

ROZPORZĄDZENIE WYKONAWCZE KOMISJI (UE) 2019/1604**z dnia 27 września 2019 r.****zmieniające rozporządzenie (EWG) nr 2568/91 w sprawie właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wycłoczyn oliwek oraz w sprawie odpowiednich metod analizy**

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1308/2013 z dnia 17 grudnia 2013 r. ustanawiające wspólną organizację rynków produktów rolnych oraz uchylające rozporządzenia Rady (EWG) nr 922/72, (EWG) nr 234/79, (WE) nr 1037/2001 i (WE) nr 1234/2007 ⁽¹⁾, w szczególności jego art. 91 akapit pierwszy lit. d),

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) W rozporządzeniu Komisji (EWG) nr 2568/91 ⁽²⁾ określono fizykochemiczne i organoleptyczne właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wycłoczyn z oliwek oraz ustalono metody oceny tych właściwości.
- (2) Metody i wartości dopuszczalne stosowane w odniesieniu do właściwości olejów są regularnie aktualizowane na podstawie opinii ekspertów w dziedzinie chemii oraz zgodnie z wynikami prac prowadzonych w ramach Międzynarodowej Rady ds. Oliwy z Oliwek (IOC).
- (3) Aby zapewnić wdrożenie na poziomie Unii najnowszych norm międzynarodowych określonych przez IOC, należy zaktualizować niektóre metody analizy określone w rozporządzeniu (EWG) nr 2568/91.
- (4) Norma handlowa IOC została zmieniona w zakresie wyrażania limitu wolnej kwasowości, liczby nadtlenkowej, oceny organoleptycznej (mediana wad i mediana aromatu owoców) oraz różnicy między ECN42 (HPLC) a teoretycznym ECN42 w celu zachowania zgodności z wartościami precyzji metody analitycznej.
- (5) Zgodnie z art. 2a ust. 5 rozporządzenia (EWG) nr 2568/91 państwa członkowskie sprawdzają, czy próbka oliwy z oliwek jest zgodna ze zgłoszoną kategorią, kontrolując właściwości określone w załączniku I do tego rozporządzenia w dowolnej kolejności albo w kolejności określonej w schemacie podejmowania decyzji zawartym w załączniku Ib do tego rozporządzenia.
- (6) W związku z ostatnimi zmianami w stosownych przypadkach należy zaktualizować tabele zamieszczone w załączniku Ib do rozporządzenia (EWG) nr 2568/91 oraz dodatek do tego załącznika. Wydaje się również, że w kontekście treści załącznika Ib termin „schemat” jest odpowiedniejszy niż termin „schemat podejmowania decyzji”.
- (7) W pkt 9.4 załącznika XII do rozporządzenia (EWG) nr 2568/91 medianę wad określa się jako medianę wady odebranej z największą intensywnością. W kontekście ocen porównawczych oraz biorąc pod uwagę, że różne zespoły muszą przeprowadzić ocenę zgodności oliwy, należy wyjaśnić, iż decyzja w sprawie zgodności właściwości oliwy ze zgłoszoną kategorią dotyczy wyłącznie wartości mediany głównej wady, niezależnie od jej charakteru.
- (8) Należy zatem odpowiednio zmienić rozporządzenie (EWG) nr 2568/91.
- (9) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Komitetu ds. Wspólnej Organizacji Rynków Rolnych,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

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

1) w art. 2 wprowadza się następujące zmiany:

a) ust. 1 lit. l) otrzymuje brzmienie:

„l) metoda oznaczania składu i zawartości steroli oraz związków alkoholi metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych, przedstawiona w załączniku XIX;”;

⁽¹⁾ Dz.U. L 347 z 20.12.2013, s. 671.⁽²⁾ Rozporządzenie Komisji (EWG) nr 2568/91 z dnia 11 lipca 1991 r. w sprawie właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wycłoczyn oliwek oraz w sprawie odpowiednich metod analizy (Dz.U. L 248 z 5.9.1991, s. 1).

b) ust. 2 akapit trzeci otrzymuje brzmienie:

„W przypadku gdy zespół nie potwierdzi kategorii zgłoszonej w odniesieniu do właściwości organoleptycznych, na wniosek zainteresowanej strony organy krajowe lub ich przedstawiciele zapewniają niezwłoczne przeprowadzenie przez inne zatwierdzone zespoły dwóch ocen porównawczych. Co najmniej jeden z zespołów to zespół zatwierdzony przez zainteresowane państwo członkowskie będące producentem. Przedmiotowe właściwości określa się jako zgodne ze zgłoszonymi właściwościami, jeżeli obydwie oceny porównawcze potwierdzą zgłoszoną klasyfikację. Jeżeli tak się nie stanie, niezależnie od rodzaju wad stwierdzonych w trakcie przeprowadzania ocen porównawczych, klasyfikację zgłasza się jako niezgodną z właściwościami, a zainteresowana strona ponosi koszty ocen porównawczych.”;

2) art. 2a ust. 5 lit. b) otrzymuje brzmienie:

„b) przez przeprowadzenie analiz w kolejności określonej w załączniku Ib w sprawie schematu aż do osiągnięcia jednej z decyzji wymienionych w tym schemacie.”;

3) tabelę „ZAŁĄCZNIKI Streszczenie” zastępuje się tabelą zawartą w załączniku I do niniejszego rozporządzenia;

4) załącznik I zastępuje się tekstem znajdującym się w załączniku II do niniejszego rozporządzenia;

5) pkt 2.1 załącznika Ia otrzymuje brzmienie:

„2.1. Każdą próbkę pierwotną należy podzielić na próbki laboratoryjne, zgodnie z pkt 2.5 normy EN ISO 5555, i analizować w kolejności przedstawionej na schemacie opisanym w załączniku Ib lub w innej dowolnej kolejności.”;

6) załącznik Ib zastępuje się tekstem znajdującym się w załączniku III do niniejszego rozporządzenia;

7) uchyla się załącznik V;

8) pkt 4.2 załącznika VII otrzymuje brzmienie:

„4.2. n-heksan (o klasie czystości do chromatografii). Heksan można zastąpić izooktanem (2,2,4-trimetylopentanem o klasie czystości do chromatografii), o ile osiągnięto porównywalne wartości precyzji.”;

9) w załączniku XII wprowadza się zmiany zgodnie z załącznikiem IV do niniejszego rozporządzenia;

10) w załączniku XVII wprowadza się zmiany zgodnie z załącznikiem V do niniejszego rozporządzenia;

11) w załączniku XVIII wprowadza się zmiany zgodnie z załącznikiem VI do niniejszego rozporządzenia;

12) załącznik XIX zastępuje się tekstem znajdującym się w załączniku VII do niniejszego rozporządzenia;

13) pkt 4.2 załącznika XX otrzymuje brzmienie:

„4.2. n-heksan o klasie czystości do chromatografii lub do wykrywania pozostałości. Heksan można zastąpić izooktanem (2,2,4-trimetylopentanem o klasie czystości do chromatografii), o ile osiągnięto porównywalne wartości precyzji. Rozpuszczalniki o temperaturze wrzenia wyższej niż n-heksan odparowują dłużej. Są jednak preferowane ze względu na toksyczność heksanu. Należy sprawdzić czystość; na przykład można kontrolować pozostałości po odparowaniu 100 ml rozpuszczalnika.

UWAGA – Opary mogą ulec samozapłonowi. Należy trzymać z daleka od źródeł ciepła, iskier lub nieosłoniętego płomienia. Należy upewnić się zawsze, że pojemniki są zawsze dobrze zamknięte. Należy zapewnić odpowiednią wentylację podczas użytkowania. Należy unikać nagromadzenia oparów i usunąć wszelkie możliwe źródła zagrożenia pożarowego takie jak grzejniki czy aparatura elektryczna wyprodukowana z materiałów innych niż materiały niepalne. Wdychanie oparów może mieć szkodliwe skutki, ponieważ może prowadzić do uszkodzenia komórek nerwowych. Nie należy wdychać oparów. Należy w razie potrzeby zastosować odpowiednie urządzenia umożliwiające oddychanie. Chronić oczy i skórę przed kontaktem.

Izooktan jest substancją ciekłą łatwopalną stanowiącą zagrożenie pożarowe. Granice palności w powietrzu wynoszą 1,1–6,0 % (ułamek objętościowy). Jest on toksyczny w przypadku jego spożywania i wdychania. Pracując z tym rozpuszczalnikiem, należy korzystać z wentylowanego dygestorium w dobrym stanie technicznym.”.

Artykuł 2

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

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

Sporządzono w Brukseli dnia 27 września 2019 r.

W imieniu Komisji
Jean-Claude JUNCKER
Przewodniczący

ZAŁĄCZNIK I

„ZAŁĄCZNIKI

STRESZCZENIE

Załącznik I	Właściwości oliwy z oliwek
Załącznik Ia	Pobieranie próbek oliwy z oliwek lub oliwy z wycłoczyn z oliwek dostarczonych w opakowaniu bezpośrednim
Załącznik Ib	Schemat weryfikacji, czy próbka oliwy z oliwek jest zgodna ze zgłoszoną kategorią
Załącznik II	Oznaczanie wolnych kwasów tłuszczowych, metoda na zimno
Załącznik III	Oznaczanie liczby nadtlenkowej
Załącznik IV	Oznaczanie zawartości wosków metodą chromatografii gazowej z użyciem kolumny kapilarnej
Załącznik VII	Oznaczanie zawartości procentowej 2-monopalmitynianu glicerolu
Załącznik IX	Badanie spektrofotometryczne w ultrafiolecie
Załącznik X	Oznaczanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej
Załącznik XI	Oznaczanie lotnych fluorowcowanych rozpuszczalników oliwy z oliwek
Załącznik XII	Metoda międzynarodowej rady ds. oliwy służąca do organoleptycznej oceny oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia
Załącznik XV	Zawartość oleju w pozostałości z oliwek
Załącznik XVI	Oznaczenie liczby jodowej
Załącznik XVII	Metoda oznaczania stigmastadienów w olejach roślinnych
Załącznik XVIII	Oznaczenie różnicy między rzeczywistą a teoretyczną zawartością triglicerydów z ECN 42
Załącznik XIX	Oznaczanie składu i zawartości steroli oraz związków alkoholowych metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych
Załącznik XX	Metoda oznaczania zawartości wosków, estrów metylowych kwasów tłuszczowych i estrów etylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych
Załącznik XXI	Wyniki kontroli zgodności przeprowadzonych w odniesieniu do oliwy z oliwek, o których mowa w art. 8 ust. 2”

WŁAŚCIWOŚCI OLIWY Z OLIVEK

Cechy jakościowe

Kategoria	Kwasowość (%) (*)	Liczba nadtlenkowa (mEq O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₆₈ lub K ₂₇₀	Delta-K	Ocena organoleptyczna		Estry etylowe kwasu tłuszczowego (mg/kg)
						Mediana wad (Md) (*)	Mediana aromatu owoców (Mf)	
1. Oliwa z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Oliwa lampante	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 (!)	—	—
4. Rafinowana oliwa z oliwek	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Oliwa z oliwek złożona z rafinowanej oliwy z oliwek i oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Surowa oliwa z wycłoczyn z oliwek	—	—	—	—	—		—	—
7. Rafinowana oliwa z wycłoczyn z oliwek	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Oliwa z wycłoczyn z oliwek	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

(!) Mediana wad może być mniejsza lub równa 3,5, kiedy mediana aromatu owocowego wynosi 0,0.

Charakterystyka czystości

Kategoria	Skład kwasów tłuszczowych ⁽¹⁾						Izomery transolei- nowe ogółem (%)	Izomery translino- lowe + izomery translino- lenowe ogółem (%)	Stigmasta- dieny (mg/kg) ⁽²⁾	Różnica między ECN42 (HPLC) a teore- tycznym ECN42	2-monopalmitynian glicerolu (%)
	Mirysty- nowy (%)	Linole- nowy (%)	Arachi- dowy (%)	Eikoze- nowy (%)	Behenowy (%)	owy (%)					
1. Oliwa z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14,00 %
											≤ 1,0, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14,00 %
2. Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14,00 %
											≤ 1,0, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14,00 %
3. Oliwa lampante	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,9, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14,00 %
											≤ 1,1, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14,00 %
4. Rafinowana oliwa z oliwek	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14,00 %
											≤ 1,1, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14,00 %
5. Oliwa z oliwek złożona z rafinowanej oliwy z oliwek i oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14,00 %
											≤ 1,0, jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14,00 %
6. Surowa oliwa z wytłoczn z oliwek	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ 0,60	≤ 1,4
7. Rafinowana oliwa z wytłoczn z oliwek	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,4
8. Oliwa z wytłoczn z oliwek	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,2

⁽¹⁾ Zawartość innych kwasów tłuszczowych (%): palmitynowy: 7,50–20,00; palmitolejowy: 0,30–3,50; heptadekanowy: ≤ 0,40; heptadekenowy ≤ 0,60; stearynowy: 0,50–5,00; olejowy: 55,00–83,00; linolowy: 2,50–21,00.

⁽²⁾ Suma izomerów, które mogłyby (lub nie mogłyby) być oddzielone kolumną kapilarną.

Kategoria	Skład steroli						Sterole ogółem (mg/kg)	Erytrodiol i uwaol (%) (**)	Woski (mg/kg) (**)
	Cholesterol (%)	Brassikasterol (%)	Kampesterol ⁽¹⁾ (%)	Stigmasterol (%)	App β-sitosterol ⁽²⁾ (%)	Delta-7-stigmastenol ⁽¹⁾ (%)			
1. Oliwa z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Oliwa lampante	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	-	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 300$ ⁽³⁾
4. Rafinowana oliwa z oliwek	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
5. Oliwa z oliwek złożona z rafinowanej oliwy z oliwek i oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Surowa oliwa z wyciżyn z oliwek	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	-	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ ⁽⁴⁾
7. Rafinowana oliwa z wyciżyn z oliwek	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Oliwa z wyciżyn z oliwek	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

⁽¹⁾ Zob. dodatek do niniejszego załącznika.

⁽²⁾ App β-sitosterol: delta-5,23-stigmastadienol+klerosterol+beta-sitosterol+sitostanol+delta-5-awenasterol+delta-5,24-stigmastadienol.

