KOMISSION TÄYTÄNTÖÖNPANOASETUS (EU) 2019/1604,

annettu 27 päivänä syyskuuta 2019,

oliiviöljyn ja uutetun oliiviöljyn ominaisuuksista sekä niiden määritysmenetelmistä annetun asetuksen (ETY) N:o 2568/91 muuttamisesta

EUROOPAN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan unionin toiminnasta tehdyn sopimuksen,

ottaa huomioon maataloustuotteiden yhteisestä markkinajärjestelystä ja neuvoston asetusten (ETY) N:o 922/72, (ETY) N:o 234/79, (EY) N:o 1037/2001 ja (EY) N:o 1234/2007 kumoamisesta 17 päivänä joulukuuta 2013 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EU) N:o 1308/2013 ([1]) ja erityisesti sen 91 artiklan ensimmäisen kohdan d alakohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Komission asetuksessa (ETY) N:o 2568/91 ([2]) määritellään oliiviöljyn ja oliivin puristemassaöljyn fysikaalis-kemialliset ja aistinvaraiset ominaisuudet ja vahvistetaan menetelmät kyseisten ominaisuuksien arviointia varten.

(2) Kyseiset menetelmät ja öljyjen ominaisuuksiin liittyvät raja-arvot saatetaan säännöllisesti ajan tasalle ottaen huomioon asiantuntijakemistien lausunnot ja kansainvälisen oliivineuvoston (IOC) puitteissa tehty työ.

(3) Eräitä asetuksessa (ETY) N:o 2568/91 säädettyjä analyysimenetelmiä olisi päivitettävä IOC:n vahvistamien tuoreimpien kansainvälisten standardien täytäntöönpanon varmistamiseksi unionin tasolla.

(4) IOC:n kauppastandardia muutettiin vapaiden happojen raja-arvon, peroksidiluvun, aistinvaraisen arvioinnin (virheen mediaani ja hedelmäisyyden mediaani) sekä HPLC:llä määritetyn ja teoreettisesti lasketun ECN42:n välisen eron ilmaisemisen osalta, jotta kauppastandardi olisi johdonmukainen analyysimenetelmän toistotarkkuus-arvoihin nähden.

(5) Asetuksen (ETY) N:o 2568/91 2 a artiklan 5 kohdan mukaisesti jäsenvaltioiden on todennettava, onko oliiviöljy ilmoitetun luokan mukaista, tarkastamalla mainitun asetuksen liitteessä I esitetyt ominaisuudet joko missä tahansa järjestyksessä tai noudattaen asetuksen liitteessä I b kuvatussa päätöksentekokaaviossa esitettyä järjestystä.

(6) Viimeaikainen kehitys huomioon ottaen on syytä päivittää asetuksen (ETY) N:o 2568/91 liitteessä I b olevat taulukot ja liitteen lisäys asianmukaisesti. Vaikuttaa myös siltä, että liitteen I b sisältö huomioon ottaen ”vuokaavio” on tarkoituksenmukaisempi termi kuin ”päätöksentekojärjestelmä”.

(7) Asetuksen (ETY) N:o 2568/91 liitteessä XII olevan 9.4 kohdan mukaan virheen mediaanilla tarkoitetaan voimakkaimmin havaitun virheen mediaania. Seurantamääritysten yhteydessä ja ottaen huomioon, että öljyn vaatimustenmukaisuutta arvioivat erilaiset raadit, olisi selvennettävä, että päätös siitä, ovatko öljyn ominaisuudet ilmoitetun luokan vaatimusten mukainen, tehdään yksinomaan pääasiallisen virheen mediaanin perusteella virheen luonteesta riippumatta.

(8) Sen vuoksi asetusta (ETY) N:o 2568/91 olisi muutettava.

(9) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat maatalouden yhteisen markkinajärjestelyn komitean lausunnon mukaiset,

ON HYVÄKSYNYT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Muutetaan asetus (ETY) N:o 2568/91 seuraavasti:

(1) Muutetaan 2 artikla seuraavasti:

a) korvataan 1 kohdan l alakohta seuraavasti:

”l) sterolien rakenne ja pitoisuus sekä alkoholiyhdisteet määritetään kapillaarikaasukromatografisella menetelmällä, joka kuvataan liitteessä XIX;”

([1]) EUVL L 347, 20.12.2013, s. 671.

([2]) Komission asetus (ETY) N:o 2568/91, annettu 11 päivänä heinäkuuta 1991, oliiviöljyn ja uutetun oliiviöljyn ominaisuuksista sekä niiden määritysmenetelmistä (EYVL L 248, 5.9.1991, s. 1).

b) korvataan 2 kohdan kolmas alakohta seuraavasti:

"Jos raati ei vahvista ilmoitusta ilmoitetun oliiviöljyluokan aistinvaraisten ominaisuuksien osalta, kansalliset viranomaiset tai niiden edustajat teettävät asianomaisen pyynnöstä viipymättä muilla hyväksytyillä raadeilla kaksi seurantamääritystä. Ainakin toisen raadin on oltava asianomaisen tuottajajäsenvaltion hyväksymä raati. Kyseisten ominaisuuksien katsotaan olevan yhdenmukaisia ilmoitettujen ominaisuuksien kanssa, jos ilmoitettu luokitus vahvistetaan molemmissa seurantamäärityksissä. Päinvastaisessa tapauksessa, riippumatta siitä, minkätyyppisiä virheitä seurantamäärityksissä todetaan, luokitus on ilmoitettava ominaisuuksia vastaamattomaksi ja seurantamääritysten kustannuksista vastaa asianomainen."

(2) Korvataan 2 a artiklan 5 kohdan b alakohta seuraavasti:

"b) seuraamalla vuokaaviota koskevassa liitteessä I b säädettyä järjestystä, kunnes päästään johonkin kyseisessä kaaviossa mainittuun päätökseen."

(3) Korvataan taulukko "LIITTEET Yhteenveto" tämän asetuksen liitteessä I olevalla taulukolla.

(4) Korvataan liite I tämän asetuksen liitteellä II.

(5) Korvataan liitteessä I a oleva 2.1 kohta seuraavasti:

"2.1 Kukin perusnäyte jaetaan standardissa EN ISO 5555 olevan 2.5 kohdan mukaisesti laboratorionäytteiksi, ja perusnäytteet määritetään liitteessä I b annetun vuokaavion mukaisessa järjestyksessä tai muussa satunnaisessa järjestyksessä."

(6) Korvataan liite I b tämän asetuksen liitteessä III olevalla tekstillä.

(7) Poistetaan liite V.

(8) Korvataan liitteessä VII oleva 4.2 kohta seuraavasti:

"4.2 n-heksaani (kromatografialaatua). Heksaani voidaan korvata iso-oktaanilla (2,2,4-trimetyylpentaani, kromatografialaatua) edellyttäen, että vastaavat toistotarkkuusarvot saavutetaan."

(9) Muutetaan liite XII tämän asetuksen liitteen IV mukaisesti.

(10) Muutetaan liite XVII tämän asetuksen liitteen V mukaisesti.

(11) Muutetaan liite XVIII tämän asetuksen liitteen VI mukaisesti.

(12) Korvataan liite XIX tämän asetuksen liitteessä VII olevalla tekstillä.

(13) Korvataan liitteessä XX oleva 4.2 kohta seuraavasti:

"4.2 n-heksaani, kromatografialaatua tai jäämien määritykseen soveltuvaa laatua. Heksaani voidaan korvata iso-oktaanilla (2,2,4-trimetyylpentaani, kromatografialaatua) edellyttäen, että vastaavat toistotarkkuusarvot saavutetaan. Liuottimien, joiden kiehumispiste on korkeampi kuin n-heksaanilla, haihtuminen kestää pidempään. Ne ovat kuitenkin suositeltavampia heksaanin myrkyllisyyden vuoksi. Puhtausaste on tarkistettava; voidaan esimerkiksi tarkastaa jäännös, kun 100 ml liuotinta on haihtunut.

VAROITUS: Höyryt ovat herkästi syttyviä. Eristettävä lämmönlähteistä, kipinöistä ja avoliekeistä. Pullot on pidettävä aina asianmukaisesti suljettuina. Riittävästä ilmanvaihdosta käytön aikana on huolehdittava. Varottava höyryjen syntymistä. Poistettava tulipaloriskin mahdollisesti aiheuttavat laitteet, kuten lämmittimet tai sähkölaitteet, joita ei ole valmistettu syttymättömästä materiaalista. Haitallista hengitettynä, koska voi vahingoittaa hermosoluja. Vältettävä höyryjen hengittämistä. Tarvittaessa on käytettävä asianmukaisia hengityssuojaimia. Varottava aineen joutumista silmiin tai iholle.

Iso-oktaani on syttyvä neste, joka aiheuttaa palovaaran. Räjähdysrajat ilmassa ovat 1,1 % ja 6,0 % (tilavuusosuus). Se on myrkyllistä nieltynä ja hengitettynä. Työskentele tämän liuotteen kanssa vetokaapissa hyvissä toimintaolosuhteissa."

2 artikla

Tämä asetus tulee voimaan kahdentenakymmenentenä päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä*.

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 27 päivänä syyskuuta 2019.

Komission puolesta

Puheenjohtaja

Jean-Claude JUNCKER

LIITE I

”LIITTEET

YHTEENVETO

Liite I	Oliiviöljyjen ominaisuudet
Liite I a	Näytteenotto oliiviöljyistä tai oliivin puristemassaöljyistä, jotka toimitetaan tuotteeseen suorassa kosketuksessa olevissa pakkauksissa
Liite I b	Vuokaavio sen todentamiseksi, onko oliiviöljynäyte ilmoitetun luokan mukainen
Liite II	Vapaiden rasvahappojen määrittäminen kylmämenetelmällä
Liite III	Peroksidiluvun määrittäminen
Liite IV	Vahapitoisuuden määrittäminen kapillaarikaasukromatografisella menetelmällä
Liite VII	2-glyseryylimonopalmitaatin prosenttiosuuden määrittäminen
Liite IX	Spektrofotometrinen määritys ultraviolettivalossa
Liite X	Rasvahappojen metyyliesterien määrittäminen kaasukromatografisella menetelmällä
Liite XI	Haihtuvien halogeeniliuottimien pitoisuuden määrittäminen oliiviöljystä
Liite XII	Kansainvälisen oliivineuvoston menetelmä neitsytoliiviöljyn aistinvaraista arviointia varten
Liite XV	Oliivijätteen öljypitoisuus
Liite XVI	Jodiluvun määrittäminen
Liite XVII	Menetelmä stigmastadieenien määrittämiseksi kasviöljyistä
Liite XVIII	ECN42-Triasyyliglyserolien teoreettisen koostumuksen ja todellisen koostumuksen välisen eron määritys
Liite XIX	Sterolien rakenteen ja pitoisuuden sekä alkoholiyhdisteiden määrittäminen kapillaarikaasukromatografisella menetelmällä
Liite XX	Vahojen, rasvahappojen metyyliestereiden ja rasvahappojen etyyliestereiden pitoisuuksien määrittäminen kapillaarikaasukromatografisella menetelmällä
Liite XXI	8 artiklan 2 kohdassa tarkoitetut oliiviöljyille tehtyjen vaatimustenmukaisuustarkastusten tulokset”

LIITE II

”LIITE I

OLIIVIÖLJYJEN OMINAISUUDET

Laatuominaisuudet

Ryhmä	Happamuus (%) (*)	Peroksidiluku (mEq O_2/kg)	K_{232}	K_{268} tai K_{270}	Delta-K	Aistinvarainen arvio		Rasva-happojen etyyliesterit (mg/kg)
						Virheen mediaani (Md) (*)	Hedelmäi-syyden mediaani (Mf)	
1. Ekstra-neitsytoliiviöljy	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Neitsytoliiviöljy	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Lamppuoliiviöljy	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 (1)	—	—
4. Jalostettu oliiviöljy	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Jalostetusta oliiviöljystä ja neitsytoliiviöljystä valmistettu oliiviöljy	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Raaka oliivin puristemassaöljy	_	—	—	—	—		—	—
7. Jalostettu oliivin puristemassaöljy	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Oliivin puristemassaöljy	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

(1) Virheen mediaani voi olla enintään 3,5, kun hedelmäisyyden mediaani on 0,0.

Puhtausominaisuudet

Ryhmä	Rasvahappokoostumus (1)						Trans-oleiini-isomeerien summa (%)	Translinoli-isomeerien ja translinoleeni-isomeerien summa (%)	Stigmastadieenit (mg/kg) (2)	HPLC:llä määritetyn ja teoreettisesti lasketun ECN42:n välinen ero	2-glyseryylimonopalmitaatti (%)
	Myristiinihappo (%)	Linoleenihappo (%)	Arakidonihappo (%)	Eikoseenihappo (%)	Beheenihappo (%)	nihappo (%)					
1. Ekstra-neitsytoliiviöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus ≤ 14,00 % ≤ 1,0 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus > 14,00 %
2. Neitsytoliiviöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus ≤ 14,00 % ≤ 1,0 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus > 14,00 %
3. Lamppuoliiviöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ |0,30|	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus ≤ 14,00 % ≤ 1,1 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus > 14,00 %
4. Jalostettu oliiviöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus ≤ 14,00 % ≤ 1,1 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus > 14,00 %
5. Jalostetusta oliiviöljystä ja neitsytoliiviöljystä valmistettu oliiviöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤|0,30|	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus ≤ 14,00 % ≤ 1,0 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus > 14,00 %
6. Raaka oliivin puristemassaöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ |0,60|	≤ 1,4
7. Jalostettu oliivin puristemassaöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,4
8. Oliivin puristemassaöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,2

(1) Muiden rasvahappojen pitoisuus (%): palmitiinihappo: 7,50–20,00; palmitoleiinihappo: 0,30–3,50; heptadekaanihappo: ≤ 0,40; heptadekeenihappo: ≤ 0,60; steariinihappo: 0,50–5,00; oleiinihappo: 55,00–83,00; linolihappo: 2,50–21,00.

(2) Isomeerien kokonaismäärä, joka voidaan (tai jota ei voida) erottaa kapillaarikolonnin avulla.

