

**INDICE**

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUZIONE | 2 |
| 1.1 | Gli oli..... | 2 |
| 1.2 | Il piano sperimentale | 2 |
| 1.3 | Il metodo ufficiale | 3 |
| 2 | RISULTATI..... | 4 |
| 2.1 | Quantità di campione..... | 4 |
| 2.2 | Possibilità di correlazione lineare | 9 |
| 2.3 | Relazione che lega assorbanza e risultati | 11 |
| 2.4 | Limite di rilevabilità | 13 |
| 2.5 | Ripetibilità e incertezza di misura | 13 |
| 2.6 | Relazione di massima verosomiglianza..... | 14 |
| 2.7 | Residui e validazione..... | 16 |
| 3 | CONSIDERAZIONI SUL METODI DI FOLIN-CIOCALTEU | 18 |
| 1.1 | Modalità operative | 20 |
| 1.2 | Taratura..... | 21 |
| 1.3 | Espressione dei risultati | 22 |
| 1.4 | Dati di validazione..... | 23 |



1 INTRODUZIONE

Vista l'attenzione crescente dei consumatori e dei produttori verso la qualità dell'olio extra vergine di oliva, si pone il problema di determinare correttamente il valore dei biofenoli, valore indicativo di tipicità, conservabilità, qualità nutrizionale e qualità sensoriale del prodotto.

Per questo sono stati progettati strumenti che permettono di poter determinare i vari parametri chimici direttamente prelevando l'olio dalla bottiglia (tramite pipetta tarata) e ottenere una stima del contenuto fenolico "in campo", senza l'utilizzo di strumentazione di precisione presente nei laboratori di analisi.

In questo contesto l'azienda CDR ha commissionato al Laboratorio Chimico Merceologico uno studio per la "taratura" dello strumento CDR Food Lab confrontando il valore del contenuto di biofenoli di alcuni oli ottenuto con lo strumento CDR Food Lab con il valore degli stessi ottenuti con il metodo ufficiale (COI/T.20/Doc. n. 29: 2009 che è equivalente a *NGD C 89-2010*, metodi che il laboratorio ha entrambi accreditati, sottoposti a controllo qualità costante attraverso carte di controllo e circuiti interlaboratorio), per avere evidenze oggettive della relazione tra i metodi.

1.1 *Gli oli*

Durante il mese di dicembre sono stati raccolti 24 oli vergini di oliva (appartenenti alle categorie merceologiche extra vergine o vergine), in modo che potessero essere rappresentativi di diverse provenienze, diverse cultivar, diversi tipi di lavorazione, filtrati e non filtrati e con vari livelli di acidità.

Il minor tempo possibile è stato fatto trascorrere tra l'analisi con il Metodo Ufficiale e l'analisi con CDR Food Lab, in ogni caso gli oli sono stati conservati in bottiglie scure, riempite all'orlo ad una temperatura di $16^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Non si ritiene opportuno riportare i nomi delle aziende in quanto non significativi per questa indagine.

1.2 *Il piano sperimentale*

Dal 3 al 24 dicembre 2015 è stato necessario sottoporre ad analisi circa 20 campioni per stabilire in maniera preliminare:

- Quantità ottimale di campione da usare per l'analisi colorimetrica



- Ripetibilità
- Correlazione lineare tra i due metodi, se possibile

A gennaio 2016 è stata eseguita una taratura con completa trattazione statistica di 3 repliche a 5 livelli.

1.3 Il metodo ufficiale

Il metodo utilizzato è semiquantitativo, in quanto non è possibile disporre di uno standard per ciascun composto fenolico.

I composti fenolici vengono estratti dall'olio con solvente idroalcolico (MeOH:H₂O=80:20). L'estratto ottenuto viene sottoposto ad analisi cromatografica utilizzando una colonna con fase stazionaria apolare (C18) e una fase diretta polare. L'analisi quantitativa è effettuata con il metodo dello standard interno, utilizzando come standard interno l'acido sirigico; utilizzando il fattore moltiplicativo (RRF) dato dal fattore di risposta relativo fra tirosolo e acido sirigico, la quantità dei composti fenolici viene espressa come mg di tirosolo per Kg di olio.

Le strutture molecolari di alcuni composti fenolici sono state determinate recentemente ed altre sono tutt'ora sconosciute. Diversi studi effettuati con NMR, GC-MS e LC-MS hanno permesso di individuare la presenza di agliconi di ligstroside e oleuropeina. È stato possibile individuare la struttura di pochi di questi agliconi: fra questi, la forma aldeidica chiusa dell'aglicone oleuropeina e la forma dialdeidica aperta del decarbossimetiloleuropeina aglicone e i rispettivi derivati del ligstroside. Recentemente è stata riscontrata la presenza di 2-(3,4-dirossifenil)-etilacetato e idrossitirosilacetato e di due lignani: pinoresinolo e 1-acetossipinoresinolo. Infine, luteolina e apigenina sono i due principali flavonoidi presenti nel profilo fenolico degli oli.

