo dell'attività dell'allumina.

Si prepara una colonna cromatografica con 30 g di allumina. Operando come descritto al paragrafo 5.4. si fa passare attraverso la colonna una miscela costituita da:

- 95 % olio di oliva vergine, avente estinzione specifica a 268 nm inferiore a 0,18;
- 5 % olio di arachide trattato con terre nel processo di raffinazione, avente estinzione specifica a 268 nm uguale o superiore a 4.

Se la miscela dopo passaggio in colonna presenta estinzione specifica a 268 nm superiore a 0,11 l'allumina è accettabile, altrimenti deve essere aumentato il tasso di idratazione.

## **APPENDICE II**

Taratura dello spettrofotometro A2.

L'apparecchio deve essere controllato periodicamente (almeno ogni 6 mesi) sia per la rispondenza della lunghezza d'onda che per l'esattezza della risposta.

**A2.1.** Il controllo della lunghezza d'onda può essere fatto mediante la lampada a vapori di mercurio o mediante gli appositi filtri.

**A2.2.** Per il controllo della risposta della fotocellula e del fotomoltiplicatore si procede come segue: si pesano 0,2000 g di potassio cromato puro per spettrofotometria e si sciolgono, in matraccio tarato da 1 000 ml, in soluzione di idrossido di potassio 0,05 N diluendo poi a volume. Della soluzione ottenuta si prelevano 25 ml esatti, si trasferiscono in matraccio tarato da 500 ml e si diluisce ulteriormente a volume con la stessa soluzione di idrossido di potassio.

Della soluzione così ottenuta si misura l'estinzione a 275 nm, impiegando la soluzione di idrossido di potassio come riferimento. L'estinzione misurata con vaschetta da 1 cm dovrà essere  $0,200 \pm 0,005$ .

## **(5) Determinazione del contenuto in clorofilla**

Per la determinazione del contenuto in clorofilla si procede operando con olio disciolto in isottano, nelle quantità indicate di seguito:

Campione = grammi 2,5 olio;

Solvente = ml 25 isottano.

Le letture spettrofotometriche vengono eseguite, impiegando uno spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 760 nm. Per la valutazione quantitativa, si confronta l'assorbanza ottenuta con quelle relative ad una soluzione a titolo noto con cui viene costruita una curva di taratura.

Questo parametro risulta particolarmente importante per la tipicizzazione degli oli monovarietali. Il contenuto delle olive in clorofilla tende a diminuire con la maturazione.

La Mignola presenta valori non particolarmente elevati.

## (6) Determinazione del numero di iodio

### 1. OGGETTO

La presente norma internazionale definisce un metodo per la determinazione del numero di iodio nei grassi e negli oli di origine animale e vegetale, qui di seguito denominati "grassi".

### 2. DEFINIZIONE

Ai fini della presente norma internazionale, si applica la seguente definizione.

- **2.1.** Numero di iodio: la massa di iodio assorbita dal campione nelle condizioni specificate nella presente norma internazionale. Il numero di iodio viene espresso in grammi di iodio per 100 g di campione.

### 3. PRINCIPIO

Scioglimento della sostanza da analizzare nel solvente ed aggiunta di reagente di Wijs. Trascorso un certo lasso di tempo, aggiunta di soluzione di ioduro di potassio e di acqua e titolazione dello iodio liberato con soluzione di tiosolfato di sodio.

### 4. REAGENTI

Tutti i reagenti devono essere di grado analitico riconosciuto.

- **4.1.** Ioduro di potassio, soluzione di 100 g/l, non contenente iodato o iodio libero.
- **4.2.** Salda d'amido (indicatore).
- **4.3.** Tiosolfato di sodio, soluzione volumetrica standard  $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/L}$ , standardizzato non oltre 7 giorni prima dell'uso.
- **4.4.** Solvente, triclorometano.
- **4.5.** Reagente di Wijs, contenente monocloruro di iodio in acido acetico. È opportuno usare il reagente di Wijs disponibile in commercio.

**Nota:** Il reagente contiene 9 g di  $\text{ICl}_3$  + 9 g di  $\text{I}_2$  in acido acetico.

### 5. APPARECCHIATURA

La consueta apparecchiatura di laboratorio e in particolare quanto segue.

- **5.1.** Ditali da pesata, in vetro, idonei per la sostanza da analizzare e per l'inserimento nelle beute (5.2).
- **5.2.** Beute, aventi una capacità di 500 ml, provviste di tappi in vetro smerigliato e completamente asciutte.

### 6. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DI SOSTANZA DA ANALIZZARE

Il campione omogeneizzato è seccato su solfato sodico e filtrato.

