PROVEDBENA UREDBA KOMISIJE (EU) 2019/1604

od 27. rujna 2019.

o izmjeni Uredbe (EEZ) br. 2568/91 o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize

EUROPSKA KOMISIJA,

uzimajući u obzir Ugovor o funkcioniranju Europske unije,

uzimajući u obzir Uredbu (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća od 17. prosinca 2013. o uspostavljanju zajedničke organizacije tržišta poljoprivrednih proizvoda i stavljanju izvan snage uredbi Vijeća (EEZ) br. 922/72, (EEZ) br. 234/79, (EZ) br. 1037/2001 i (EZ) br. 1234/2007 ([1]), a posebno njezin članak 91. prvi stavak točku (d),

budući da:

(1) Uredbom Komisije (EEZ) br. 2568/91 ([2]) definirana su fizičko-kemijska i organoleptička svojstva maslinova ulja i ulja komine maslina te su propisane metode za ocjenjivanje tih svojstava.

(2) Metode i granične vrijednosti za svojstva ulja redovito se ažuriraju na temelju mišljenja kemijskih stručnjaka i u skladu s radom koji se obavlja u okviru Međunarodnog vijeća za masline (IOC).

(3) Kako bi se na razini Unije osigurala provedba najnovijih međunarodnih normi koje je utvrdio IOC, trebalo bi ažurirati određene metode analize utvrđene u Uredbi (EEZ) br. 2568/91.

(4) Trgovinska norma IOC-a izmijenjena je u pogledu izražavanja graničnih vrijednosti slobodne kiselosti, peroksidnog broja, organoleptičkog ocjenjivanja (medijan mana i medijan svojstva voćnosti) i razlike između ECN42 (HPLC) i ECN42 (teoretski izračun) radi usklađenosti s vrijednostima preciznosti u okviru metode analize.

(5) U skladu s člankom 2.a stavkom 5. Uredbe (EEZ) br. 2568/91 države članice provjeravaju sukladnost uzorka maslinova ulja s deklariranom kategorijom provjerom svojstava utvrđenih u Prilogu I. toj uredbi bilo kojim redoslijedom ili slijedeći redoslijed utvrđen u Prilogu I.b na shemi odlučivanja.

(6) S obzirom na nedavne promjene, prikladno je ažurirati tablice iz Priloga I.b Uredbi (EEZ) br. 2568/91 i, prema potrebi, njegov dodatak. Čini se i da je s obzirom na sadržaj tog Priloga I.b prikladnije upotrebljavati termin „dijagram toka” umjesto termina „shema odlučivanja”.

(7) U točki 9.4. Priloga XII. Uredbi (EEZ) br. 2568/91 medijan mana definiran je kao medijan mane koja se osjeća najvećim intenzitetom. U kontekstu protuocjenjivanja i s obzirom na to da različite komisije moraju procijeniti sukladnost ulja, trebalo bi pojasniti da se odluka o sukladnosti svojstava određenog ulja s deklariranom kategorijom odnosi isključivo na vrijednost medijana glavne mane, bez obzira na njezinu vrstu.

(8) Uredbu (EEZ) br. 2568/91 trebalo bi stoga na odgovarajući način izmijeniti.

(9) Mjere predviđene ovom Uredbom u skladu su s mišljenjem Odbora za zajedničku organizaciju poljoprivrednih tržišta,

DONIJELA JE OVU UREDBU:

Članak 1.

Uredba (EEZ) br. 2568/91 mijenja se kako slijedi:

(1) Članak 2. mijenja se kako slijedi:

(a) stavak 1. točka (l) zamjenjuje se sljedećim:

„(l) za određivanje sastava i sadržaja sterola i za određivanje alkoholnih spojeva kapilarnom plinskom kromatografijom, metoda utvrđena u Prilogu XIX.”;

([1]) SL L 347, 20.12.2013., str. 671.
([2]) Uredba Komisije (EEZ) br. 2568/91 od 11. srpnja 1991. o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize (SL L 248, 5.9.1991., str. 1.).

(b) stavak 2. treći podstavak zamjenjuje se sljedećim:

„Ako komisija ne potvrdi deklariranu kategoriju u vezi s organoleptičkim svojstvima, na zahtjev zainteresirane strane nacionalna tijela ili njihovi predstavnici odmah obavljaju dva protuocjenjivanja koja provode ostale odobrene komisije. Najmanje je jedna od njih komisija koju je odobrila predmetna država članica proizvođač. Predmetna se svojstva smatraju sukladnima s deklariranim svojstvima ako se tim dvama protuocjenjivanjima potvrdi deklarirana kategorija. Ako to nije slučaj, bez obzira na vrstu mana utvrđenih tijekom protuocjenjivanja, kategorija se proglašava nesukladnom sa svojstvima i zainteresirana strana odgovorna je za trošak protuocjenjivanjâ.”;

(2) U članku 2.a stavku 5. točka (b) zamjenjuje se sljedećim:

„(b) slijedeći redoslijed utvrđen u dijagramu toka u Prilogu I.b, sve dok se ne postigne jedna od odluka iz dijagrama toka.”;

(3) tablica „PRILOZI Sadržaj” zamjenjuje se tablicom iz Priloga I. ovoj Uredbi;

(4) Prilog I. zamjenjuje se tekstom iz Priloga II. ovoj Uredbi;

(5) U Prilogu I.a točka 2.1. zamjenjuje se sljedećim:

„2.1 Svaki primarni uzorak mora se podijeliti na laboratorijske uzorke, u skladu s točkom 2.5. norme EN ISO 5555, i analizirati prema redoslijedu prikazanom na dijagramu toka iz Priloga I.b ili bilo kojim drugim nasumičnim redoslijedom.”;

(6) Prilog I.b zamjenjuje se tekstom iz Priloga III. ovoj Uredbi;

(7) Prilog V. briše se;

(8) U Prilogu VII. točka 4.2. zamjenjuje se sljedećim:

„4.2 n-heksan (kromatografski stupanj). Heksan se može zamijeniti izo-oktanom (2,2,4-trimetilpentan u kromatografskom stupnju) pod uvjetom da se postignu usporedive vrijednosti preciznosti.”;

(9) Prilog XII. mijenja se u skladu s Prilogom IV. ovoj Uredbi;

(10) Prilog XVII. mijenja se u skladu s Prilogom V. ovoj Uredbi;

(11) Prilog XVIII. mijenja se u skladu s Prilogom VI. ovoj Uredbi;

(12) Prilog XIX. zamjenjuje se tekstom iz Priloga VII. ovoj Uredbi;

(13) U Prilogu XX. točka 4.2. zamjenjuje se sljedećim:

„4.2 n-heksan, kromatografski stupanj ili stupanj ostatka. Heksan se može zamijeniti izo-oktanom (2,2,4-trimetilpentan u kromatografskom stupnju) pod uvjetom da se postignu usporedive vrijednosti preciznosti. Otapala s vrelištem višim od vrelišta n-heksana dulje isparavaju. Međutim, daje im se prednost zbog toksičnosti heksana. Mora se provjeriti čistoća; na primjer, mogu se provjeriti ostatci nakon isparavanja 100 ml otapala.

UPOZORENJE – Para se može zapaliti. Držite se podalje od izvora topline, iskrenja ili golog plamena. Uvijek provjerite jesu li boce dobro zatvorene. Osigurajte pravilno provjetravanje tijekom uporabe. Treba izbjegavati nakupljanje pare i otkloniti eventualne ugroze od požara, kao što su grijači ili električni aparati koji nisu proizvedeni od nezapaljivog materijala. Opasno je ako se para udiše jer može izazvati oštećenje živčanih stanica. Treba izbjegavati udisanje pare. Ako je potrebno, koristite odgovarajuće aparate za disanje. Treba izbjegavati dodir s očima i kožom.