Oleuropeina e ligstroside, i due principali glucosidi secoiridoidi, a causa della loro idrofilia, non si ritrovano negli oli, se non in piccole quantità: negli oli si trovano, invece, i loro agliconi, i quali si formano in due modi:

- per via enzimatica. La β -glucosidasi rompe il legame fra il glucosio e il resto della molecola originando gli agliconi con la struttura aldeidica chiusa



- per idrolisi, con formazione di agliconi con struttura alcolica chiusa

Questi ultimi composti sono soggetti all'apertura dell'anello della struttura elenolica, con formazione, anche, dell'enolo che, successivamente, isomerizza nella forma dialdeidica aperta. Infine, si può avere decarbossilazione con formazione delle due forme fenoliche legate alle caratteristiche sensoriali: amaro (oleuropeina) e piccante (ligstroside)

2 RISULTATI

2.1 *Quantità di campione*

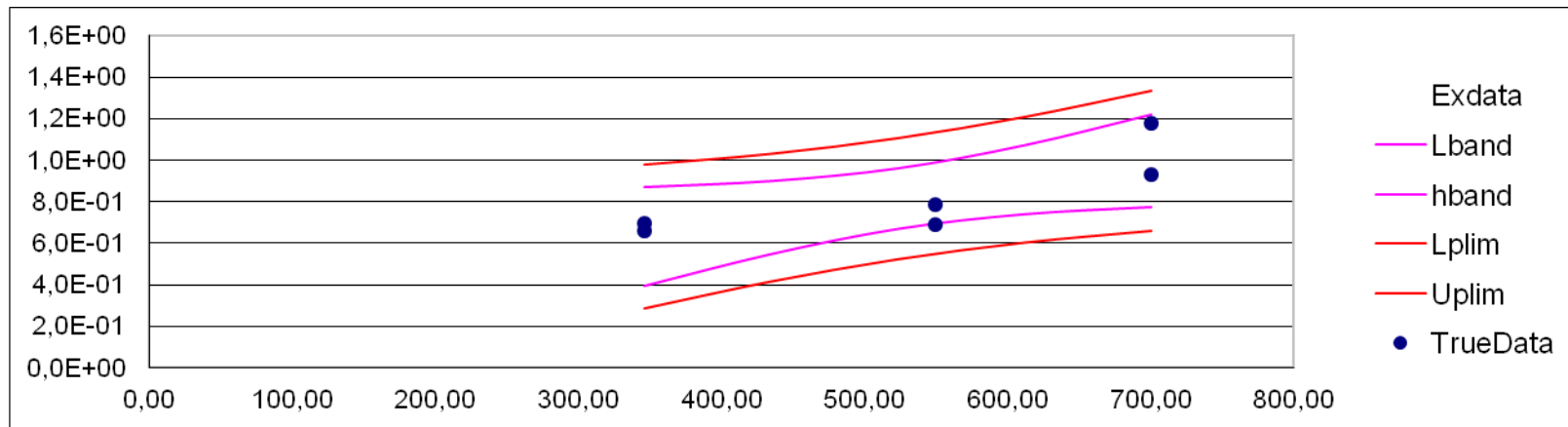
E' stata studiata la quantità ottimale di campione di olio extra vergine di oliva. In particolare è stato testato il test colorimetrico con 20 μ l (quantità che teoricamente potrebbe aumentare la sensibilità) e con 10 μ l.

I risultati analizzati attraverso l'ANOVA rivelano che sia a livello di linearità sia a livello di ripetibilità è migliore la lettura colorimetrica con 10 μ l.

Nel resto della relazione, una volta stabilito preliminarmente questo, si è continuato a usare 10 μ l di olio.



Prove eseguite con 20 microlitri di campione (X=contenuto in biofenoli in mg/kg; Y=assorbanza CDR)





Report

Sistemi tecnologici per la determinazione rapida del contenuto di biofenoli in oli di oliva

Data

| ID | Level | X | Y | Ycalc |
|----|-------|-----|-------|----------|
| 1 | 1 | 346 | 0,657 | 6,32E-01 |
| 2 | 1 | 346 | 0,694 | 6,32E-01 |
| 3 | 2 | 549 | 0,786 | 8,41E-01 |
| 4 | 2 | 549 | 0,691 | 8,41E-01 |
| 5 | 3 | 700 | 1,178 | 9,96E-01 |
| 6 | 3 | 700 | 0,932 | 9,96E-01 |

Min : 3,46E+02 6,57E-01 6,32E-01

Max : 7,00E+02 1,18E+00 9,96E-01

Ave : 5,32E+02 8,23E-01 8,23E-01

Results (y = a + bx)

| n | a | b | RSS | MSS | TSS |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|
| 6 | 2,76E-01 | 1,03E-03 | 6,71E-02 | 1,34E-01 | 2,01E-01 |

| r | s(a) | s(b) | s(y) | SSx |
|---------|----------|----------|----------|----------|
| 0,81607 | 2,01E-01 | 3,65E-04 | 1,30E-01 | 1,26E+05 |

