

ROZPORZĄDZENIE WYKONAWCZE KOMISJI (UE) NR 299/2013**z dnia 26 marca 2013 r.****zmieniające rozporządzenie (EWG) nr 2568/91 w sprawie właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wyłocznym oliwek oraz w sprawie odpowiednich metod analizy**

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie Rady (WE) nr 1234/2007 z dnia 22 października 2007 r. ustanawiające wspólną organizację rynków rolnych oraz przepisy szczegółowe dotyczące niektórych produktów rolnych („rozporządzenie o jednolitej wspólnej organizacji rynku”) ⁽¹⁾, w szczególności jego art. 113 ust. 1 lit. a) i art. 121 akapit pierwszy lit. a), w związku z jego art. 4,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) W rozporządzeniu Komisji (EWG) nr 2568/91 z dnia 11 lipca 1991 r. w sprawie właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wyłocznym oliwek oraz w sprawie odpowiednich metod analizy ⁽²⁾ określono właściwości chemiczne i organoleptyczne oliwy z oliwek i oliwy z wyłocznym oliwek oraz metody oceny tych właściwości. Metody te należy aktualizować na podstawie opinii ekspertów w dziedzinie chemii oraz zgodnie z wynikami prac prowadzonych w ramach Międzynarodowej Rady ds. Oliwy z Oliwek (zwanej dalej „IOC”).
- (2) Zgodnie z art. 113 ust. 3 rozporządzenia (WE) nr 1234/2007 państwa członkowskie mają kontrolować, czy oliwy z oliwek i oliwy z wyłocznym oliwek są zgodne z normami handlowymi określonymi w rozporządzeniu (EWG) nr 2568/91, a we właściwych przypadkach stosować sankcje. W art. 2 i 2a rozporządzenia (EWG) nr 2568/91 określono szczegółowe przepisy dotyczące takich kontroli zgodności. Przepisy te powinny gwarantować, że oliwa z oliwek, w odniesieniu do której określono normę jakości, jest zgodna z tą normą. Przepisy te należy bardziej uszczegółwić, uwzględniając analizę ryzyka. Na potrzeby wspomnianych kontroli zgodności należy zdefiniować termin „oliwa z oliwek wprowadzona do obrotu”.
- (3) Doświadczenie pokazało, że niektóre zagrożenia związane z nadużyciami finansowymi utrudniają pełną skuteczność ochrony konsumentów przewidzianej w rozporządzeniu (EWG) nr 2568/91. Dlatego też posiadacze oliwy z oliwek powinni prowadzić rejestr wprowadzania i wycofywania dla każdej kategorii oliwy. Aby uniknąć nadmiernych obciążeń administracyjnych, a jednocześnie nie podważać celów rejestru oliwy z oliwek, gromadzenie informacji powinno obejmować dane jedynie do etapu butelkowania oliwy z oliwek.
- (4) Aby zapewnić działania następcze oraz ocenić środki przewidziane w rozporządzeniu (EWG) nr 2568/91, państwa członkowskie powinny zgłaszać Komisji nie tylko krajowe przepisy wykonawcze, ale również przekazywać wyniki kontroli zgodności.
- (5) Aby kontynuować proces harmonizacji z międzynarodowymi normami określonymi przez IOC, należy zaktualizować niektóre metody analizy określone w rozporządzeniu (EWG) nr 2568/91. W konsekwencji metodę analizy opisaną w załączniku XVIII do tego rozporządzenia należy zastąpić bardziej wydajną metodą. Należy również usunąć pewne niespójności i niedoskonałości metod analizy przewidzianych w załączniku IX do wzmiankowanego rozporządzenia.
- (6) Aby zastosować nowe przepisy określone w niniejszym rozporządzeniu, państwa członkowskie potrzebują okresu przejściowego.
- (7) Komisja opracowała system informacyjny umożliwiający elektroniczne administrowanie dokumentami i procedurami w ramach swoich własnych wewnętrznych procedur pracy oraz w relacjach z organami zaangażowanymi we wspólną politykę rolną. Uznaje się, że obowiązki w zakresie zgłaszania przewidziane w rozporządzeniu (EWG) nr 2568/91 mogą być wypełnione w ramach tego systemu zgodnie z rozporządzeniem Komisji (WE) nr 792/2009 z dnia 31 sierpnia 2009 r. ustanawiającym szczegółowe zasady, zgodnie z którymi państwa członkowskie przekazują Komisji informacje i dokumenty dotyczące wdrożenia wspólnej organizacji rynków, systemu płatności bezpośrednich, promocji produktów rolnych oraz systemów stosowanych w odniesieniu do regionów najbardziej oddalonych i mniejszych wysp Morza Egejskiego ⁽³⁾.
- (8) Dlatego też rozporządzenie (EWG) nr 2568/91 należy odpowiednio zmienić.
- (9) Komitet Zarządzający ds. Wspólnej Organizacji Rynków Rolnych nie wydał opinii w terminie wyznaczonym przez jego przewodniczącego,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

W rozporządzeniu (EWG) nr 2568/91 wprowadza się następujące zmiany:

- 1) artykuł 2a otrzymuje brzmienie:

„Artykuł 2a

1. Do celów niniejszego artykułu »oliwa z oliwek wprowadzona do obrotu« oznacza całkowitą ilość oliwy z oliwek i oliwy z wyłocznym oliwek odpowiedniego państwa członkowskiego konsumowanej w tym państwie członkowskim lub wywożonej z tego państwa członkowskiego.

⁽¹⁾ Dz.U. L 299 z 16.11.2007, s. 1.⁽²⁾ Dz.U. L 248 z 5.9.1991, s. 1.⁽³⁾ Dz.U. L 228 z 1.9.2009, s. 3.

2. Państwa członkowskie zapewniają selektywne przeprowadzanie opartych o analizę ryzyka i odpowiednio częstszych kontroli zgodności, tak aby zagwarantować, że oliwa z oliwek wprowadzona do obrotu jest zgodna ze zgłoszoną kategorią.

3. Kryteria oceny ryzyka mogą obejmować:

- a) kategorię oliwy, okres produkcji, cenę oliwy w stosunku do innych olejów roślinnych, czynności związane z mieszaniem i pakowaniem, obiekty i warunki przechowywania, państwo pochodzenia, państwo przeznaczenia, środki transportu lub objętość partii;
- b) pozycję podmiotów gospodarczych w łańcuchu wprowadzania do obrotu, objętość lub wartość produktów wprowadzanych przez nie do obrotu, zakres kategorii oliwy, które wprowadzają do obrotu, rodzaj prowadzonej działalności, na przykład tłoczenie, przechowywanie, rafinowanie, mieszanie, pakowanie lub sprzedaż detaliczna;
- c) ustalenia poczynione podczas poprzednich kontroli, w tym liczbę i rodzaj stwierdzonych wad, typową jakość oliwy wprowadzanej do obrotu, efektywność wykorzystywanego wyposażenia technicznego;
- d) wiarygodność systemów zapewnienia jakości lub systemów samokontroli podmiotów gospodarczych w odniesieniu do zgodności z normami handlowymi;
- e) miejsce przeprowadzania kontroli, zwłaszcza jeśli jest to pierwszy punkt wprowadzenia produktów na teren Unii, ostatni punkt wyprowadzenia produktów z Unii lub miejsce, w którym oleje są produkowane, pakowane, ładowane lub sprzedawane konsumentowi finalnemu;
- f) wszelkie inne informacje, które mogą wskazywać na ryzyko niezgodności.