### 7. PROCEDIMENTO

- **7.1.** Sostanza da analizzare

Il peso della sostanza da analizzare varia a seconda del numero di iodio che si prevede, come indicato nella tab.1.

**Tabella 1**

Numero di iodio previsto	massa della sostanza da analizzare g
Inferiore a 5	3,00
Da 5 a 20	1,00
Da 21 a 50	0,40
Da 51 a 100	0,20
Da 101 a 150	0,13
Da 151 a 200	0,10

Pesare la sostanza da analizzare con l'approssimazione di 0,1 mg in un ditale da pesata in vetro (5.1).

▪ **7.2. Determinazione**

Versare la sostanza da analizzare in una beuta da 500 ml (5.2). Aggiungere 20 ml del solvente (4.4) in modo da sciogliere il grasso. Aggiungere esattamente 25 ml del reagente di Wijs (4.5), inserire il tappo, agitare il contenuto e riporre la beuta al buio. Per il reagente di Wijs non usare una pipetta a bocca. Analogamente preparare un bianco col solvente ed il reagente, ma tralasciando la sostanza da analizzare. Per le sostanze aventi un numero di iodio inferiore a 150, mantenere le beute al buio per un'ora; per quelle aventi un numero di iodio superiore a 150 nonché per i prodotti polimerizzati oppure per i prodotti notevolmente ossidati, lasciar riposare per due ore. Trascorso il periodo necessario, aggiungere 20 ml della soluzione di ioduro di potassio (4.1) e 150 ml di acqua a ciascuna delle beute. Titolare con la soluzione volumetrica standard di tiosolfato di sodio (4.3) finché la colorazione gialla dovuta allo iodio non sia quasi scomparsa. Aggiungere alcune gocce della soluzione di amido (4.2) e continuare la titolazione finché la colorazione blu sia appena scomparsa a seguito di agitazione molto vigorosa.

**Nota** - È consentita la determinazione potenziometrica del punto finale.

▪ **7.3. Numero di determinazioni**

Effettuare due determinazioni sullo stesso campione.

## 8. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il numero di iodio viene dato dalla seguente espressione:

$$12,69 c (V1-V2) / M$$

Dove:

c = è il numerico della concentrazione esatta, in moli per litro, della soluzione di Tiosolfato di sodio Titolata (5.4) utilizzata;

V1 = è il valore numerico del volume, in ml, della soluzione di Tiosolfato di sodio Titolata (5.4) utilizzata;

V2 = è il valore numerico del volume, in ml, delle soluzioni di Tiosolfato di sodio (5.4) utilizzato per la determinazione;

m = è il valore numerico del peso, in g, della sostanza da analizzare (7.1).

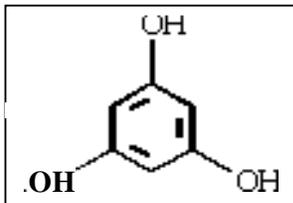
Prendere come risultato la media aritmetica di due determinazioni.

## (7) Reazione di Kreiss

Le proprietà organolettiche dei grassi rancidi e in via di irrancidimento sono significativamente correlate alla presenza di prodotti carbonilici formatisi per interazione tra l'ossigeno e gli acidi grassi insaturi.

La reazione di Kreiss è un'analisi di tipo qualitativo che consente il rilevamento della rancidità: quando risulta positiva indica un grado avanzato di ossidazione sufficiente per il declassamento merceologico del prodotto.

La floroglucina [da fluoro-(greco) *glykys*, dolce]. Composto chimico del gruppo dei trifenoli, di formula bruta  $C_6H_6O_3$ , è l'1,3,5-trifenolo o trifenolo simmetrico.



Cristallizza dalle sue soluzioni acquose come biidrato,  $C_6H_6O_3 \cdot 2H_2O$ , in cristalli bianchi di sapore dolce. Da quella della fluoroglucina derivano le strutture di sostanze diffusissime nel regno vegetale, appartenenti alla serie dei flavoni e delle antocianine.

Il metodo impiegato è basato sulla reazione di condensazione tra composti carbonilici (originatisi per l'irrancidimento dei grassi) con la floroglucina in presenza di HCl che dà origine ad un composto di colorazione rossa. Questo è un metodo qualitativo e il risultato viene considerato positivo quando la colorazione dello strato inferiore è più intenso di una soluzione allo 0.0012% di  $KMnO_4$  e negativo al contrario.

## 7.1 PROCEDIMENTO

In un cilindro graduato ( $V = 50$  ml) si versano 10 ml olio e 10 ml di HCl concentrato. Dopo agitazione ( $t=30''$ ), si aggiungono 10 ml di una soluzione di floroglucina (0.1% in etere etilico) e si rimescola per altri 30 secondi.