Min = -2,82E-01 1,73E-05

Max = 8,33E-01 2,04E-03

t-Test (Two-tailed) on Parameters

| Param. | t-values | p | t crit. | df |
|--------|----------|----------|---------|----|
| a | 1,372 | 2,42E-01 | 2,78 | 4 |
| b | 2,824 | 4,76E-02 | | |

Risk = 0,050

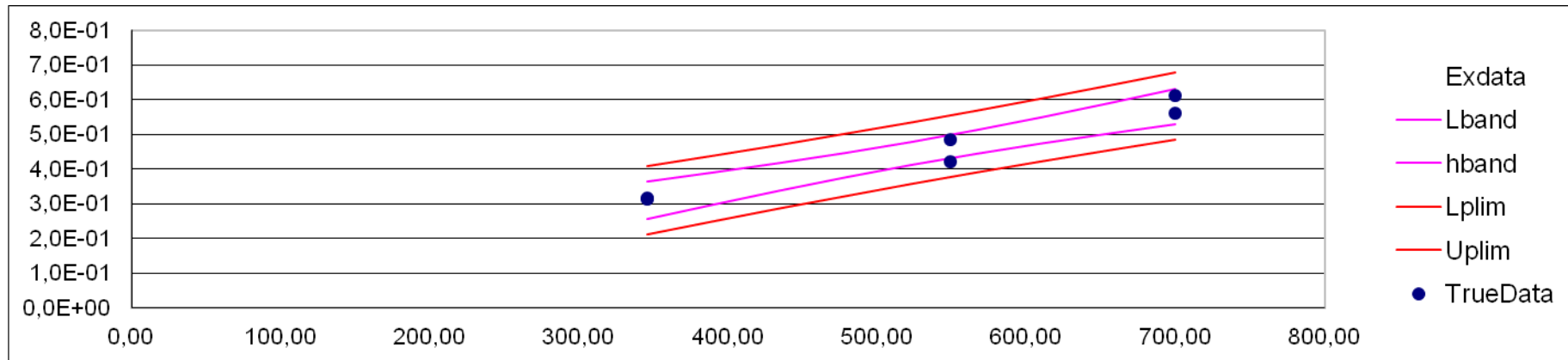
ANOVA - ANalysis Of VAriance

| Source | SS | df | MS | F | Fcrit |
|--------|----------|----|----------|----------|-------|
| Reg | 1,34E-01 | 1 | 1,34E-01 | 7,98E+00 | 7,71 |
| Res | 6,71E-02 | 4 | 1,68E-02 | | |
| Total | 2,01E-01 | 5 | | | |

OK



Prove eseguite con 10 microlitri di campione (X=contenuto in biofenoli in mg/kg; Y=assorbanza CDR)



**Report**

Sistemi tecnologici per la determinazione rapida del contenuto di biofenoli in oli di oliva

Data

| ID | Level | X | Y | Ycalc |
|--------------|-------|----------|----------|----------|
| 1 | 1 | 346 | 0,317 | 3,10E-01 |
| 2 | 1 | 346 | 0,314 | 3,10E-01 |
| 3 | 2 | 549 | 0,423 | 4,65E-01 |
| 4 | 2 | 549 | 0,484 | 4,65E-01 |
| 5 | 3 | 700 | 0,612 | 5,81E-01 |
| 6 | 3 | 700 | 0,563 | 5,81E-01 |
| Min : | | 3,46E+02 | 3,14E-01 | 3,10E-01 |
| Max : | | 7,00E+02 | 6,12E-01 | 5,81E-01 |
| Ave : | | 5,32E+02 | 4,52E-01 | 4,52E-01 |

Results (y = a+ bx)

| n | a | b | RSS | MSS | TSS |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|
| 6 | 4,63E-02 | 7,63E-04 | 3,49E-03 | 7,36E-02 | 7,71E-02 |

| r | s(a) | s(b) | s(y) | SSx |
|---------|----------|----------|----------|----------|
| 0,97707 | 4,58E-02 | 8,32E-05 | 2,96E-02 | 1,26E+05 |

| | | |
|--------------|-----------|----------|
| Min = | -8,10E-02 | 5,32E-04 |
| Max = | 1,74E-01 | 9,94E-04 |

t-Test (Two-tailed) on Parameters

| Param. | t-values | p | t crit. | df |
|--------|----------|----------|---------|----|
| a | 1,010 | 3,70E-01 | 2,78 | 4 |
| b | 9,178 | 7,83E-04 | | |

Risk = 0,050

ANOVA - ANALYSIS OF VARIANCE

| Source | SS | df | MS | F | Fcrit |
|--------|----------|----|----------|----------|-------|
| Reg | 7,36E-02 | 1 | 7,36E-02 | 8,42E+01 | 7,71 |
| Res | 3,49E-03 | 4 | 8,73E-04 | | |
| Total | 7,71E-02 | 5 | | | |

OK



2.2 Possibilità di correlazione lineare

Il punto centrale è se si può affermare che esista una relazione tra il risultato del metodo ufficiale che è semiquantitativo (vedi paragrafo 1.3) e il risultato del metodo CDR Food Lab. In questo caso si parla di un metodo colorimetrico nel visibile (lunghezza d'onda 505 nm) in cui le sostanze riducenti interagiscono con un reattivo, posto in cuvette già riempite e colorato, riducendo l'assorbanza.