Izo-oktan zapaljiva je tekućina i predstavlja opasnost od požara. Granične vrijednosti eksplozivnosti u zraku iznose od 1,1 % do 6,0 % (volumni udjel). Toksičan je pri gutanju i udisanju. Pri radu s ovim otapalom upotrebljavajte ventilacijski sustav u dobrom stanju.”

Članak 2.

Ova Uredba stupa na snagu dvadesetog dana od dana objave u *Službenom listu Europske unije*.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje u svim državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 27. rujna 2019.

Za Komisiju
Predsjednik
Jean-Claude JUNCKER

PRILOG I.

„*PRILOZI*

SADRŽAJ

Prilog I.	Svojstva maslinova ulja
Prilog I.a	Uzorkovanje ulja od ploda ili komine maslina koje se dostavlja u unutarnjem pakiranju
Prilog I.b	Dijagram toka za provjeru usklađenosti uzorka maslinova ulja s deklariranom kategorijom
Prilog II.	Određivanje slobodnih masnih kiselina, hladna metoda
Prilog III.	Određivanje peroksidnog broja
Prilog IV.	Određivanje sadržaja voska kapilarnom plinskom kromatografijom
Prilog VII.	Određivanje postotka 2-gliceril monopalmitata
Prilog IX.	Spektrofotometrijsko ispitivanje u ultraljubičastom području
Prilog X.	Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom
Prilog XI.	Određivanje hlapivih halogeniranih otapala u maslinovu ulju
Prilog XII.	Postupak međunarodnog vijeća za masline za organoleptičko ocjenjivanje djevičanskog maslinova ulja
Prilog XV.	Sadržaj ulja u komini maslina
Prilog XVI.	Određivanje jodnog broja
Prilog XVII.	Metoda za određivanje stigmastadiena u biljnim uljima
Prilog XVIII.	Određivanje razlike između stvarne i teoretske količine triacilglicerola s ECN 42
Prilog XIX.	Određivanje sastava i sadržaja sterola i alkoholnih spojeva kapilarnom plinskom kromatografijom
Prilog XX.	Metoda određivanja sadržaja voskova, metil estera masnih kiselina i etil estera masnih kiselina kapilarnom plinskom kromatografijom
Prilog XXI.	Rezultati provjera sukladnosti provedenih na maslinovim uljima iz članka 8. stavka 2.”

PRILOG II.

„*PRILOG I.*

SVOJSTVA MASLINOVA ULJA

Svojstva kvalitete

Kategorija	Kiselost (%) (*)	Peroksidni broj (mEq O_2/kg)	K_{232}	K_{268} ili K_{270}	Delta-K	Organoleptičko ocjenjivanje		Etil esteri masnih kiselina (mg/kg)
						Medijan mana (Mm) (*)	Medijan voćnosti (Mv)	
1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Mm = 0,0	Mv > 0,0	≤ 35
2. Djevičansko maslinovo ulje	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Mm ≤ 3,5	Mv > 0,0	—
3. Maslinovo ulje lampante	> 2,0	—	—	—	—	Mm > 3,5 (1)	—	—
4. Rafinirano maslinovo ulje	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Maslinovo ulje koje se sastoji od rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Sirovo ulje komine maslina	—	—	—	—	—		—	—
7. Rafinirano ulje komine maslina	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Ulje komine maslina	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

(1) Medijan mana može biti 3,5 ili manji ako je medijan voćnosti jednak 0,0.

Svojstva čistoće

Kategorija	Sastav masnih kiselina (1)						Ukupni transoleinski izomeri (%)	Ukupni translinolni i translinolenski izomeri (%)	Stigmastadieni (mg/kg) (2)	Razlika: ECN42 (HPLC) i ECN42 (teoretski izračun)	2-gliceril monopalmitat (%)
	Miristinska (%)	Linolenska (%)	Arahinska (%)	Eikozenska (%)	Behenska (%)	Lignocerinska (%)					
1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9 ako je ukupni udio palmitinske kiseline ≤ 14,00 % ≤ 1,0 ako je ukupni udio palmitinske kiseline > 14,00 %
2. Djevičansko maslinovo ulje	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9 ako je ukupni udio palmitinske kiseline ≤ 14,00 % ≤ 1,0 ako je ukupni udio palmitinske kiseline > 14,00 %
3. Maslinovo ulje lampante	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ |0,30|	≤ 0,9 ako je ukupni udio palmitinske kiseline ≤ 14,00 % ≤ 1,1 ako je ukupni udio palmitinske kiseline > 14,00 %
4. Rafinirano maslinovo ulje	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9 ako je ukupni udio palmitinske kiseline ≤ 14,00 % ≤ 1,1 ako je ukupni udio palmitinske kiseline > 14,00 %
5. Maslinovo ulje koje se sastoji od rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9 ako je ukupni udio palmitinske kiseline ≤ 14,00 % ≤ 1,0 ako je ukupni udjel palmitinske kiseline > 14,00 %
6. Sirovo ulje komine maslina	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ |0,60|	≤ 1,4
7. Rafinirano ulje komine maslina	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,4
8. Ulje komine maslina	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,2

(1) Sadržaj drugih masnih kiselina (%): palmitinska: 7,50–20,00; palmitoleinska: 0,30–3,50; heptadekanska: ≤ 0,40; heptadecenska ≤ 0,60; stearinska: 0,50–5,00; oleinska: 55,00–83,00; linolna: 2,50–21,00.

(2) Ukupni izomeri koji bi se mogli (ili ne) odijeliti kapilarnom kolonom.

Kategorija	Sastav sterola						Ukupni steroli (mg/kg)	Eritrodiol i uvaol (%) (**)	Voskovi (mg/kg) (**)
	Kolesterol (%)	Brasikasterol (%)	Kampesterol (1) (%)	Stigmasterol (%)	App β-sitosterol (2) (%)	Delta-7-stigmastenol (1) (%)			
1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Djevičansko maslinovo ulje	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥> 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Maslinovo ulje 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. Rafinirano maslinovo ulje	≤ 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. Maslinovo ulje koje se sastoji od rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja	≤ 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. Sirovo ulje komine maslina	≤ 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. Rafinirano ulje komine maslina	≤ 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. Ulje komine maslina	≤ 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) Vidjeti Dodatak ovom Prilogu.

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

(3) Ulja s udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se maslinovim uljima lampante ako je ukupni udjel alifatskih alkohola 350 mg/kg ili manji ili ako je udio eritrodiola i uvaola 3,5 % ili manji.

(4) Ulja s udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se sirovim uljima komine maslina ako je ukupni udio alifatskih alkohola iznad 350 mg/kg i ako je udio eritrodiola i uvaola veći od 3,5 %.

Napomene:

(a) Rezultati analiza moraju biti izraženi onim brojem decimalnih mjesta kojim je izražena granična vrijednost za pojedino svojstvo. Zadnja znamenka mora se uvećati za jednu jedinicu ako je znamenka koja slijedi veća od 4.

(b) Ako najmanje jedno od svojstava ne odgovara navedenim vrijednostima, za potrebe ove Uredbe kategorija ulja može se promijeniti ili se ulje može deklarirati kao nesukladno.