4. Państwa członkowskie z wyprzedzeniem ustanawiają:

- a) kryteria oceny ryzyka wystąpienia niezgodności poszczególnych partii;
- b) na podstawie analizy ryzyka dla każdej kategorii ryzyka – minimalną liczbę podmiotów gospodarczych, partii lub ilości podlegających kontroli zgodności.

Rocznie przeprowadza się co najmniej jedną kontrolę zgodności na tysiąc ton oliwy z oliwek wprowadzonej do obrotu w państwie członkowskim.

5. Państwa członkowskie sprawdzają zgodność:

- a) przez przeprowadzenie, w dowolnej kolejności, analiz określonych w załączniku I; lub
- b) przez przeprowadzenie analiz w kolejności określonej w załączniku Ib w sprawie schematu decyzyjnego aż do osiągnięcia jednej z decyzji wymienionych w tym schemacie decyzyjnym.”;

2) artykuł 3 otrzymuje brzmienie:

„Artykuł 3

W przypadku gdy stwierdzono, że oliwa nie odpowiada opisowi jej kategorii, zainteresowane państwo członkowskie

stosuje, bez uszczerbku dla wszelkich innych kar, skuteczne, proporcjonalne i odstraszające kary, które są ustalane w świetle tego, jak poważna jest stwierdzona nieprawidłowość.

W przypadku gdy w ramach kontroli ujawnione zostają istotne nieprawidłowości, państwa członkowskie zwiększają częstotliwość kontroli w odniesieniu do etapu wprowadzania do obrotu, kategorii oliwy, pochodzenia lub innych kryteriów.”;

3) dodaje się art. 7a w brzmieniu:

„Artykuł 7a

Osoby fizyczne lub prawne oraz grupy osób, które posiadają oliwę z oliwek lub oliwę z wyciśniętą z oliwek od etapu ekstrakcji w tłoczni do etapu butelkowania włącznie, w dowolnych celach zawodowych bądź handlowych, muszą prowadzić rejestry wprowadzania i wycofywania w odniesieniu do każdej kategorii takiej oliwy.

Państwa członkowskie zapewniają należyte przestrzeganie obowiązku określonego w akapicie pierwszym.”;

4) artykuł 8 otrzymuje brzmienie:

„Artykuł 8

1. Państwa członkowskie powiadamiają Komisję o środkach służących wprowadzeniu w życie niniejszego rozporządzenia. Państwa członkowskie powiadamiają Komisję o wszelkich późniejszych zmianach.

2. Nie później niż do 31 maja każdego roku państwa członkowskie przekazują Komisji sprawozdanie dotyczące wdrażania niniejszego rozporządzenia w poprzednim roku kalendarzowym. Sprawozdanie zawiera przynajmniej wyniki kontroli zgodności przeprowadzonych w odniesieniu do oliwy z oliwek przedstawione zgodnie z szablonami określonymi w załączniku XXI.

3. Powiadomienia, o których mowa w niniejszym rozporządzeniu, są dokonywane zgodnie z rozporządzeniem Komisji (WE) nr 792/2009 (*).

(*) Dz.U. L 228 z 1.9.2009, s. 3.”;

5) załącznik IX zastępuje się tekstem określonym w załączniku I do niniejszego rozporządzenia;

6) załącznik XVIII zastępuje się tekstem określonym w załączniku II do niniejszego rozporządzenia;

7) dodaje się załącznik XXI w brzmieniu określonym w załączniku III do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie siódmego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie stosuje się od dnia 1 stycznia 2014 r. Natomiast art. 8 ust. 2 stosuje się od dnia 1 stycznia 2015 r.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 26 marca 2013 r.

W imieniu Komisji
José Manuel BARROSO
Przewodniczący

ZAŁĄCZNIK I

„ZAŁĄCZNIK IX

BADANIE SPEKTROFOTOMETRYCZNE W ULTRAFIOLECIE

WPROWADZENIE

Dzięki badaniu spektrofotometrycznemu w ultrafiolecie można uzyskać informacje o jakości substancji tłuszczowej, jej stanie zachowania i zmianach wywołanych procesami technologicznymi.

Efekty absorpcji fal o długości określonej w tej metodzie są wywołane obecnością sprzężonych systemów dienowych i trienowych. Wielkość takiej absorpcji jest wyrażana jako właściwa gęstość optyczna $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (gęstość optyczna 1 % roztworu substancji tłuszczowej w określonym rozpuszczalniku, dla warstwy o grubości 1 cm) oznaczona zgodnie z konwencją jako K (zwana również „współczynnikiem ekstynkcji”).

1. ZAKRES

W ramach metody opisuje się procedurę przeprowadzania badania spektrofotometrycznego oliwy z oliwek (opisanej w dodatku) w ultrafiolecie.

2. PODSTAWOWA ZASADA METODY

Badana substancja tłuszczowa jest rozpuszczana w wymaganym rozpuszczalniku, a następnie dokonywane jest oznaczenie gęstości optycznej roztworu dla określonych długości fal w porównaniu z czystym rozpuszczalnikiem. Na podstawie odczytów spektrofotometrycznych oblicza się właściwe gęstości optyczne. Oblicza się absorbancję właściwą przy 232 nm i 268 nm w izooktanie lub przy 232 nm i 270 nm w cykloheksanie dla stężenia 1 g na 100 ml w ogniwie 10 mm.

3. URZĄDZENIA

- 3.1. Spektrofotometr do pomiaru gęstości optycznej w ultrafiolecie w zakresie od 220 do 360 nm z możliwością odczytu pojedynczych jednostek nanometrycznych. Zaleca się, aby przed użyciem spektrometru sprawdzić jego skalę długości fal i absorbancji w niżej opisany sposób.

- 3.1.1. *Skala długości fal:* Można ją sprawdzić poprzez zastosowanie materiału wzorcowego złożonego z filtra ze szkła optycznego zawierającego tlenek holmu o charakterystycznych pasmach absorpcyjnych. Materiał wzorcowy służy do weryfikacji i kalibracji skali długości fal w spektrofotometrach w świetle widzialnym i nadfiolecie o nominalnej spektralnej szerokości wiązki do 5 nm. Przeprowadza się pomiar filtra ze szkła optycznego w trybie absorbancji względem próbki wzorcowej z powietrzem otoczenia, w zakresie długości fal od 640 do 240 nm. Dla każdej spektralnej szerokości wiązki (0,10 – 0,25 – 0,50 – 1,00 – 1,50 – 2,00 i 3,00) przeprowadzana jest korekta bazowa przy pustym pojemniku na ogniwo. Długości fal dla określonej spektralnej szerokości wiązki są wymienione w certyfikacie materiału wzorcowego zgodnie z normą ISO 3656.