Ryhmä	Sterolikoostumus						Kokonaissteroolit (mg/kg)	Erytrodioli ja uvaoli (%) (**)	Vahat (mg/kg) (**)
	Kolesteroli (%)	Brassicasteroli (%)	Kampesteroli (1) (%)	Stigmasteroli (%)	Näenn. ß-sitosterolipit. (2) (%)	δ-7- Stigmastenoli (1) (%)			
1. Ekstra-neitsytoliiviöljy	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Neitsytoliiviöljy	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Lamppuoliiviöljy	≤ 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. Jalostettu oliiviöljy	≤ 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. Jalostetusta oliiviöljystä ja neitsytoliiviöljystä valmistettu oliiviöljy	≤ 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. Raaka oliivin puristemassaöljy	≤ 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. Jalostettu oliivin puristemassaöljy	≤ 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. Oliivin puristemassaöljy	≤ 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) Ks. tämän liitteen lisäys.

(2) Näennäinen β-sitosterolipitoisuus: δ-5,23-stigmastadienoli + klerosteroli + β-sitosteroli + sitostanoli + δ-5-avenasteroli + δ-5,24-stigmastadienoli.

(3) Kun öljyn vahapitoisuus on 300–350 mg/kg, öljyä pidetään lamppuöljynä, jos alifaattisten alkoholien kokonaispitoisuus on enintään 350 mg/kg tai jos erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on enintään 3,5 prosenttia.

(4) Kun öljyn vahapitoisuus on 300–350 mg/kg, öljyä pidetään raakana oliivin puristemassaöljynä, jos alifaattisten alkoholien kokonaispitoisuus on yli 350 mg/kg ja jos erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on yli 3,5 prosenttia.

Huomautukset:

a) Analyysitulokset on ilmaistava yhtä monen desimaalin tarkkuudella kuin kunkin ominaisuuden osalta esitetään. Viimeinen luku on pyöristettävä yhdellä yksiköllä ylöspäin, jos sitä seuraava luku on suurempi kuin 4.

b) Jos öljyn yksikin ominaisuus poikkeaa annetuista arvoista, öljyn luokka muutetaan tai todetaan, ettei öljy täytä tässä asetuksessa säädettyjä puhtausvaatimuksia.

c) Lamppuöljyllä molemmat tähdellä (*) merkityt ominaisuudet saavat poiketa samanaikaisesti kyseiselle luokalle vahvistetuista raja-arvoista.

d) Kaksi tähteä (**) laatuominaisuuden kohdalla tarkoittaa, että raa'an oliivin puristemassaöljyn ei tarvitse täyttää kaikkia raja-arvoja koskevia vaatimuksia samanaikaisesti. Oliivin puristemassaöljyn ja jalostetun oliivin puristemassaöljyn osalta yksi asianomaisista arvoista saa poiketa todetuista arvoista.

Lisäys

Päätöksentekojärjestelmä

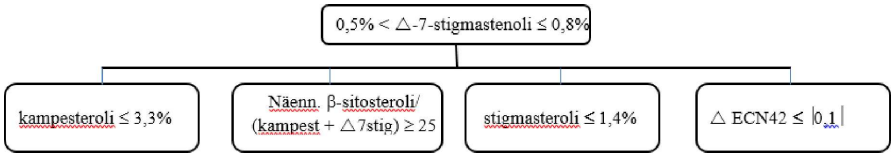
Kampesterolia koskeva päätöksentekokaavio neitsytoliiviöljyä ja ekstra-neitsytoliiviöljyä varten:



Muiden parametrien on vastattava asetuksen mukaisia rajoja.

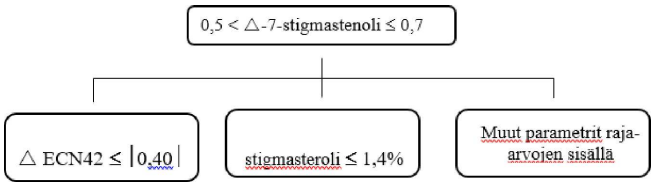
δ-7-stigmastenolia koskeva päätöksentekojärjestelmä:

— Ekstra-neitsytoliiviöljy ja neitsytoliiviöljy



Muiden parametrien on vastattava asetuksen mukaisia rajoja.

— Oliivin puristemassaöljy (raaka ja jalostettu)



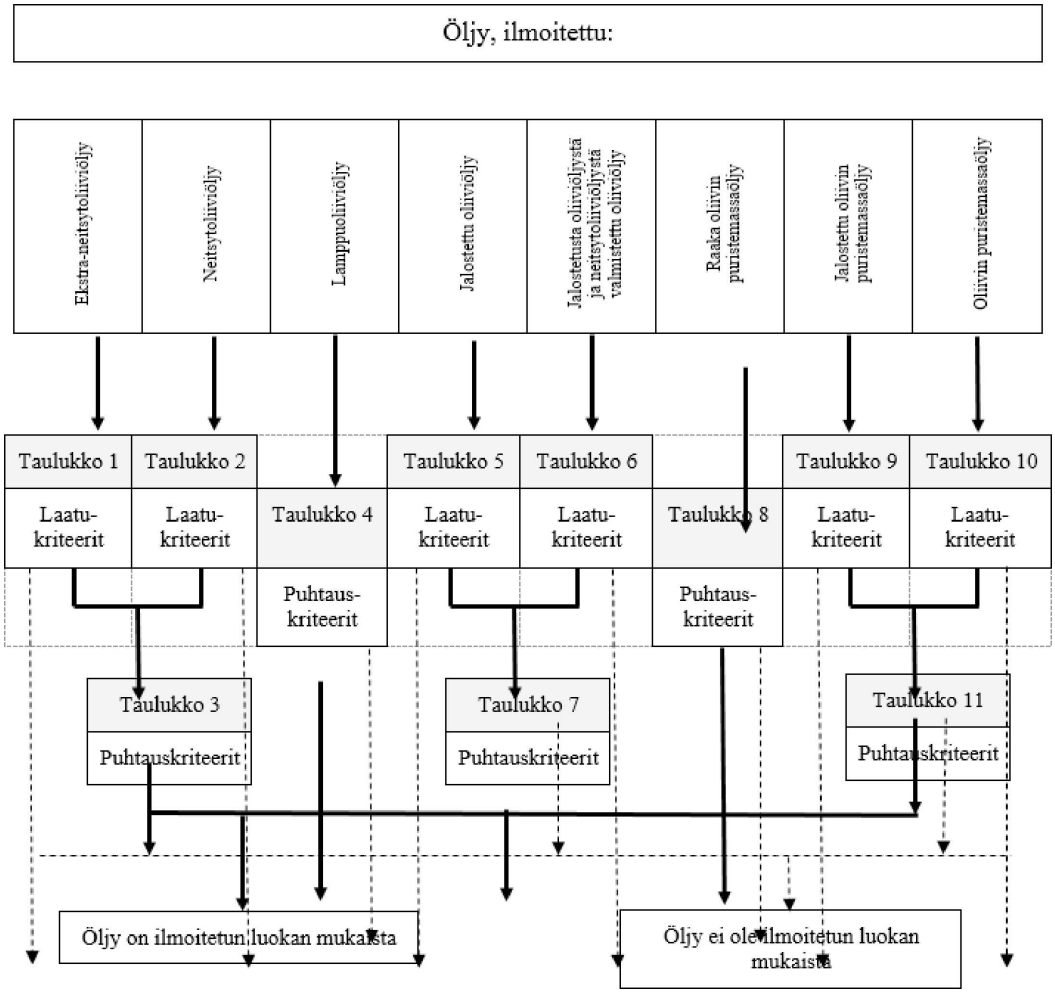
Muiden parametrien on vastattava asetuksen mukaisia rajoja."