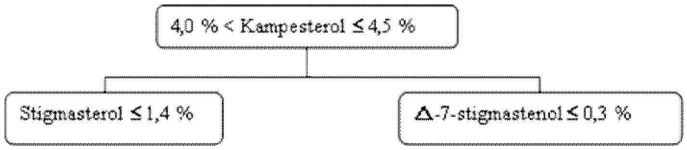
(c) U slučaju maslinovog ulja lampante oba se svojstva kvalitete označena zvjezdicom (*) mogu istodobno razlikovati od graničnih vrijednosti utvrđenih za tu kategoriju.

(d) Ako je svojstvo označeno s dvije zvjezdice (**), to znači da je za sirovo ulje komine maslina moguće da se istodobno obje relevantne granične vrijednosti razlikuju od navedenih vrijednosti. U slučaju ulja komine maslina i rafiniranog ulja komine maslina, jedna od relevantnih graničnih vrijednosti može se razlikovati od navedenih vrijednosti.

Dodatak

Sheme odlučivanja

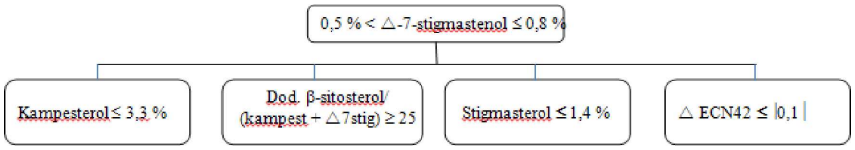
Shema odlučivanja koja se odnosi na **kampesterol** za djevičanska i ekstra djevičanska maslinova ulja:



Drugi parametri moraju biti u skladu s ograničenjima utvrđenima u ovoj Uredbi.

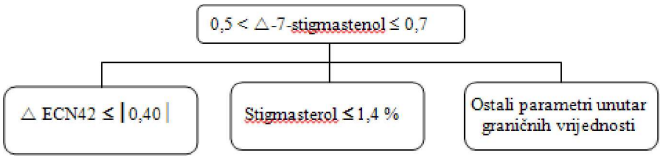
Shema odlučivanja koja se odnosi na **delta-7-stigmastenol** za:

— ekstra djevičanska i djevičanska maslinova ulja



Drugi parametri moraju biti u skladu s ograničenjima utvrđenima u ovoj Uredbi.

— Ulja komine maslina (sirova i rafinirana)



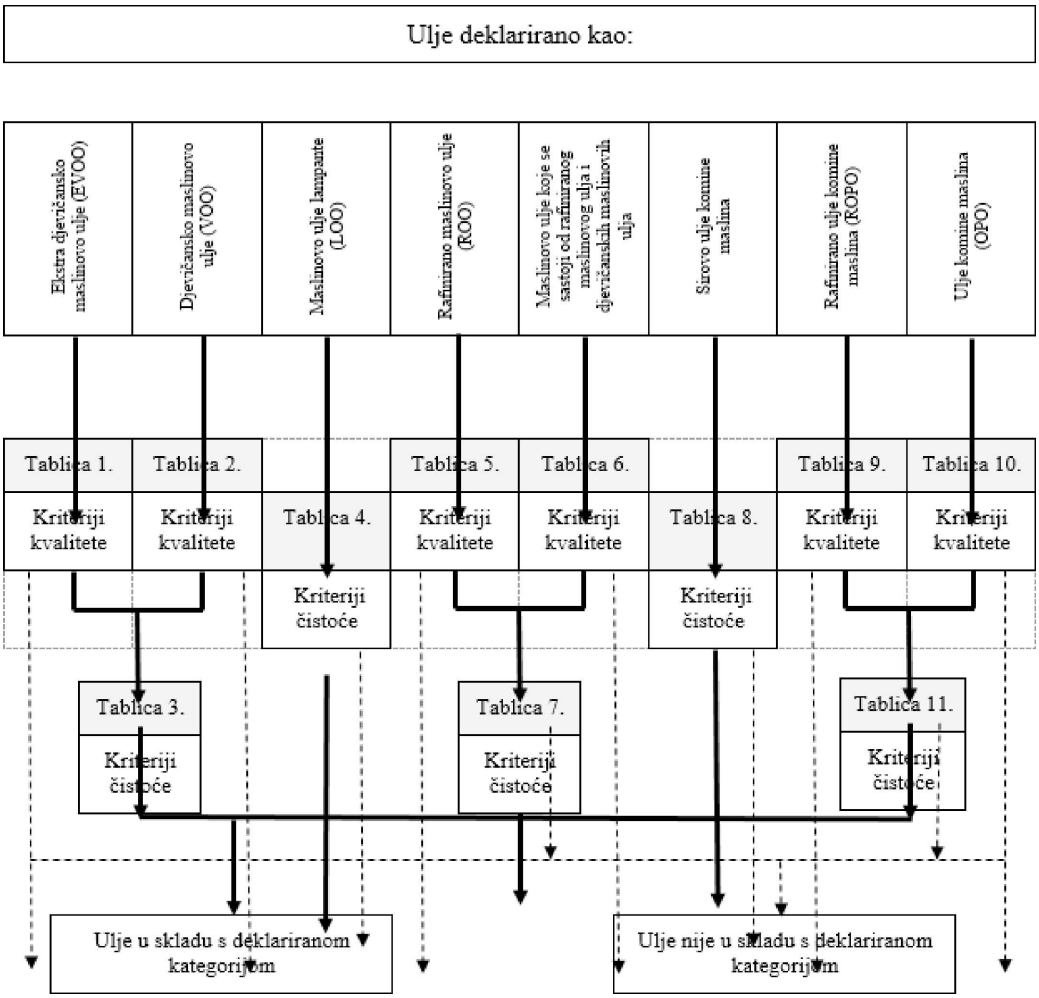
Drugi parametri moraju biti u skladu s ograničenjima utvrđenima u ovoj Uredbi.”

PRILOG III.