Su 20 punti che coprono il livello 200-760 mg/kg di biofenoli si sono ottenuti i seguenti risultati:

biofenoli (mg/kg) = 1330,94 abs – 46,83

r= 0,9430

R²= 0,8893

RSS (residual sum of square) = 79705,5076

Al momento non si sofferma l'attenzione sulla relazione migliore da usare per lo strumento CDR Food Lab ma sul fatto se sia legittimo usare una relazione lineare.

L'analisi statistica puntuale mostra che esiste una relazione non casuale tra i dati di assorbanza ottenuti con CDR Food Lab e il dato HPLC del Metodo Ufficiale (vedi valori di p in tabella).



| Pearson Product Moment Correlation | | |
|------------------------------------|---------------------------------------|------------------|
| Statistic | Variable X | Variable Y |
| Mean | 0.392 | 473.1 |
| Biased Variance | 0.018196 | 35999.69 |
| Biased Standard Deviation | 0.134892549831338 | 189.735842686615 |
| Covariance | 25.4382105263158 | |
| Correlation | 0.944219179753697 | |
| Determination | 0.891549859414745 | |
| T-Test | 12.1644929437632 | |
| p-value (2 sided) | 4.05197653208234e-10 | |
| p-value (1 sided) | 2.02598826604117e-10 | |
| 95% CI of Correlation | [0.861782802172718, 0.97806753766711] | |
| Degrees of Freedom | 18 | |
| Number of Observations | 20 | |



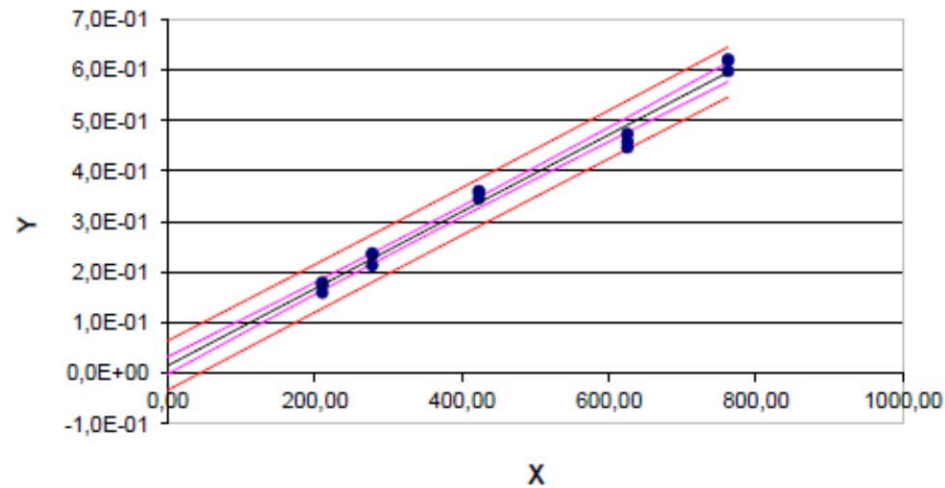
2.3 Relazione che lega assorbanza e risultati

La taratura è eseguita con oli a contenuto noto di biofenoli a 5 livelli per 3 repliche.

I risultati sono:

$$\text{Biofenoli (mg/kg)} = 1290 \cdot \text{Abs} - 13$$

I parametri che stimano la bontà della regressione sono (in questo caso si considera $y=a+bx$ con y =assorbanza e x = biofenoli):





| n | a | b | RSS | MSS | TSS |
|----|----------|----------|----------|----------|----------|
| 15 | 1,59E-02 | 7,61E-04 | 6,16E-03 | 3,74E-01 | 3,80E-01 |

| r | s(a) | s(b) | s(y) | SSx |
|---------|----------|----------|----------|----------|
| 0,99188 | 1,37E-02 | 2,71E-05 | 2,18E-02 | 6,46E+05 |

| | | |
|-------|-----------|----------|
| Min = | -1,36E-02 | 7,02E-04 |
| Max = | 4,54E-02 | 8,19E-04 |

t-Test (Two-tailed) on Parameters

| Param. | t-values | p | t crit. | df |
|--------|----------|----------|---------|----|
| a | 1,167 | 2,64E-01 | 2,16 | 13 |
| b | 28,113 | 4,99E-13 | | |

Risk = 0,050

ANOVA - ANalysis Of VAriance

| Source | SS | df | MS | F | Fcrit |
|--------|----------|----|----------|----------|-------|
| Reg | 3,74E-01 | 1 | 3,74E-01 | 7,90E+02 | 4,67 |
| Res | 6,16E-03 | 13 | 4,73E-04 | | |
| Total | 3,80E-01 | 14 | | | |

OK



2.4 Limite di rilevabilità

Dal calcolo statistico sulla retta di taratura si desume un LOD (Limit of Detection) di 146 mg/kg di biofenoli che corrisponde ad una assorbanza di 0,127.