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

⁽⁴⁾ Oliwa z zawartością wosków wynoszącą 300–350 mg/kg uznawana jest za surową oliwę z wyciżyn z oliwek, jeżeli całkowita zawartość alkoholi alifatycznych jest większa niż 350 mg/kg oraz jeżeli zawartość erytrodiolu i uwaolu jest większa niż 3,5 %.

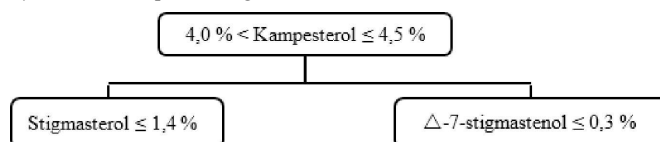
Uwagi:

- wyniki analiz muszą być wyrażone z dokładnością do tej samej liczby miejsc po przecinku, jaką zastosowano w odniesieniu do każdej właściwości. Ostatnia cyfra musi być powiększona o jeden, jeżeli następną cyfrą jest większa niż 4;
- jeżeli tylko jedna właściwość nie jest zgodna ze wskazanymi wartościami, kategoria oliwy może zostać zmieniona lub zgłoszona jako niezgodna do celów niniejszego rozporządzenia;
- w przypadku oliwy lampante obie cechy jakości oznaczone gwiazdką (*) mogą jednocześnie różnić się od wartości dopuszczalnych ustanowionych dla tej kategorii;
- jeżeli właściwość oznaczona jest dwiema gwiazdkami (**), oznacza to, że w przypadku surowej oliwy z wycłoczyn z oliwek obie odpowiednie wartości dopuszczalne mogą różnić się jednocześnie od podanych wartości. W przypadku oliwy z wycłoczyn z oliwek i rafinowanej oliwy z wycłoczyn z oliwek jedna z odpowiednich wartości dopuszczalnych może różnić się od podanych wartości.

Dodatek

Schemat podejmowania decyzji

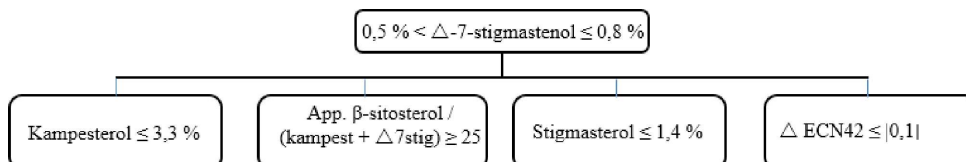
Schemat podejmowania decyzji dotyczących **kampesterolu** w przypadku oliwy z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia i oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia:



Pozostałe parametry są zgodne z wartościami dopuszczalnymi określonymi w niniejszym rozporządzeniu.

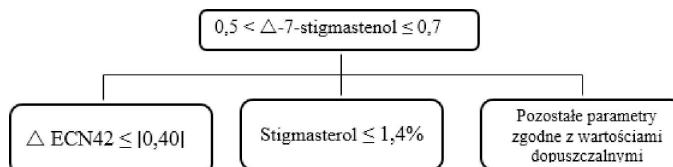
Schemat podejmowania decyzji dotyczących **delta-7-stigmasterolu** w przypadku:

— Oliwa z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia i oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia



Pozostałe parametry są zgodne z wartościami dopuszczalnymi określonymi w niniejszym rozporządzeniu.

— Oliwa z wycłoczyn z oliwek (surowa i rafinowana)



Pozostałe parametry są zgodne z wartościami dopuszczalnymi określonymi w niniejszym rozporządzeniu.”

ZAŁĄCZNIK III

„ZAŁĄCZNIK Ib

SCHEMAT WERYFIKACJI, CZY PRÓBKA OLIWY Z OLIVEK JEST ZGODNA ZE ZGŁOSZONĄ KATEGORIĄ

Tabela ogólna

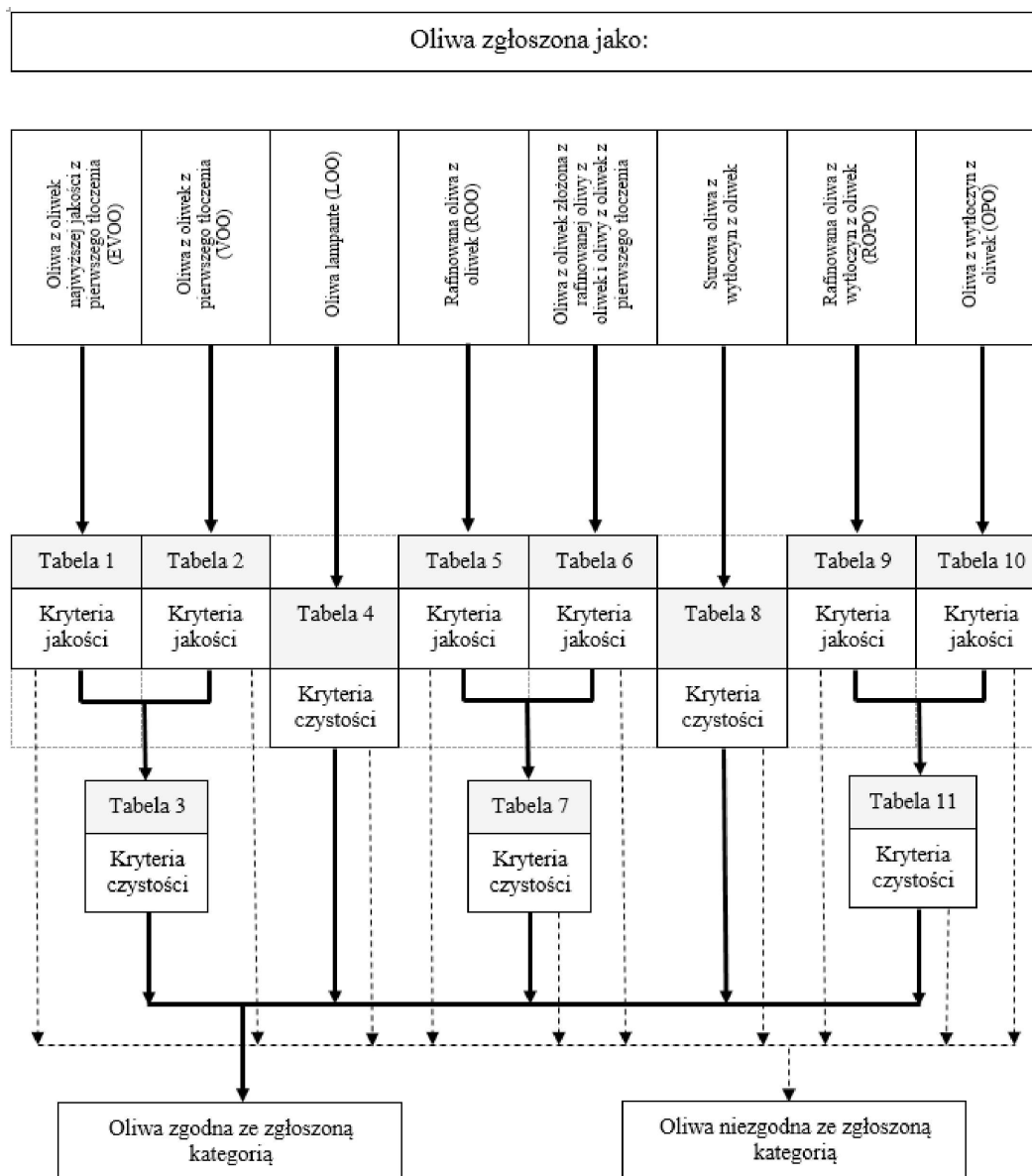


Tabela 1 – Oliwa z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia – Kryteria jakości

1	Kwasowość %	$\leq 0,80$	$> 0,80$	Oliwa niezgodna ze zgłoszoną kategorią	Zob. VOO (tabela 2)
2	Liczba nadtlenkowa (mEq O ₂ /kg)	$\leq 20,0$	$> 20,0$		Zob. LOO (tabela 4)
3	Badanie spektrofotometryczne w ultrafiolecie (K 270/268)	$\leq 0,22$	$> 0,22$		Zob. VOO (tabela 2)
4	Badanie spektrofotometryczne w ultrafiolecie (ΔK)	$\leq 0,01$	$> 0,01$		Zob. LOO (tabela 4)
5	Badanie spektrofotometryczne w ultrafiolecie (K 232)	$\leq 2,50$	$> 2,50$		Zob. VOO (tabela 2)
6	Ocena organoleptyczna	Mediana aromatu owoców $> 0,0$ oraz Mediana wad = $0,0$	Mediana aromatu owoców = $0,0$ Mediana aromatu owoców $> 0,0$ oraz Mediana wad $> 0,0$		Zob. LOO (tabela 4) Zob. VOO (tabela 2)
7	Estry etylowe kwasu tłuszczowego (mg/kg)	≤ 35	> 35		Zob. VOO (tabela 2)

Zgłoszony rodzaj oliwy w odniesieniu do kryteriów jakości.
Zob. tabela 3 w odniesieniu do kryteriów czystości

Tabela 2 – Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia – Kryteria jakości

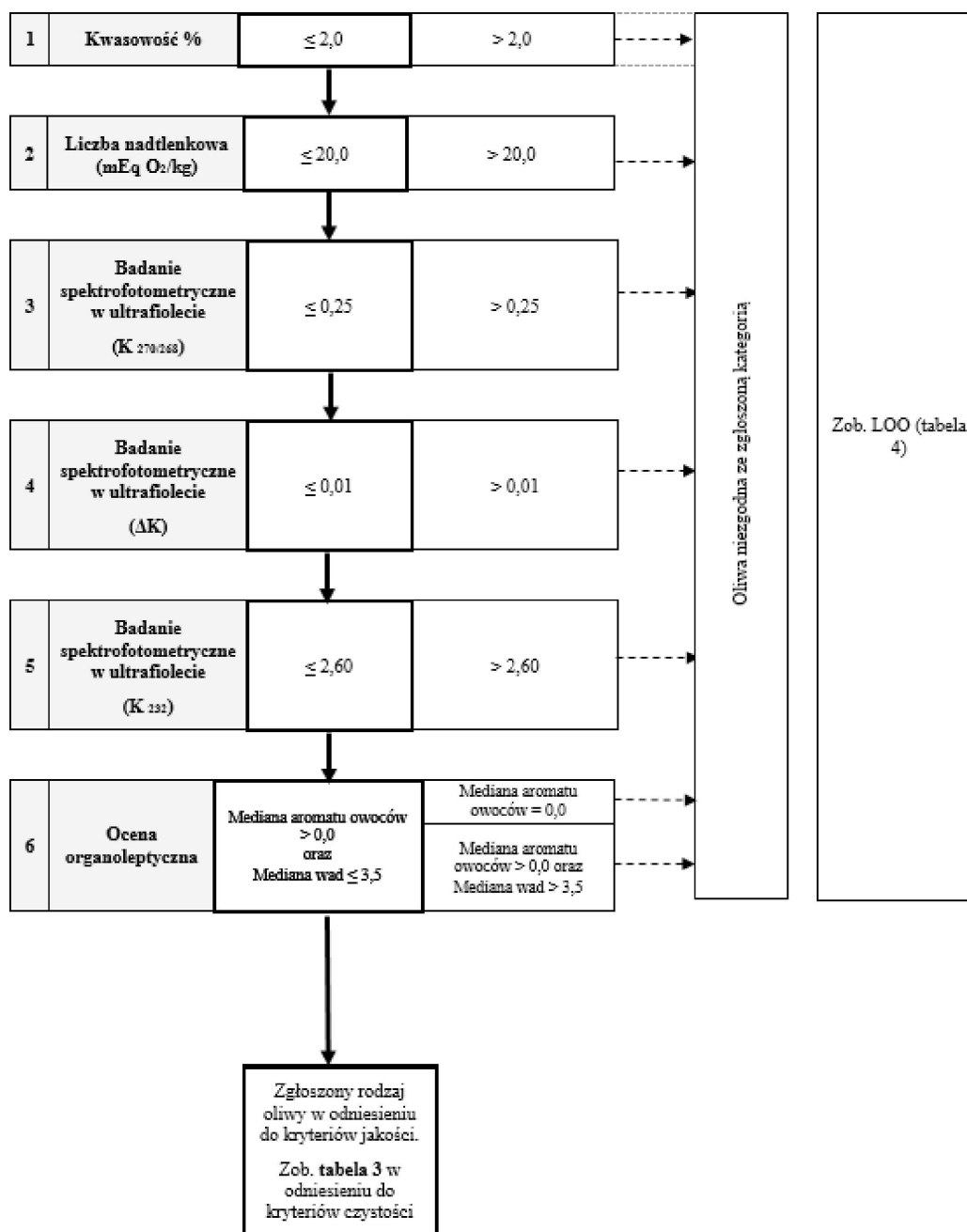


Tabela 3 – Oliwa z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia i oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia – Kryteria czystości