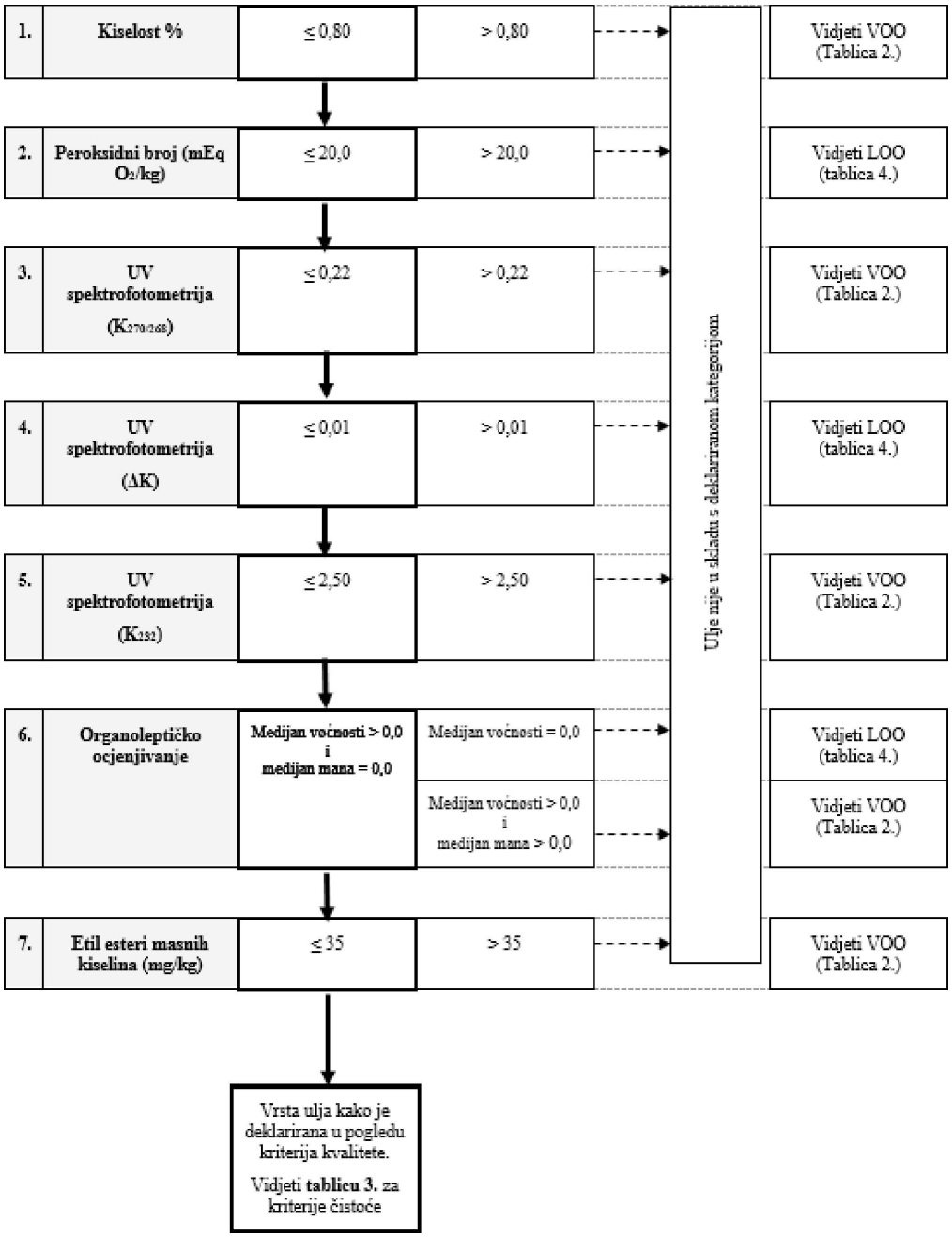
„PRILOG I.b

DIJAGRAM TOKA ZA PROVJERU USKLAĐENOSTI UZORKA MASLINOVA ULJA S DEKLARIRANOM KATEGORIJOM

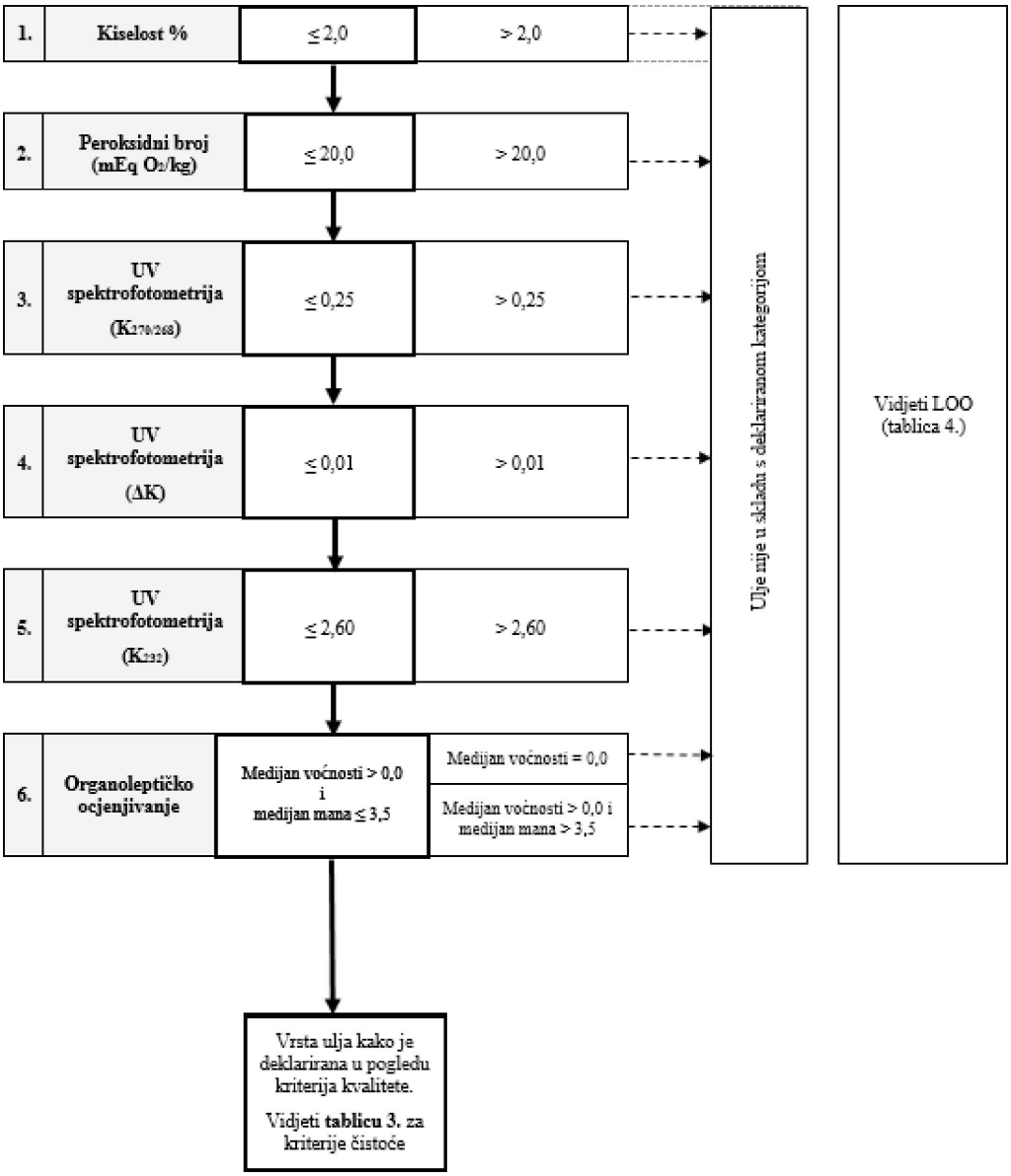
Opća tablica