- 3.1.2. *Skala absorbancji:* Można ją sprawdzić poprzez zastosowanie materiału wzorcowego złożonego z 4 roztworów dichromianu potasu w kwasie nadchlorowym szczelnie zamkniętych w kwarcowych ośniewach ultrafioletowych oraz zmierzenie wartości referencyjnej liniowości i dokładności fotometrycznej w ultrafiolecie. Dokonuje się pomiaru ogniwi wypełnionych dichromianem potasu (40 mg/ml, 60 mg/ml, 80 mg/ml i 100 mg/ml) względem próbki wzorcowej z kwasem nadchlorowym. Wartości absorbancji netto są wymienione w certyfikacie materiału wzorcowego zgodnie z normą ISO 3656.

- 3.2. Prostokątne ogniwa kwarcowe z pokrywkami mają długość optyczną równą 1 cm. Po napełnieniu ich wodą lub innym odpowiednim rozpuszczalnikiem ogniwa nie powinny się różnić między sobą o więcej niż 0,01 jednostki gęstości optycznej.

- 3.3. Kolby miarowe o pojemności 25 ml.

- 3.4. Waga analityczna z dokładnością odczytu do najbliższego 0,0001 g.

4. ODCZYNNIKI

Jeżeli nie ma innych wskazań, należy używać wyłącznie odczynników o uznanej klasie analitycznej.

Rozpuszczalnik: izooktan (2,2,4-trimetylopentan) do pomiaru przy 232 nm i 268 nm lub cykloheksan do pomiaru przy 232 nm i 270 nm, przy czym absorbancja wynosi mniej niż 0,12 przy 232 nm i mniej niż 0,05 przy 250 nm w stosunku do wody destylowanej; pomiar w ogniwie 10 mm.

5. PROCEDURA

- 5.1. Badana próbka musi być całkowicie jednorodna i pozbawiona wszelkich zanieczyszczeń występujących w postaci zawiesiny. Oleje pozostające w stanie płynnym w temperaturze otoczenia są filtrowane przez filtr papierowy w temperaturze około 30 °C, tłuszcze stałe są homogenizowane i filtrowane w temperaturze, która nie przekracza ich temperatury topnienia o więcej niż o 10 °C.

- 5.2. Odważyć około 0,25 g (z dokładnością do najbliższego 1 mg) przygotowanej w ten sposób próbki w kolbie miarowej o pojemności 25 ml, uzupełnić wskazanym rozpuszczalnikiem i poddać homogenizacji. Uzyskany roztwór musi być idealnie przezroczysty. W razie wystąpienia opalizacji lub mętnienia przefiltrować szybko przez papierowy filtr.
- 5.3. Napełnić kwarcowe ogniwo otrzymanym roztworem i dokonać pomiaru gęstości optycznych, stosując jako wzorzec zastosowany rozpuszczalnik, dla właściwej długości fal mieszczącej się w przedziale od 232 do 276 nm.

Zarejestrowane wartości gęstości optycznej muszą mieścić się w przedziale od 0,1 do 0,8. Jeżeli się nie mieszczą, należy powtórzyć pomiary, stosując odpowiednio silniejsze lub słabsze roztwory.

UWAGA: Nie jest konieczne dokonywanie pomiaru absorbancji dla całego zakresu długości fal.

6. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

- 6.1. Należy zarejestrować właściwe gęstości optyczne (współczynniki ekstynkcji) dla różnych długości fal, obliczając je w następujący sposób:

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

gdzie:

K_{λ} = właściwa gęstość optyczna przy długości fali λ ,

E_{λ} = gęstość optyczna zmierzona przy długości fali λ ;

c = stężenie roztworu w g/100 ml;

s = grubość ogniw kwarcowych w cm.

Wyniki należy podawać z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku.

6.2. Zmienność właściwej gęstości optycznej (ΔK)

Spektrofotometryczna analiza oliwy z oliwek zgodna z urzędową metodą określoną w przepisach Unii obejmuje również oznaczenie zmienności wartości bezwzględnej właściwej gęstości optycznej (ΔK), którą określa wzór:

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

gdzie K_m oznacza właściwą gęstość optyczną dla długości fal m ; długość fal dla maksymalnej absorpcji zależy od zastosowanego rozpuszczalnika: 270 nm dla cykloheksanu i 268 nm dla izooktanu.

WŁAŚCIWOŚCI OLIWY Z OLIVEK

Kategoria	Estry metylowe kwasu tłuszczowego (FAME) i estry etylowe kwasu tłuszczowego (FAEE)	Kwasowość (%) (*)	Liczba nadtlenkowa mEq O ₂ /kg (*)	Woski mg/kg (**)	2-monopalmitynian glicerolu (%)	Stigmatadien mg/kg (1)	Różnica między HPLC ECN42 a teoretycznym ECN42	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*) lub K ₂₆₈ (2)	Delta-K (*) (2)	Ocena organoleptyczna Mediana błędów (Md) (*)	Ocena organoleptyczna Mediana owocowości (Mf) (*)
1. Oliwa z oliwek ekstra z pierwszego tłoczenia	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg/kg lub 75 mg/kg < Σ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg oraz (FAEE/FAME) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
					≤ 1,0, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %							
2. Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
					≤ 1,0, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %							
3. Oliwa z oliwek typu lampante	—	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (2)	—
					≤ 1,1, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %							
4. Rafinowana oliwa z oliwek	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %							
5. Oliwa z oliwek złożona z rafinowanej oliwy z oliwek oraz oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %							
6. Surowa oliwa z wycłoczn oliwek	—	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Rafinowana oliwa z wycłoczn oliwek	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Oliwa z wycłoczn oliwek	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Suma izomerów, które mogłyby (lub nie mogłyby) być oddzielone kolumną kapilarną.

(2) Lub jeżeli mediana błędów jest mniejsza lub równa 3,5, a mediana owocowości wynosi 0.

(3) Oliwa z zawartością wosków między 300 mg/kg a 350 mg/kg jest uznawana za oliwę lampante, jeżeli całkowita zawartość alkoholi alifatycznych jest mniejsza lub równa 350 mg/kg lub jeżeli zawartość procentowa erytrodiolu i uwaolu jest niższa lub równa 3,5.

(4) Oliwa z zawartością wosków między 300 mg/kg a 350 mg/kg jest uznawana za surową oliwę z wycłoczn oliwek, jeżeli całkowita zawartość alkoholi alifatycznych wynosi powyżej 350 mg/kg i jeżeli zawartość procentowa erytrodiolu i uwaolu jest większa niż 3,5.

(5) K 270, jeżeli rozpuszczalnikiem jest cykloheksan; K 268, jeżeli rozpuszczalnikiem jest izooktan."

ZAŁĄCZNIK II

„ZAŁĄCZNIK XVIII

OZNACZENIE RÓŻNICY MIĘDZY RZECZYWISTĄ A TEORETYCZNĄ ZAWARTOŚCIĄ TRIGLICERYDÓW Z ECN 42**1. ZAKRES**

Oznaczenie różnicy bezwzględnej między wartościami doświadczalnymi triglicerydów (TAG) z równoważną liczbą atomów węgla 42 (ECN_{42-HPLC}) uzyskanymi poprzez oznaczenie ich zawartości w oliwie metodą wysokowydajnej chromatografii cieczowej (HPLC) a wartością teoretyczną TAG z równoważną liczbą atomów węgla 42 (ECN 42_{teoretyczny}) obliczoną na podstawie składu kwasu tłuszczowego.