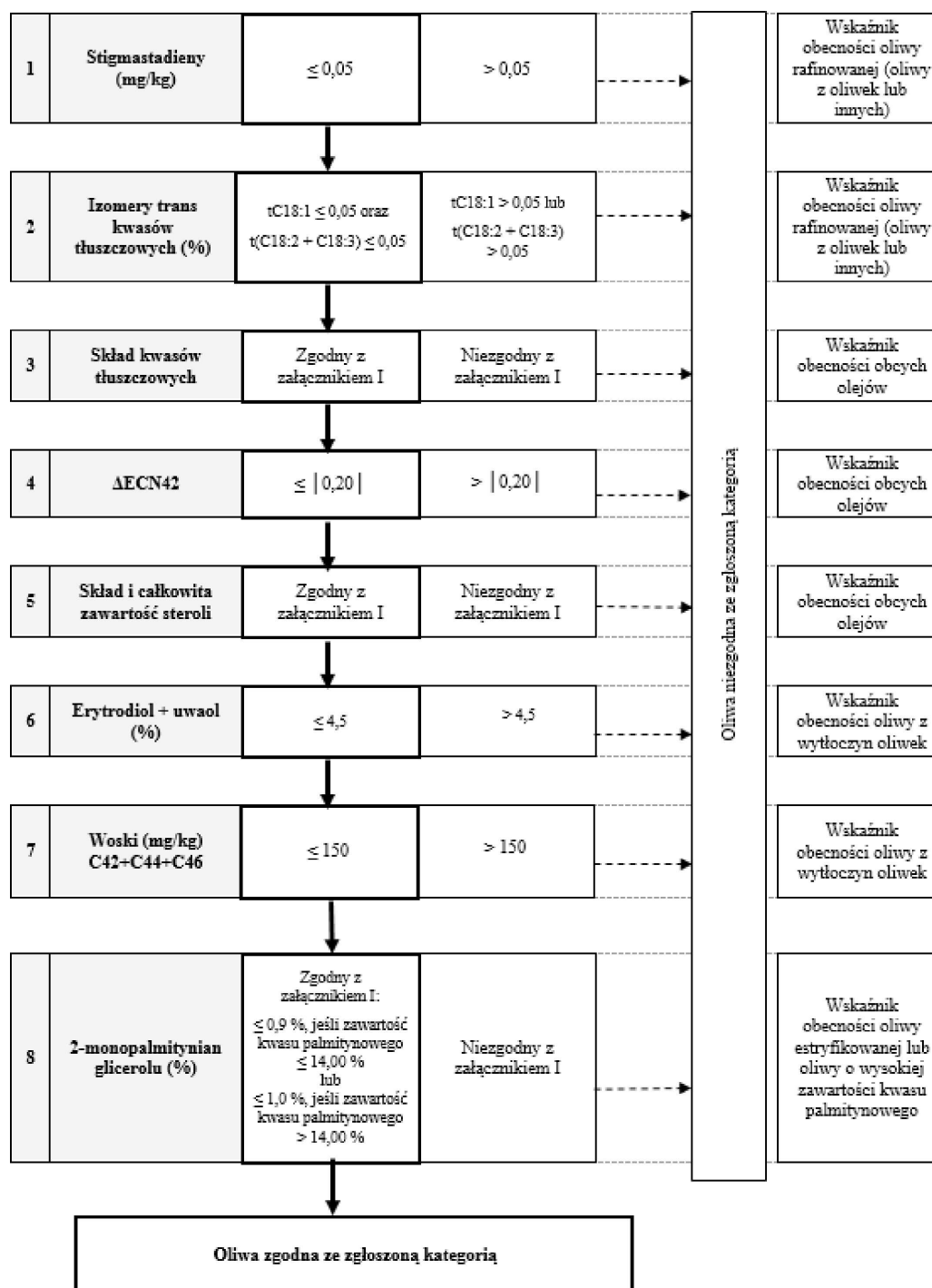


Tabela 4 – Oliwa lampante – Kryteria czystości

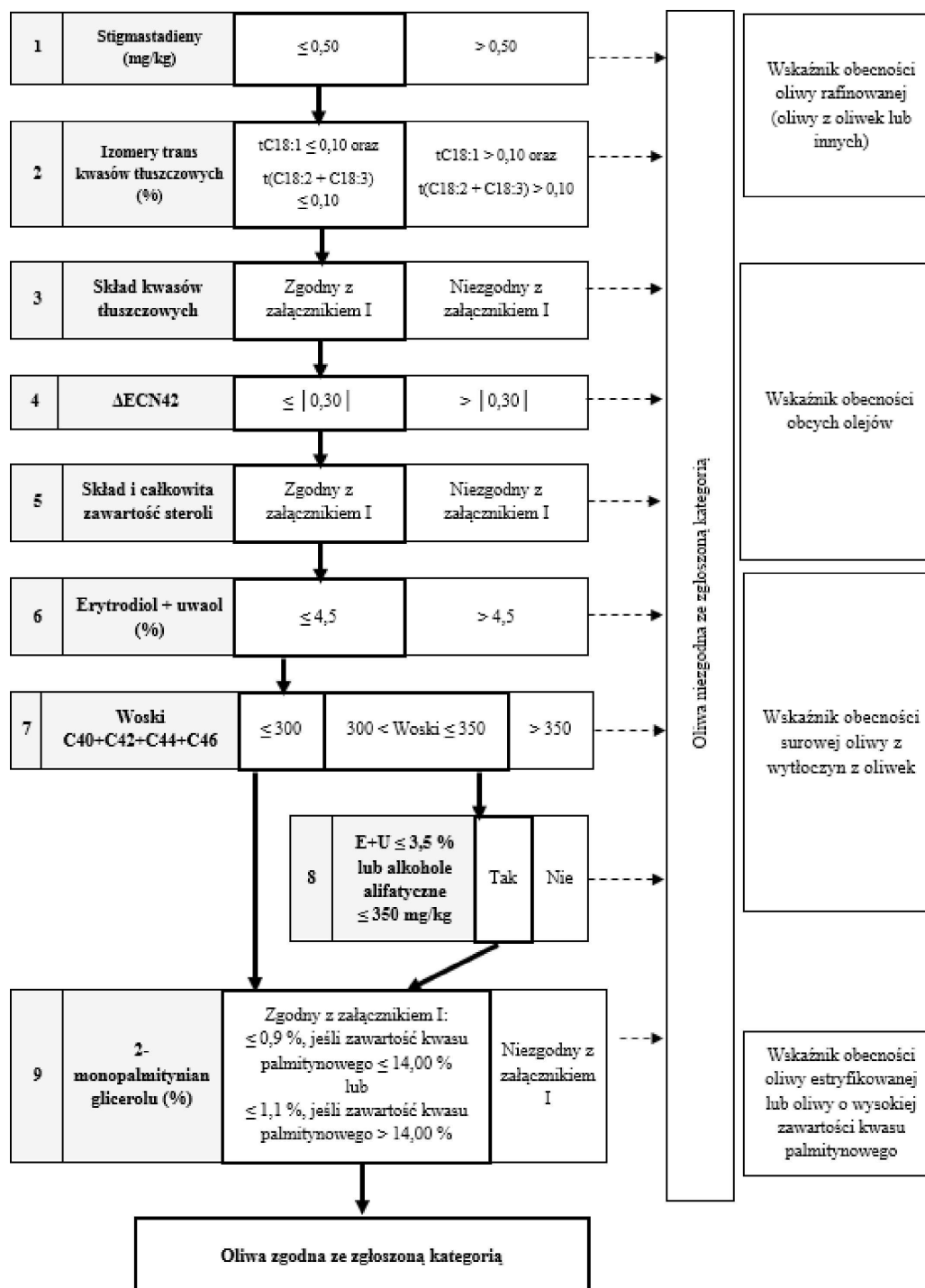


Tabela 5 – Rafinowana oliwa z oliwek – Kryteria jakości

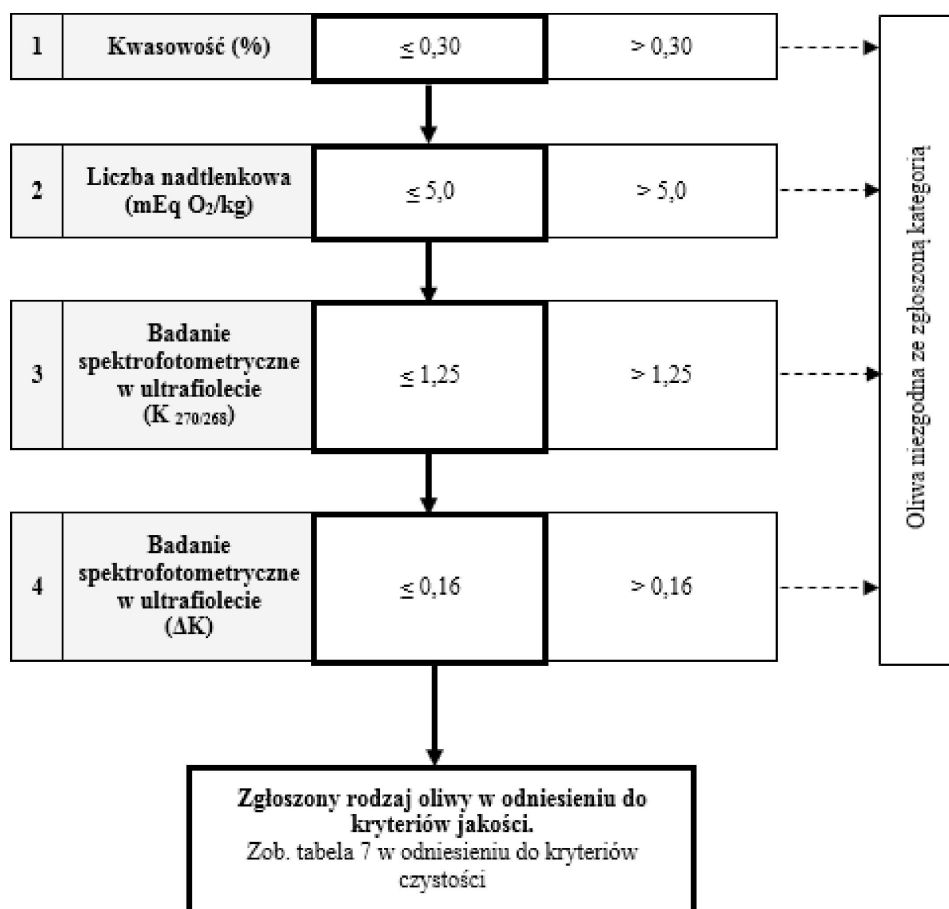


Tabela 6 – Oliwa z oliwek (złożona z rafinowanej oliwy z oliwek i oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia) – Kryteria jakości

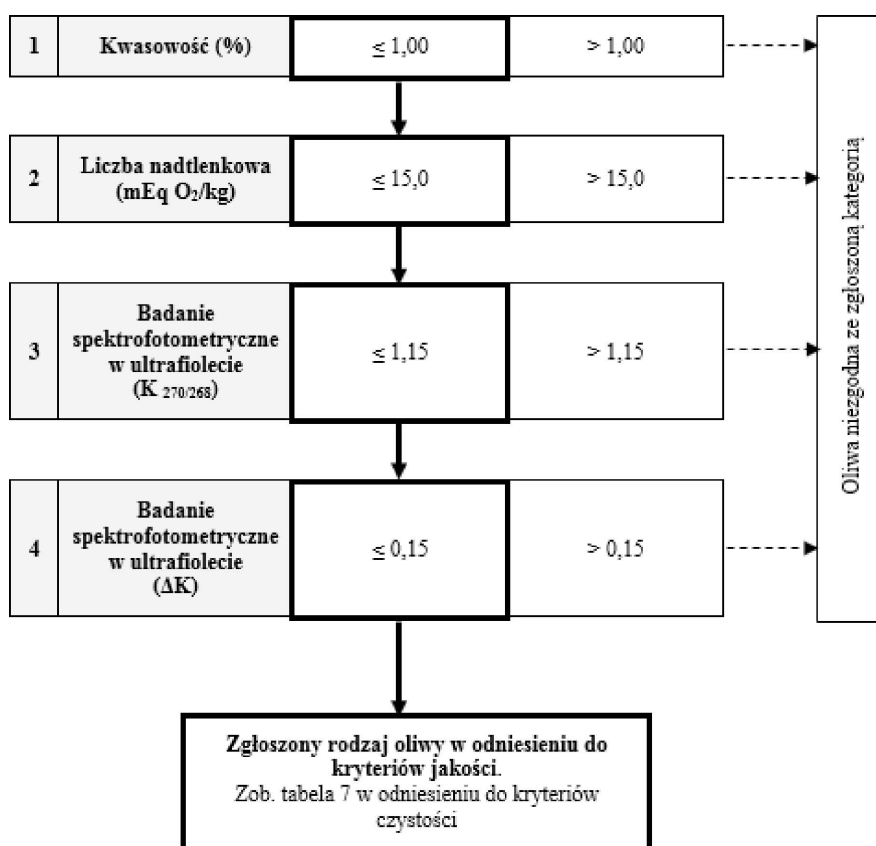


Tabela 7 – Rafinowana oliwa z oliwek oraz oliwa z oliwek złożona z rafinowanej oliwy z oliwek i oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia – Kryteria czystości