LIITE III

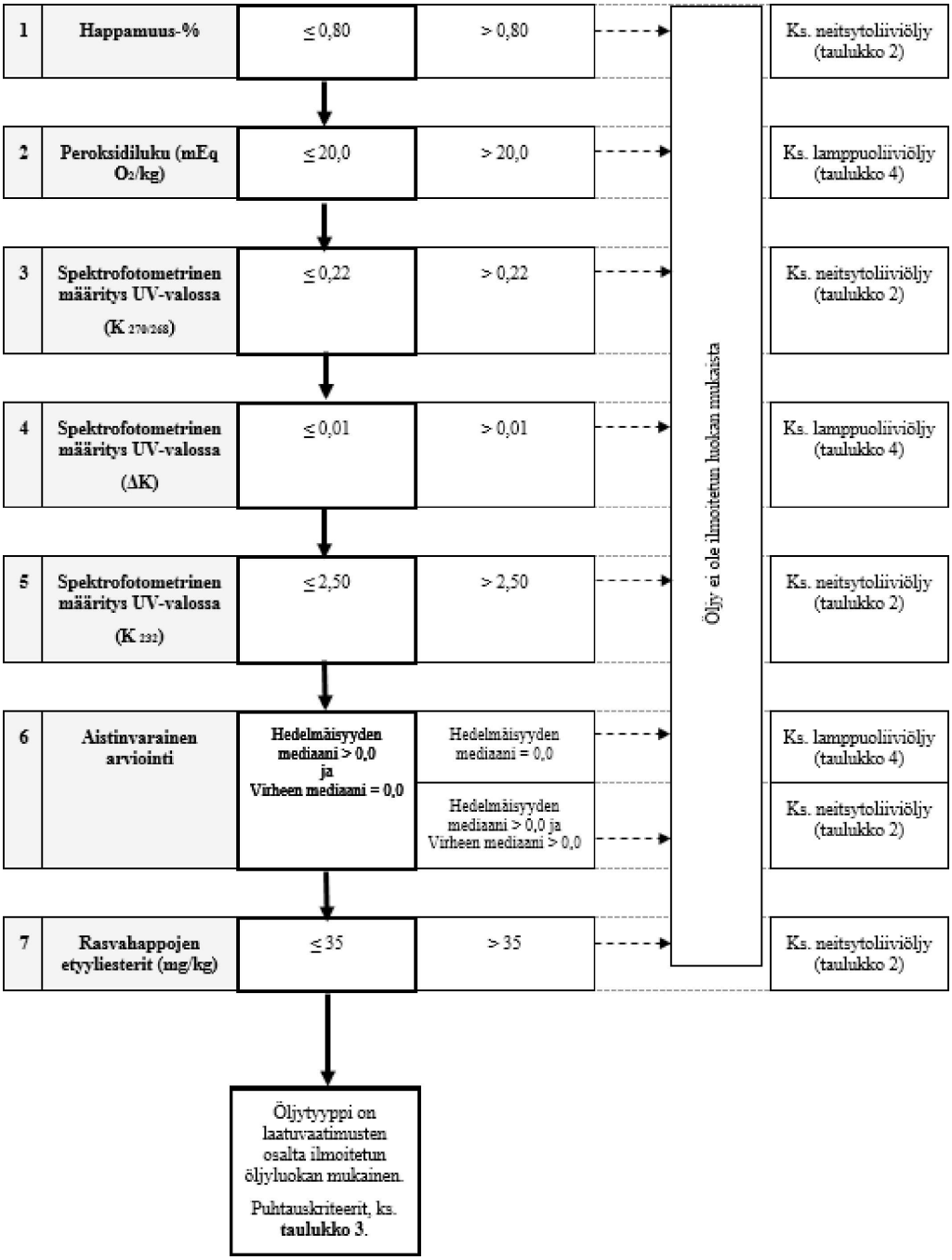
”LIITE I b

VUOKAAVIO SEN TODENTAMISEKSI, ONKO OLIIVIÖLJYNÄYTE ILMOITETUN LUOKAN MUKAINEN

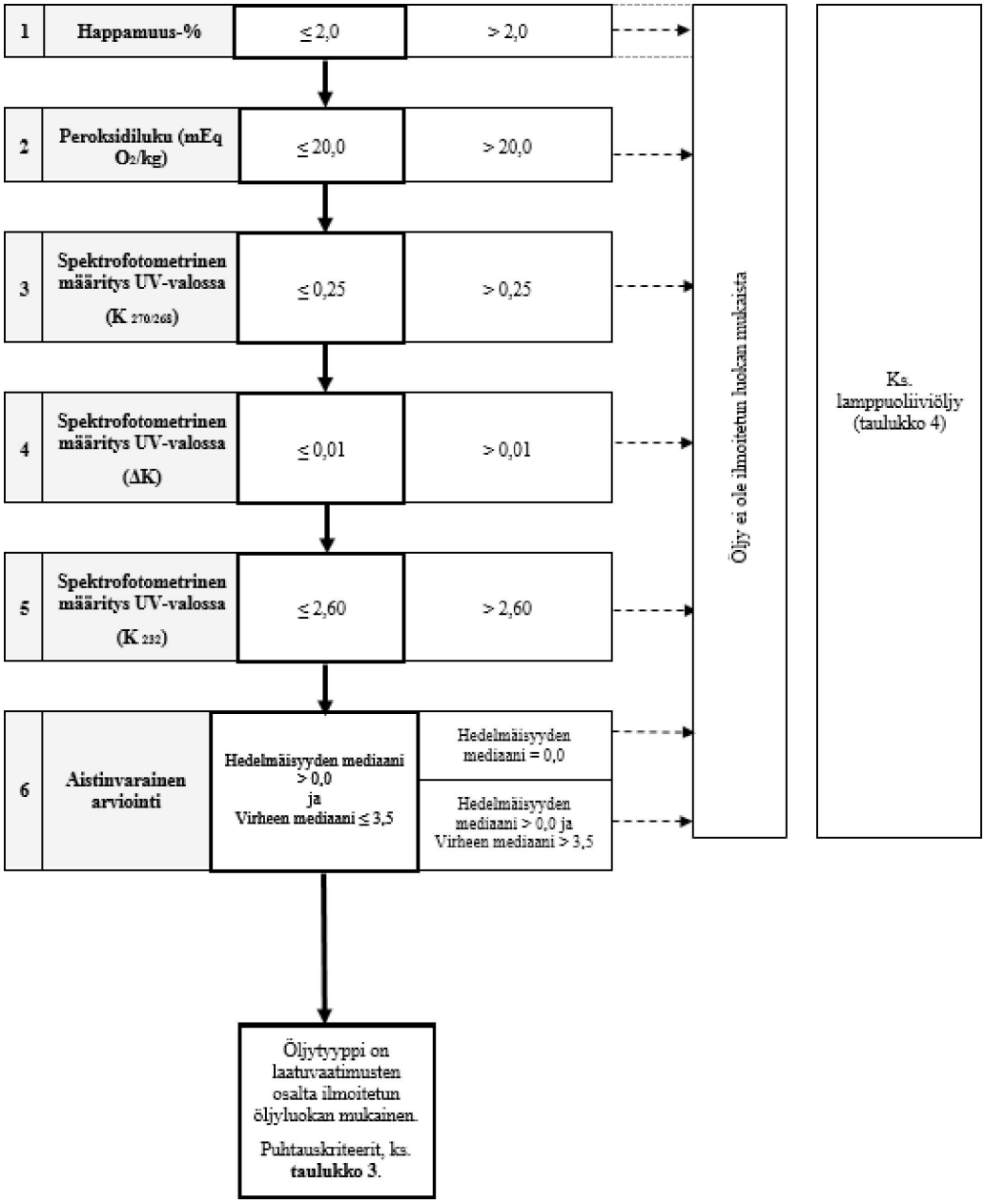
Yleistaulukko



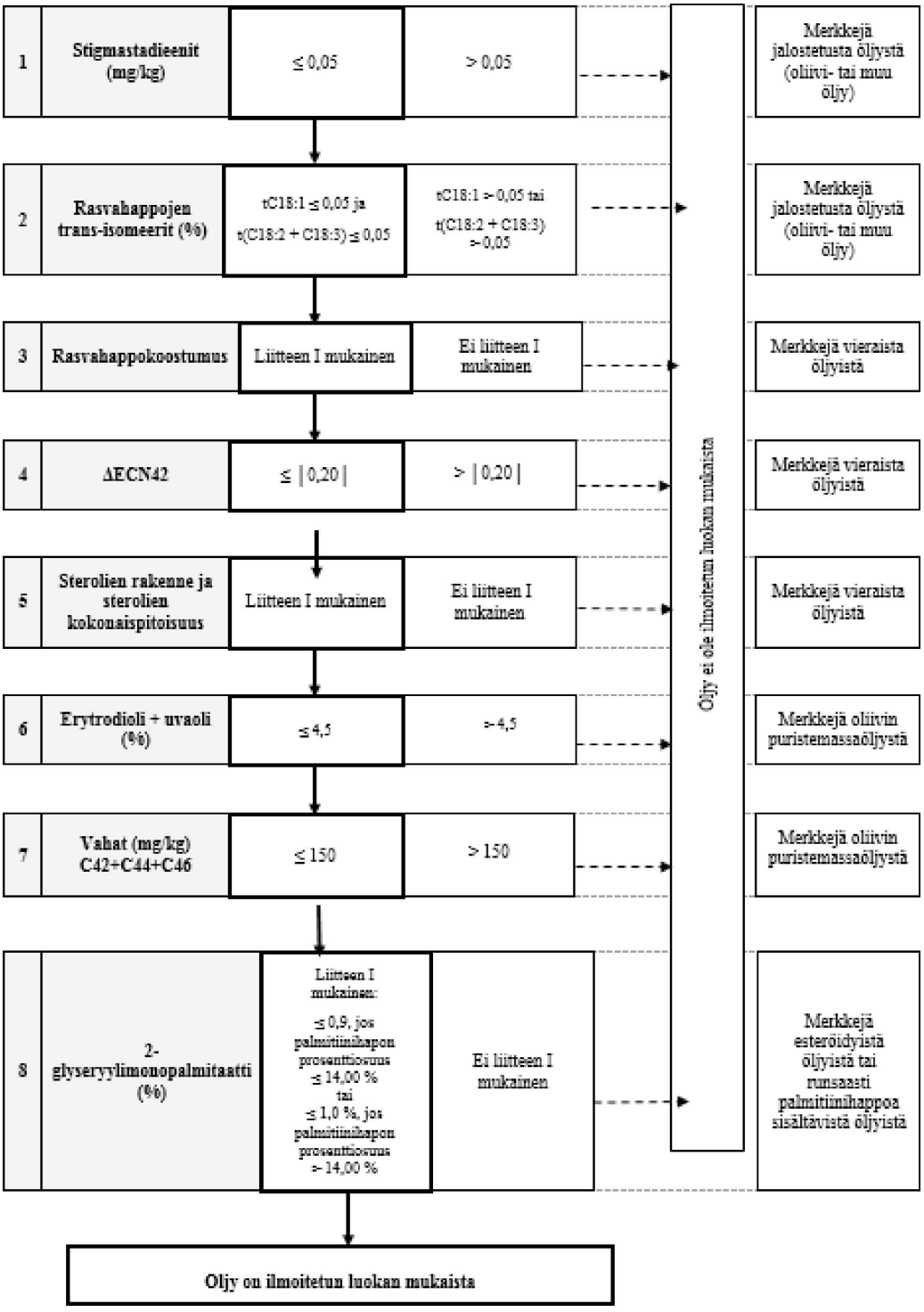
Taulukko 1 – Ekstra-neitsytoliiviöljy – laatukriteerit



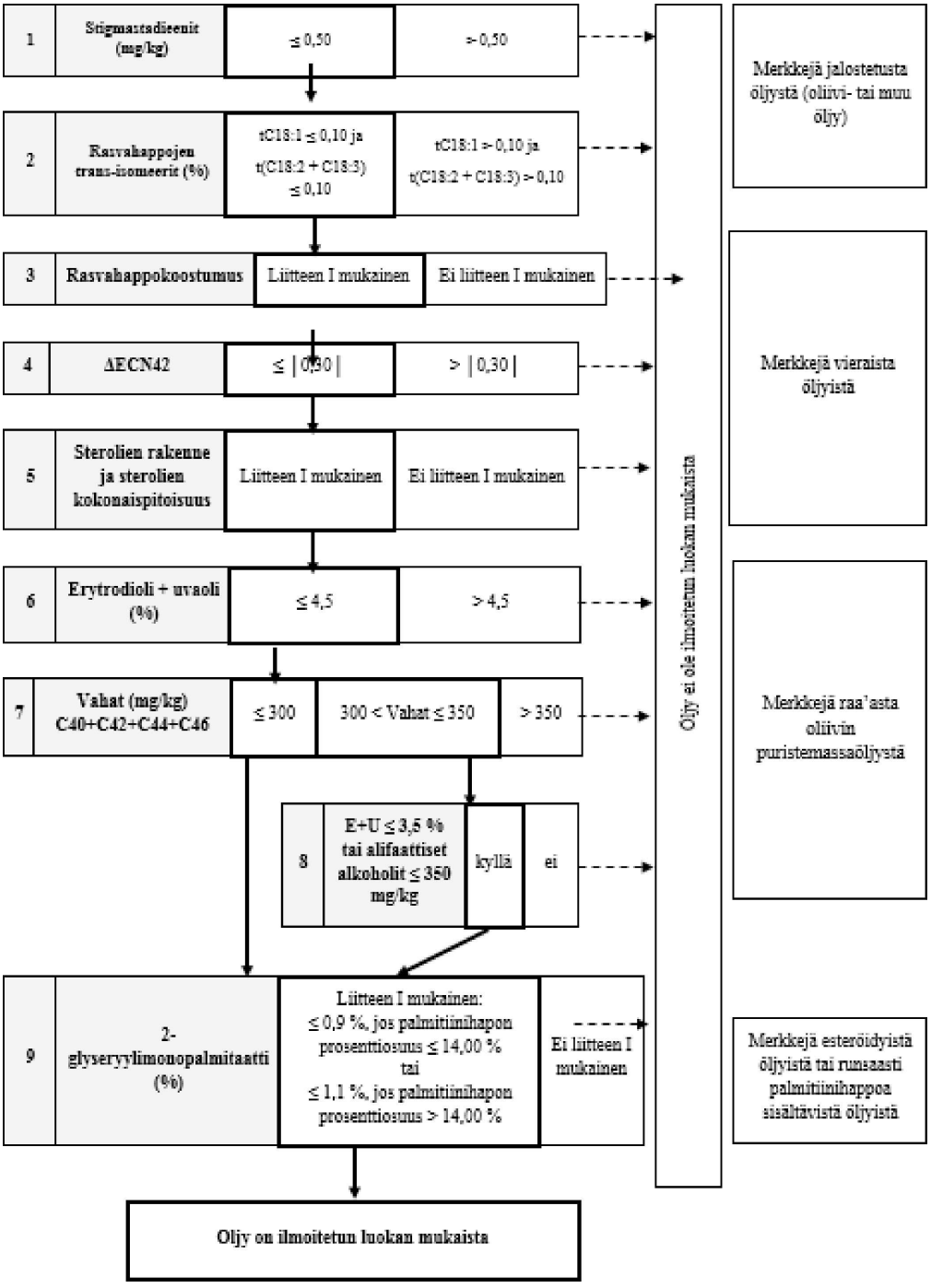
Taulukko 2 – Neitsytoliiviöljy – laatukriteerit



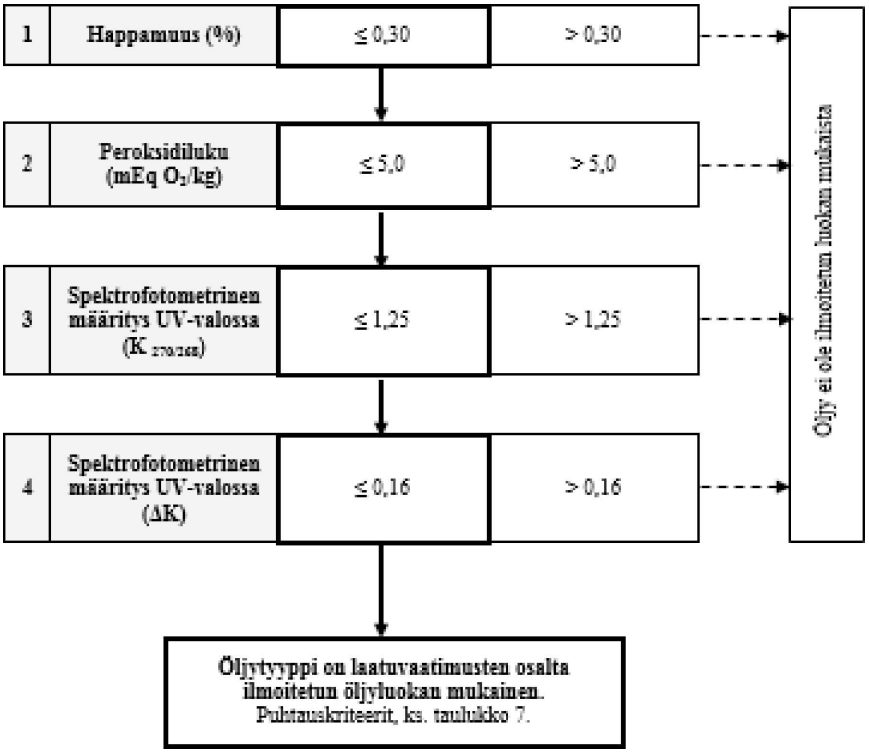
Taulukko 3 – Ekstra-neitsytoliiviöljy ja neitsytoliiviöljy – puhtauskriteerit



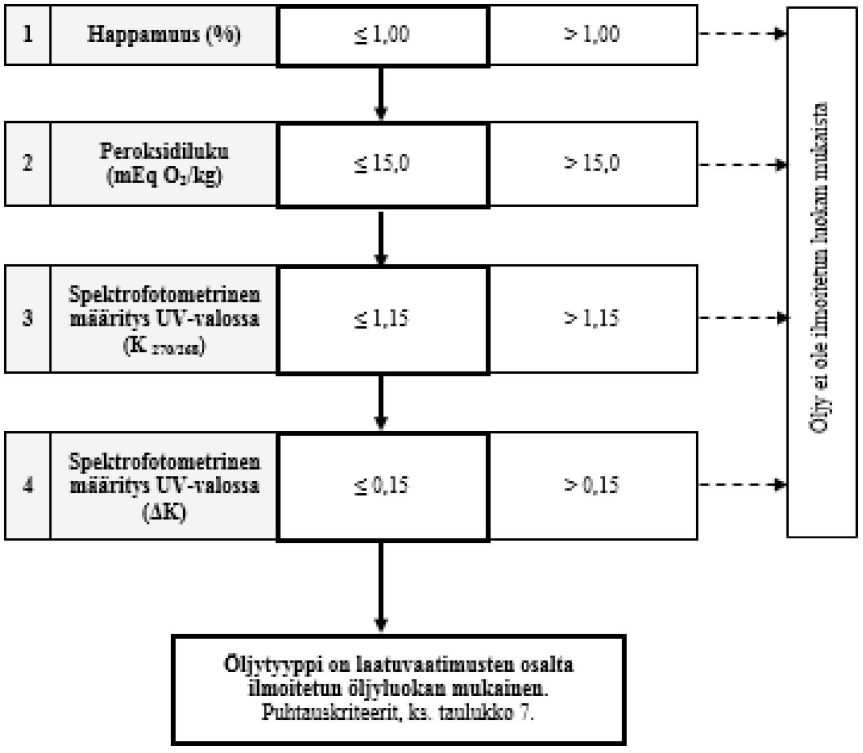
Taulukko 4 – Lamppuoliiviöljy – puhtauskriteerit