2. DZIEDZINA ZASTOSOWANIA

Metoda ma zastosowanie do oliwy z oliwek. Metodę stosuje się do wykrywania obecności małych ilości olejów z nasion (zawierających dużo kwasu linolowego) we wszystkich klasach oliwy z oliwek.

3. ZASADA

W przypadku czystej oliwy z oliwek zawartość triglicerydów z ECN 42 oznaczona metodą analizy HPLC oraz teoretyczna zawartość triglicerydów z ECN 42 (obliczona na podstawie oznaczenia składu kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowo-cieczowej (GLC)) są sobie równe w pewnych granicach. Różnice większe niż wartości przyjęte dla każdego rodzaju oliwy świadczą, że oliwa zawiera oleje z nasion.

4. METODA

Metoda obliczania teoretycznej zawartości triglicerydów z ECN 42 oraz różnicy w stosunku do danych uzyskanych metodą HPLC polega w zasadzie na koordynacji danych analitycznych uzyskanych innymi metodami. Można wyróżnić trzy fazy: oznaczenie składu kwasów tłuszczowych metodą kapilarnej chromatografii gazowej, obliczenie teoretycznego składu triglicerydów z ECN 42, oznaczenie triglicerydów z ECN 42 metodą HPLC.

4.1. Aparatura

4.1.1. Kolby okrągłodenne o pojemności 250 i 500 ml.

4.1.2. Zlewki 100 ml.

4.1.3. Szklana kolumna chromatograficzna, o średnicy wewnętrznej 21 mm, długości 450 mm, z kranikiem i znormalizowanym szlifem górnym (żeńskim).

4.1.4. Rozdzielacze, 250 ml, ze znormalizowanym szlifem dolnym (męskim), dopasowanym do połączenia z górą kolumny.

4.1.5. Szklana pałeczka o długości 600 mm.

4.1.6. Szklany lejek o średnicy 80 mm.

4.1.7. Kolby miarowe, 50 ml.

4.1.8. Kolby miarowe, 20 ml.

4.1.9. Wyparka obrotowa.

4.1.10. Wysokowydajny chromatograf cieczowy umożliwiający termostatyczną kontrolę temperatury kolumny.

4.1.11. Zespoły iniekcyjne dla pojemności 10 µl.

4.1.12. Detektor: refraktometr różnicowy. Czułość w pełnej skali powinna wynosić co najmniej 10⁻⁴ jednostek detekcji refraktometrycznej.

4.1.13. Kolumna: rura ze stali nierdzewnej o długości 250 mm i wewnętrznej średnicy 4,5 mm, wypełniona cząsteczkami krzemionki o średnicy 5 µm zawierających 22-23 % węgla w postaci oktadecylosilanu.

4.1.14. Oprogramowanie do przetwarzania danych.

4.1.15. Fiolki, o objętości około 2 ml, z przegrodami z warstw teflonu i zakrętkami.

4.2. Odczynniki

Odczynniki powinny charakteryzować się czystością analityczną. Rozpuszczalniki elucyjne należy odgazować i mogą one być ponownie użyte kilka razy bez wpływu na operacje oddzielania.

- 4.2.1. Eter naftowy 40–60 °C o klasie czystości do chromatografii lub heksan.
- 4.2.2. Eter etylowy, wolny od nadtlenków, świeżo destylowany.
- 4.2.3. Rozpuszczalnik elucyjny do oczyszczania oliwy metodą chromatografii kolumnowej w mieszaninie eteru naftowego z eterem etylowym 87/13 (ułamek objętościowy).
- 4.2.4. Żel krzemionkowy, sito 70–230, rodzaj Merck 7734, o znormalizowanej zawartości wilgoci na poziomie 5 % (wartość procentowa masy – w/w/).
- 4.2.5. Wata szklana.
- 4.2.6. Aceton do HPLC.
- 4.2.7. Acetonitryl lub propionitryl do HPLC.
- 4.2.8. Rozpuszczalnik elucyjny do HPLC: acetonitryl + aceton (proporcje należy dostosować w celu uzyskania pożądanego oddzielenia; zaczynając od mieszaniny 50:50) lub propionitryl.
- 4.2.9. Rozpuszczalnik do rozpuszczania: aceton.
- 4.2.10. Triglicerydy wzorcowe: można zastosować triglicerydy handlowe (tripalmitynian, trioleinian itp.) i wtedy czasy retencji można nanieść zgodnie z równoważną liczbą atomów węgla lub alternatywnie chromatogramy wzorcowe uzyskane z oleju sojowego, mieszaniny oleju sojowego i oliwy z oliwek w proporcji 30:70 oraz czystej oliwy z oliwek (zob. uwagi 1 i 2 oraz rysunki 1–4).
- 4.2.11. Kolumnienka do ekstrakcji do fazy stałej z zastosowaniem fazy krzemionki 1 g, 6 ml.

4.3. Przygotowanie próbek

Jako że szereg substancji interferujących może mieć wpływ na wyniki fałszywie dodatnie, próbkę zawsze należy oczyścić zgodnie z metodą IUPAC 2.507, stosowaną do oznaczania związków jonowych w tłuszczach do smażenia.

4.3.1. Przygotowanie kolumny chromatograficznej

Do kolumny (4.1.3) wlać około 30 ml rozpuszczalnika elucyjnego (4.2.3), następnie do kolumny wprowadzić watę szklaną (4.2.5), przeciskając ją na dno kolumny za pomocą szklanej pałeczki (4.1.5).

W zlewce 100 ml sporządzić zawiesinę 25 g żelu krzemionkowego (4.2.4) w 80 ml mieszaniny elucyjnej (4.2.3), następnie przenieść ją do kolumny za pomocą szklanego lejka (4.1.6).

Aby zapewnić całkowite przeniesienie żelu krzemionkowego do kolumny, opłukać zlewkę mieszaniną elucyjną i przenieść do kolumny również pozostałości po opłukaniu.

Otworzyć kranik i spuścić rozpuszczalnik z kolumny, aż osiągnie poziom około 1 cm powyżej żelu krzemionkowego.

4.3.2. Chromatografia kolumnowa

Z dokładnością do 0,001 g odważyć $2,5 \pm 0,1$ g oliwy, uprzednio przefiltrowanej, homogenizowanej i odwodnionej, w razie konieczności, w kolbie miarowej 50 ml (4.1.7).

Rozpuścić ją w około 20 ml rozpuszczalnika elucyjnego (4.2.3). W razie konieczności podgrzać go nieco, aby ułatwić rozpuszczanie. Ochłodzić w temperaturze pokojowej i dostosować objętość rozpuszczalnikiem elucyjnym.

Pipetą miarową wprowadzić 20 ml roztworu do kolumny przygotowanej zgodnie z pkt 4.3.1, otworzyć kranik i spuścić rozpuszczalnik do poziomu warstwy żelu krzemionkowego.

Następnie zlać za pomocą 150 ml rozpuszczalnika elucyjnego (4.2.3), ustawiając szybkość przepływu rozpuszczalnika na około 2 ml/min (150 ml przejdzie przez kolumnę w ciągu około 60–70 minut).