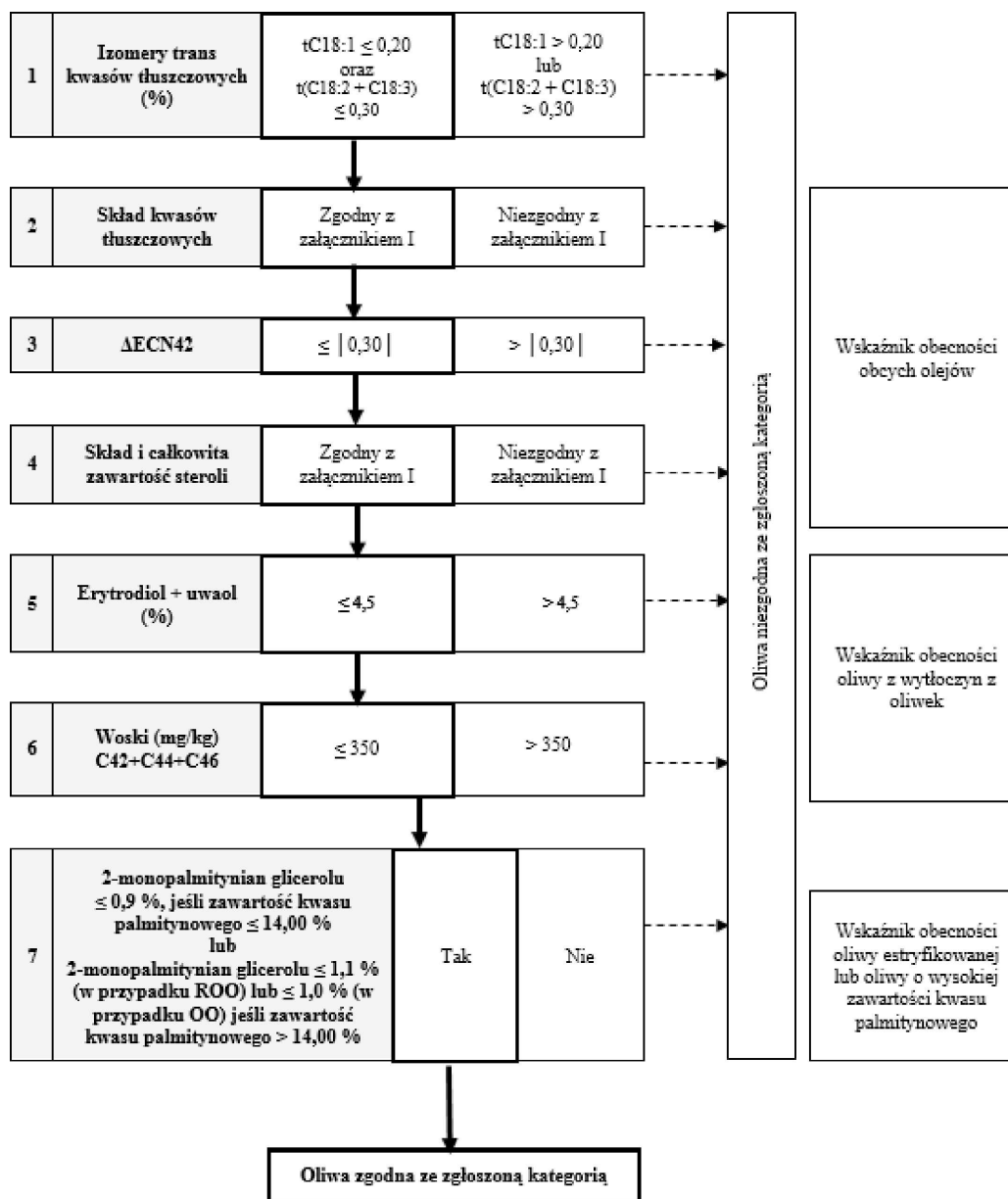


Tabela 8 – Surowa oliwa z wyłoczyn z oliwek – Kryteria czystości

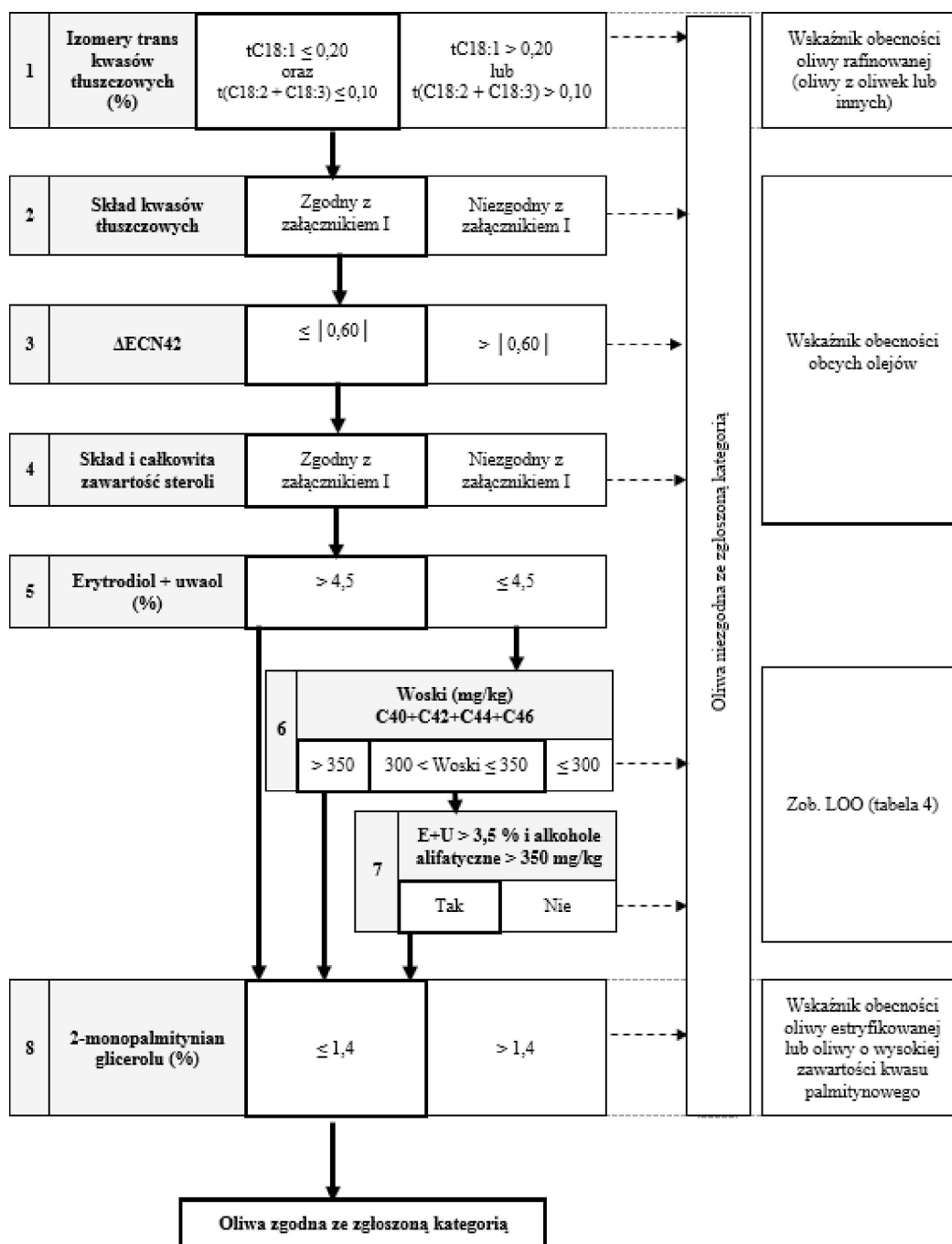


Tabela 9 – Rafinowana oliwa z wycłoczyn z oliwek – Kryteria jakości

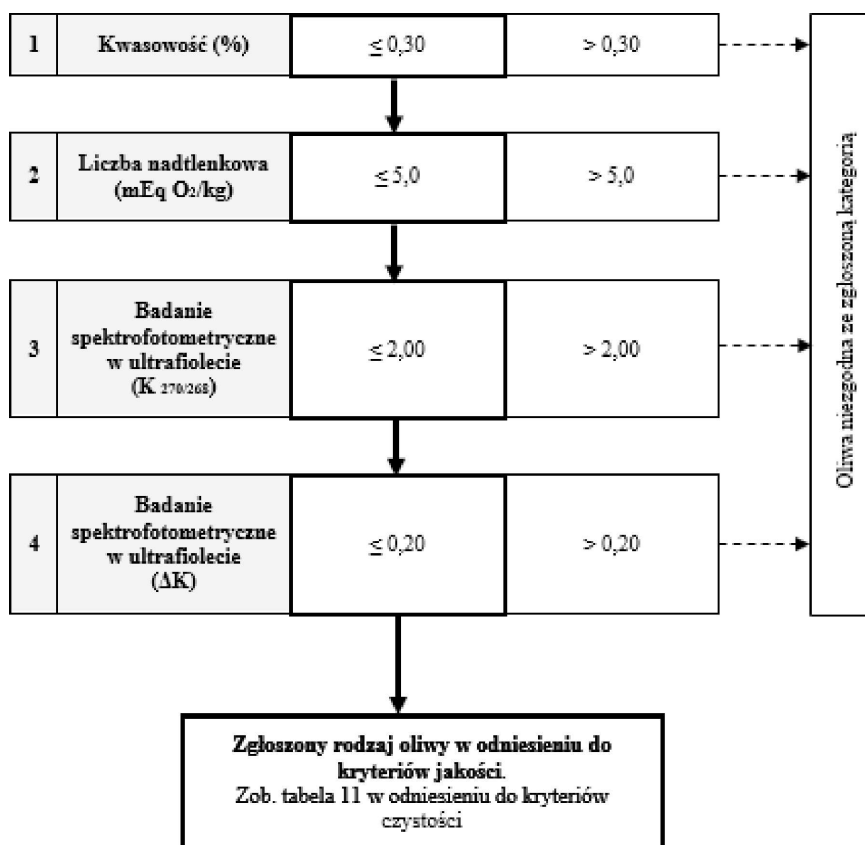


Tabela 10 – Oliwa z wycłoczyn z oliwek – Kryteria jakości

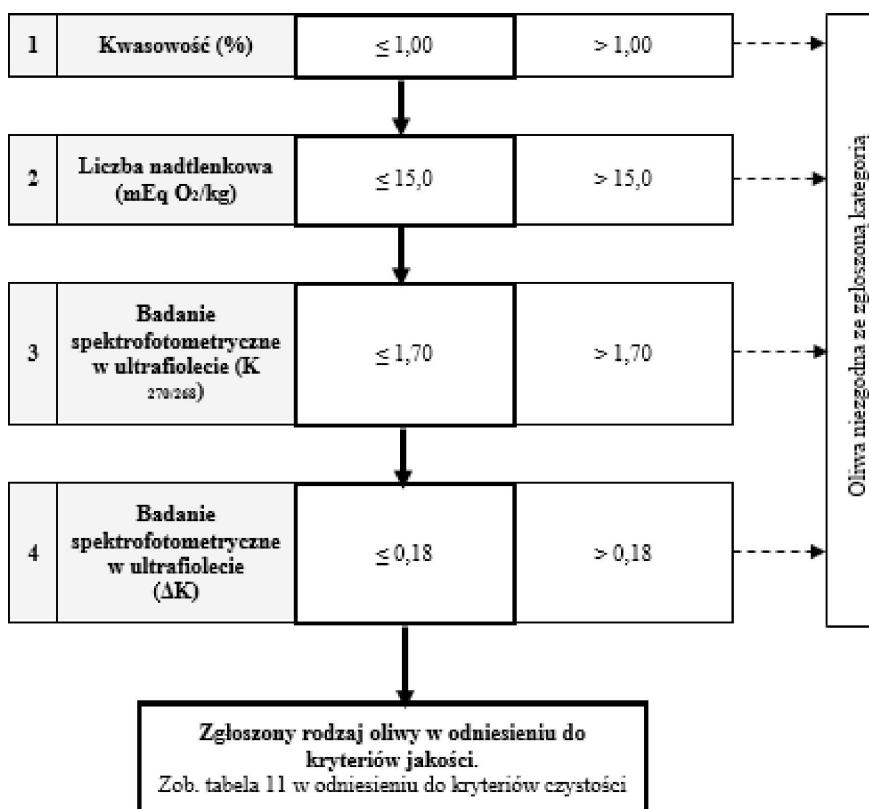
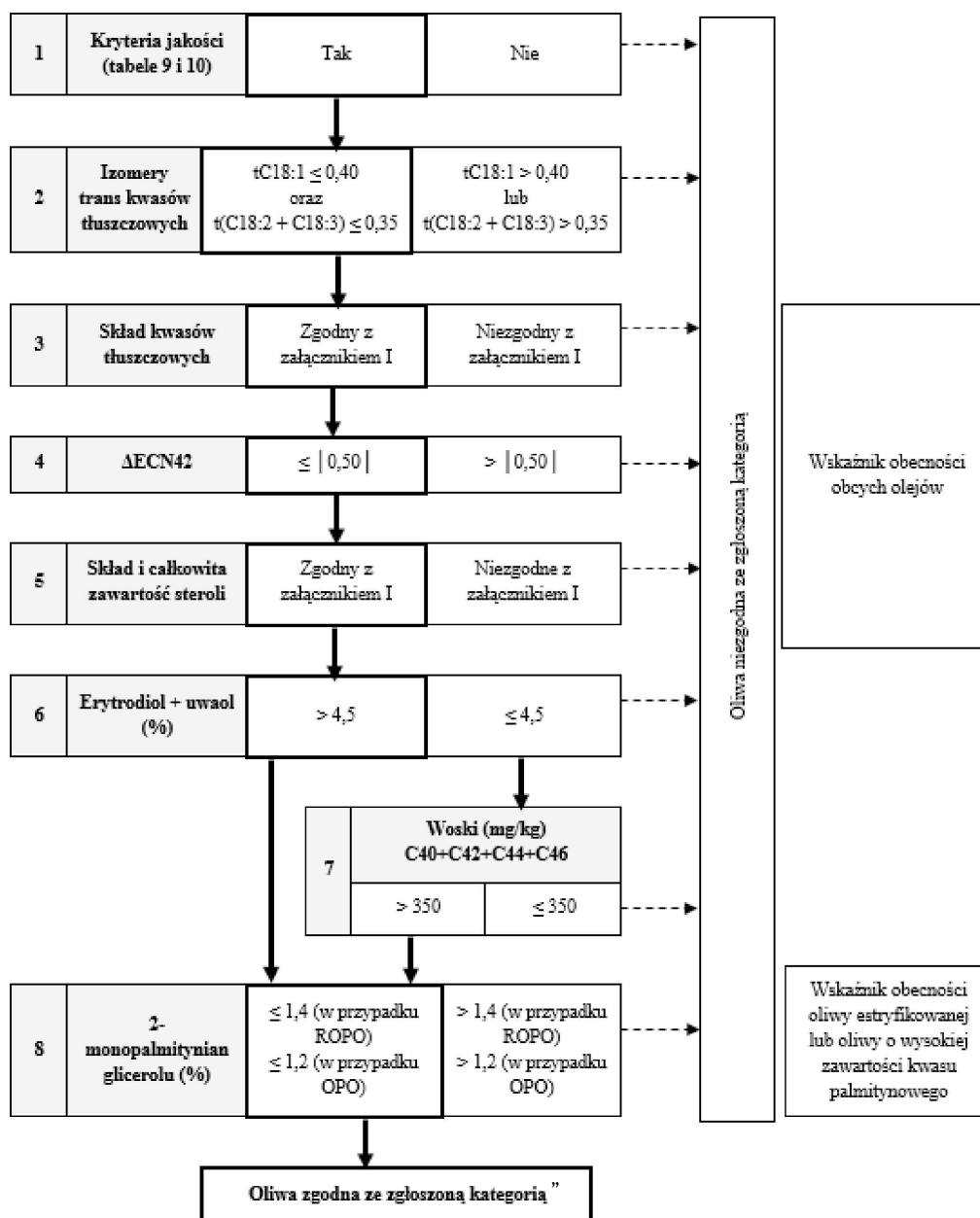


Tabela 11 – Rafinowana oliwa z wyłoczyn z oliwek i oliwa z wyłoczyn z oliwek – Kryteria czystości



ZAŁĄCZNIK IV

W załączniku XII wprowadza się następujące zmiany:

1) pkt 3.3 otrzymuje brzmienie:

„3.3. Nieobowiązkowa terminologia stosowana do celów etykietowania

Na żądanie kierownik zespołu degustatorów może potwierdzić, że oceniane oliwy są zgodne z definicjami i przedziałami odpowiadającymi wyłącznie następującym określeniom, w zależności od stopnia intensywności i percepcji cech oliwy.