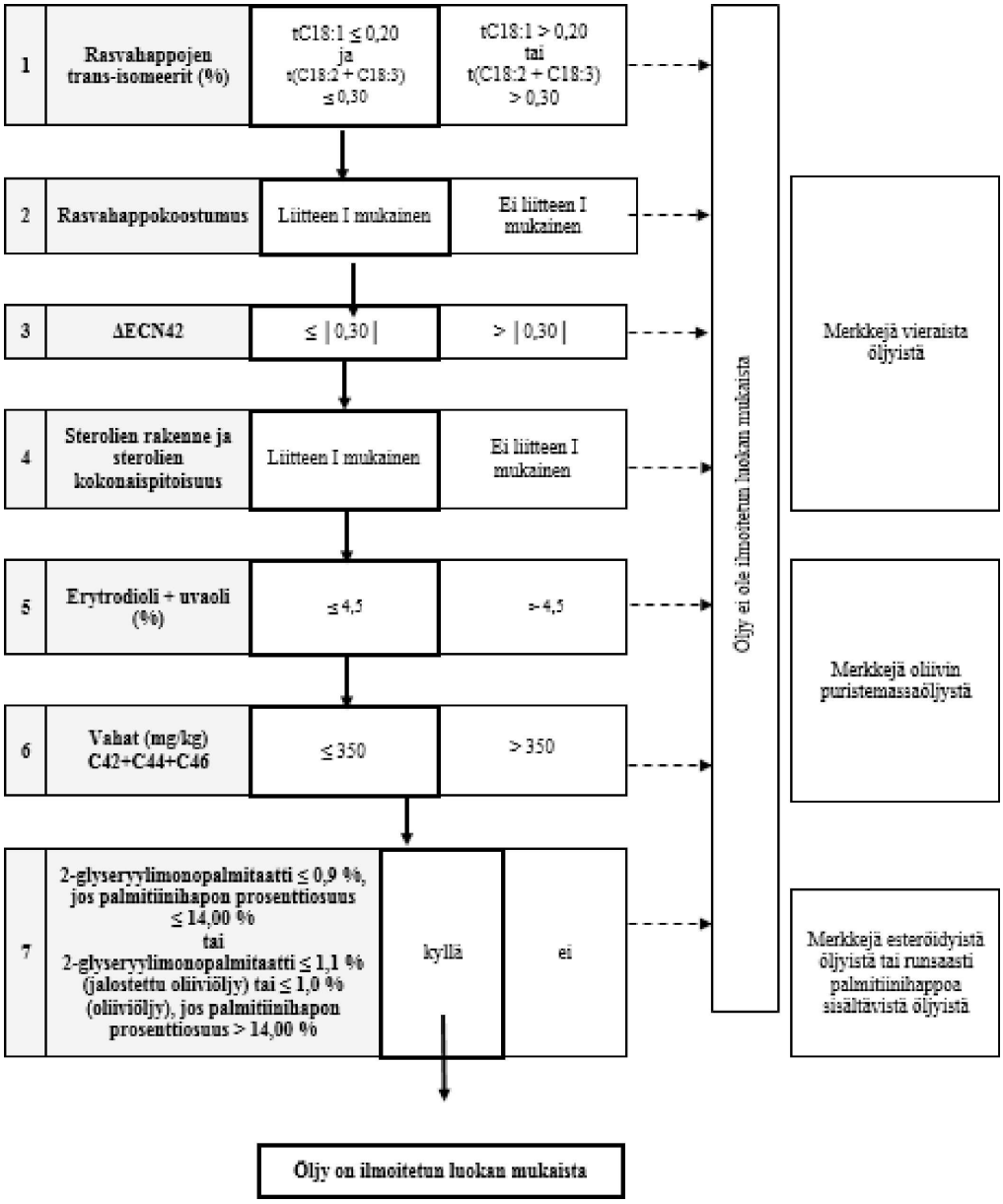
Taulukko 5 – Jalostettu oliiviöljy – laatukriteerit



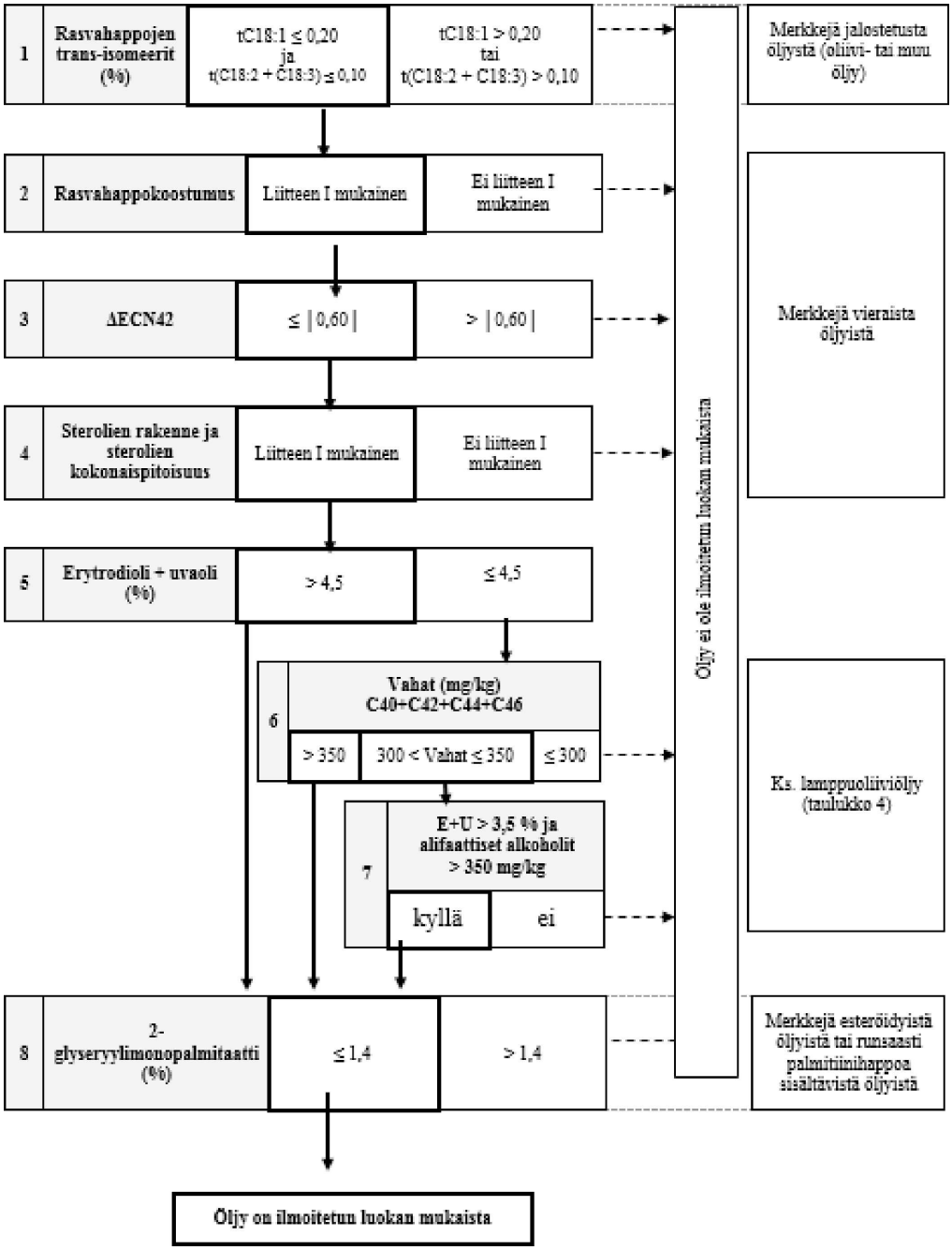
Taulukko 6 – Oliiviöljy (jalostetusta oliiviöljystä ja neitsytoliiviöljystä valmistettu oliiviöljy) – puhtauskriteerit



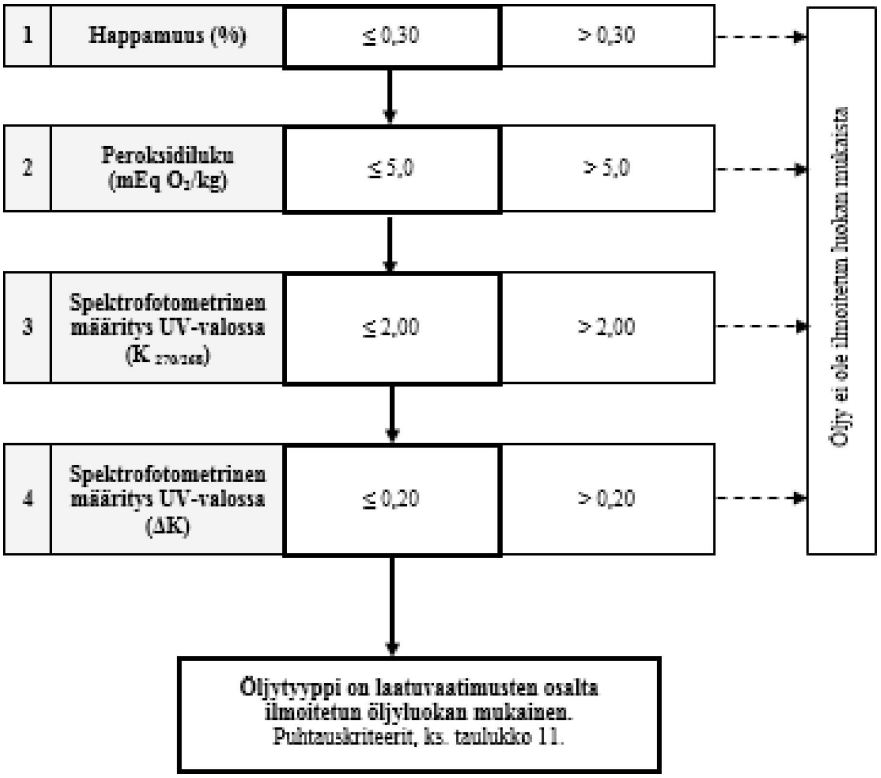
Taulukko 7 – Jalostettu oliiviöljy ja jalostetusta oliiviöljystä ja neitsytoliiviöljystä valmistettu oliiviöljy – puhtauskriteerit



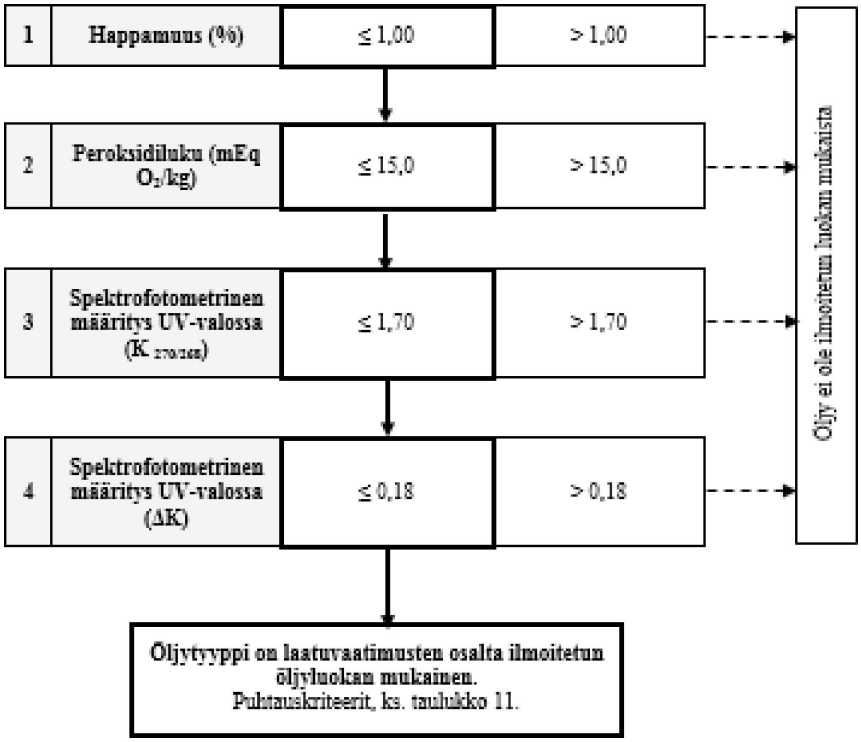
Taulukko 8 – Raaka oliivin puristemassaöljy – puhtauskriteerit



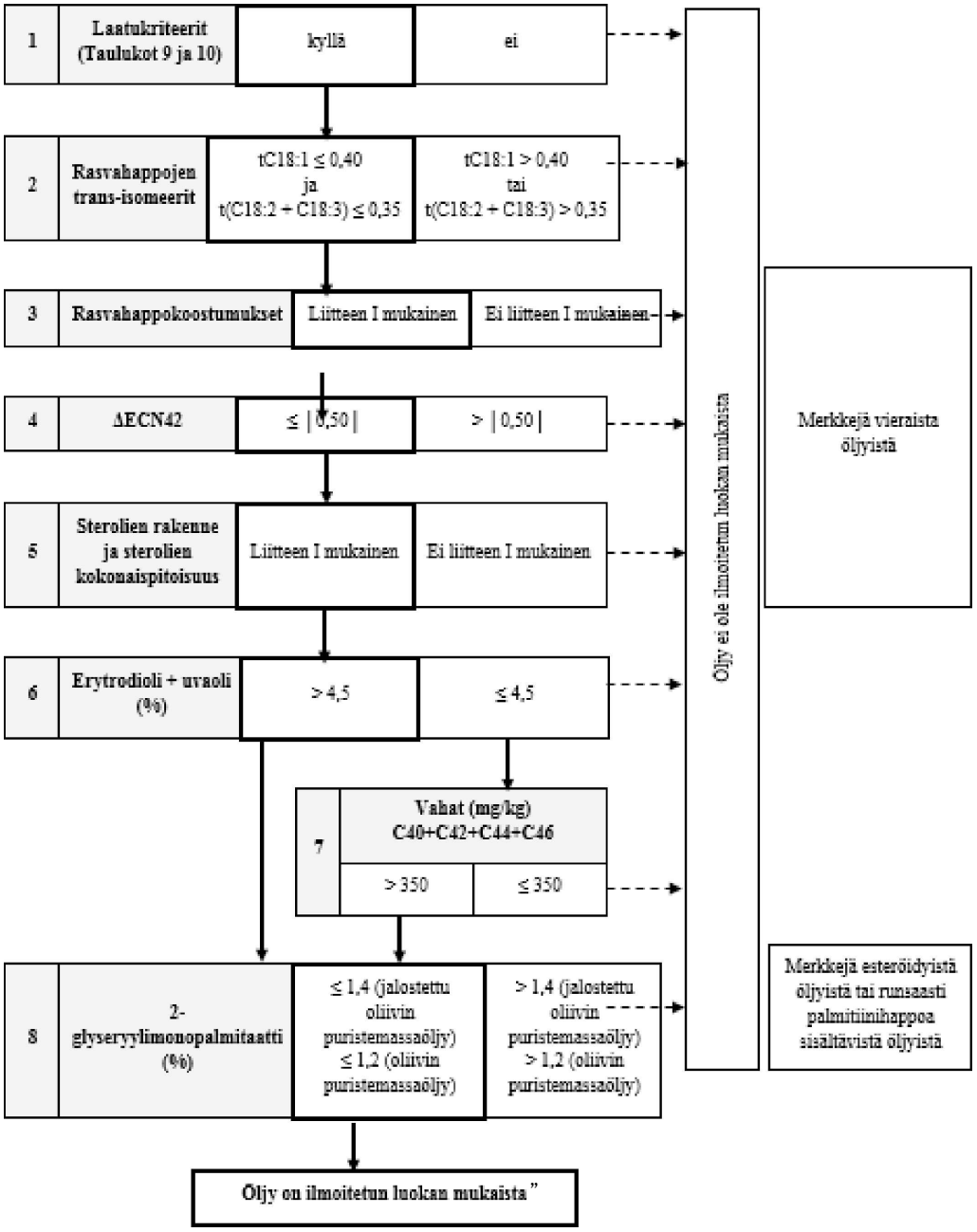
Taulukko 9 – Jalostettu oliivin puristemassaöljy – laatukriteerit



Taulukko 10 – Oliivin puristemassaöljy – laatukriteerit



Taulukko 11 – Jalostettu oliivin puristemassaöljy ja oliivin puristemassaöljy – puhtauskriteerit



LIITE IV

Muutetaan liite XII seuraavasti:

1) Korvataan 3.3 kohta seuraavasti:

”3.3 **Valinnaiset termit pakkausmerkintöjä varten**

Raadin puheenjohtaja voi pyynnöstä todistaa, että arvioidut öljyt ovat ominaisuuksien voimakkuuden ja havaitsemisen osalta seuraavia ilmaisuja vastaavien määritelmien ja vertailuvälien mukaisia.