Odciek zbiera się do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml (4.1.1) uprzednio wytarowanej w piecu i dokładnie zważonej. Usunąć rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem w wyparce obrotowej (4.1.9) i zważyć pozostałość, która będzie wykorzystana do przygotowania roztworu do analizy HPLC oraz do przygotowania estru metyloвого.

Poziom odzyskania próbki z kolumny musi wynosić co najmniej 90 % w przypadku kategorii oliwy z oliwek ekstra z pierwszego tłoczenia, oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia, oliwy rafinowanej zwyczajnie i oliwy z oliwek oraz co najmniej 80 % w przypadku oliwy z oliwek typu lampante i oliwy z wyłoczyn oliwek.

4.3.3. *Oczyszczanie SPE*

Kolumna z wkładem krzemionkowym SPE jest aktywowana poprzez przepuszczenie 6 ml heksanu (4.2.3) w próżni, unikając suchości.

Z dokładności do 0,001 g odważyć 0,12 g w fiolce 2 ml (4.1.15) i rozpuścić w 0,5 ml heksanu (4.2.3).

Kolumnę SPE napełnić roztworem i złączyć za pomocą 10 ml mieszaniny heksanu i eteru dietylowego (87:13 w proporcji objętościowej) (4.2.3) w próżni.

Zebrałą frakcję należy odparować do suchości w wyparce obrotowej (4.1.9) pod zmniejszonym ciśnieniem, w temperaturze pokojowej. Pozostałość rozpuszcza się w 2 ml acetonu (4.2.6) na potrzeby analizy triglicerydów (TAG).

4.4. **Analiza HPLC**4.4.1. *Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej*

Przygotować 5 % roztwór próbki przeznaczonej do analizy, odważając $0,5 \pm 0,001$ g próbki w kolbie miarowej o pojemności 10 ml i uzupełnić do 10 ml rozpuszczalnikiem do rozpuszczania (4.2.9).

4.4.2. *Procedura*

Utworzyć układ chromatograficzny. Wpompować rozpuszczalnik elucyjny (4.2.8) w tempie 1,5 ml/min w celu oczyszczenia całego układu. Odczekać do uzyskania stabilnej linii podstawowej.

Wstrzyknąć 10 µl próbki przygotowanej zgodnie z pkt 4.3.

4.4.3. *Obliczanie i formułowanie wyników*

Zastosować metodę normalizacji powierzchni (normalizacji wewnętrznej), to znaczy założyć, że suma powierzchni pików odpowiadających poszczególnym triglicerydom od ECN 42 do ECN 52 wynosi 100 %.

Obliczyć względny procentowy udział każdego triglicerydu, stosując następujący wzór:

procentowy udział triglicerydu [%] = $\frac{\text{powierzchnia pików}}{\text{suma powierzchni pików}} \times 100$

Wyniki należy podawać co najmniej do dwóch miejsc po przecinku.

Zob. uwagi 1–4.

4.5. **Obliczenie składu triglicerydów (odsetka molowego [%]) na podstawie danych dotyczących składu kwasów tłuszczowych (procentowego udziału powierzchni [%])**4.5.1. *Oznaczenie składu kwasów tłuszczowych*

Skład kwasów tłuszczowych oznacza się zgodnie z normą ISO 5508 za pomocą kolumny kapilarnej. Estrы metylowe są przygotowywane zgodnie z COI/T.20/Doc. nr 24.

4.5.2. *Kwasy tłuszczowe przyjmowane do obliczeń*

Glicerydy są grupowane według równoważnej liczby atomów węgla (ECN), przy uwzględnieniu poniższych ekwiwalencji między ECN a kwasami tłuszczowymi. Uwzględniono jedynie kwasy tłuszczowe z liczbą atomów węgla 16 i 18, ponieważ tylko one są istotne w odniesieniu do oliwy z oliwek. Kwasy tłuszczowe należy normalizować do 100 %.

Kwas tłuszczowy	Skrót	Masa cząsteczkowa (MW)	ECN
Kwas palmitynowy	P	256,4	16
Kwas oleopalmitynowy	Po	254,4	14
Kwas stearynowy	S	284,5	18
Kwas oleinowy	O	282,5	16
Kwas linolowy	L	280,4	14
Kwas linolenowy	Ln	278,4	12

4.5.3. *Przekształcenie procentowego udziału powierzchni (% pow.) w liczbę moli w odniesieniu do wszystkich kwasów tłuszczowych (1)*

$$\text{liczba moli P} = \frac{\% \text{ pow. P}}{\text{MW P}}$$

$$\text{liczba moli S} = \frac{\% \text{ pow. S}}{\text{MW S}}$$

$$\text{liczba moli Po} = \frac{\% \text{ pow. Po}}{\text{MW Po}}$$

$$\text{liczba moli O} = \frac{\% \text{ pow. O}}{\text{MW O}}$$

$$\text{liczba moli L} = \frac{\% \text{ pow. L}}{\text{MW L}}$$

$$\text{liczba moli Ln} = \frac{\% \text{ pow. Ln}}{\text{MW Ln}}$$

4.5.4. Normalizacja liczby moli kwasów tłuszczowych do 100 % (2)

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

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

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

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

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

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

Uzyskuje się procentowy udział każdego kwasu tłuszczowego jako odsetek moly (% moly) w ogólnej (1, 2, 3-) pozycji triglicerydów.

Następnie oblicza się sumę nasyconych kwasów tłuszczowych P i S (SFA) oraz nienasycone kwasy tłuszczowe Po, O, L i Ln (UFA) (3):

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

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

4.5.5. Obliczenie składu kwasów tłuszczowych w pozycjach 2- i 1,3- triglicerydów

Kwasy tłuszczowe rozkładają się na trzy grupy w następujący sposób: jedna na pozycję 2-, a dwie identyczne na pozycje 1- i 3-, przy czym do kwasów nasyconych (P i S) i nienasyconych (Po, O, L i Ln) odnoszą się różne współczynniki.

4.5.5.1. Nasycone kwasy tłuszczowe w pozycji 2- [P(2) i S(2)] (4)

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

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

4.5.5.2. Nienasycone kwasy tłuszczowe w pozycji 2- [Po(2), O(2), L(2) i Ln(2)] (5):

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

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

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

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

4.5.5.3. Kwasy tłuszczowe w pozycjach 1,3- [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) i Ln(1,3)] (6):

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

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

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

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

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

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

4.5.6. Obliczenie triglicerydów

4.5.6.1. Triglicerydy z jednym kwasem tłuszczowym (AAA, w tym przypadku LLL, PoPoPo) (7)

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

4.5.6.2. Triglicerydy z dwoma kwasami tłuszczowymi (AAB, w tym przypadku PoPoL, PoLL) (8)

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

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

4.5.6.3. Triglicerydy z trzema różnymi kwasami tłuszczowymi (ABC, w tym przypadku OLLn, PLLn, PoOLn, PPOln) (9)

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

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

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

4.5.6.4. Triglicerydy z ECN42

Triglicerydy z ECN42 oblicza się według wzorów 7, 8 i 9, a następnie podaje się je w kolejności przewidzianej elucji w HPLC (zazwyczaj jedynie trzy piki).