In realtà in prove su oli a basso contenuto di biofenoli e anche rettificati (con contenuto di biofenoli pari a zero) l'assorbanza è comunque 0,16, che corrisponde a 193 mg/kg biofenoli, quindi si sconsiglia la lettura sotto questa assorbanza .

A questo limite di assorbanza si consiglia di riportare il risultato come “minore o uguale a 200 mg/kg”. Da questo punto in poi non si evidenziano deviazioni dalla linearità.

Si ritiene che il limite possa essere migliorato procedendo con quantitativi differenti di reattivo e/o campione grasso.

2.5 Ripetibilità e incertezza di misura

Dal calcolo statistico sui 5 livelli di assorbanza degli oli letti in 3 ripetizioni si ricava che la deviazione standard media dell'assorbanza è 0,012 (s_r =scarto tipo di ripetibilità), che corrisponde a 15 mg/kg di biofenoli.

Questo vuol dire che lo stesso campione analizzato di seguito allo strumento non deve fornire dati che si discostino di più di 43 mg/kg (r =limite di ripetibilità).

Si considera 3 livelli di assorbanza per stimare l'incertezza del risultato associato alla retta di taratura:

**Report**

Sistemi tecnologici per la determinazione rapida del contenuto di biofenoli in oli di oliva

| Assorbanza | Biofenoli (mg/kg) | Limite di confidenza inferiore (mg/kg) | Limite di confidenza superiore(mg/kg) | Intervallo di confidenza (mg/kg) |
|------------|-------------------|--|---------------------------------------|----------------------------------|
| 0,2 | 245 | 225 | 262 | 17 |
| 0,4 | 503 | 490 | 516 | 13 |
| 0,6 | 761 | 741 | 781 | 20 |

2.6 Relazione di massima verosomiglianza

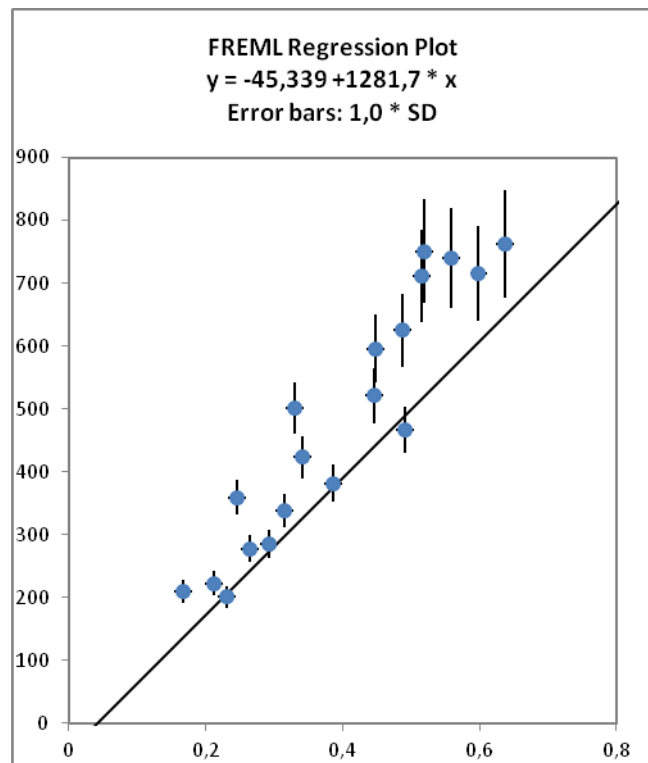
Tenendo conto che i dati di assorbanza hanno una deviazione standard media di 0,013 e che i biofenoli hanno essi stessi una incertezza analitica funzione del livello, è possibile anche stimare la relazione tra i dati come relazione di massima verosomiglianza.

Da questo algoritmo che tiene conto sia dell'incertezza sul valore di biofenoli del metodo HPLC, sia della deviazione standard della assorbanza del CDR Food Lab, si otterrebbe che la miglior stima della relazione lineare è:

$$\text{Biofenoli (mg/kg)} = 1282 \cdot \text{Abs} - 45$$



I dati sostanzialmente confermano una relazione molto simile a quella ottenuta con il metodo dei minimi quadrati (in questo caso si interpola meglio i dati più bassi rispetto a quelli più alti).