Cechy pozytywne (owocowy, gorzki i ostry): w odniesieniu do intensywności percepcji:

- określenie *mocny* stosuje się, jeżeli mediana danej cechy jest wyższa niż 6,0;
- określenie *średni* stosuje się, jeżeli mediana danej cechy jest wyższa niż 3,0 oraz nie wyższa niż 6,0;
- określenie *lekki* stosuje się, jeżeli mediana danej cechy jest nie wyższa niż 3,0.

Owocowy	charakterystyczny dla oliwy ogół doznań węchowych, zależnych od odmiany oliwek, właściwych dla oliwy z oliwek uzyskanej ze zdrowych i świeżych oliwek, niezdominowanej zapachem ani zielonych, ani dojrzałych oliwek. Doznania te odbierane są bezpośrednio lub poprzez jamę nosowo-gardłową.
Owocowy niedojrzały	charakterystyczny dla oliwy ogół doznań węchowych przypominających zapach niedojrzałych owoców, zależnych od odmiany oliwek i właściwych dla oliwy z oliwek uzyskanej z zielonych, zdrowych i świeżych oliwek. Doznania te odbierane są bezpośrednio lub poprzez jamę nosowo-gardłową.
Owocowy dojrzały	charakterystyczny dla oliwy ogół doznań węchowych przypominających zapach dojrzałych owoców, zależnych od odmiany oliwek, właściwych dla oliwy z oliwek uzyskanej ze zdrowych i świeżych oliwek. Doznania te odbierane są bezpośrednio lub poprzez jamę nosowo-gardłową.
Oliwa zrównoważona	oliwa, która nie wykazuje braku równowagi, co oznacza wrażenie węchowo-smakowe i dotykowe, w którym mediana goryczy i mediana ostrego smaku są co najwyżej o dwa punkty wyższe od mediany owocowego smaku/zapachu.
Oliwa łagodna	oliwa, w odniesieniu do której mediana goryczy i ostrego smaku jest niższa lub równa 2,0.

Wykaz określeń w odniesieniu do intensywności percepcji:

Określenia pod warunkiem przedstawienia świadectwa badania organoleptycznego	Mediana danej cechy
Owocowy	—
Owocowy dojrzały	—
Owocowy niedojrzały	—
Lekko owocowy	$\leq 3,0$
Średnio owocowy	$3,0 < Me \leq 6,0$
Mocno owocowy	$> 6,0$
Owocowy lekko dojrzały	$\leq 3,0$
Owocowy średnio dojrzały	$3,0 < Me \leq 6,0$
Owocowy mocno dojrzały	$> 6,0$
Owocowy lekko niedojrzały	$\leq 3,0$
Owocowy średnio niedojrzały	$3,0 < Me \leq 6,0$
Owocowy mocno niedojrzały	$> 6,0$

Określenia pod warunkiem przedstawienia świadectwa badania organoleptycznego	Mediana danej cechy
Lekko gorzki	$\leq 3,0$
Średnio gorzki	$3,0 < Me \leq 6,0$
Mocno gorzki	$> 6,0$
Lekko ostry	$\leq 3,0$
Średnio ostry	$3,0 < Me \leq 6,0$
Mocno ostry	$> 6,0$
Oliwa zrównoważona	Mediana goryczy i mediana ostrego smaku są co najwyżej o dwa punkty wyższe od mediany owocowego smaku/zapachu.
Oliwa łagodna	Mediana goryczy i mediana ostrego smaku nie przekraczają 2,0.”

2) pkt 9.4 otrzymuje brzmienie:

„9.4. Klasyfikacja oliwy

Oliwa klasyfikowana jest zgodnie z wymienionymi poniżej kategoriami, w zależności od mediany wad i mediany aromatu owoców. Medianę wad określa się jako medianę wady odebranej z największą intensywnością. Mediana wad i mediana aromatu owoców przedstawiane są z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

Klasyfikacji oliwy dokonuje się poprzez porównanie wartości mediany wad i mediany aromatu owoców z przedstawionymi poniżej przedziałami odniesienia. Ponieważ przy ustalaniu poziomów przedziałów uwzględniono błąd metody, uznaje się, iż poziomy te są ostateczne. Pakiety oprogramowania umożliwiają przedstawienie klasyfikacji w formie tabeli danych statystycznych lub w formie wykresu.

- Oliwa z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia: mediana wad jest równa 0,0, a mediana aromatu owoców jest wyższa niż 0,0.
- Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia: mediana wad jest wyższa niż 0,0 ale nie przekracza 3,5, a mediana aromatu owoców jest wyższa niż 0,0.
- Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia typu lamparte: mediana wad jest wyższa niż 3,5 lub mediana wad jest niższa lub równa 3,5, a mediana aromatu owoców jest równa 0,0.

Uwaga 1: Jeżeli mediana cech dotyczących goryczy lub ostrego smaku jest wyższa niż 5,0, kierownik zespołu zaznacza to na świadectwie badania oliwy z oliwek.

W przypadku analiz przeprowadzonych w ramach kontroli zgodności przeprowadza się jeden test. W przypadku sprzeczności ocen należy zorganizować przeprowadzenie dwóch ocen w różnych sesjach. Wyniki ocen z obu sesji muszą być statystycznie jednorodne (zob. pkt 9.5). Jeśli tak nie jest, próbkę należy zbadać ponownie na dwóch sesjach. Ostateczną wartość mediany cech decydujących o zaklasyfikowaniu oblicza się, stosując średnią obu median.”.

ZAŁĄCZNIK V

W załączniku XVII wprowadza się następujące zmiany:

1) pkt 5.1 otrzymuje brzmienie:

„5.1. Heksan lub mieszanina alkanów o przedziale temperatury wrzenia 65 do 70 °C, destylowana w kolumnie rektyfikacyjnej. Heksan można zastąpić izooktanem (2,2,4-trimetylopentanem o klasie czystości do chromatografii), o ile osiągnięto porównywalne wartości precyzji, a pozostałości po odparowaniu 100 ml rozpuszczalnika można kontrolować. Rozpuszczalniki o temperaturze wrzenia wyższej niż n-heksan odparowują dłużej. Są jednak preferowane ze względu na toksyczność heksanu.”;

2) w pkt 6.3.3 dodaje się tekst w brzmieniu:

„Uwaga 10: W przypadku gdy stigmastadieny występują w stężeniach wyższych niż 4 mg/kg, jeżeli wymagane jest oznaczenie ilościowe, należy zastosować metodę międzynarodowej rady ds. oliwy dotyczącą oznaczania styrenów w oliwie rafinowanej.”.

—

ZAŁĄCZNIK VI

W załączniku XVIII wprowadza się następujące zmiany:

1) pkt 4.2.1 otrzymuje brzmienie:

„4.2.1. Eter naftowy 40–60 °C o klasie czystości do chromatografii lub heksan. Heksan można zastąpić izooktanem (2,2,4-trimetylopentanem o klasie czystości do chromatografii), o ile osiągnięto porównywalne wartości precyzji. Rozpuszczalniki o temperaturze wrzenia wyższej niż n-heksan odparowują dłużej. Są jednak preferowane ze względu na toksyczność heksanu.”;

2) dodaje się pkt 4.2.12 w brzmieniu:

„4.2.12. Heptan, jakość chromatograficzna. Heptan można zastąpić izooktanem (2,2,4-trimetylopentanem o klasie czystości do chromatografii).”.

—

ZAŁĄCZNIK VII

„ZAŁĄCZNIK XIX

OZNACZANIE SKŁADU I ZAWARTOŚCI STEROLI ORAZ ZWIĄZKÓW ALKOHOLOWYCH METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ NA KOLUMNACH KAPILARNYCH

1. ZAKRES

W ramach metody opisuje się sposoby oznaczania zawartości prostych i łącznych związków alkoholowych w oliwie z oliwek i oliwie z wycłoczyn z oliwek, jak również w mieszankach tych dwóch rodzajów oliwy.

Związki alkoholowe w oliwie i oliwie z wycłoczyn z oliwek obejmują alkohole alifatyczne, sterole i dialkohole triterpenowe.

2. ZASADA

Oliwa, do której dodano α -cholestanol i 1-eikozanol, pełniąc rolę wewnętrznego wzorca, jest zmydlana roztworem wodorotlenku potasu w etanolu, a następnie substancja niezmydlająca się jest ekstrahowana eterem dietylowym.

Poszczególne frakcje związków alkoholowych są oddzielane od substancji niezmydlającej się albo metodą chromatografii cienkowarstwowej na podstawowej płytce z żelu krzemionkowego (metoda referencyjna), albo metodą HPLC z wykorzystaniem kolumny z żelem krzemionkowym. Frakcja uzyskana w wyniku oddzielenia żelu krzemionkowego przekształcana jest w trimetylsilyletery i następnie poddawana analizie metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych.

CZĘŚĆ 1**PRZYGOTOWANIE SUBSTANCJI NIEZMYDLAJĄCEJ SIĘ**

1. ZAKRES

W niniejszej części opisano proces przygotowania i ekstrakcji substancji niezmydlającej się. Część ta obejmuje proces przygotowania i ekstrakcji substancji niezmydlającej się z oliwy z oliwek i oliwy z wycłoczyn z oliwek.

2. ZASADA

Porcja badana jest zmydlana poprzez gotowanie pod chłodnicą zwrotną wraz z roztworem wodorotlenku potasu w etanolu. Substancja niezmydlająca się jest ekstrahowana eterem dietylowym.

3. APARATURA

Typowe wyposażenie laboratoryjne, a w szczególności następujące urządzenia:

- 3.1. Kolba okrągłodenna o pojemności 250 ml wyposażona w chłodnicę zwrotną ze szlifem szklanym.
- 3.2. Rozdzielacz o pojemności 500 ml.
- 3.3. Kolby o pojemności 250 ml.
- 3.4. Mikrostrzykawkę o pojemności 100 i 500 μ l.
- 3.5. Cylindryczny lejek do sączenia z porowatą przegrodą G3 (porowatość 15–40 μ m) o średnicy około 2 cm i głębokości 5 cm, przystosowany do filtracji w próżni i ze szlifem szklanym zewnętrznym.
- 3.6. Kolba stożkowa o pojemności 50 ml ze szlifem szklanym wewnętrznym, którą można połączyć z lejkiem do sączenia (3.5).
- 3.7. Probówka o pojemności 10 ml z lejkowatym dnem i szczelnym korkiem szklanym.
- 3.8. Eksykator z chlorkiem wapnia.

4. ODCZYNNIKI

- 4.1. Minimalne miano roztworu wodorotlenku potasu 85 %.

- 4.2. Roztwór wodorotlenku potasu w etanolu, w przybliżeniu roztwór 2 M.
Rozpuścić 130 g wodorotlenku potasu (4.1), jednocześnie schładzając, w 200 ml wody destylowanej, następnie uzupełnić etanolem do objętości jednego litra (4.7). Roztwór przechowywać w dobrze zakorkowanej butelce z ciemnego szkła przez maksymalnie 2 dni.
- 4.3. Eter dietylowy do analiz.
- 4.4. Bezwodny siarczan sodu do analiz.
- 4.5. Aceton do chromatografii.
- 4.6. Eter dietylowy do chromatografii.
- 4.7. Etanol do analiz.
- 4.8. Octan etylu do analiz.
- 4.9. Wzorzec wewnętrzny, α -cholestanol o czystości większej niż 99 % (czystość należy sprawdzać metodą analizy GC).
- 4.10. 0,2 % wewnętrzny roztwór wzorcowy (m/V) α -cholestanolu w octanie etylu (4.8).
- 4.11. Roztwór fenolofaleiny, 10 g/l w etanolu (4.7).
- 4.12. 0,1 % (m/V) roztwór 1-eikozanolu w octanie etylu (wzorzec wewnętrzny).

5. PROCEDURA

Do kolby o pojemności 250 ml (pkt 3.1) wprowadzić przy użyciu mikrostrzykawki o pojemności 500 μ l (pkt 3.4) pewną ilość wewnętrznego roztworu wzorcowego α -cholestanolu (pkt 4.10) i 1-eikozanolu (4.12) zawierającą ilość cholestanolu i eikozanolu odpowiadającą w przybliżeniu 10 % zawartości steroli i alkoholi w próbce. Na przykład w przypadku próbki zawierającej 5 g oliwy z oliwek dodać 500 μ l roztworu α -cholestanolu (4.10) i 250 μ l roztworu 1-eikozanolu (4.12). W przypadku oliwy z wyłoczyn oliwek dodać 1 500 μ l zarówno roztworu α -cholestanolu (4.10), jak i 1-eikozanolu (4.12). Odparować do wysuszenia pod słabym strumieniem azotu w łaźni wypełnionej ciepłą wodą. Następnie po schłodzeniu kolby odważyć $5,00 \pm 0,01$ g suchej przefiltrowanej próbki w tej samej kolbie.

Uwaga 1: w przypadku zwierzęcych lub roślinnych olejów i tłuszczów zawierających znaczne ilości cholesterolu może wystąpić pik o czasie retencji identycznym z czasem retencji cholestanolu. W takich sytuacjach należy dokonać analizy frakcji steroli z dodaniem wewnętrznego wzorca i bez dodawania go.

Dodać 50 ml roztworu 2 M wodorotlenku potasu w etanolu (4.2) i niewielką ilość kamienia pumekowego, uruchomić chłodnicę zwrotną i podgrzać do momentu lekkiego wrzenia, aż nastąpi zmydlenie (roztwór stanie się przejrzysty). Kontynuować podgrzewanie przez dalsze 20 minut, następnie wprowadzić 50 ml wody destylowanej od strony wylotu chłodnicy, odłączyć chłodnicę i schłodzić kolbę do temperatury około 30 °C.