LLL

PoLL oraz izomer pozycyjny LPoL

OLLn oraz izomery pozycyjne OLnL i LnOL

PoPoL oraz izomer pozycyjny PoLPo

PoOLn oraz izomery pozycyjne OPoLn i OLnPo

PLLn oraz izomery pozycyjne LLnP i LnPL

PoPoPo

SLnLn oraz izomer pozycyjny LnSLn

PPoLn oraz izomery pozycyjne PLnPo i PoPLn

Triglicerydy z ECN42 podaje się w postaci sumy dziewięciu triglicerydów wraz z ich izomerami pozycyjnymi. Wyniki należy podawać z dokładnością co najmniej do dwóch miejsc po przecinku.

5. OCENA WYNIKÓW

Porównuje się obliczoną zawartość teoretyczną z zawartością oznaczoną metodą analizy HPLC. Jeżeli różnica między wartością bezwzględną danych z HPLC a danymi teoretycznymi jest większa niż wskazane w normie wartości dla odpowiedniej kategorii oliwy, to próbka zawiera olej z nasion.

Wyniki podaje się z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku.

6. PRZYKŁAD (DANE LICZBOWE ODNOSZĄ SIĘ DO SEKCJI TEKSTU DOTYCZĄCYCH OPISYWANEJ METODY)

- 4.5.1. Obliczenie odsetka (%) molowego kwasów tłuszczowych na podstawie danych z GLC (znormalizowanego procentowego udziału [%] powierzchni)

Metodą GLC uzyskano następujące dane dotyczące składu kwasów tłuszczowych:

Kwas tł.	P	S	Po	O	L	Ln
MW	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
% pow.	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

- 4.5.3 Przekształcenie % powierzchni w liczbę moli w odniesieniu do wszystkich kwasów tłuszczowych (zob. wzór (1))

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

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

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

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

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

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

$$\text{Łącznie} = 0,35821 \text{ mola triglicerydów}$$

- 4.5.4 Normalizacja liczby moli kwasów tłuszczowych do 100 % (zob. wzór (2))

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

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

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

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

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

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

$$\text{Suma \% molowych} = 100 \%$$

Suma nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych w pozycjach 1,2,3- triglicerydów (zob. wzór (3)):

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

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

- 4.5.5 *Obliczenie składu kwasów tłuszczowych w pozycjach 2- i 1,3- triglicerydów*
- 4.5.5.1 Nasycone kwasy tłuszczowe w pozycji 2- [P(2) i S(2)] (zob. wzór (4))
- $$\% \text{ molowy P(2)} = 10,887 \% * 0,06 = 0,653 \% \text{ molowego}$$
- $$\% \text{ molowy S(2)} = 2,942 \% * 0,06 = 0,177 \% \text{ molowego}$$
- 4.5.5.2 Nienasycone kwasy tłuszczowe w pozycji 2- [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) i Ln(1,3)] (zob. wzór (5))
- $$\% \text{ molowy Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,262 \% \text{ molowego}$$
- $$\% \text{ molowy O(2)} = \frac{74,116 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 85,296 \% \text{ molowego}$$
- $$\% \text{ molowy L(2)} = \frac{9,955 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 11,457 \% \text{ molowego}$$
- $$\% \text{ molowy Ln(2)} = \frac{1,002 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,153 \% \text{ molowego}$$
- 4.5.5.3 Kwasy tłuszczowe w pozycjach 1,3- [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) i Ln(1,3)] (zob. wzór (6))
- $$\% \text{ molowy P(1,3)} = \frac{10,887 - 0,653}{2} + 10,887 = 16,004 \% \text{ molowego}$$
- $$\% \text{ molowy S(1,3)} = \frac{2,942 - 0,177}{2} + 2,942 = 4,325 \% \text{ molowego}$$
- $$\% \text{ molowy Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,262}{2} + 1,097 = 1,015 \% \text{ molowego}$$
- $$\% \text{ molowy O(1,3)} = \frac{74,116 - 85,296}{2} + 74,116 = 68,526 \% \text{ molowego}$$
- $$\% \text{ molowy L(1,3)} = \frac{9,955 - 11,457}{2} + 9,955 = 9,204 \% \text{ molowego}$$
- $$\% \text{ molowy Ln(1,3)} = \frac{1,002 - 1,153}{2} + 1,002 = 0,927 \% \text{ molowego}$$
- 4.5.6. *Obliczenie triglicerydów*

Na podstawie obliczonego składu kwasów tłuszczowych w pozycjach sn-2- oraz sn-1,3-:

Kwas tł. w	poz. 1,3-	poz. 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 %
Suma	100,0 %	100,0 %

oblicza się następujące triglicerydy:

LLL

PoPoPo

PoLL z 1 izomerem pozycyjnym

SLnLn z 1 izomerem pozycyjnym

PoPoL z 1 izomerem pozycyjnym

PPoLn z 2 izomerami pozycyjnymi

OLLn z 2 izomerami pozycyjnymi

PLLn z 2 izomerami pozycyjnymi

PoOLn z 2 izomerami pozycyjnymi

— 4.5.6.1. Triglicerydy z jednym kwasem tłuszczowym (LLL, PoPoPo) (zob. wzór (7))

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

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

— 4.5.6.2 Triglicerydy z dwoma kwasami tłuszczowymi (PoLL, SLnLn, PoPoL) (zob. wzór (8))

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

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

0,03210 mola PoLL

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

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

0,00094 mola SLnLn

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

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

0,00354 mola PoPoL

— 4.5.6.3 Triglicerydy z trzema różnymi kwasami tłuszczowymi (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) zob. wzór (9)

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

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

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

0,00761 mola PPOln

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

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

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

0,43655 mola OLLn

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

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

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

0,06907 mola PLLn

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

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

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

0,04812 mola PoOLn

ECN42 = 0,69512 mola TAG

Uwaga 1: Kolejność elucji można oznaczyć poprzez obliczenie równoważnej liczby atomów węgla, często określonej stosunkiem $ECN = CN - 2n$, gdzie CN oznacza liczbę atomów węgla, a n liczbę wiązań podwójnych; obliczenie może być dokładniejsze po uwzględnieniu pochodzenia wiązania podwójnego. Jeżeli n_o , n_l i n_{ln} są liczbami wiązań podwójnych przypisanych, odpowiednio, kwasowi oleinowemu, kwasowi linolowemu i kwasowi linolenowemu, to równoważna liczba atomów węgla może być obliczona według wzoru:

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

gdzie współczynniki d_o , d_l i d_{ln} można obliczyć na podstawie triglicerydów wzorcowych. Przy zachowaniu warunków określonych w tej metodzie uzyskany stosunek byłby zbliżony do poniższej postaci:

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

Uwaga 2: Za pomocą kilku triglicerydów wzorcowych można również obliczyć rozdzielczość w odniesieniu do trioleinianu:

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

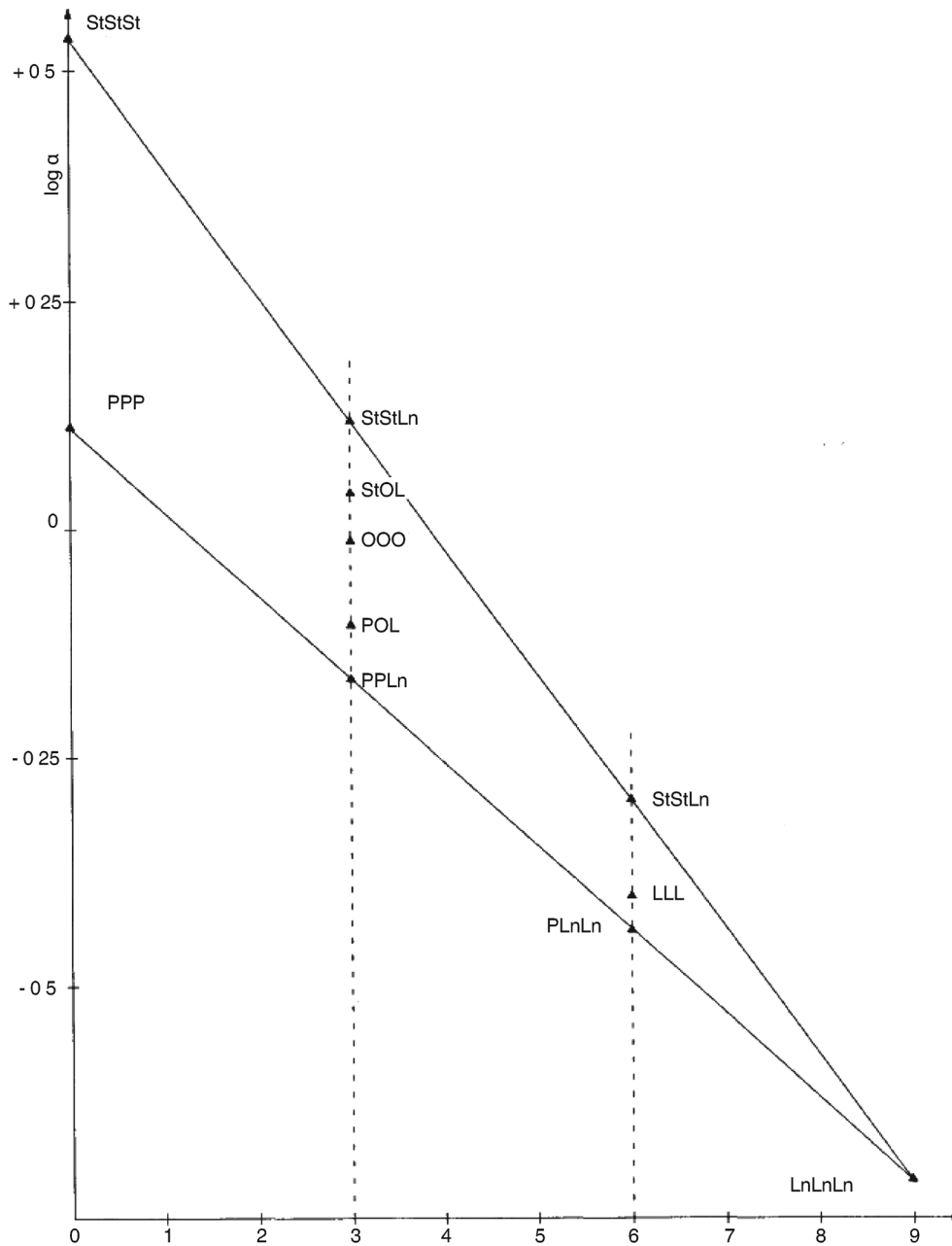
poprzez zastosowania skróconego czasu retencji $RT^1 = RT - RT$ rozpuszczalnika

Wykres $\log \alpha$ w zależności od f (liczby wiązań podwójnych) umożliwia oznaczenie wartości retencji w odniesieniu do wszystkich triglicerydów kwasów tłuszczowych zawartych w triglicerydach wzorcowych – zob. rysunek 1.

Uwaga 3: Efektywność kolumny powinna umożliwić wyraźne oddzielenie pików trioleinianu od pików triglicerydów o zbliżonej wartości RT. Elucja jest przeprowadzana do pików ECN 52.

Uwaga 4: Prawidłowy pomiar powierzchni wszystkich pików istotnych z punktu widzenia przedmiotowego oznaczenia jest zapewniony, jeżeli drugi pik odpowiadający ECN 50 wynosi 50 % pełnej skali rejestratora.

Rysunek 1

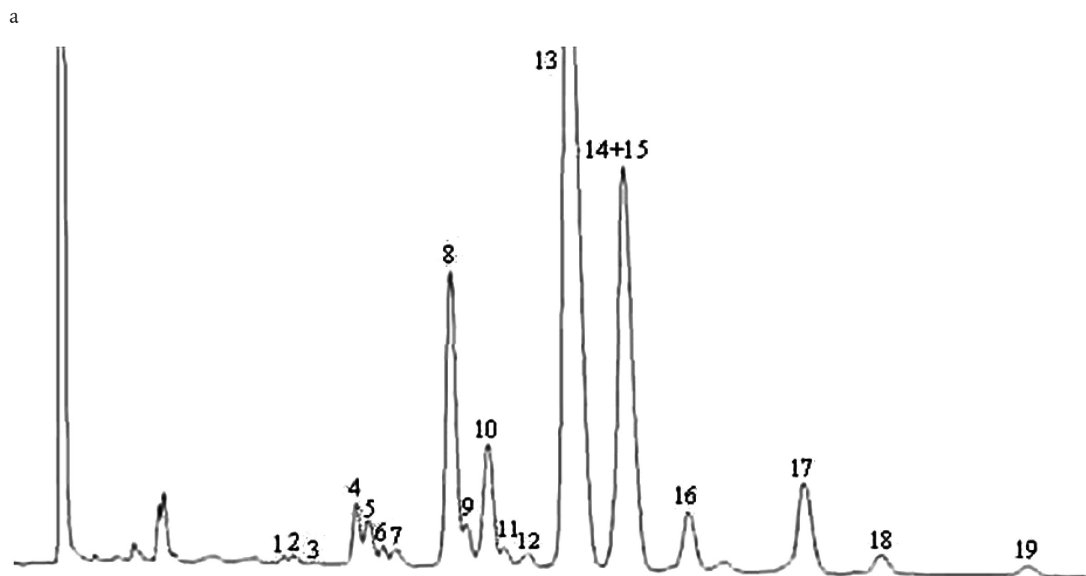
Wykres $\log \alpha$ w zależności od f (liczby wiązań podwójnych)

Liczba wiązań podwójnych

La: kwas laurynowy; My: kwas mirystynowy; P: kwas palmitynowy; S: kwas stearynowy; O: kwas oleinowy; L: kwas linolowy; Ln: kwas linolenowy