Positiiviset ominaisuudet (hedelmäinen, karvas ja pistävä): Aistimuksen voimakkuuden mukaan:

— *Voimakas*, jos asianomaisen ominaisuuden mediaani on yli 6,0,

— *Keskivoimakas*, jos asianomaisen ominaisuuden mediaani on yli 3,0 ja enintään 6,0,

— *Mieto*, jos asianomaisen ominaisuuden mediaani on enintään 3,0.

Hedelmäisyys	Oliivien lajikkeesta riippuvat hajuaistimukset ovat ominaisia hyvänlaatuisista ja tuoreista oliiveista saadulle öljylle, jossa raakoja ja kypsiä oliiveja on samassa suhteessa. Ne havaitaan suoraan ja/tai nenän takaosan kautta.
Vihreä hedelmäisyys	Oliivien lajikkeesta riippuvat hajuaistimukset tuovat mieleen vihreät hedelmät. Ne ovat ominaisia raaoista, hyvänlaatuisista ja tuoreista oliiveista saadulle öljylle. Ne havaitaan suoraan ja/tai nenän takaosan kautta.
Kypsä hedelmäisyys	Oliivien lajikkeesta riippuvat hajuaistimukset tuovat mieleen kypsät hedelmät. Ne ovat ominaisia hyvänlaatuisista ja tuoreista oliiveista saadulle öljylle. Ne havaitaan suoraan ja/tai nenän takaosan kautta.
Tasapainoinen öljy	Öljy ei ole epätasapainossa; epätasapainolla tarkoitetaan sellaisen öljyn haju- ja makuaistimusta sekä suutuntumaa, jossa karvauden ja pistävyyden mediaanit ovat enintään 2,0 yksikköä korkeampia kuin hedelmäisyyden mediaani.
Mieto öljy	Karvauden mediaani ja pistävyyden mediaani ovat öljyssä 2,0 tai vähemmän.

Ilmaisujen luettelo aistimuksen voimakkuuden mukaan:

Aistinvaraisessa arviointitodistuksessa käytettävät ilmaisut	Ominaisuuden mediaani
Hedelmäisyys	—
Kypsä hedelmäisyys	—
Vihreä hedelmäisyys	—
Mieto hedelmäisyys	≤ 3,0
Keskivoimakas hedelmäisyys	3,0 < Me ≤ 6,0
Voimakas hedelmäisyys	> 6,0
Mieto kypsä hedelmäisyys	≤ 3,0
Keskivoimakas kypsä hedelmäisyys	3,0 < Me ≤ 6,0
Voimakas kypsä hedelmäisyys	> 6,0
Mieto vihreä hedelmäisyys	≤ 3,0
Keskivoimakas vihreä hedelmäisyys	3,0 < Me ≤ 6,0
Voimakas vihreä hedelmäisyys	> 6,0

Aistinvaraisessa arviointitodistuksessa käytettävät ilmaisut	Ominaisuuden mediaani
Mieto karvaus	≤ 3,0
Keskivoimakas karvaus	3,0 < Me ≤ 6,0
Voimakas karvaus	> 6,0
Mieto pistävyys	≤ 3,0
Keskivoimakas pistävyys	3,0 < Me ≤ 6,0
Voimakas pistävyys	> 6,0
Tasapainoinen öljy	Karvauden ja pistävyyden mediaanit ovat enintään 2,0 yksikköä korkeampia kuin hedelmäisyyden mediaani.
Mieto öljy	Karvauden ja pistävyyden mediaanit ovat enintään 2,0.”

2) Korvataan 9.4 kohta seuraavasti:

”9.4 **Öljyn luokittelu**

Öljy luokitellaan jäljempänä esitettyihin luokkiin virheen mediaanin ja hedelmäisyyden mediaanin mukaan. Virheen mediaanilla tarkoitetaan voimakkaimmin havaitun virheen mediaania. Virheen mediaani ja hedelmäisyyden mediaani ilmaistaan yhden desimaalin tarkkuudella.

Öljy luokitellaan vertaamalla virheen mediaanin ja hedelmäisyyden mediaanin arvoa jäljempänä annettuihin vertailuväleihin. Koska vertailuvälien rajoja määriteltäessä on otettu huomioon menetelmän virhe, niitä on pidettävä absoluuttisina. Luokittelu voidaan esittää tietokonesovellusten avulla visuaalisesti tilastotiedoista koottuna taulukkona tai kaaviona.

a) Ekstra-neitsytoliiviöljy: virheen mediaani on 0,0 ja hedelmäisyyden mediaani yli 0,0;

b) Neitsytoliiviöljy: virheen mediaani on yli 0,0 mutta enintään 3,5 ja hedelmäisyyden mediaani on yli 0,0;

c) Lamppuneitsytoliiviöljy: virheen mediaani on yli 3,5 tai virheen mediaani on enintään 3,5 ja hedelmäisyyden mediaani on 0,0.

Huomautus 1: Jos karvaan ja/tai pistävän ominaisuuden mediaani on yli 5,0, raadin puheenjohtaja tekee siitä merkinnän öljyn arviointitodistukseen.

Jos kyse on vaatimustenmukaisuustarkastuksina tehdyistä analyyseistä, on tehtävä koe. Jos kyse on vasta-analyyseistä, on tehtävä toistomääritys eri tilaisuudessa. Toistomäärityksen tulosten on oltava tilastollisesti yhdenmukaisia (ks. 9.5 kohta). Jollei näin ole, näytteelle on jälleen tehtävä kaksi uutta määritystä. Luokitteluominaisuuksien mediaanin lopullinen arvo lasketaan käyttäen molempien mediaanien keskiarvoa.”

LIITE V

Muutetaan liite XVII seuraavasti:

1) Korvataan 5.1 kohta seuraavasti:

"5.1 Heksaani tai alkaaniseos, jonka aineosien kiehumispisteet ovat 65–70 °C ja joka on tislattu rektifioimiskolonnilla. Heksaani voidaan korvata iso-oktaanilla (2,2,4-trimetyylipentaani, kromatografialaatua) edellyttäen, että sillä saadaan vertailukelpoiset toistotarkkuusarvot. Jäännös, kun 100 ml liuotinta on haihtunut, voidaan tarkastaa. Liuottimien, joilla on n-heksaania korkeampi kiehumispiste, haihtuminen kestää pidempään. Ne ovat kuitenkin suositeltavampia heksaanin myrkyllisyyden vuoksi."

2) Lisätään 6.3.3 kohtaan teksti seuraavasti:

"Huomautus 10. Kun stigmastadieeneja esiintyy pitoisuuksina yli 4 mg/kg ja jos kvantifioimista edellytetään, on käytettävä stereenien määrittämiseen jalostetusta öljystä tarkoitettua kansainvälisen oliivineuvoston menetelmää."

LIITE VI

Muutetaan liite XVIII seuraavasti:

1) Korvataan 4.2.1 kohta seuraavasti:

"4.2.1 Petrolieetteri 40–60 °C, kromatografialaatua, tai heksaani. Heksaani voidaan korvata iso-oktaanilla (2,2,4-trimetyylipentaani, kromatografialaatua) edellyttäen, että sillä saadaan vertailukelpoiset toistotarkkuusarvot. Liuottimien, joilla on n-heksaania korkeampi kiehumispiste, haihtuminen kestää pidempään. Ne ovat kuitenkin suositeltavampia heksaanin myrkyllisyyden vuoksi."

2) Lisätään 4.2.12 kohta seuraavasti:

"4.2.12 Heptaani, kromatografialaatua. Heptaani voidaan korvata iso-oktaanilla (2,2,4-trimetyylipentaani, kromatografialaatua)."

LIITE VII

"LIITE XIX

STEROLIEN RAKENTEEN JA PITOISUUDEN SEKÄ ALKOHOLIYHDISTEIDEN MÄÄRITTÄMINEN KAPILLAARIKAASUKROMATOGRAFISELLA MENETELMÄLLÄ

1. SOVELTAMISALA

Menetelmässä kuvataan menettely oliiviöljyjen ja oliivin puristemassaöljyjen yksittäisten alkoholiyhdisteiden pitoisuuden ja alkoholiyhdisteiden kokonaispitoisuuden määrittämiseksi.

Oliiviöljyjen ja oliivin puristemassaöljyjen sisältämiin alkoholiyhdisteisiin kuuluvat alifaattiset alkoholit, sterolit ja triterpeenidialkoholit.

2. PERIAATE

Öljyt, joihin on lisätty α-kolestanolia ja 1-eikosanolia sisäiseksi standardiksi, saippuoidaan kaliumhydroksidin etanoliliuoksella ja saippuoitumaton aines uutetaan etyylieetterillä.

Eri alkoholiyhdisteiden fraktiot erotetaan saippuoitumattomasta uutteesta joko ohutkerroskromatografian avulla emäksisellä silikageelilevyllä (vertailumenetelmä) tai HPLC:llä silikageelikolonnissa. Silikageelierotuksella saatu fraktio muutetaan trimetyylisilyylieettereiksi ja määritetään kapillaarikaasukromatografialla.

1 OSA

SAIPPUOITUMATTOMAN AINEKSEN ESIKÄSITTELY

1. SOVELTAMISALA

Tässä osassa kuvataan saippuoitumattoman aineksen valmistelu ja uuttaminen. Se kattaa myös oliiviöljystä ja oliivin puristemassaöljystä saadun saippuoitumattoman aineksen valmistelun ja uuttamisen.

2. PERIAATE

Näyte saippuoidaan keittämällä sitä palautusjäähdytintä käyttäen kaliumhydroksidin etanoliliuoksessa. Saippuoitumaton aines uutetaan dietyylieetterillä.

3. VÄLINEISTÖ

Tavallinen laboratoriovälineistö ja erityisesti seuraavat:

3.1 Pullo, 250 ml, jossa on hiotut lasiliitännät sekä palautusjäähdytin.

3.2 Erotussuppilo, 500 ml.

3.3 Pulloja, 250 ml.

3.4 Mikroruiskuja, 100 µl ja 500 µl.

3.5 Lasisintterisuodatinsuppilo, jonka huokoskoko on G 3 (15–40 µm), halkaisija noin 2 cm ja korkeus 5 cm ja jossa on liitäntä tyhjiösuodatusta varten sekä koirashios.

3.6 Erlenmeyerpullo, 50 ml, jossa on naarashios ja joka sopii suodatinsuppiloon (3.5).

3.7 Koeputki, 10 ml, jossa on kartiomainen pohja ja ilmatiivis lasitulppa.

3.8 Kalsiumkloridia sisältävä eksikaattori.

4. REAGENSSIT

4.1 Kaliumhydroksidi (vähintään 85 %).

4.2 Kaliumhydroksidin etanoliliuos, noin 2 M.

130 g kaliumhydroksidia (4.1) liuotetaan 200 ml:aan tislattua vettä samalla jäähdyttäen ja lisätään etanolia (4.7) niin, että liuosta on yksi litra. Liuosta säilytetään tiiviisti suljetuissa, tummissa lasipulloissa enintään kahden päivän ajan.

4.3 Etyylieetteri, analyysilaatua.

4.4 Vedetön natriumsulfaatti, analyysilaatua.

4.5 Asetoni, kromatografialaatua.

4.6 Etyylieetteri, kromatografialaatua.

4.7 Etanoli, analyysilaatua.

4.8 Etyyliasetaatti, analyysilaatua.

4.9 Sisäinen standardi, α-kolestanoli, puhtausaste yli 99 prosenttia (puhtausaste on tarkastettava kaasukromatografisella määrityksellä).

4.10 α-Kolestanoli, sisäisen standardin mukainen liuos, 0,2-prosenttisena (m/V) etyyliasetaattiluoksena (4.8).

4.11 Fenolftaleiini, 10 g liuotettuna litraan etanolia (4.7).

4.12 0,1-prosenttinen (m/V) 1-eikosanolin etyyliasetaattiliuos (sisäinen standardi).

5. SUORITUS

250 µl:n pulloon (3.1) lisätään 500 µl:n mikroruiskulla (3.4) sellainen tilavuusmäärä α-kolestanolin sisäisen standardin mukaista liuosta (4.10) ja 1-eikosanolia (4.12), jonka sisältämä kolestanolin ja eikosanolin määrä on noin 10 prosenttia sterolin ja alkoholin määrästä näytteessä. Esimerkiksi 5 gramman oliiviöljynäytteeseen lisätään 500 µl α-kolestanoliliuosta (4.10) ja 250 µl 1-eikosanoliliuosta (4.12). Oliivin puristemassaöljyä koskevaan näytteeseen lisätään 1 500 µl α-kolestanoliliuosta (4.10) ja 1 500 µl 1-eikosanoliliuosta (4.12). Haihdutetaan kuiviin kevyessä typpivirrassa lämpimässä vesihauteessa. Pullon jäähdyttyä punnitaan 5,00 ± 0,01 g kuivattua, suodatettua näytettä samaan pulloon.

Huomautus 1: Eläin- tai kasvirasvat ja -öljyt, jotka sisältävät paljon kolesterolia, voivat tuottaa piikin, jonka retentioaika on sama kuin kolestanolin. Jos käy näin, sterolifraktio on määritettävä kahdesti niin, että toisella kertaa käytetään sisäistä standardia ja toisella ei.

Lisätään 50 ml 2 M kaliumhydroksidin etanoliliuosta (4.2) ja hieman hohkakiveä, käynnistetään palautusjäähdytin ja kuumennetaan vesihauteessa hiljalleen kiehuvaksi koko ajan voimakkaasti sekoittaen, kunnes saippuoituminen on tapahtunut (liuos kirkastuu). Kuumentamista jatketaan vielä 20 minuuttia, sitten lisätään 50 ml tislattua vettä jäähdyttimen yläpäästä, irrotetaan jäähdytin ja jäähdytetään pullo noin 30 °C:n lämpötilaan.