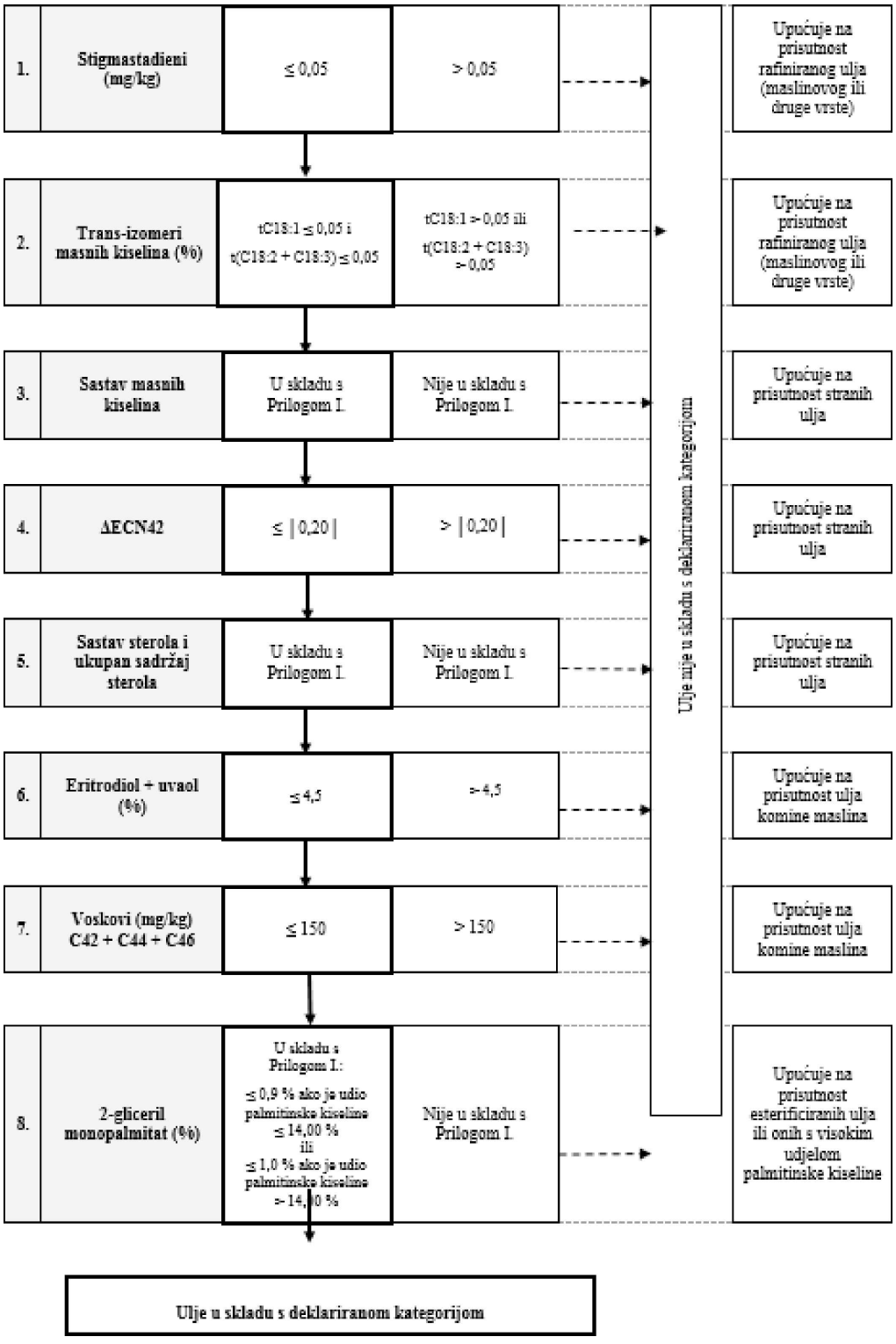
Tablica 1. – Ekstra djevičansko maslinovo ulje – Kriteriji kvalitete



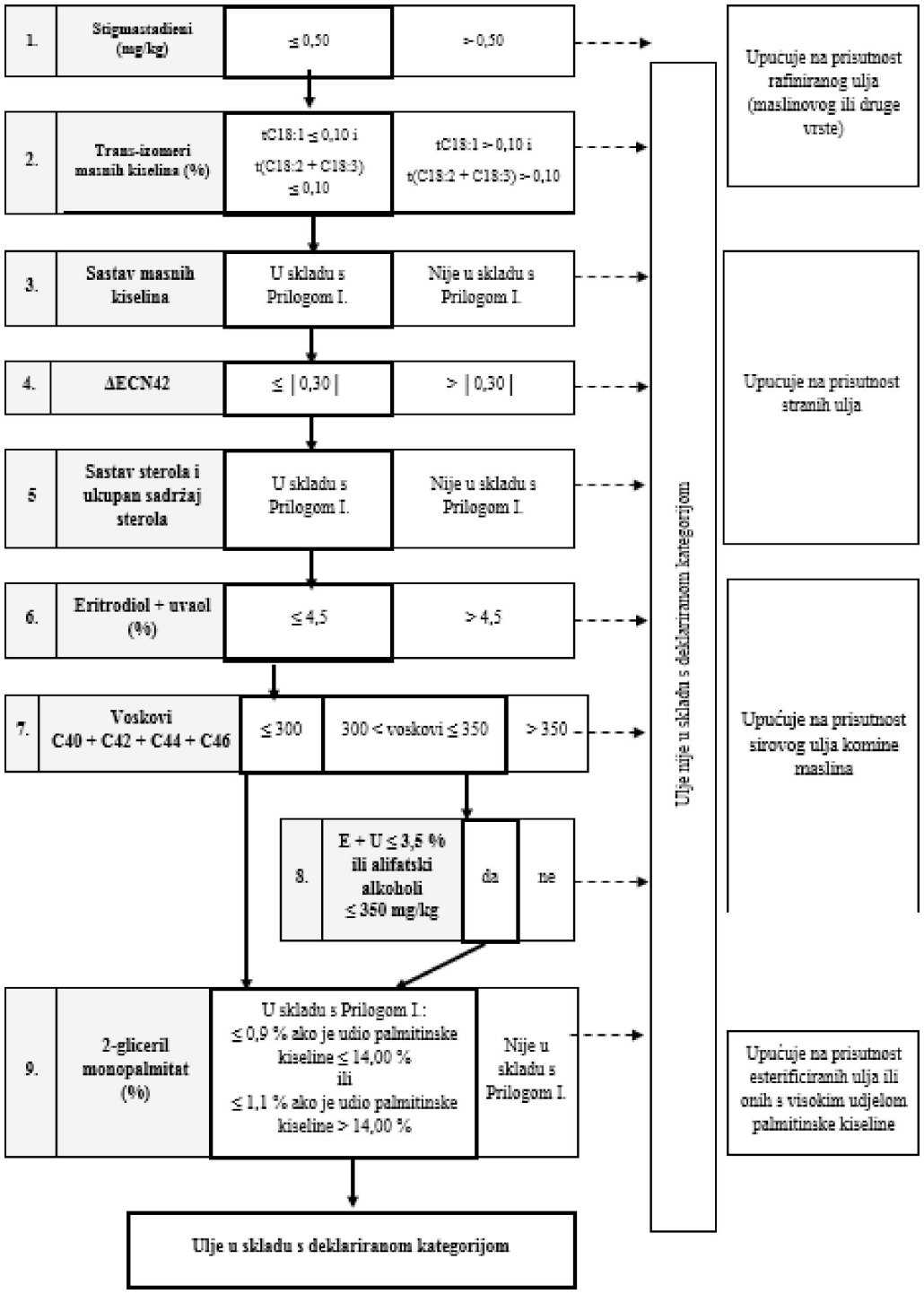
Tablica 2. – Djevičansko maslinovo ulje – Kriteriji kvalitete