**2.7 Residui e validazione**

Applicando la relazione che deriva dal metodo dei minimi quadrati dagli oli di taratura sugli oli si ottiene i seguenti risultati:

| abs | pol HPLC mg/kg | Pol calcolati minimi quadrati | Residui % | pol calcolati max verosomiglianza | Residui % |
|--------------|-------------------|----------------------------------|--------------|--------------------------------------|--------------|
| 0,212 | 223 | 260 | 16,8 | 227 | 1,7 |
| 0,292 | 286 | 364 | 27,2 | 329 | 15,2 |
| 0,23 | 201 | 284 | 41,1 | 250 | 24,3 |
| 0,167 | 210 | 202 | -3,6 | 169 | -19,5 |
| 0,387 | 382 | 486 | 27,3 | 451 | 18,1 |
| 0,245 | 359 | 303 | -15,6 | 269 | -25,0 |
| 0,264 | 278 | 328 | 17,8 | 293 | 5,6 |
| 0,315 | 338 | 393 | 16,4 | 359 | 6,2 |



LABORATORIO CHIMICO MERCEOLOGICO – FIRENZE

Report

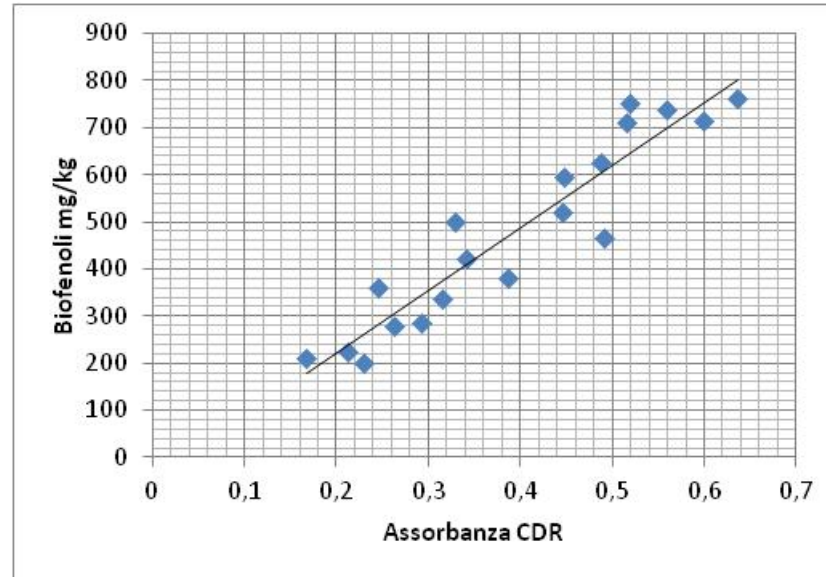
Sistemi tecnologici per la determinazione rapida del contenuto di biofenoli in oli di oliva

Rev 0 del 27.12.15

| | | | | | |
|--------------|-----|-----|-------------|-----|-------------|
| 0,342 | 423 | 428 | 1,2 | 393 | -7,0 |
| 0,33 | 501 | 413 | -17,6 | 378 | -24,5 |
| 0,491 | 467 | 620 | 32,8 | 584 | 25,2 |
| 0,447 | 521 | 564 | 8,2 | 528 | 1,4 |
| 0,448 | 596 | 565 | -5,2 | 529 | -11,2 |
| 0,488 | 625 | 617 | -1,4 | 581 | -7,1 |
| 0,516 | 711 | 653 | -8,2 | 617 | -13,3 |
| 0,637 | 762 | 809 | 6,1 | 772 | 1,3 |
| 0,519 | 751 | 657 | -12,6 | 620 | -17,4 |
| 0,599 | 716 | 760 | 6,1 | 723 | 1,0 |
| 0,559 | 740 | 708 | -4,3 | 672 | -9,2 |
| | | RSS | 6106 | RSS | 4255 |

In conclusione la migliore relazione lineare tra assorbanza e biofenoli

Biofenoli (mg/kg) = 1282·Abs -45



che minimizza l'errore sui valori calcolati di biofenoli più bassi e che tende leggermente a sottostimare quelli molto alti (che hanno una incertezza analitica di partenza maggiore).

3 CONSIDERAZIONI SUL METODI DI FOLIN-CIOCALTEU

Il metodo è applicabile agli oli di oliva nel campo di concentrazione tra 30 e 650 mg/Kg di polifenoli (espressi come mg di tirosolo su kg di olio di oliva).

Il Laboratorio Chimico della Camera di Commercio di Firenze utilizza di routine questo metodo di prova dall'anno 1995.



Tale metodo di prova è stato messo a punto soprattutto per controllare la conformità degli oli a Denominazioni di Origine al limite minimo di polifenoli previsto dai Disciplinari di Produzione.

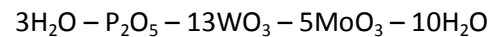
Tale metodo è stato quindi utilizzato per il controllo per la qualità degli oli extravergini effettuate conto terzi (per esempio per frantoi o aziende agricole) e per ricerche per il miglioramento della qualità dell'olio.