Pullon sisältämä seos siirretään kvantitatiivisesti 500 ml:n erotussuppiloon (3.2) käyttämällä useita annoksia tislattua vettä (50 ml). Lisätään noin 80 ml etyylieetteriä (4.6), ravistetaan voimakkaasti noin 60 sekunnin ajan siten, että paine poistetaan ajoittain kääntämällä erotussuppilo ylösalaisin ja avaamalla tulppa. Annetaan seistä, kunnes kaksi faasia ovat täysin erottuneet (huomautus 2). Sen jälkeen saippualiuos otetaan mahdollisimman tarkoin toiseen erotussuppiloon. Vesi-alkoholifaasi uutetaan vielä kaksi kertaa samalla tavoin käyttämällä 60–70 ml etyylieetteriä (4.6).

Huomautus 2: Mahdollinen emulsio voidaan hajottaa lisäämällä pieniä määriä etanolia (4.7).

Yhdistetään saadut kolme eetteriuutetta yhteen erotussuppiloon, joka sisältää 50 ml vettä. Pestään vedellä (50 ml kerralla), kunnes pesuvesi ei enää saa vaaleanpunaista väriä, kun siihen lisätään tippa fenolftaleiiniliuosta (4.11). Kun pesuvesi on poistettu, suodatetaan vedettömän natriumsulfaatin (4.4) läpi etukäteen punnittuun 250 ml:n pulloon ja pestään suppilo ja suodatin pienillä määrillä etyylieetteriä (4.6).

Liuotin haihdutetaan haihduttimessa 30 °C:n lämpötilassa tyhjiössä. Lisätään 5 ml asetonia (4.5), ja haihtuva liuotin poistetaan kokonaan kevyessä typpivirrassa. Jäännöstä kuivatetaan lämpökaapissa 103 ± 2 °C:n lämpötilassa 15 minuutin ajan. Jäähdytetään eksikaattoreissa ja punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella.

2 OSA

ALKOHOLIYHDISTEIDEN FRAKTIOIDEN EROTTAMINEN

1. SOVELTAMISALA

Edellä olevan 1 osan mukaisesti valmisteltu saippuoitumaton aines fraktioidaan erilaisiksi alkoholiyhdisteiksi, alifaattisiksi alkoholeiksi, steroleiksi ja triterpeenidialkoholeiksi (erytrodioliksi ja uvaoliksi).

2. PERIAATE

Saippuoitumaton aines voidaan fraktioida emäksisten levyjen avulla ohutkerroskromatografialla (vertailumenetelmä) ja tehdä näkyväksi ja sitä vastaavat vyöhykkeet voidaan raaputtaa ja erottaa uuttamalla. Vaihtoehtoisena erotusmenetelmänä voidaan käyttää HPLC:tä silikageelikolonnissa ja UV-detektoria ja kerätä erilaiset fraktiot. Alifaattiset ja terpeenialkoholit sekä sterolit ja triterpeenidialkoholit eristetään yhdessä.

3. VÄLINEISTÖ

Tavallinen laboratoriovälineistö ja erityisesti seuraavat:

3.1 Ohutkerroskromatografialaitteisto, jonka lasilevyjen koko on 20 × 20 cm.

3.2 Ultraviolettivalo, jonka aallonpituus on 366 tai 254 nm.

3.3 Mikroruiskuja, 100 µl ja 500 µl.

3.4 Lasisintterisuodatinsuppilo, jonka huokoskoko on G 3 (15–40 µm), halkaisija noin 2 cm ja korkeus 5 cm ja jossa on liitäntä tyhjiösuodatusta varten sekä koirashios.

3.5 Erlenmeyerpullo, 50 ml, jossa on naarashios ja joka sopii suodatinsuppiloon (3.4).

3.6 Koeputki, 10 ml, jossa on kartiomainen pohja ja ilmatiivis lasitulppa.

3.7 Kalsiumkloridia sisältävä eksikaattori.

3.8 HPLC-järjestelmä, joka koostuu seuraavista osista:

3.8.1 Binääripumppu.

3.8.2 Manuaalinen tai automaattinen injektori, jossa on 200 µl:n injektiosilmukka.

3.8.3 Integroitu kaasunpoistaja.

3.8.4 UV/VIS- tai infrapunadetektori.

3.9 HPLC-laitteiston kolonni, (25 cm × 4 mm sisähalkaisija), silikageeli 60 (hiukkaskoko 5 µm).

3.10 Ruiskusuodatin, 0,45 µm.

3.11 Erlenmeyerpullo, 25 mL.

4. REAGENSSIT

4.1 Kaliumhydroksidi (vähintään 85 %).

4.2 Kaliumhydroksidin etanoliliuos, noin 2 M.

130 g kaliumhydroksidia (4.1) liuotetaan 200 ml:aan tislattua vettä samalla jäähdyttäen ja lisätään etanolia (4.9) niin, että liuosta on yksi litra. Liuosta säilytetään tiiviisti suljetuissa, tummissa lasipulloissa enintään kahden päivän ajan.

4.3 Etyylieetteri, analyysilaatua.

4.4 Kaliumhydroksidin etanoliliuos, noin 0,2 M.

Liuotetaan 13 g kaliumhydroksidia (4.1) 20 ml:aan tislattua vettä ja lisätään etanolia (4.9) niin, että liuosta on yksi litra.

4.5 Silikageelillä päällystetyt lasilevyt (20 × 20 mm), paksuudeltaan 0,25 mm, ilman fluoresenssi-indikaattoria (voidaan ostaa käyttövalmiina).

4.6 Asetoni, kromatografialaatua.

4.7 n-Heksaani, kromatografialaatua.

4.8 Etyylieetteri, kromatografialaatua.

4.9 Etanoli, analyysilaatua.

4.10 Etyyliasetaatti, analyysilaatua.

4.11 Ohutkerroskromatografian vertailuliuos: kolesteroli, fytosterolit, alkoholit ja erytrodiolin 5-prosenttinen liuos etyyliasetaatissa (4.10).

4.12 2,7-Dikloorifluoreseiini, 0,2-prosenttinen etanoliliuos. Liuos tehdään lievästi emäksiseksi lisäämällä muutama tippa kaliumhydroksidin 2 M alkoholiliuosta (4.2).

4.13 n-Heksaani (4.7)/etyylieetteri (4.8)-seos, 65:35 (V/V).

4.14 HPLC:n liikkuva faasi, n-heksaani (4.7)/etyylieetteri (4.8)-seos, 1:1 (V/V).

5. VERTAILUMENETELMÄ: ALKOHOLIYHDISTEIDEN EROTTAMINEN EMÄKSISELLÄ OHUTKERROSKROMATOGRAFIAN LEVYLLÄ

Emäksisten ohutkerroskromatografian levyjen valmistaminen. Upotetaan tai kastetaan silikageelilevyt (4.5) kokonaan kaliumhydroksidin 0,2 M etanoliliuokseen (4.4) kymmeneksi sekunniksi, minkä jälkeen niiden annetaan kuivua kaksi tuntia vetokaapissa ja lopuksi yksi tunti 100 °C:ssa lämpökaapissa.

Kun levyt on otettu lämpökaapista, niitä säilytetään kalsiumkloridia sisältävässä eksikaattorissa käyttöhetkeen saakka (näin käsitellyt levyt on käytettävä 15 päivän kuluessa).

Heksaani-etyylieetteriseos (4.13) (huomautus 3) kaadetaan kehitysastiaan siten, että sitä on noin 1 cm. Kehitysastia suljetaan sopivalla kannella ja annetaan seistä avaamatta viileässä paikassa vähintään puoli tuntia, jotta syntyy neste-höyrytasapaino. Astian sisäseinille voidaan kiinnittää suodatinpaperisuikaleita, jotka ulottuvat eluointiaineeseen. Tämä lyhentää kehitysaikaa lähes kolmanneksella ja aineosat eluoituvat tasaisemmin.

Huomautus 3: Kehitysliuos on vaihdettava uuteen ennen jokaista koetta, jotta eluointiolosuhteet olisivat täysin toistettavissa. Vaihtoehtoisesti liuottimena voidaan käyttää n-heksaani-etyylieetteriseosta (50:50, V/V).

Edellä olevan 1 osan mukaisesti valmistetusta saippuoitumattomasta aineksesta valmistetaan noin 5-prosenttinen liuos etyyliasetaattiin (4.10), jota levitetään 0,3 ml ohuena ja tasaisena nauhana 100 µl:n mikroruiskulla (3.3) kromatografialevyn (4.5) alareunaan (2 cm). Asetetaan 2–3 µl aineen vertailuliuosta (4.11) lähtöviivan tasalle niin, että sterolin, triterpeenidialkoholien ja alkoholien vyöhykkeet voidaan tunnistaa kehityksen jälkeen.

Levy asetetaan kehitysastiaan (3.1). Ympäristön lämpötilan on oltava 15–20 °C (huomautus 4). Astian kansi suljetaan heti ja levyn annetaan eluoitua, kunnes liuotinrintama on siirtynyt noin 1 cm:n päähän levyn yläreunasta. Levy otetaan kehitysastiasta ja liuotin haihdutetaan kuumassa ilmavirrassa tai panemalla levy joksikin aikaa vetokaappiin.

Huomautus 4: Korkeampi lämpötila voi haitata erotusta.

Levylle suihkutetaan ohuelti ja tasaisesti 2,7-dikloorifluoreseiiniliuosta (4.12), ja se jätetään kuivumaan. Sterolien, triterpeenidialkoholien ja alkoholien vyöhykkeet voidaan tunnistaa ultraviolettivalossa kohdistamalla ne vertailuliuoksesta (4.11) syntyneisiin pisteisiin. Vyöhykkeiden ääriviivat merkitään mustalla kynällä fluoresenssin rajoja seuraten (ks. kuvio 1, TLC-levy).

Silikageeli raaputetaan levystä irti metallilastalla merkityn alueen kohdalta. Saatu aines hienonnetaan ja siirretään suodatinsuppiloon (3.4). Lisätään 10 ml kuumaa etyyliasetaattia (4.10), sekoitetaan huolellisesti metallilastalla ja suodatetaan (tarvittaessa tyhjiössä). Suodos kerätään suodatinsuppiloon liitettyyn erlenmeyerpulloon (3.5).

Pulloon jäänyt aines pestään kolme kertaa noin 10 ml:lla etyylieetteriä (4.3), ja suodos kerätään samaan, suodatinsuppiloon liitettyyn pulloon. Suodosta haihdutetaan, kunnes sen tilavuus on noin 4–5 ml, ja jäännösliuos kaadetaan etukäteen punnittuun 10 ml:n koeputkeen (3.6). Liuosta kuivataan alhaisella lämmöllä kevyessä typpivirrassa; jäännös liuotetaan muutamaan tippaan asetonia (4.6) ja kuivataan jälleen. Koeputkessa olevan jäännös on steroli- ja triterpeenidialkoholifraktio tai alkoholi- ja triterpeenialkoholifraktio.

6. ALKOHOLIFRAKTION EROTUS HPLC:LLÄ

Saippuoitumaton aines, joka saatiin 1 osasta, liuotetaan 3 ml:aan liikkuvaa faasia (4.14), liuos suodatetaan ruiskusuodattimella (3.10) ja otetaan talteen.

200 µl suodatettua saippuoitumatonta liuosta injektoidaan HPLC-laitteistoon (3.8).

HPLC-erotus ajetaan virtauksella 0,8 ml/min, ensimmäiset 5 minuuttia jätetään huomiotta ja aikavälillä 5–10 minuuttia kerätään alifaattiset ja triterpeenialkoholit ja aikavälillä 11–25 minuuttia sterolit sekä erytrodioli ja uvaoli 25 ml:n erlenmeyerpulloihin (huomautus 5).

Erotusta voidaan seurata UV-detektorilla 210 nm:n aallonpituudella tai refraktioindeksidetektorilla (ks. kuva 6).

Fraktiot kuivataan haihduttamalla ja valmistellaan kromatografiamääritystä varten.

Huomautus 5: Valvokaa tarkoin HPLC-pumpun painetta, sillä etyylieetteri voi lisätä painetta, ja säätäkää virtausta paineen pitämiseksi valvonnassa.

3 OSA

ALKOHOLIYHDISTEIDEN FRAKTIOIDEN KAASUKROMATOGRAFINEN MÄÄRITYS

1. SOVELTAMISALA

Tässä osassa annetaan yleisohjeita kapillaarikaasukromatografian käyttöön, kun tarkoituksena on määrittää tämän menetelmän 2 osan mukaisesti eristettyjen alkoholiyhdisteiden koostumus kvalitatiivisesti ja kvantitatiivisesti.

2. PERIAATE

Saippuoitumattomasta aineksesta TLC:tä tai HPLC:tä käyttäen kerätyt fraktiot johdetaan trimetyylisilyylieettereihin ja määritetään sen jälkeen kapillaarikaasukromatografialla, jossa käytetään jakoinjektiota ja liekki-ionisaatiodetektoria.

3. VÄLINEISTÖ

Tavallinen laboratoriovälineistö ja erityisesti seuraavat:

3.1 Koeputki, 10 ml, jossa on kartiomainen pohja ja ilmatiivis lasitulppa.

3.2 Kaasukromatografi, jota käytetään kapillaarikolonnin ja jakoinjektiojärjestelmän kanssa ja jonka osat ovat

3.2.1 termostaattisäätöinen kolonniuuni, joka säilyttää halutun lämpötilan noin ± 1 °C:n tarkkuudella;

3.2.2 injektoriyksikkö, jonka lämpötilaa voi säätää ja jonka höyrystämisosa on persilanoitua lasia ja jossa on virtauksenjakojärjestelmä;

3.2.3 liekki-ionisaatiodetektori (FID);

3.2.4 tiedonkeruujärjestelmä, joka sopii käytettäväksi FID-detektorin kanssa (3.10.3) ja jonka voi integroida manuaalisesti.

3.3 Kvartsilasinen kapillaarikolonni, jonka pituus on 20–30 m ja sisähalkaisija 0,25–0,32 mm ja jonka sisäpinta on päällystetty yhdisteellä, jossa on 5 prosenttia bifenyyliä ja 95 prosenttia dimetyylipolysiloksaania (SE-52 tai SE-54, stationäärifaasi tai vastaava) siten, että päällysteen paksuus on kauttaaltaan 0,10–0,30 µm.