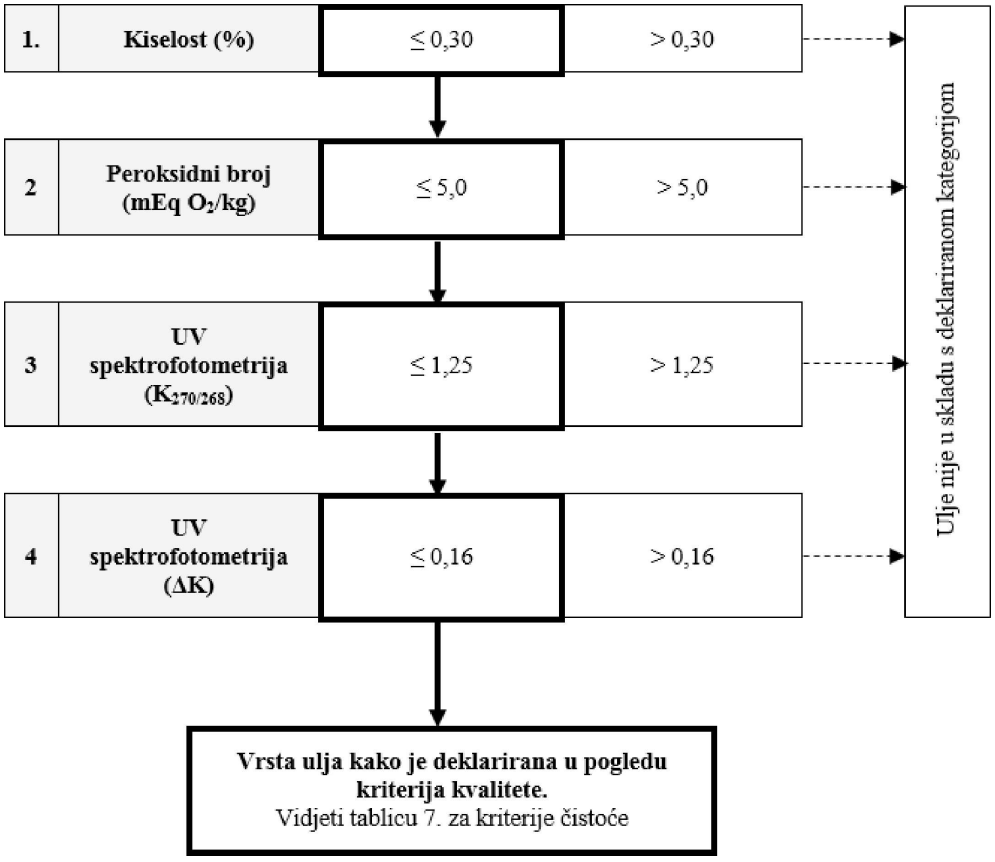
Tablica 3. – Ekstra djevičansko maslinovo ulje i djevičansko maslinovo ulje – Kriteriji čistoće



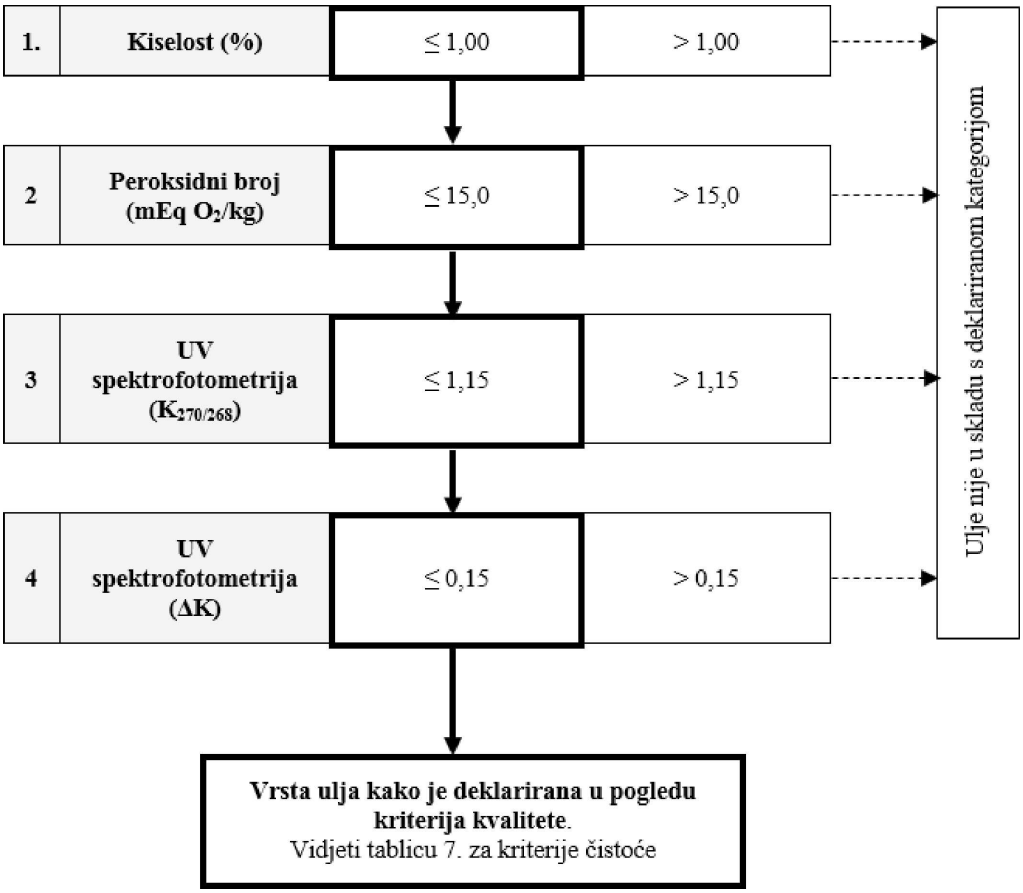
Tablica 4. – Maslinovo ulje lampante – Kriteriji čistoće



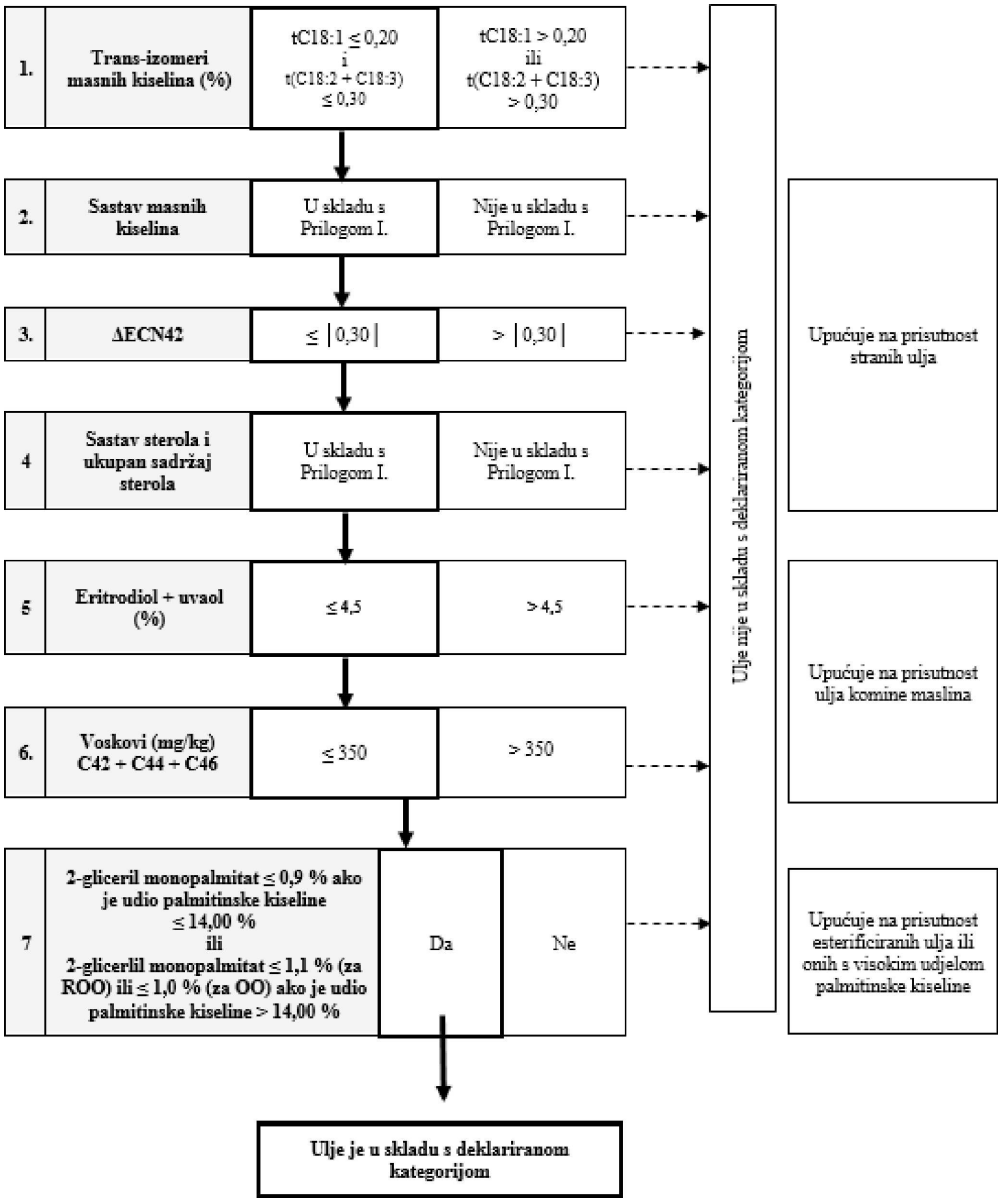
Tablica 5. – Rafinirano maslinovo ulje – Kriteriji kvalitete