Normalmente i risultati sono espressi in mg di acido gallico per kg di olio ma, essendo obiettivo di questa tesi confrontare i risultati di vari metodi, si è scelto di esprimere i risultato in mg di tirosolo per kg di olio.

La taratura è stata quindi effettuata con lo standard tirosolo.

I polifenoli sono una classe di sostanze antiossidanti che danno assorbimento aspecifico alla lunghezza d'onda di 765 nm, dopo trattamento con reattivo di Folin-Ciocalteu.

Il reattivo di F-C è una miscela di fosfotungstato e fosfomolibdato:



e



di colore giallo chiaro.

Per reazione con il substrato riducente in ambiente basico si ha la formazione di Mo(V) di colore blu. Il saggio avviene su una porzione di estratto metanolico a cui viene aggiunto il reattivo e successivamente reso alcalino con una soluzione di carbonato di sodio. Per far volgere la reazione a completezza si attendono 2 ore dopo l'aggiunta del carbonato.



Il metodo non è specifico per i composti fenolici ma si tratta di una misura di potere riducente che può essere ricondotto a determinati analiti conoscendo la composizione del campione. Difatti, oltre all'analisi dei polifenoli, viene utilizzato anche per alcuni composti azotati e proteine (saggio di Lowry).

Il metodo ha subito variazioni nel corso del tempo. Inizialmente il reattivo era formato da $\text{Na}_2\text{WO}_4/\text{Na}_2\text{MoO}_4$ e fu messo a punto per l'analisi della tirosina. Successivamente Singleton e Rossi utilizzarono gli eteropolianioni di fosforo e stabilirono precise condizioni in merito a: concentrazione finale di metanolo, concentrazione del reattivo e del carbonato, tempi di attesa per l'aggiunta del carbonato e tempi di attesa per la lettura spettrofotometrica. Anche il metodo di S-R ha subito lievi modifiche proposte da vari autori, ma comunque tutte si basano sulla seguente successione di operazioni: estrazione – aggiunta del reattivo – aggiunta di carbonato – attesa – lettura.

Il principale fattore da cui dipende la riproducibilità dell'analisi è la concentrazione finale di metanolo che non deve superare il 5%.

Il metodo si basa sull'estrazione quantitativa dei polifenoli presenti nell'olio mediante una fase metanolica. I polifenoli estratti sono dosati per colorimetria nel visibile ed espressi come tirosolo per mezzo di una curva di taratura.

Per la taratura si usa:

- Tirosolo ACS purezza >97% (materiale di riferimento).

1.1 Modalità operative

In una provetta da centrifuga da 100 mL, si pesa con la precisione del mg un quantitativo di olio pari a 10 grammi: sia A la quantità pesata.



Al quantitativo di olio si aggiungono 10 mL di una soluzione metanolo:acqua 80:20 (V:V), si lascia l'emulsione ad agitare su supporto magnetico per 30 minuti e si separa il surnatante per centrifugazione (10 minuti a 4.000 giri).

Si ripete il procedimento per due volte, si riuniscono gli estratti e si porta a volume con la soluzione metanolo: acqua 80:20 (V:V) in un matraccio da 25 mL.

Si lascia l'estratto almeno per cinque ore a temperatura $\approx 20^{\circ}\text{C}$ in freezer, si filtra su filtro a pieghe e si procede ad effettuare la reazione colorimetrica sul filtrato (per eliminare eventuali residui di olio).

La reazione colorimetrica viene fatta nel seguente modo: in un matraccio da 20 mL ad 1 mL di filtrato si aggiungono 10 mL di Folin-Ciocalteu (diluito 1:10) e si porta a volume con carbonato di sodio (soluzione al 7.5%).

Insieme ai campioni da analizzare si prepara sempre un bianco, sostituendo 1 mL della soluzione MeOH:H₂O 80:20 (V:V) al posto della stessa quantità di filtrato. Dopo due ore esatte si legge l'assorbanza a 765 nm. Dalla assorbanza, secondo la legge di Lambert-Beer, si risale alla concentrazione di polifenoli totali nel campione, servendosi di una curva di taratura in tirosolo.

1.2 Taratura

In un matraccio da 100 mL si pesa con la precisione del mg un quantitativo di tirosolo pari a circa 100 mg, si porta a volume con la soluzione metanolo:acqua 80:20 (V:V) in modo tale da avere una soluzione madre con una concentrazione di circa 1000 mg/l di tirosolo.

Le soluzioni alle concentrazioni di 25, 50, 125, 200 e 250 mg/l si preparano utilizzando una pipetta automatica da 5 mL con incertezza nota. Le diluizioni da effettuare sono le seguenti:

| mL prelevati di soluzione 1000 mg/L | Matraccio (si porta a volume con metanolo:acqua 80:20) | Concentrazione finale in mg/L |
|-------------------------------------|--|-------------------------------|
| 2.5 | 100 | 25 |



| | | |
|-----|----|-----|
| 2.5 | 50 | 50 |
| 2.5 | 20 | 125 |
| 5.0 | 25 | 200 |
| 2.5 | 10 | 250 |

Su 1 mL di ciascuna soluzione si effettua la reazione colorimetrica come descritto per i campioni di olio, ricordandosi di fare anche una prova in bianco. Dopo due ore le soluzioni sono lette in triplo. Il software associato allo spettrofotometro provvede a riportare in grafico le concentrazioni contro le assorbanze ed a calcolare la retta di interpolazione dei punti, nonché il coefficiente di correlazione.