Przenieść zawartość kolby ilościowo do rozdzielacza o pojemności 500 ml (3.2), używając kilku porcji wody destylowanej (50 ml). Dodać około 80 ml eteru dietylowego (4.6), mieszać energicznie przez około 60 sekund, obniżając okresowo ciśnienie przez przełączenie rozdzielacza i otwarcie zaworu odcinającego. Odstawić do całkowitego rozdzielenia się dwóch faz (uwaga 2). Następnie do drugiego rozdzielacza zebrać jak najdokładniej roztwór mydła. Przeprowadzić jeszcze dwie ekstrakcje na fazie wodno-alkoholowej w ten sam sposób przy użyciu 60–70 ml eteru dietylowego (4.6).

Uwaga 2: emulsję można wyeliminować, dodając niewielkie ilości etanolu (4.7).

Połączyć wszystkie trzy eterowe ekstrakty w jednym rozdzielaczu zawierającym 50 ml wody. Przemycać nadal wodą (50 ml), aż woda przestanie barwić się na różowy kolor po dodaniu kropli roztworu fenolofaleiny (4.11). Po usunięciu wody popłucznej przefiltrować przez bezwodny siarczan sodu (4.4) do wcześniej zważonej kolby o pojemności 250 ml, płuczac rozdzielacz i filtr niewielkimi ilościami eteru dietylowego (4.6).

Odparować rozpuszczalnik przez destylację w wyparce obrotowej w temperaturze 30 °C w próżni. Dodać 5 ml acetonu (4.5) i usunąć całkowicie lotny rozpuszczalnik pod delikatnym strumieniem azotu. Suszyć pozostałość w piecu w temperaturze 103 ± 2 °C przez 15 minut. Schłodzić w eksykatorze i zważyć z dokładnością do 0,1 mg.

CZĘŚĆ 2**ODDZIELENIE FRAKCJI ZWIĄZKÓW ALKOHOLOWYCH**

1. ZAKRES

Frakcje substancji niezmydlającej się przygotowanej w części 1 są oddzielane w poszczególnych związkach alkoholowych, alkoholach alifatycznych, sterolach i dialkoholach triterpenowych (erytrodiolu i uwaolu).

2. ZASADA

Substancja niezmydlająca się może zostać poddana frakcjonowaniu z wykorzystaniem podstawowej chromatografii cienkowarstwowej (metoda referencyjna) oraz ujawniona, zaś odpowiadające pasma mogą zostać zarysowane i wyekstrahowane. Alternatywną metodą oddzielenia jest metoda HPLC z wykorzystaniem kolumny z żelem krzemionkowym i detektora UV oraz poszczególnych zebranych frakcji. Alkohole alifatyczne i triterpenowe, a także sterole i dialkohole triterpenowe są wyodrębniane wspólnie.

3. APARATURA

Typowe wyposażenie laboratoryjne, a w szczególności następujące urządzenia:

- 3.1. Kompletny zestaw aparatury do analizy metodą chromatografii cienkowarstwowej łącznie z płytkami szklanymi 20 × 20.
- 3.2. Źródło światła ultrafioletowego o długości fal 366 lub 254 nm.
- 3.3. Mikrostrzykawkki o pojemności 100 i 500 µl.
- 3.4. Cylindryczny lejek do sączenia z porowatą przegrodą G3 (porowatość 15–40 µm) o średnicy około 2 cm i głębokości 5 cm, przystosowany do filtracji w próżni i ze szlifem szklanym zewnętrznym.
- 3.5. Kolba stożkowa o pojemności 50 ml ze szlifem szklanym wewnętrznym, którą można połączyć z lejkiem do sączenia (3.4).
- 3.6. Probówka o pojemności 10 ml z lejkowatym dnem i szczelnym korkiem szklanym.
- 3.7. Eksykator z chlorkiem wapnia.
- 3.8. System HPLC składający się z:
 - 3.8.1. podwójnej pompy;
 - 3.8.2. ręcznego lub automatycznego dozownika wyposażonego w pętlę dozującą o pojemności 200 µL;
 - 3.8.3. wbudowanego degazera;
 - 3.8.4. detektora UV–VIS lub podczerwieni.
- 3.9. Kolumna HPLC (25 cm x 4 mm średnicy wewnętrznej) wypełniona żelem krzemionkowym 60 (o uziarnieniu 5 µm).
- 3.10. Filtr strzykawkowy o rozmiarze 0,45 µm.
- 3.11. Kolba stożkowa o pojemności 25 ml.

4. ODCZYNNIKI

- 4.1. Minimalne miano roztworu wodorotlenku potasu 85 %.
- 4.2. Roztwór wodorotlenku potasu w etanolu, w przybliżeniu roztwór 2 M.

Rozpuścić 130 g wodorotlenku potasu (4.1), jednocześnie schładzając, w 200 ml wody destylowanej, następnie uzupełnić etanolem do objętości jednego litra (4.9). Roztwór przechowywać w dobrze zakorkowanej butelce z ciemnego szkła przez maksymalnie 2 dni.

- 4.3. Eter dietylowy do analiz.
- 4.4. Roztwór wodorotlenku potasu w etanolu, w przybliżeniu roztwór 0,2 M.

Rozpuścić 13 g wodorotlenku potasu (4.1) w 20 ml wody destylowanej, następnie uzupełnić etanolem do objętości jednego litra (4.9).

- 4.5. Płytki szklane o wymiarach 20x20 pokryte żelem krzemionkowym, niezawierającym wskaźnika fluorescencyjnego, o grubości 0,25 mm (dostępne w handlu w postaci gotowej do użytku).
- 4.6. Aceton do chromatografii.

- 4.7. n-heksan do chromatografii.
 - 4.8. Eter dietylowy do chromatografii.
 - 4.9. Etanol do analiz.
 - 4.10. Octan etylu do analiz.
 - 4.11. Roztwór porównawczy stosowany w chromatografii cienkowarstwowej: roztwór cholesterolu, fitosterolu, alkoholi i erytrodiolu w octanie etylu o stężeniu 5 % (4.10).
 - 4.12. 0,2 % roztwór 2,7-dichlorofluorosceiny w etanolu. Roztwór ten uzyskuje nieco zasadowy charakter w wyniku dodania kilku kropli 2 M roztworu wodorotlenku potasu w alkoholu (4.2).
 - 4.13. Mieszanina n-heksanu (4.7)/eteru dietylowego (4.8) w proporcji 65:35 (V/V).
 - 4.14. n-heksan (4.7)/eter dietylowy (4.8) w fazie ruchomej HPLC (1:1) (V/V).
5. METODA REFERENCYJNA: ODDZIELENIE ZWIĄZKÓW ALKOHOLOWYCH ZA POMOCĄ PODSTAWOWEJ PŁYTKI DO CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ (TLC)

Przygotowanie podstawowych płytek do chromatografii cienkowarstwowej. Zanurzyć lub zamoczyć płytki z żelu krzemionkowego (4.5) na głębokość około 4 cm w 0,2 M roztworze wodorotlenku potasu w etanolu (4.4) na 10 sekund, następnie suszyć je w dygestorium przez dwie godziny i na koniec umieścić w piecu nagrzanym do temperatury 100 °C na godzinę.

Wyjąć z pieca i umieścić w eksykatorze z chlorkiem wapnia (3.7) aż do czasu ich użycia (płytki poddane takiej obróbce powinny być wykorzystane w ciągu 15 dni).

Napełnić komorę chromatograficzną mieszaniną heksanu i eteru dietylowego (4.13) (uwaga 3) do poziomu około 1 cm. Zamknąć komorę odpowiednią pokrywą i pozostawić na co najmniej godzinę w chłodnym miejscu w celu uzyskania równowagi układu ciecz-para. Na wewnętrznych powierzchniach komory można umieścić paski bibuły filtracyjnej zanurzone w eluencie. Pozwala to skrócić o około jedną trzecią czas przemieszczenia linii cieczy i uzyskać bardziej jednorodną i regularną elucję składników.

Uwaga 3: przy każdej analizie należy wymienić mieszaninę rozwijającą w celu uzyskania idealnie odtwarzalnych warunków elucji. Zamiennie można stosować rozpuszczalnik w postaci mieszaniny n-heksanu i eteru dietylowego w proporcji 50:50 (V/V).

Przygotować roztwór substancji niezmydlającej się w octanie etylu (4.10) o stężeniu około 5 % przygotowanej w części 1 i za pomocą mikrostrzykawki o pojemności 100 µl (3.3) nanieść 0,3 ml roztworu w postaci wąskiego i jednolitego pasma na dolnej części płytki chromatograficznej (4.5) w odległości 2 cm od dolnej krawędzi. Na linii pasma nanieść 2–3 µl roztworu porównawczego (4.11) w celu identyfikacji pasm steroli, dialkoholi triterpenowych i alkoholi po rozwinięciu.

Umieścić płytkę w komorze chromatograficznej (3.1). Temperaturę otoczenia należy utrzymywać w granicach 15–20 °C (uwaga 4). Bezzwłocznie zakryć komorę pokrywą i pozostawić w celu elucji składników aż do momentu, gdy czoło rozpuszczalnika dotrze na odległość około 1 cm od górnej krawędzi płytki. Wyjąć płytkę z komory chromatograficznej i odparować rozpuszczalnik w strumieniu gorącego powietrza lub umieścić w tym celu płytkę na chwilę w dygestorium.

Uwaga 4: wyższa temperatura mogłaby utrudniać oddzielenie.

Spryskać płytkę lekko i równomiernie roztworem 2,7-dichlorofluorosceiny (4.12) i pozostawić do wyschnięcia. Obserwując płytkę pod lampą ultrafioletową (3.2), pasma steroli, dialkoholi triterpenowych i alkoholi można zidentyfikować, przyrównując je do plamek uzyskanych za pomocą roztworu porównawczego (4.11). Zaznaczyć czarnym ołówkiem granice pasm wzdłuż krawędzi fluorydujących (zob. rysunek 1 dotyczący płytki TLC).

Za pomocą metalowej szpatułki zeszkobać żel krzemionkowy z zaznaczonego obszaru. Usunięty i dokładnie rozdrobniony materiał przenieść do lejka do sączenia (3.4). Dodać 10 ml gorącego octanu etylu (4.10), ostrożnie wymieszać za pomocą metalowej szpatułki i przefiltrować (w stosownych przypadkach w próżni), zbierając filtrat do kolby stożkowej (3.5) połączonej z lejkiem do sączenia.

Pozostałość na filtrze przepłukać trzykrotnie eterem dietylowym (4.3) (około 10 ml przy każdym płukaniu), zbierając filtrat do tej samej kolby połączonej z lejkiem, odparować filtrat do objętości 4–5 ml, przelać pozostały roztwór do zważonej wcześniej probówki o pojemności 10 ml (3.6), wysuszyć poprzez lekkie podgrzewanie w delikatnym strumieniu azotu, rozpuścić jeszcze raz kilkoma kroplami acetonu (4.6), ponownie wysuszyć. Pozostałość znajdująca się w probówce to frakcje steroli i dialkoholi triterpenowych lub alkoholi i alkoholi triterpenowych.

6. ODDZIELENIE FRAKCJI ALKOHOLOWEJ METODĄ HPLC

Substancja niezmydlająca się uzyskana w części 1 rozpuszcza się w 3 ml fazy ruchomej (4.14); przefiltrować roztwór za pomocą filtra strzykawkowego (3.10) i zachować.

Wstrzyknąć 200 µL przefiltrowanego roztworu niezmydlającego się do HPLC (3.8).

Przeprowadzić oddzielenie metodą HPLC z prędkością 0,8 ml/min, odrzucić ilość uzyskaną w ciągu pierwszych 5 min i zebrać do kolb stożkowych o pojemności 25 ml (3.11) ilość otrzymaną między 5 a 10 min. w przypadku alkoholi alifatycznych i triterpenowych oraz ilość otrzymaną między 11 a 25 min. w przypadku steroli oraz erytrodiołu i uwaolu (uwaga 5).

Oddzielenie można monitorować za pomocą detektora UV przy długości fali 210 nm lub detektora współczynnika refraktometrycznego (zob. rysunek 6).

Fracje odparowuje się do wysuszenia i przygotowuje do analizy chromatograficznej.

Uwaga 5: należy dokładnie kontrolować ciśnienie pompy HPLC, eter dietylowy może zwiększyć ciśnienie, należy regulować przepływ, aby utrzymać ciśnienie pod kontrolą.

CZĘŚĆ 3

ANALIZA FRAKCJI ZWIĄZKÓW ALKOHOLOWYCH METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ

1. ZAKRES

Niniejsza część zawiera ogólne wytyczne dotyczące stosowania chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych do oznaczania składu jakościowego i ilościowego związków alkoholowych wyodrębnionych zgodnie z metodą określoną w części 2 niniejszej metody.

2. ZASADA

Fracje zebrane z substancji niezmydlającej się z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej (TLC) lub metody HPLC są poddawane derywatywacji do eterów trimetylosilanowych i poddawane analizie metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych z systemem rozdziału strumienia i detektorem płomieniowo-jonizacyjnym.

3. APARATURA

Typowe wyposażenie laboratoryjne, a w szczególności następujące urządzenia:

- 3.1. Probówka o pojemności 10 ml z lejkowatym dnem i szczelnym korkiem szklanym.
- 3.2. Chromatograf gazowy współpracujący z kolumną kapilarną z systemem rozdziału strumienia, składający się z:
 - 3.2.1. komory termostaticznej do kolumn w celu utrzymania wymaganej temperatury z dokładnością do ± 1 °C;
 - 3.2.2. regulowanego termostatem zespołu dozowania z otworem wytryskowym ze szkła krzemowanego i z systemem rozdziału strumienia;
 - 3.2.3. detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID);
 - 3.2.4. systemu gromadzenia danych współpracującego z detektorem FID (3.10.3.), z możliwością całkowania ręcznego.
- 3.3. Kolumna kapilarna wypełniona żelem krzemionkowym o długości 20–30 m, o wewnętrznej średnicy 0,25–0,32 mm, pokryta w 5 % difenylem i w 95 % dimetylopolisiloksanem (faza stacjonarna SE-52 lub SE-54 lub podobna), o jednakowej grubości wynoszącej 0,10–0,30 µm.
- 3.4. Mikrostrzykawka o pojemności 10 µl przeznaczona do chromatografii gazowej z umocowaną na stałe igłą do rozdzielania strumienia.