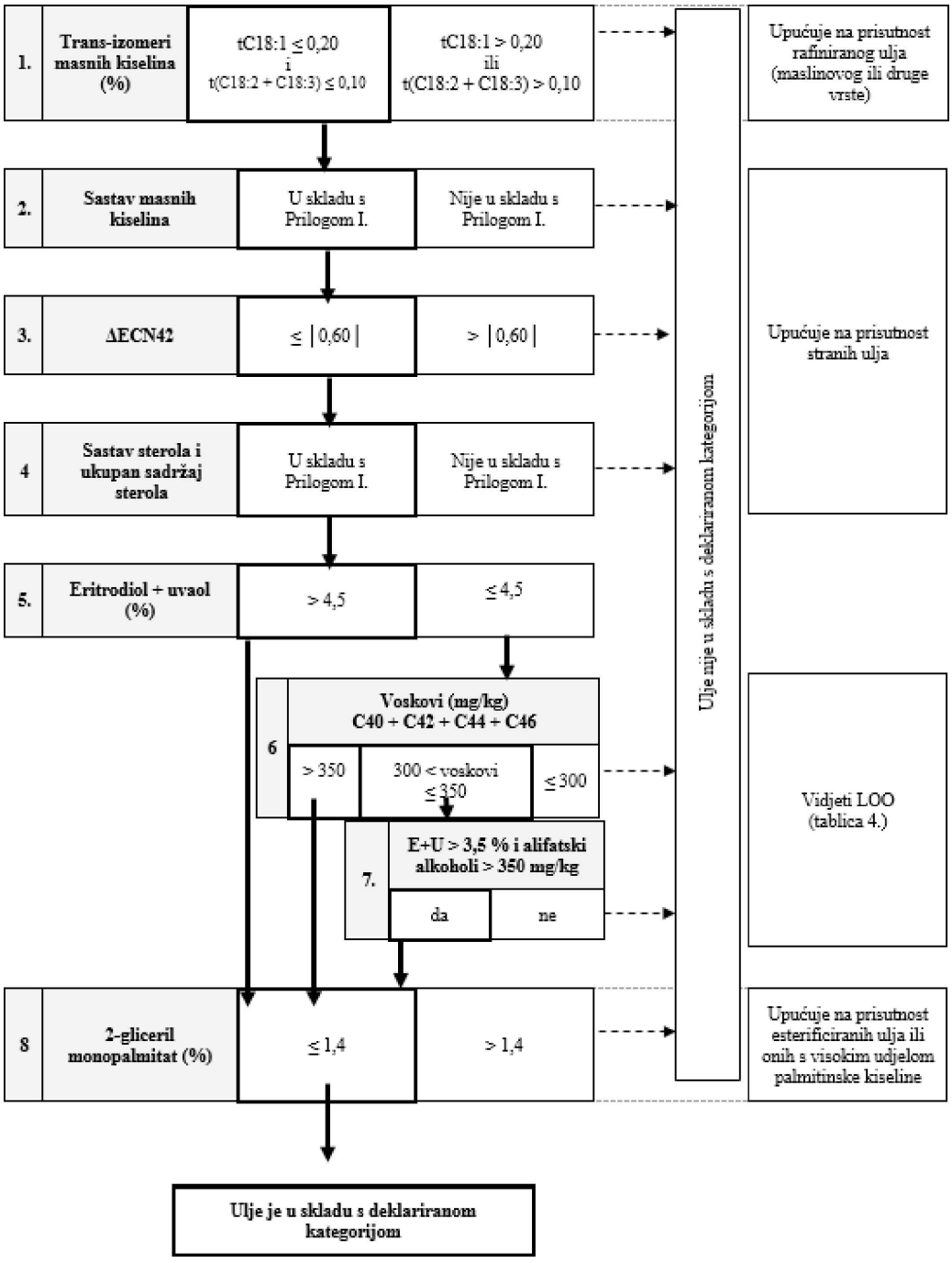
Tablica 6. – Maslinovo ulje (koje se sastoji od rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja)– Kriteriji kvalitete



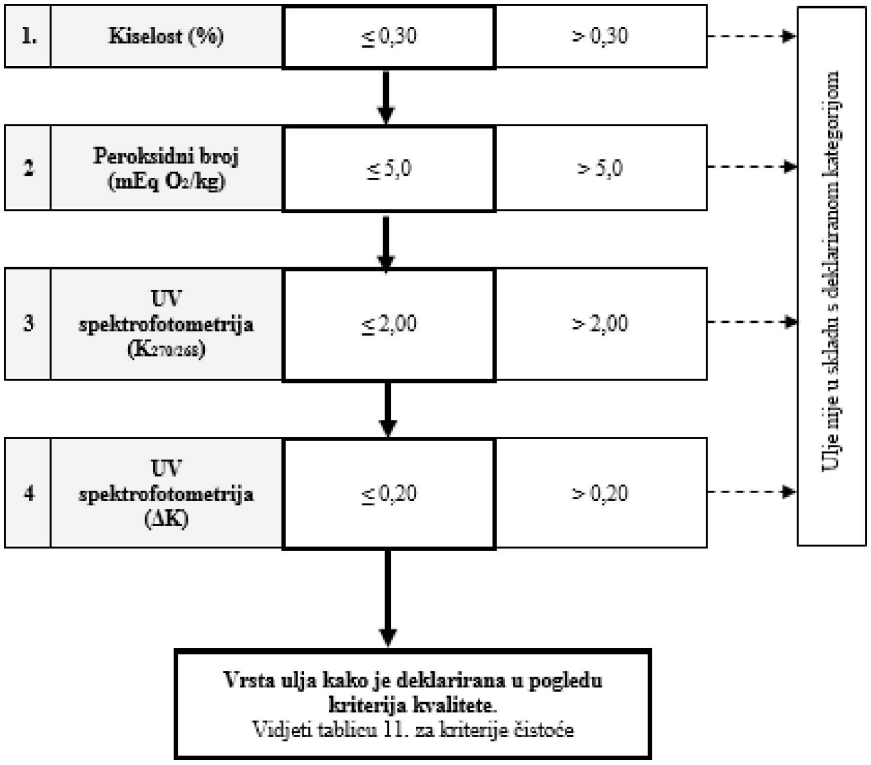
Tablica 7. – Maslinovo ulje koje se sastoji od rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja– Kriteriji čistoće