Rysunek 2

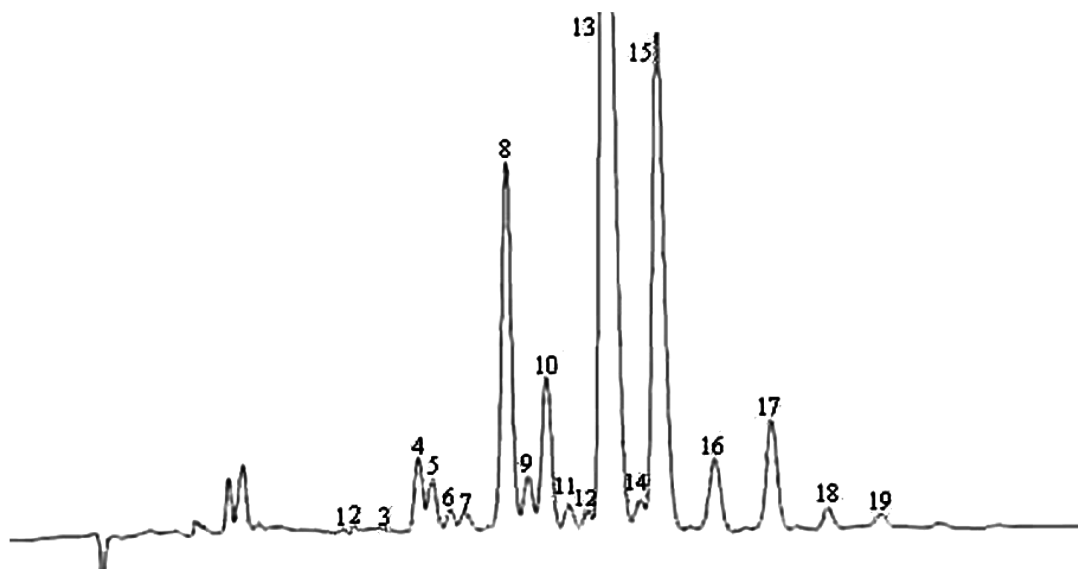
Oliwa z oliwek z niską zawartością kwasu linolowego



Z rozpuszczalnikiem: aceton/acetonytryl.

PROFIL a: Główne składowe pików chromatograficznych: **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

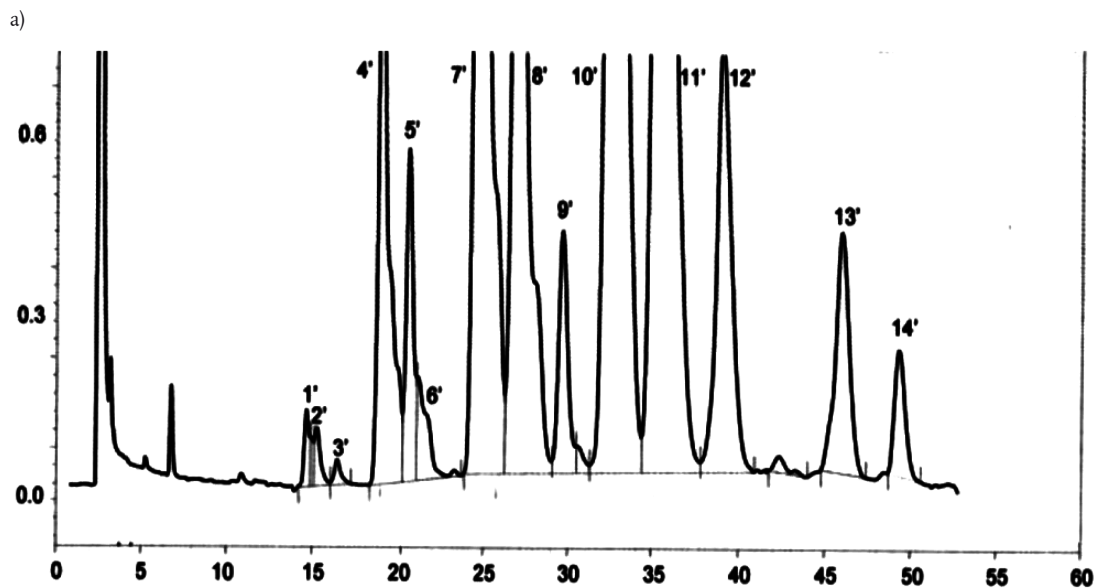


Z rozpuszczalnikiem: propionitryl

PROFIL b: Główne składowe pików chromatograficznych: **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

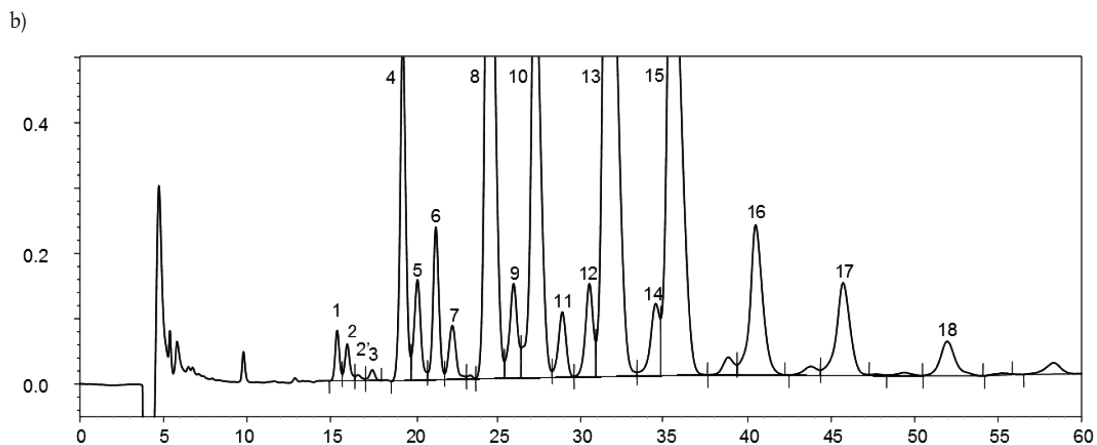
Rysunek 3

Oliwa z oliwek z wysoką zawartością kwasu linolowego



Z rozpuszczalnikiem: aceton/acetonytryl (50:50).

Profil a: Główne składowe pików chromatograficznych: **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



Z rozpuszczalnikiem: propionitryl.

Profil b: Główne składowe pików chromatograficznych: **ECN42:** (1) LLL; (2 + 2') OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44:** (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PPOo; (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."

ZAŁĄCZNIK III

„ZAŁĄCZNIK XXI

Wyniki kontroli zgodności przeprowadzonych w odniesieniu do oliwy z oliwek, o których mowa w art. 8 ust. 2

				Oznakowanie						Właściwości chemiczne			Właściwości organoleptyczne ⁽⁴⁾			Wniosek końcowy	
Próbka	Kategoria	Państwo pochodzenia	Miejsce inspekcji ⁽¹⁾	Nazwa prawna	Nazwa pochodzenia	Warunki przechowywania	Błędne informacje	Czytelność	Z/NZ ⁽³⁾	Parametry przekraczają limit T/N	Jeżeli tak, proszę wskazać który (które) ⁽²⁾	Z/NZ ⁽³⁾	Mediana błędów	Mediana owocowości	Z/NZ ⁽³⁾	Wymagane działanie	Sankcja

(1) Rynek wewnętrzny (tłocznia, podmiot dokonujący butelkowania, etap sprzedaż detalicznej), wywóz, przywóz.

(2) Każda właściwość oliwy z oliwek określona w załączniku I jest oznaczona kodem.

(3) Zgodność/niezgodność.

(4) Nie wymagane w odniesieniu do oliwy z oliwek i oliwy z wycłoczyn oliwek.”