4. ODCZYNNIKI

- 4.1. Bezwodnik pirydyny do chromatografii.
- 4.2. Heksametyldizylazyna do analiz.
- 4.3. Trimetylochlorosilan do analiz.

- 4.4. Roztwory próbek eterów trimetylosilanowych steroli. Należy je przygotować tuż przed użyciem ze steroli i erytrodiolu uzyskanych z zawierających je olejów.
- 4.5. Roztwory mianowane eterów trimetylosilanowych alkoholi alifatycznych od C20 do C28. Można je sporządzić z mieszanin czystych alkoholi, w momencie gdy są potrzebne do użycia.
- 4.6. Gaz nośny: czysty wodór lub hel, do chromatografii gazowej.
- 4.7. Gazy pomocnicze: czysty wodór, hel, azot i powietrze do celów chromatografii gazowej.
- 4.8. Odczynnik wywołujący reakcję siliłowania składający się z mieszaniny pirydyny/heksametylodisilazanu/trimetylochlorosilanu w proporcji 9:3:1 (V/V/V).
- 4.9. n-heksan do chromatografii.

5. PRZYGOTOWANIE TRIMETYLSILOETERÓW

Do próbki (3.1) zawierającej frakcje związków alkoholowych dodać odczynnik wywołujący reakcję siliłowania (4.8) (uwaga 6) w ilości 50 µl na każdy miligram związków alkoholowych, w sposób pozwalający uniknąć wchłaniania wilgoci (uwaga 7).

Uwaga 6: w handlu dostępne są gotowe roztwory. Inne odczynniki siliłujące, takie jak na przykład bis-trimetylsilyltrifluoroacetamid + 1 % trimetylochlorosilanu, który musi zostać wymieszany z taką samą ilością bezwodnika pirydyny, również są dostępne. Pirydynę można zastąpić taką samą ilością acetonitrylu.

Uwaga 7: pojawienie się lekkiej opalizacji jest zjawiskiem normalnym i nie stanowi żadnej nieprawidłowości. Pojawienie się białej zawiesiny lub różowego koloru wskazuje na obecność wilgoci w odczynniku lub pogorszenie jego jakości. W takich przypadkach badanie należy powtórzyć (tylko w przypadku zastosowania heksametylodisilazanu/trimetylochlorosilanu).

Zamknąć próbkę (3.1) korkiem i ostrożnie wstrząsając (bez odwracania) aż do całkowitego rozpuszczenia się związków. Pozostawić na co najmniej 15 minut w temperaturze otoczenia, a następnie wirować przez kilka minut. Przezroczysty roztwór można poddać analizie metodą chromatografii gazowej.

6. ANALIZA METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ

6.1. Czynności wstępne, przygotowanie kolumn kapilarnych

Osadzić kolumnę (3.3) w chromatografie gazowym, podłączając końcówkę wlotową do dozownika z rozdziałem strumienia, a końcówkę wylotową do detektora.

Dokonać ogólnych kontroli zespołu chromatografu gazowego (szczelność układu zasilania gazem, wydajność detektora, wydajność systemu dzielenia strumienia i systemu zapisu itd.).

Jeżeli kolumna zostaje użyta po raz pierwszy, zaleca się jej przygotowanie: przepuścić powoli przez kolumnę strumień gazu, następnie włączyć zespół chromatografu gazowego i rozpocząć stopniowe podgrzewanie do temperatury co najmniej 20 °C powyżej temperatury roboczej (uwaga 8). Utrzymywać taką temperaturę przez co najmniej dwie godziny, następnie ustawić zespół w trybie pracy (regulacja strumienia gazu i układu rozdzielania, zapalenie płomienia, połączenie z systemem obliczeniowymi, regulacja temperatury kolumny, detektora i dozownika itd.), a następnie rejestrować sygnał z czułością co najmniej dwa razy większą niż przewidziana czułość analizy. Przebieg linii podstawowej musi mieć charakter liniowy, bez jakichkolwiek pików i bez przesunięcia. Ujemne przesunięcie prostej linii wskazuje na nieszczelność połączeń kolumn; przesunięcie dodatnie wskazuje na niedostateczne przygotowanie kolumny.

Uwaga 8: temperatura przygotowania kolumn musi zawsze być co najmniej o 20 °C niższa niż maksymalna temperatura określona dla fazy stacjonarnej.

6.2. Warunki robocze

Należy zoptymalizować program temperatury i natężenie przepływu gazu nośnego, tak aby otrzymać chromatogramy podobne do chromatogramów przedstawionych na rysunkach 3–6.

Poniższe parametry zostały zbadane i stwierdzono, że są użyteczne:

6.2.1. Alkohole alifatyczne

Programowanie pieca	180 °C (8 min.) → 260 °C (w temp. 5 °C/min) → 260 °C (15 min.)
Temperatura dozownika	280 °C
Temperatura detektora	290 °C
Prędkość liniowa gazu nośnego	Hel (20–30 cm/s); wodór (30–50 cm/s)
Stosunek strumienia dzielonego	1:50–1:100
Wstrzykiwana porcja	0,5–1 µl roztworu TMSE

6.2.2. Sterole i dialkohole triterpenowe

Programowanie pieca	stała temperatura 260 ± 5 °C
Temperatura dozownika	280–300 °C
Temperatura detektora	280–300 °C
Prędkość liniowa gazu nośnego	Hel (20–30 cm/s); wodór (30–50 cm/s)
Stosunek strumienia dzielonego	1:50–1:100
Wstrzykiwana porcja	0,5–1 µl roztworu TMSE

Warunki te mogą być zmieniane zgodnie z charakterystyką kolumny i chromatografu gazowego w celu uzyskiwania chromatogramów spełniających następujące wymogi:

- Czas retencji w przypadku alkoholu C26 wynosi 18 ± 5 minut.
- Pik dla alkoholu C22 wynosi 80 ± 20 % wartości pełnego zakresu skali dla oliwy z oliwek i 40 ± 20 % wartości pełnego zakresu skali dla oliwy z wycłoczyn z oliwek.
- Czas retencji w przypadku piku β-sitosterolu powinien wynosić 20 ± 5 min.
- Pik kampesterolu powinien wynosić: w przypadku oliwy z oliwek (średnia zawartość 3 %) 20 ± 5 % w pełnej skali.
- Należy oddzielić wszystkie występujące sterole. Oprócz całkowitego oddzielenia od siebie piki muszą także być całkowicie rozdzielone, co oznacza, że wykres piku musi łączyć się z linią podstawową, zanim przejdzie w następny pik. Niepełna rozdzielczość jest jednak tolerowana, pod warunkiem że pik w punkcie RRT 1,02 (sitostanol) może zostać oznaczony ilościowo na podstawie linii prostopadłej.

6.3. Procedura analityczna

Za pomocą mikrostrzykawkki (3.4) o pojemności 10 µl pobrać 1 µl heksanu, zassać 0,5 µl powietrza i następnie 0,5–1 µl roztworu próbki. Pociągnąć dalej tłoczek w celu opróżnienia igły. Wprowadzić igłę przez membranę dozownika i po jednej, dwóch sekundach szybko wstrzyknąć, a następnie powoli wyjąć igłę po około pięciu sekundach. Można zastosować także dozownik automatyczny.

Prowadzić rejestrację do całkowitego wyeluowania TMSE obecnych w próbce odpowiednich związków alkoholowych. Linia podstawowa powinna nadal spełniać wymogi odpowiednich warunków roboczych (6.2.1 lub 6.2.2).

6.4. Identyfikacja pików

Zidentyfikować poszczególne piki na podstawie czasów retencji oraz przez porównanie z mieszaniną alkoholi alifatycznych i triterpenowych lub steroli i TMSE dialkoholi triterpenowych poddanych analizie w takich samych warunkach. Chromatogram frakcji alkoholi alifatycznych i triterpenowych przedstawiono na rysunku 3, a odpowiadające chromatogramy steroli i dialkoholi triterpenowych – na rysunku 2.

Alkohole alifatyczne podlegają elucji w następującej kolejności: C20-ol (I.S.), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol i C28-ol.

Sterole i dialkohole triterpenowe podlegają elucji w następującej kolejności: cholesterol, brassikasterol, ergosterol, 24-metylen-cholesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ 7-kampesterol, Δ 5,23-stigmastadienol, klerosterol, β -sistosterol, sitostanol, Δ 5-awenasterol, Δ 5,24-stigmastadienol, Δ 7-stigmasterol, Δ 7-awenasterol, erytrodiol i uwaol.

6.5. Ocena ilościowa

Powierzchnie pików 1-eikozanolu i alkoholi alifatycznych C22, C24, C26 i C28 oblicza się za pomocą systemu odbioru danych. Współczynnik odpowiedzi w przypadku 1-eikozanolu przyjmuje się jako równy 1.

Obliczyć powierzchnie pików α -cholestanolu i steroli oraz dialkoholi triterpenowych za pomocą systemu obliczeniowego. Pominąć związki, które nie są ujęte w tabeli 1 (nie należy uwzględniać w obliczeniach ergosterolu). Współczynnik odpowiedzi w przypadku α -cholestanolu przyjmuje się jako równy 1.

Obliczyć stężenie każdego poszczególnego związku alkoholowego w mg/kg substancji tłuszczowej w następujący sposób:

$$\text{Związek alkoholowy } x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

gdzie:

A_x = powierzchnia pików w przypadku związku alkoholowego x, zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym.

A_s = powierzchnia pików 1-eikozanolu/ α -cholestanolu, zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym.

m_s = masa dodanego 1-eikozanolu/ α -cholestanolu, w miligramach.

m = masa próbki użytej do oznaczenia, w gramach.

7. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

Podać stężenie poszczególnych alkoholi alifatycznych i triterpenowych w mg/kg substancji tłuszczowej i ich sumę jako »całkowitą zawartość alkoholi alifatycznych«. Całkowita zawartość to suma C22, C24, C26 i C28.

Skład każdego z poszczególnych związków alkoholowych należy podać z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

Całkowite stężenie steroli musi być podane jako liczba całkowita bez przecinka dziesiętnego.

Procentową zawartość każdego sterolu obliczyć na podstawie stosunku powierzchni odpowiedniego pików do sumy powierzchni pików steroli:

$$\text{Sterol } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

gdzie:

A_x = powierzchnia pików dla sterolu x.

ΣA = suma powierzchni pików dla steroli.

APP β -sitosterol: Δ 5,23-stigmastadienol + klerosterol + β -sitosterol + sitostanol + Δ 5-awenasterol + Δ 5,24-stigmastadienol.

Obliczyć procentową zawartość erytrodiolu i uwaolu:

$$\text{Erytrodiol} + \text{Uwaol} = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

gdzie:

A_{Er} = powierzchnia erytrodiolu, zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym.

A_{Uv} = powierzchnia uwaolu, zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym.

ΣA_T = suma powierzchni piku dla steroli + erytrodiolu + uwaolu, zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym.

Oprócz obliczenia względnego procentowego udziału poszczególnych steroli i dialkoholi triterpenowych oraz całkowitego stężenia steroli należy – zgodnie z poniższymi wzorami – obliczyć stężenie erytrodiolu i uwaolu oraz ich sumę w mg/kg substancji tłuszczowej:

$$\text{Erytrodiol} = \frac{A_{Er} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

$$\text{Uwaol} = \frac{A_{Uv} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

gdzie:

A_{Er} = powierzchnia piku erytrodiolu, zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym.

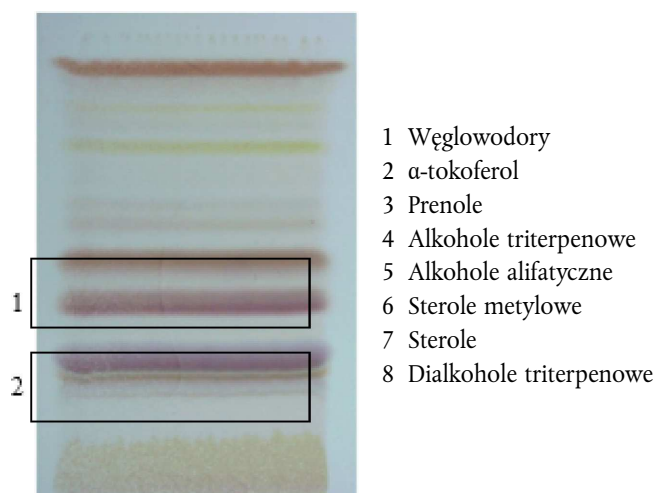
A_{Uv} = powierzchnia uwaolu, zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym.

A_s = powierzchnia piku α -cholestanolu, zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym.

m_s = masa dodanego α -cholestanolu, w miligramach.

m = masa próbki użytej do oznaczenia, w gramach.