3.4 Jakoinjektioon sopiva kiinteäneulainen mikroruisku, 10 µl, kaasukromatografiaa varten.

4. REAGENSSIT

4.1 Vedetön pyridiini, kromatografialaatua.

4.2 Heksametyylidisilatsaani, analyysilaatua.

4.3 Trimetyylikloorisilaani, analyysilaatua.

4.4 Sterolien trimetyylisilyylieettereiden (TMSE) näyteliuokset. Ne valmistetaan vasta käyttöhetkellä steroleista ja erytrodiolista, jotka saadaan niitä sisältävistä öljyistä.

4.5 Alifaattisten C20–C28-alkoholien trimetyylisilyylieettereiden standardiliuokset. Ne valmistetaan puhtaiden alkoholien seoksista juuri ennen käyttöä.

4.6 Kantajakaasut: vety tai helium, kaasukromatografista laatua.

4.7 Apukaasut: vety, helium, typpi ja ilma, kaasukromatografista laatua.

4.8 Silylointireagenssi, jossa on pyridiiniä, heksametyylidisilatsaania ja trimetyylikloorisilaania tilavuussuhteessa 9:3:1 (V/V/V).

4.9 n-Heksaani, kromatografialaatua.

5. TRIMETYYLISILYYLIEETTEREIDEN VALMISTUS

Koeputkessa (3.1) olevaan alkoholiyhdisteen fraktioon lisätään 50 µl silylointireagenssia (4.8) (huomautus 6) jokaista koeputkessa olevaa alkoholiyhdisteen milligrammaa kohti niin, että kosteutta ei pääse mukaan (huomautus 7).

Huomautus 6: Käyttövalmiita liuoksia on kaupan. Saatavana on myös muita silylointireagensseja, kuten esim. bistrimetyylisilyylitrifluoriasetamidi + 1 % trimetyylikloorisilaani; reagenssi laimennetaan samalla määrällä vedetöntä pyridiiniä. Pyridiini voidaan korvata samalla määrällä asetonitriiliä.

Huomautus 7: Lievä sameus on tavallista eikä ole haitaksi. Valkoiset hiutaleet tai vaaleanpunaiseksi värjäytyminen ovat merkkejä kosteudesta tai reagenssien muuttumisesta. Jos näitä ilmenee, koe on uusittava (ainoastaan käytettäessä heksametyylidisilatsaania tai trimetyylikloorisilaania).

Koeputki (3.1) suljetaan tulpalla, ravistetaan varovasti (ei ylösalaisin), kunnes yhdisteet ovat täysin liuenneet. Annetaan seistä vähintään 15 minuuttia huoneenlämmössä ja sentrifugoidaan sitten muutaman minuutin ajan. Kirkas liuos on nyt valmis kaasukromatografista määritystä varten.

6. KAASUKROMATOGRAFINEN MÄÄRITYS

6.1 Esivalmistelut ja kapillaarikolonnin valmistelu

Kolonni (3.3) asennetaan kaasukromatografialaitteistoon kiinnittämällä kolonnin alkupää jakoinjektoriin ja kolonnin loppupää detektoriin.

Tarkistetaan kaasukromatografisten laitteiden toiminta (kaasuliitännän tiiviys, detektorin, virtauksenjakojärjestelmän ja piirturin toimivuus jne.).

Jos kapillaarikolonnia ei ole aikaisemmin käytetty, se on ensin valmisteltava käyttöön. Pieni määrä kaasua johdetaan kolonnin läpi, käynnistetään kaasukromatografi ja aloitetaan asteittainen lämmittäminen, jota jatketaan, kunnes lämpötila on kohonnut vähintään 20 °C korkeammaksi kuin käyttölämpötila (huomautus 8). Korkeaa lämpötilaa pidetään yllä vähintään kaksi tuntia, minkä jälkeen kromatografialaitteisto saatetaan käyttövalmiiksi (kaasuvirtojen ja jaon säätö, liekinsytytys, tietojärjestelmään kytkeminen, kolonnin, detektorin ja injektorin lämpötilan säätö jne.) ja signaalia rekisteröidään herkkyydellä, joka on vähintään kaksi kertaa niin suuri kuin määrityksessä käytettävä. Saadun perusviivan on oltava suora, eikä siinä saa olla minkäänlaisia piikkejä eikä siirtymää mihinkään suuntaan. Jos ilmenee negatiivista suoraviivaista siirtymää, se on merkki kolonnin liitäntöjen vuodosta, ja jos ilmenee positiivista siirtymää, se johtuu kolonnin riittämättömästä valmistelusta.

Huomautus 8: Esivalmistelulämpötilan on aina oltava vähintään 20 °C alempi kuin käytettävä stationäärifaasin korkein lämpötila.

6.2 Käyttöolosuhteet

Optimoidaan lämpötilaohjelma ja kantajakaasun virtaus siten, että saadaan kuvien 3–6 kaltaiset kromatogrammit.

Seuraavat parametrit testattiin ja todettiin käyttökelpoisiksi:

6.2.1 Alifaattiset alkoholit

Uunin lämpötilaohjelma	180 °C (8 min) → 260 °C (5 °C/min) → 260 °C (15 min)
Injektorin lämpötila	280 °C
Detektorin lämpötila	290 °C
Kantajakaasun lineaarinopeus	helium (20–30 cm/s); vety (30–50 cm/s)
Jakosuhde	1:50–1:100
Injektiotilavuus	0,5–1 µl trimetyylisilyylieetteriliuosta (TMSE)

6.2.2 Sterolit ja triterpeenidialkoholit

Uunin lämpötilaohjelma	260 ± 5 °C isoterminen
Injektorin lämpötila	280–300 °C
Detektorin lämpötila	280–300 °C
Kantajakaasun lineaarinopeus	helium (20–30 cm/s); vety (30–50 cm/s)
Jakosuhde	1:50–1:100
Injektiotilavuus	0,5–1 µl trimetyylisilyylieetteriliuosta (TMSE)

Näitä olosuhteita voidaan muuttaa kolonnin ja kaasukromatografin ominaisuuksien mukaan siten, että saadaan seuraavat vaatimukset täyttävät kromatogrammit:

— C26-alkoholin retentioaika on 18 ± 5 minuuttia.

— C22-alkoholin piikki on 80 ± 20 % täydestä asteikosta oliiviöljylle ja 40 ± 20 % täydestä asteikosta oliivin puristemassaöljylle.

— β-sitosterolin piikin retentioaika on 20 ± 5 minuuttia.

— kampesterolin piikki: oliiviöljylle (pitoisuus keskimäärin 3 %) 20 ± 5 % täydestä asteikosta.

— kaikki mukana olevat sterolit on erotettava. Lisäksi kunkin piikin jälkeen piirturin tulee palata perusviivalle ennen uuden piikin alkua. Tämä ei ole kuitenkaan tarpeen, jos suhteellisen retentioajan (RRT) 1,02 piikki (sitostanoli) pystytään mittaamaan kohtisuoraan.

6.3 Määritys

Imetään 10 µl:n mikroruiskuun (3.4) 1 µl heksaania, sitten 0,5 µl ilmaa ja tämän jälkeen 0,5–1 µl näyteliuosta; lopuksi männällä vedetään vielä neula tyhjäksi. Neula työnnetään septumin läpi injektoriin ja 1–2 sekunnin kuluttua seos injektoidaan nopeasti, odotetaan noin viisi sekuntia, minkä jälkeen neula vedetään pois hitaasti. Myös automaattista injektoria voidaan käyttää.

Rekisteröintiä jatketaan, kunnes näytteessä olevien vastaavien alkoholiyhdisteiden TMSE on kokonaan eluoitunut. Perusviivan on koko ajan oltava vastaavien käyttöolosuhteiden vaatimusten mukainen (6.2.1 tai 6.2.2).

6.4 Piikkien tunnistaminen

Yksittäiset piikit tunnistetaan retentioaikojen perusteella sekä vertaamalla samoissa olosuhteissa määritettyyn alifaattisten ja triterpeenialkoholien tai sterolien ja triterpeenidialkoholien TMSE-seokseen. Alifaattisten ja triterpeenialkoholien fraktion kromatogrammi esitetään kuviossa 3, ja vastaavat kromatogrammit sterolien ja triterpeenidialkoholien osalta esitetään kuviossa 2.

Alifaattiset alkoholit eluoituvat seuraavassa järjestyksessä: C20-oli (I.S.), C22-oli, C23-oli, C24-oli, C25-oli, C26-oli, C27-oli ja C28-oli.

Sterolit ja triterpeenidialkoholit eluoituvat seuraavassa järjestyksessä: kolesteroli, brassikasteroli, ergosteroli, 24-metyleenikolesteroli, kampesteroli, kampestanoli, stigmasteroli, δ-7-kampesteroli, δ-5,23-stigmastadienoli, klerosteroli, β-sitosteroli, sitostanoli, δ-5-avenasteroli, δ-5,24-stigmastadienoli, δ-7-sigmastenoli, δ-7-avenasteroli, erytrodioli ja uvaoli.

6.5 Kvantitatiivinen arviointi

1-eikosanolin ja C22, C24, C26 ja C28 alifaattisten alkoholien piikkien pinta-alat lasketaan tiedonkeruujärjestelmän avulla. 1-eikosanolin vastekerroin on 1.

Lasketaan α-kolestanolin sekä sterolien ja triterpeenidialkoholien piikkien pinta-alat tietojärjestelmän avulla. Sellaisten aineiden piikit jätetään huomiotta, jotka eivät esiinny taulukossa 1 (ergosterolin piikkiä ei lasketa). α-Kolestanolin vastekerroin on 1.

Lasketaan kunkin yksittäisen alkoholiyhdisteen pitoisuus mg/kg:ssa rasvaa tai öljyä seuraavalla kaavalla:

$$Alkoholiyhdiste\ x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

jossa:

A_x = alkoholiyhdisteen x piikin pinta-ala, tietojärjestelmällä laskettuna;

A_s = 1-eikosanolin/α-kolestanolin piikin pinta-ala, tietojärjestelmällä laskettuna;

m_s = lisätyn 1-eikosanolin/α-kolestanolin massa milligrammoina;

m = määritykseen käytetyn näytteen massa grammoina.

7. TULOSTEN ESITTÄMINEN

Ilmoitetaan yksittäisten alifaattisten ja triterpeenialkoholien pitoisuudet mg/kg:ssa rasvaa tai öljyä ja niiden pitoisuuksien yhteismäärä, ”alifaattisen alkoholin kokonaismäärä”. Kokonaismäärä on C22, C24, C26 ja C28 alifaattisten alkoholien yhteenlaskettu määrä.

Kunkin yksittäisen alkoholiyhdisteen pitoisuus ilmaistaan yhden desimaalin tarkkuudella.

Kokonaissterolipitoisuus ilmaistaan kokonaislukuna.

Lasketaan yksittäisen sterolin prosenttiosuus sitä vastaavan piikin suhteellisena osuutena kaikkien sterolipiikkien yhteenlasketusta pinta-alasta:

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

jossa:

A_x = sterolin x piikin pinta-ala;

ΣA = kaikkien sterolien piikkien yhteenlaskettu pinta-ala.

Näennäinen β-sitosterolipitoisuus: δ-5-23-stigmastadienoli + klerosteroli + β-sitosteroli + sitostanoli + δ-5-avenasteroli + δ-5-24-stigmastadienoli.

Lasketaan erytrodiolin ja uvaolin prosenttiosuus:

$$Erytrodioli + \ uvaoli = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

jossa:

A_{Er} = erytrodiolin pinta-ala, tietojärjestelmällä laskettuna;

A_{Uv} = uvaolin pinta-ala, tietojärjestelmällä laskettuna;

Σ_{AT} = sterolin + erytrodiolin + uvaolin kokonaispinta-ala, tietojärjestelmällä laskettuna.

Yksittäisten sterolien ja triterpeenidialkoholien suhteellisen prosenttiosuuden sekä sterolien kokonaispitoisuuden lisäksi on laskettava erytrodiolin ja uvaolin pitoisuudet sekä niiden summa mg/kg:ssa rasvaa tai öljyä seuraavasti:

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

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

jossa:

A_{Er} = erytrodiolin piikin pinta-ala, tietojärjestelmällä laskettuna;

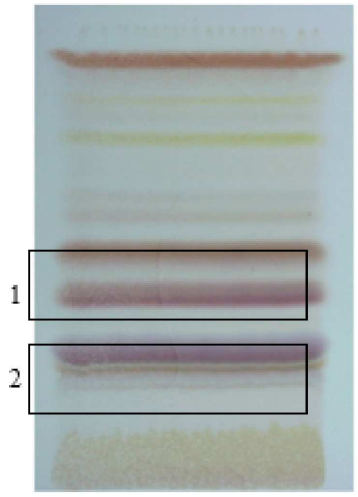
A_{Uv} = uvaolin pinta-ala, tietojärjestelmällä laskettuna;

A_s = α-kolestanolin piikin pinta-ala, tietojärjestelmällä laskettuna;

m_s = lisätyn α-kolestanolin massa milligrammoina;

m = määritykseen käytetyn näytteen massa grammoina.

Lisäys



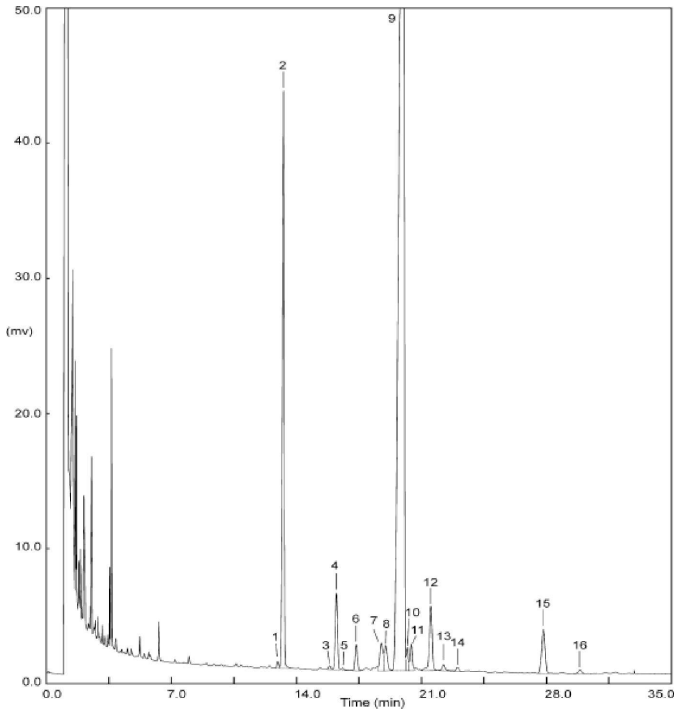
1 Hiilivedyt
2 α-Tokoferoli
3 Prenolit
4 Triterpeenialkoholit
5 Alifaattiset alkoholit
6 Metyylisterolit
7 Sterolit
8 Triterpeenidialkoholit

Kuvio 1 – TLC oliivin puristemassaöljyn saippuoitumattomasta osasta; eluoitu kahdesti heksaani-dietyylieetteriseoksella (65:35), kehitetty SO4H2:lla (50 %) ja kuumennettu. Raaputettavat vyöhykkeet näkyvät kuviossa suorakulmioina, 1 on alifaattisten alkoholien vyöhykkeet ja 2 sterolien ja triterpeenidialkoholien vyöhykkeet.