La retta ottenuta è stata: $y = 0,00393x + 0,02342$

Sono stati calcolati i parametri della curva di taratura utilizzando il metodo dei minimi quadrati e si è verificato che il valore del coefficiente di correlazione è 0,99791.

1.3 Espressione dei risultati

Il contenuto polifenolico totale espresso in tirosolo di un olio si ricava dalla seguente formula:

$$P_{\text{olio}} = \frac{c \cdot (m \cdot nL) \cdot gc^2}{P(g)}$$

dove:



conc (mg/l) = si legge direttamente dal report dello spettrofotometro

P(g) = grammi di olio pesati

I risultati si esprimono senza cifre decimali.

Se l'assorbanza misurata supera un valore di 1,5 è opportuno ricominciare il procedimento, diminuendo la pesata dell'olio in modo da rientrare nella retta di taratura.

1.4 Dati di validazione

Il laboratorio, avendo sottoposto il metodo interno ad accreditamento secondo la norma ISO 17025:2005, ha calcolato sperimentalmente i seguenti parametri di validazione:

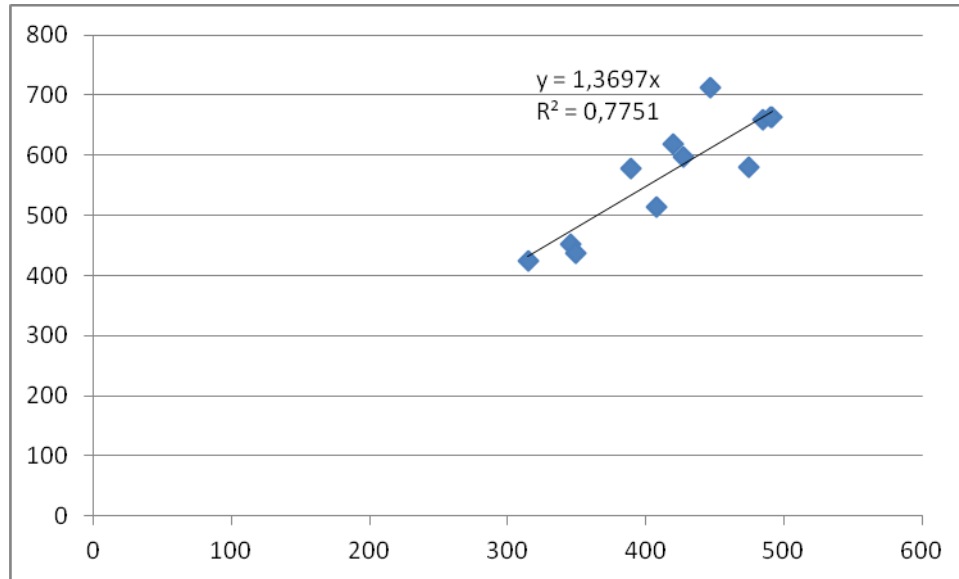
- Incertezza di misura: 8 mg/kg
- Limite di rilevabilità: 8 mg/kg
- Limite di quantificazione: 27 mg/kg
- Ripetibilità CVR %: 1%
- Recuperi: 96-103%

Correlazione tra Folin Ciocalteu-HPLC

I metodi sono ambedue espressi in tirosolo

**Report**Sistemi tecnologici per la determinazione rapida del
contenuto di biofenoli in oli di oliva

| | Totali HPLC | Totali F-C |
|-----------|--------------------|-------------------|
| 1 | 315 | 425 |
| 2 | 484 | 659 |
| 3 | 420 | 618 |
| 4 | 447 | 714 |
| 5 | 492 | 663 |
| 6 | 490 | 663 |
| 7 | 408 | 513 |
| 8 | 475 | 581 |
| 9 | 345 | 452 |
| 10 | 427 | 597 |
| 11 | 389 | 578 |
| 12 | 349 | 437 |



(x= mg/kg biofenoli HPLC, y mg/kg biofenoli Folin Ciocalteu; entrambi espressi in tirosolo).

Quindi il Folin Ciocalteu fornisce un risultato proporzionale al metodo HPLC:

dalla taratura del CDR si può ottenere il risultato in biofenoli HPLC e per riportarlo in “Folin-Ciocalteu” andrebbe moltiplicato per 1,3697.

Non si può fare altro che ribadire che in questo caso, a maggiore ragione, i risultati sono convenzionali e dipendono del tutto dal metodo e dallo standard scelto, e questi non possono essere altro che arbitrari non esistendo alcun metodo ufficiale.