Dodatek

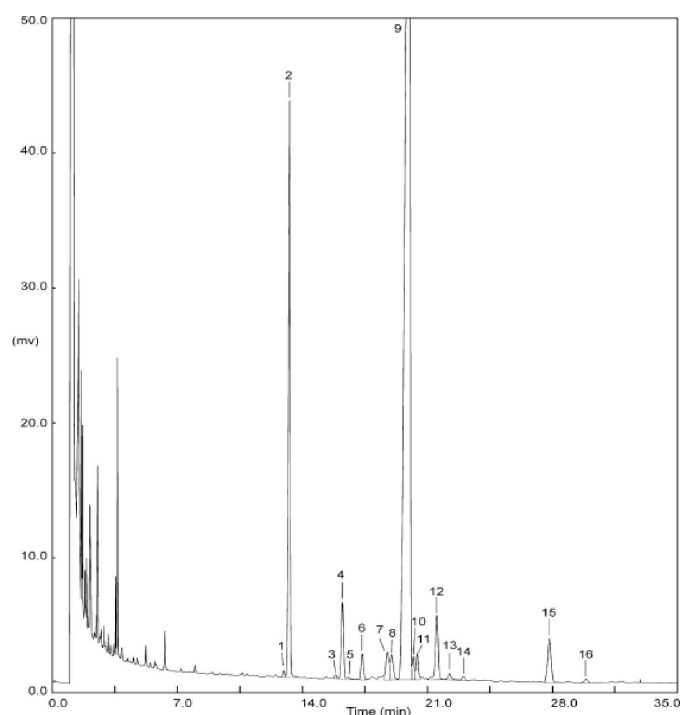


Rysunek 1 – TLC niezmydlającej się frakcji oliwy z wytłocznym z oliwek eluowanej dwukrotnie heksanem:eterem dietylowym (65:35), rozwiniętej z wykorzystaniem SO_4H_2 (50 %) i podgrzanej. Pasma, które należy zeszkrobać, to pasma znajdujące się w prostokącie; prostokąt nr 1 zawiera pasma alkoholi alifatycznych, a prostokąt nr 2 – steroli i dialkholi triterpenowych.

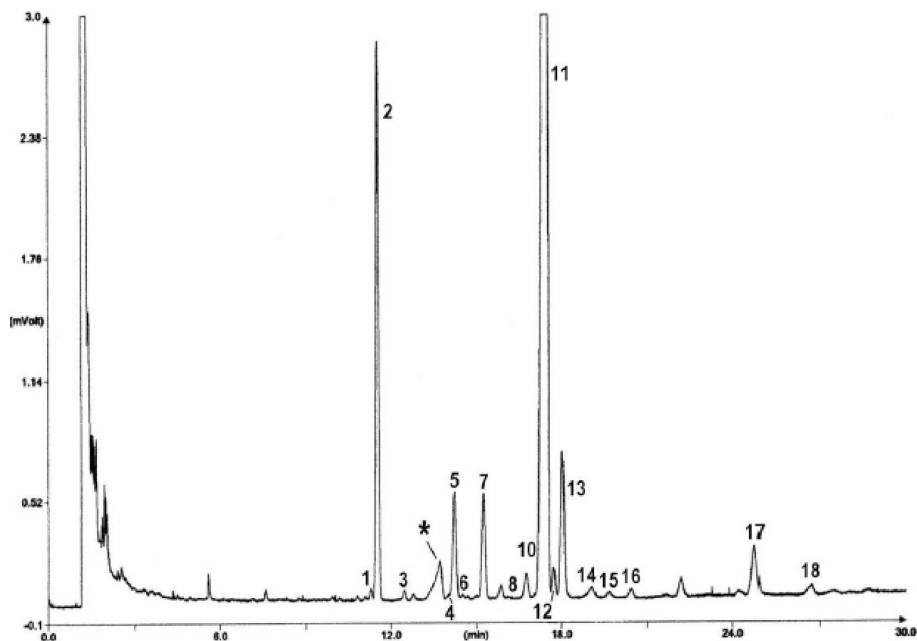
Tabela I – Względne czasy retencji dla steroli

Pik	Identyfikacja		Względny czas retencji	
			Kolumna SE 54	Kolumna SE 52
1	Cholesterol	Δ -5-cholesten-3 β -ol	0,67	0,63
2	Cholestanol	5 α -cholestan-3 β -ol	0,68	0,64
3	Brassikasterol	[24S]-24-metyl- Δ -5,22-cholestadien-3 β -ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S]-24-metyl- Δ -5,7,22-cholestatrien-3 β -ol	0,78	0,76
4	24-metylen-cholesterol	24-metylen- Δ -5,24-cholestadien-3 β -ol	0,82	0,80
5	Kampesterol	(24R)-24-metyl- Δ -5-cholesten-3 β -ol	0,83	0,81
6	Kampestanol	(24R)-24-metyl-cholestan-3 β -ol	0,85	0,82
7	Stigmasterol	(24S)-24-etyl- Δ -5,22-cholestadien-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ -7-kampesterol	(24R)-24-metyl- Δ -7-cholesten-3 β -ol	0,93	0,92
9	Δ -5,23-stigmastadienol	(24R,S)-24-etyl- Δ -5,23-cholestadien-3 β -ol	0,95	0,95
10	Klerosterol	(24S)-24-etyl- Δ -5,25-cholestadien-3 β -ol	0,96	0,96

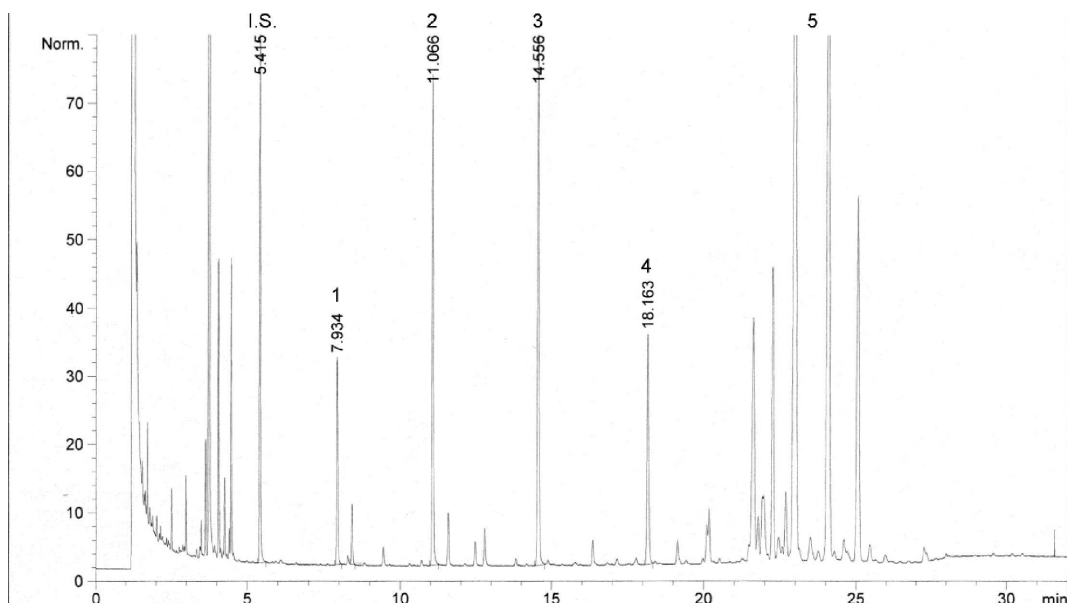
Pik	Identyfikacja		Względny czas retencji	
			Kolumna SE 54	Kolumna SE 52
11	β -sitosterol	(24R)-24-etyl- Δ -5-cholesten-3 β -ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-etyl-cholestan-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ -5-awenasterol	(24Z)-24-etyliden- Δ -cholesten-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5,24-stigmastadienol	(24R,S)-24-etyl- Δ -5,24-cholestadien-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastenol	(24R,S)-24-etyl- Δ -7-cholesten-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-awenasterol	(24Z)-24-etyliden- Δ -7-cholesten-3 β -ol	1,16	1,16
17	Erytrodiol	5 α -olean-12-en-3 β ,28-diol	1,41	1,41
18	Uwaol	Δ 12-ursen-3 β ,28-diol	1,52	1,52



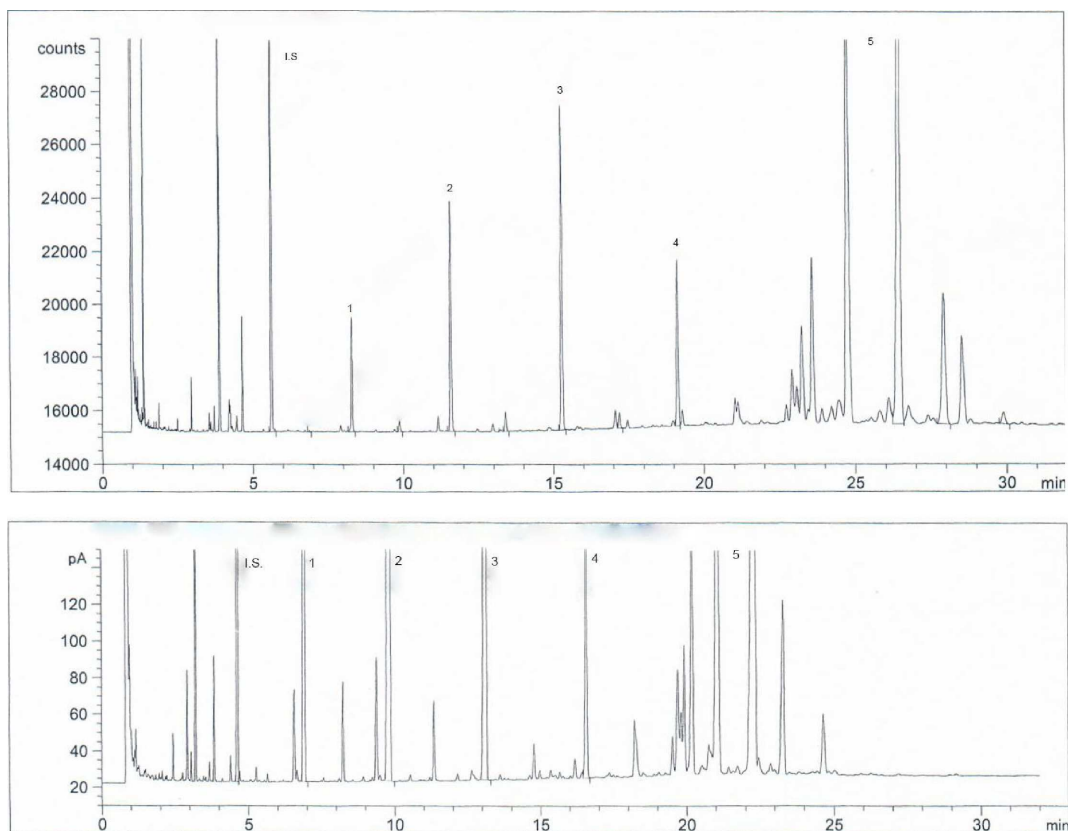
Rysunek 2 – Chromatogram z chromatografii gazowej steroli i dialkoholi triterpenowych z rafinowanej oliwy z oliwek przeprowadzonej z wykorzystaniem detektora płomieniowo-jonizacyjnego (GC-FID). (1) Cholesterol, (2) α -cholestanol (I. S.), (3) 24-metylen-cholesterol, (4) kampesterol, (5) kampestanol, (6) stigmasterol, (7) Δ 5,23-stigmastadienol, (8) klerosterol, (9) β -sitosterol, (10) sitostanol, (11) Δ 5-awenasterol, (12) Δ 5,24-stigmastadienol, (13) Δ 7-stigmastenol, (14) Δ 7-awenasterol, (15) erytrodiol, (16) uwaol.



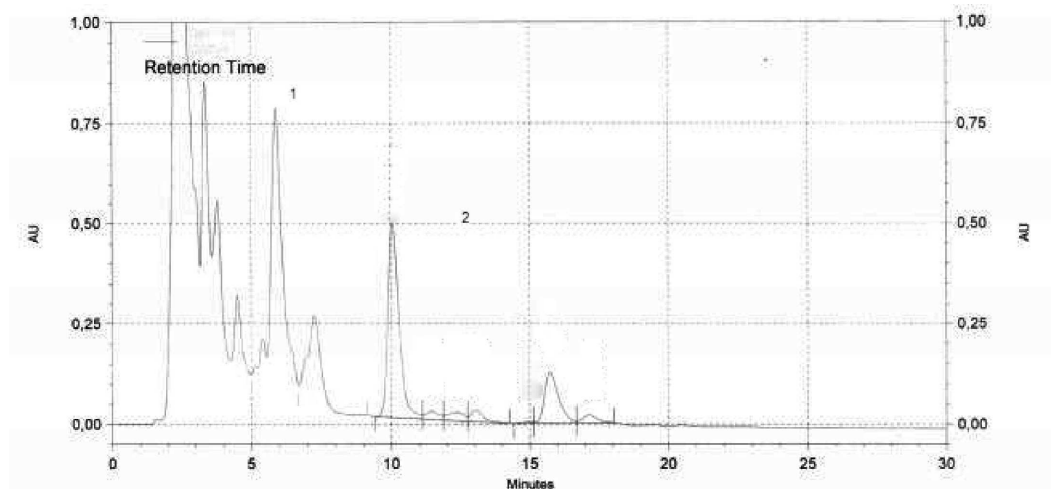
Rysunek 3 – Chromatogram z chromatografii gazowej steroli i dialkolei triterpenowych z oliwy lampante przeprowadzonej z wykorzystaniem detektora płomieniowo-jonizacyjnego (GC-FID). (1) Cholesterol, (2) α -cholestanol (I.S.), (3) brassikasterol, (4) 24-metylen-cholesterol, (5) kampesterol, (6) kampestanol, (7) stigmasterol, (8) Δ 7-kampesterol, (9) Δ 5,23-stigmastadienol, (10) klerosterol, (11) β -sitosterol, (12) sitostanol, (13) Δ 5-awenasterol, (14) Δ 5,24-stigmastadienol, (15) Δ 7-stigmastenol, (16) Δ 7-awenasterol, (17) erytrodiol, (18) uwaol.



Rysunek 4 – Chromatogram z chromatografii gazowej alkoholi alifatycznych i triterpenowych z oliwy z oliwek przeprowadzonej z wykorzystaniem detektora płomieniowo-jonizacyjnego (GC-FID). (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) alkohole triterpenowe.



Rysunek 5 – Chromatogram z chromatografii gazowej alkoholi alifatycznych i triterpenowych z oliwy z oliwek i oliwy z oliwek z drugiego odwirowania oliwy z oliwek przeprowadzonej z wykorzystaniem detektora płomieniowo-jonizacyjnego (GC-FID). (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) alkohole triterpenowe.



Rysunek 6 – Chromatogram z HPLC niezmydlającej się frakcji oliwy z oliwek oddzielonej metodą HPLC z wykorzystaniem detektora UV. (1) Alkohole alifatyczne i triterpenowe; (2) Sterole i dialkohole triterpenowe.”