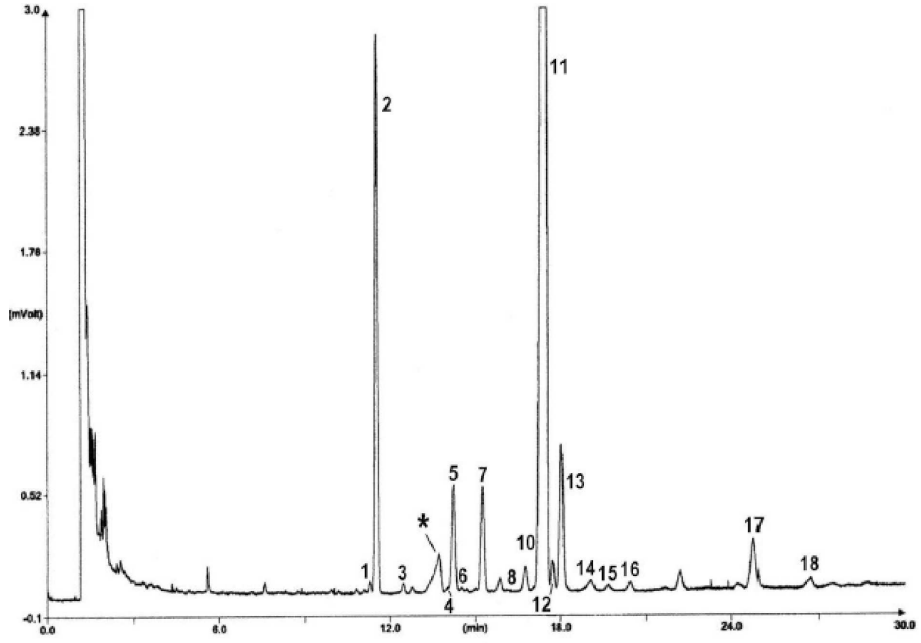
Taulukko I – Sterolien suhteelliset retentioajat

Piikki	Nimi		Suhteellinen retentioaika	
			Kolonni SE 54	Kolonni SE 52
1	kolesteroli	δ-5-kolesteeni-3-β-oli	0,67	0,63
2	kolestanoli	5-α-kolestaani-3-ß-oli	0,68	0,64
3	brassicasteroli	[24S]-24-metyyli-δ-5,22-kolestadieeni-3-ß-oli	0,73	0,71
*	ergosteroli	[24S]-24-metyyli-δ-5,7,22-kolestatrieeni-3-ß-oli	0,78	0,76
4	24-metyleenikolesteroli	24-metyleeni-δ-5,24-kolestadieeni-3-ß-oli	0,82	0,80
5	kampesteroli	(24R)-24-metyyli-δ-5-kolesteeni-3-ß-oli	0,83	0,81
6	kampestanoli	(24R)-24-metyyli-δ-5-kolestaani-3-ß-oli	0,85	0,82
7	stigmasteroli	(24S)-24-etyyli-δ-5,22-kolestadieeni-3-ß-oli	0,88	0,87
8	δ-7-kampesteroli	(24R)-24-metyyli-δ-7-kolesteeni-3-ß-oli	0,93	0,92
9	δ-5,23-stigmastadienoli	(24R,S)-24-etyyli-δ-5,23-kolestadieeni-3-ß-oli	0,95	0,95
10	klerosteroli	(24S)-24-etyyli-δ-5,25-kolestadieeni-3-ß-oli	0,96	0,96

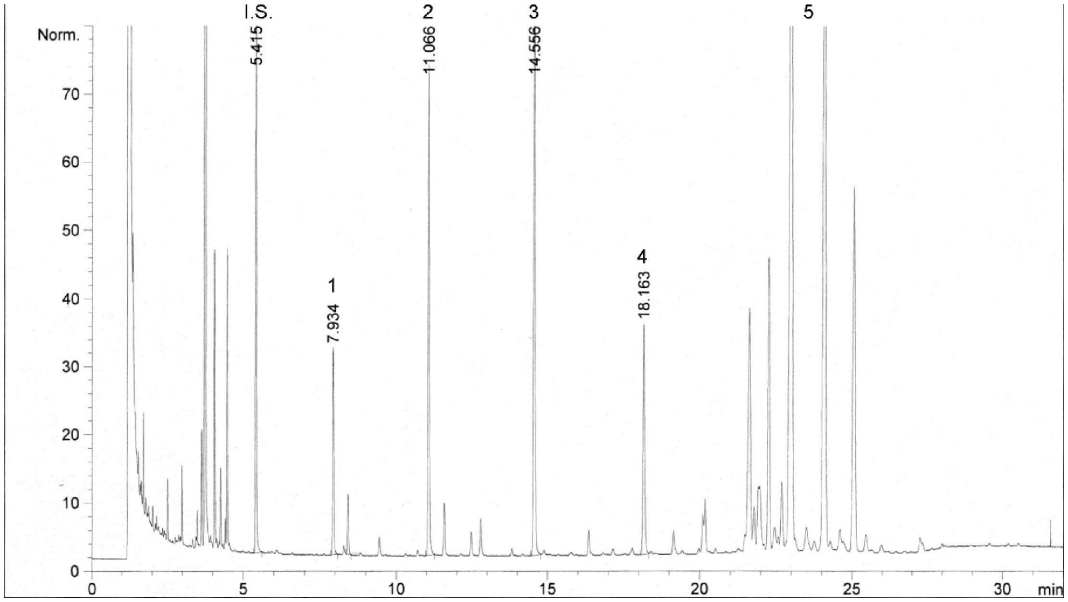
Piikki	Nimi		Suhteellinen retentioaika	
			Kolonni SE 54	Kolonni SE 52
11	ß-sitosteroli	(24R)-24-etyyli-δ-5-kolesteeni-3-ß-oli	1,00	1,00
12	sitostanoli	24-etyyli-kolestaani-3-ß-oli	1,02	1,02
13	δ-5-avenasteroli	(24Z)-24-etylideeni-δ-5-kolesteeni-3-ß-oli	1,03	1,03
14	δ-5,24-stigmastadienoli	(24R,S)-24-etyyli-δ-5,24-kolestadieeni-3-ß-oli	1,08	1,08
15	δ-7-stigmastenoli	(24R,S)-24-etyyli-δ-7-kolesteeni-3-ß-oli	1,12	1,12
16	δ-7-avenasteroli	(24Z)-24-etylideeni-δ-5-kolesteeni-3-ß-oli	1,16	1,16
17	erytrodioli	5-α-oleaani-12-eeni-3-β-28-dioli	1,41	1,41
18	uvaoli	δ-12-urseeni-3-β-28-dioli	1,52	1,52



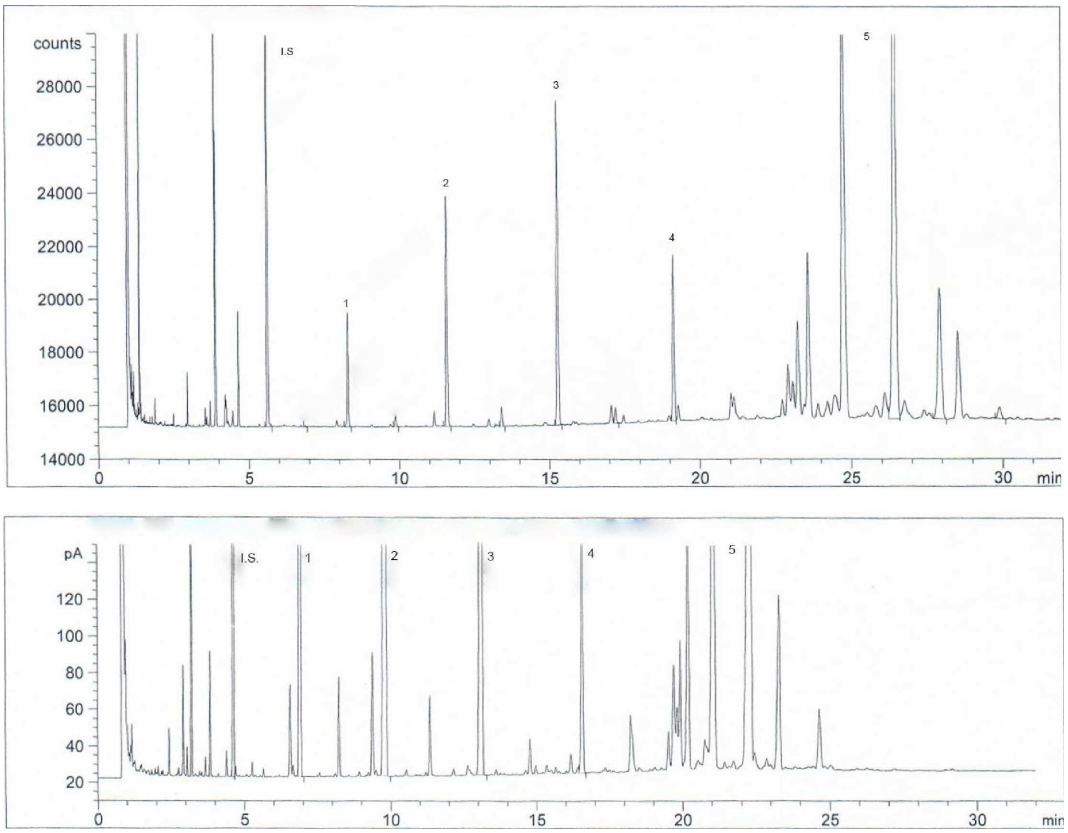
Kuvio 2. GC–FID-kromatografinen profiili jalostetusta oliiviöljystä saaduista sterolista ja triterpeenidialkoholeista. 1) kolesteroli, 2) α-kolestanoli (I.S.), 3) 24-metyleenikolesteroli, 4) kampesteroli, 5) kampestanoli, 6) stigmasteroli, 7) δ-5,23-stigmastadienoli, 8) klerosteroli, 9) β-sitosteroli, 10) sitostanoli, 11) δ-5-avenasteroli, 12) δ-5,24-stigmastadienoli, 13) δ-7-stigmastenoli, 14) δ-7-avenasteroli, 15) erytrodioli, 16) uvaoli.



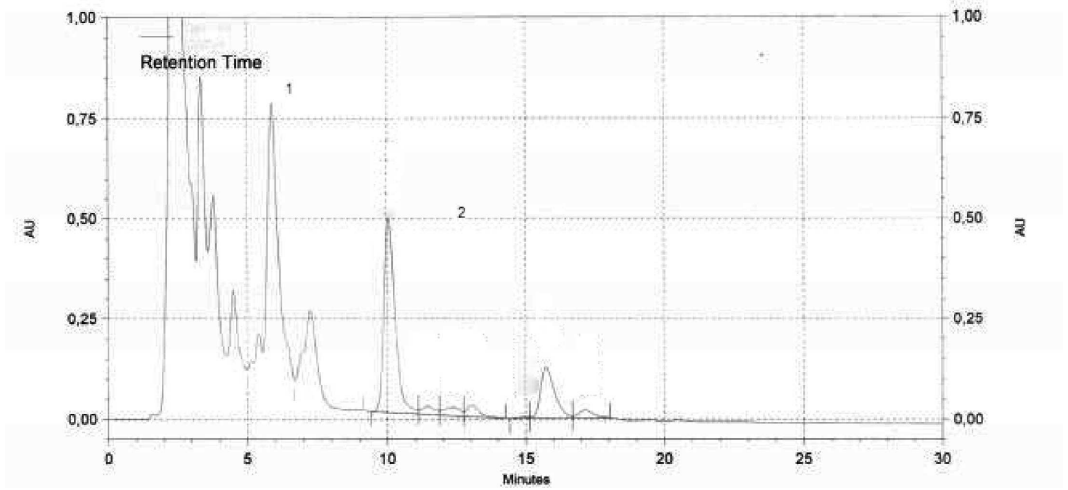
Kuvio 3. GC–FID-kromatografinen profiili lamppuoliiviöljystä saaduista sterolista ja triterpeenidialkoholeista. 1) kolesteroli, 2) α-kolestanoli, 3) brassicasteroli, 4) 24-metyleenikolesteroli, 5) kampesteroli, 6) kampestanoli, 7) stigmasteroli, 8) δ-7-kampesteroli, 9) δ-5,23-stigmastadienoli, 10) klerosteroli, 11) β-sitosteroli, 12) sitostanoli, 13) δ-5-avenasteroli, 14) δ-5,24-stigmastadienoli, 15) δ-7-stigmastenoli, 16) δ-7-avenasteroli, 17) erytrodioli, 18) uvaoli.



Kuvio 4. GC–FID-kromatografinen profiili oliiviöljystä saaduista alifaattisista alkoholeista ja triterpeenialkoholeista. (I.S.) C20-oli, 1) C22-oli, 2) C24-oli, 3) C26-oli, 4) C28-oli, 5) triterpeenialkoholit.



Kuvio 5. GC–FID-kromatografinen profiili jalostetusta oliiviöljystä ja toisen sentrifugoinnin oliiviöljystä saaduista alifaattisista alkoholeista ja triterpeenialkoholeista. (I.S.) C20-oli, 1) C22-oli, 2) C24-oli, 3) C26-oli, 4) C28-oli, 5) triterpeenialkoholit.



Kuvio 6. HPLC-kromatogrammi oliiviöljystä, erotettu saippuoitumatta HLPC:llä UV-detektoria käyttäen. 1) Alifaattiset ja triterpeenialkoholit 2) Sterolit ja triterpeenidialkoholit.”