Dopo aver lasciato stratificare, si esamina la colorazione dello strato inferiore:

reazione negativa  $\Rightarrow$  colorazione brunastra o sbiadita;

reazione positiva  $\Rightarrow$  colorazione rosa o rossa.

La determinazione della stabilità dell'olio all'irrancidimento è utile ai fini della commercializzazione dell'olio, specie se imbottigliato, per diagnosticarne la resistenza alla conservazione. La prova consisterebbe nell'espore una piccola quantità in un becker alla temperatura di  $60^\circ C$  in stufa e determinando quotidianamente la reazione di Kreiss e/o la determinazione dell'indice dei perossidi fino a comparsa dell'irrancidimento. Se l'intervallo di tempo intercorso supera 8-10 giorni, l'olio può essere considerato sufficientemente stabile.

### (8) Ricerca generale degli oli di semi (reazione di Bellier)

In un tubo da saggio si versano:

8.1 – 5 ml di olio filtrato;

8.2 – 5 ml di acido nitrico incolore (60%;  $d=1.4$ );

8.3 – 5 ml di soluzione eterea di floroglucina (1%).

Dopo aver mantenuto in agitazione per 10', si osserva la colorazione assunta dal miscuglio nei 10 secondi successivi:

reazione negativa (assenza di oli di semi)  $\Rightarrow$  nessuna colorazione.

reazione positiva  $\Rightarrow$  colorazione dal roseo al rosso, al viola, al bruno.

### (9) Ricerca generale dell'olio di arachide (reazione di Blarez)

In un provettone si versano:

9.1 – 1 ml di olio filtrato;

9.2 – 15 ml di reattivo di Blarez.

### 9.3 REAGENTI

Reattivo di Blarez: soluzione alcolica al 5% (P/V) di KOH.

Dopo aver mantenuto in ebollizione in bagno maria a ricadere per 15', si raffredda per immersione in acqua refrigerata fino a 12 °C, chiudendo la bocca del provettone con un tappo attraversato da termometro. La presenza dell'olio di arachide è indicata dalla formazione di cristalli di arachidato di potassio: i cristalli appaiono sospesi nel mezzo come piccoli granuli aderenti anche alle pareti del tubo da saggio.

### (10) Dosaggio della componente fenolica.

E' un indice molto importante della qualità dell'olio, sia dal punto di vista organolettico, in quanto i polifenoli conferiscono all'olio le caratteristiche di amaro e piccante, che salutistico, in quanto antiossidanti naturali che proteggono sia l'olio, che le cellule dell'organismo umano dall'ossidazione. La Mignola presenta valori particolarmente elevati rispetto alle varietà di riferimento, con una leggera diminuzione con la maturazione.

Procedimento di valutazione colorimetrica degli acidi fenolici totali in olii alimentari (Vázquez-Roncero et al., 1973 modificato). L'olio (10 g) viene disciolto tre volte con 10 ml per volta di miscela metanolo/acqua (80: 20, V/V) e Tween 20 (2%V/W) e posta in agitazione per almeno 5 min (Ultraturrax a 15000 g per 1'), a cui seguono 3 min di attesa (opt. 10') (poi centrifugare a 4000 r.p.m. per 15'). Il subnatante (frazione idro-metanolica) è recuperato e posto in un'altra provetta di vetro con tappo a vite, e viene aggiunto nuovo solvente. La soluzione estratta viene raffreddata (-20 °C per 24 h) e filtrata per eliminare i residui di olio. La concentrazione dei fenoli totali negli estratti metanolici è stata valutata con il reagente di Folin-Ciocalteu usando l'acido caffeico come standard. La procedura consiste in una diluzione di 1 ml degli estratti con acqua fino a 5 ml e nell'aggiunta di 0.5 ml di reagente di Folin-Ciocalteu. Dopo 3 minuti, 1 ml di soluzione del Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.5% P/V) è stato aggiunto, mescolato con un vortex ed incubando alla temperatura ambiente per 1 ora. La capacità di assorbimento del campione è stata misurata dopo 2 h a 765 nanometri contro bianco.

### Preparazione della soluzione dello standard interno.

Pesare accuratamente 30mg di acido caffeico in un matraccio tarato da 10ml e portare a volume con la soluzione metanolo-acqua 80/20. Prelevare 1ml con pipetta Eppendorf e portare a volume in un matraccio tarato da 100ml con la medesima soluzione. La concentrazione dello standard interno è quindi 0,03 g/L.