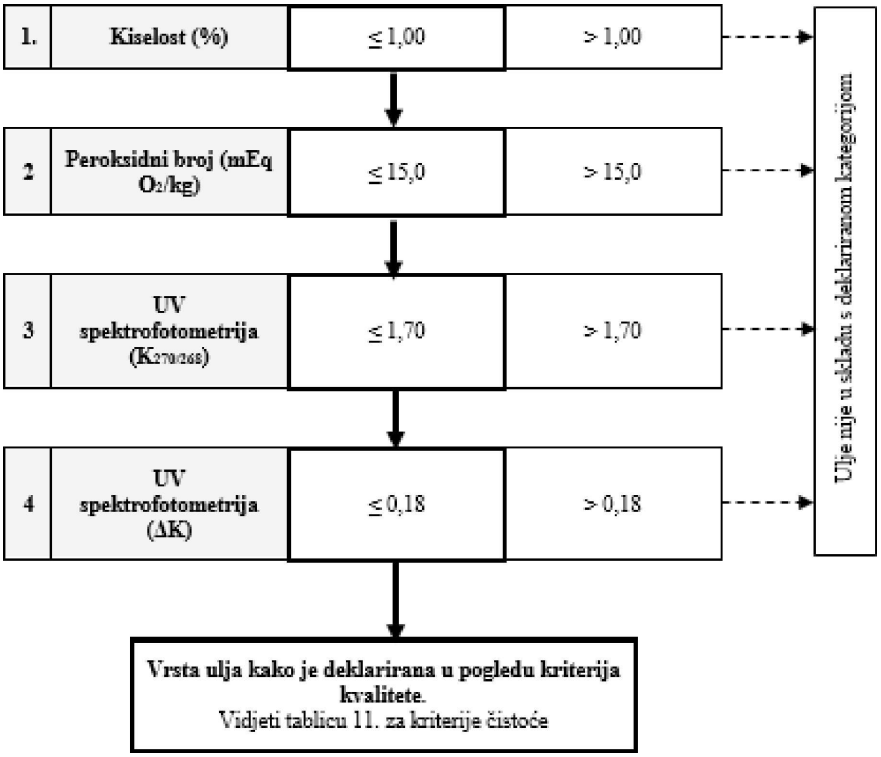
Tablica 8. – Sirovo ulje komine maslina – Kriteriji čistoće



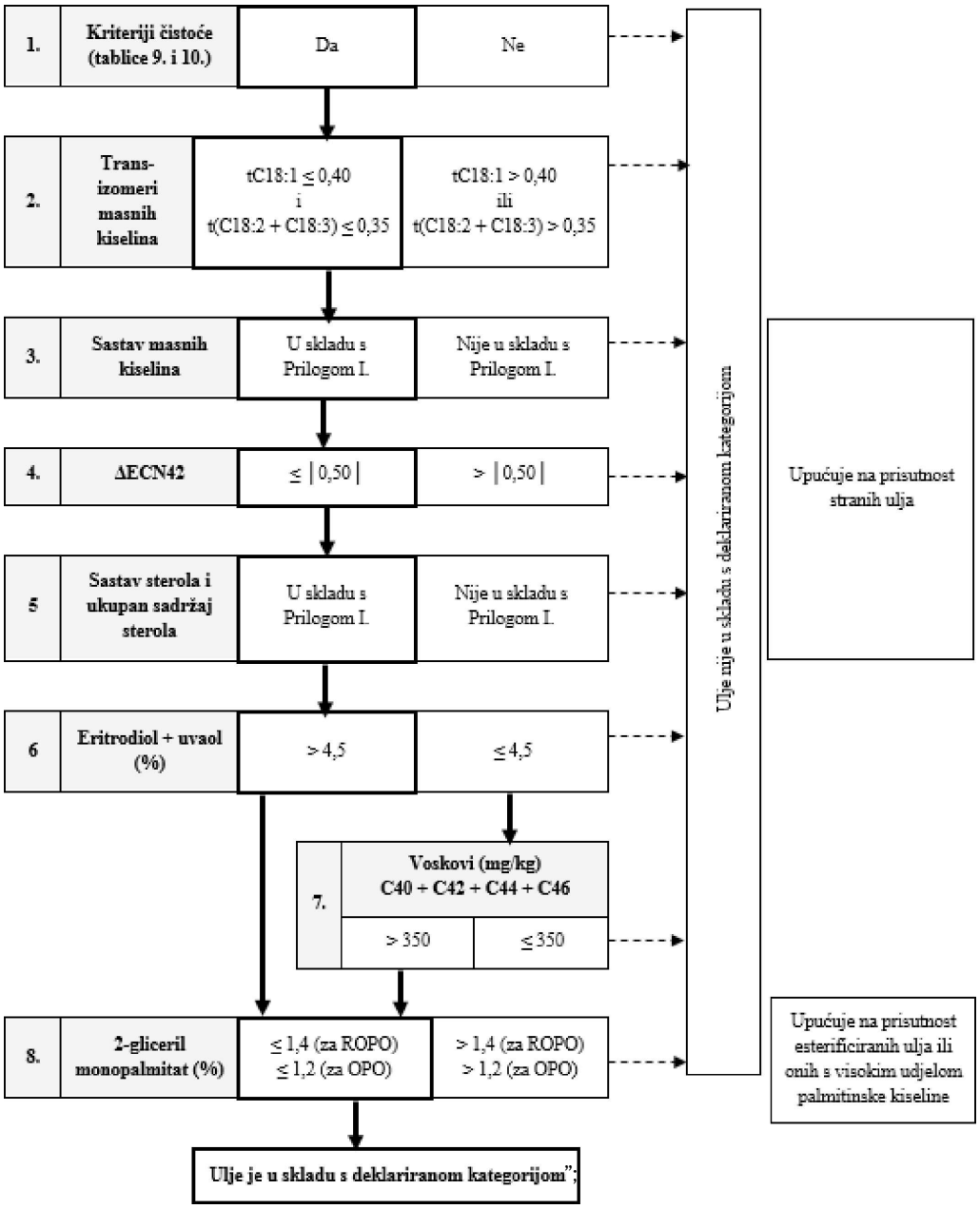
Tablica 9. – Rafinirano ulje komine maslina – Kriteriji kvalitete



Tablica 10. – Ulje komine maslina – Kriteriji kvalitete



Tablica 11. – Rafinirano ulje komine maslina i ulje komine maslina – Kriteriji čistoće



PRILOG IV.

Prilog XII. mijenja se kako slijedi:

1. Točka 3.3. zamjenjuje se sljedećim:

„3.3. **Neobvezna terminologija u svrhe označivanja**

Predsjednik komisije može na zahtjev izdati potvrdu da ocjenjivana ulja odgovaraju definicijama i intervalima koji na temelju intenziteta i percepcije svojstava odgovaraju isključivo sljedećim izrazima.

Pozitivna svojstva (voćno, gorko, oštro): prema intenzitetu percepcije:

— *intenzivno*, kad je medijan svojstva veći od 6,0,

— *srednje*, kad je medijan svojstva veći od 3,0 i manji od ili jednak 6,0,

— *blago*, kad je medijan svojstva 3,0 ili manji.

Voćnost Skup mirisnih osjećaja karakterističan za ulja, koji ovisi o sorti masline i nastaje od zdravih i svježih maslina u kojima ne prevladava ni zelena ni zrela voćnost. Zapaža se izravno i/ili u stražnjem dijelu nosa.

Zelena voćnost Skup mirisnih osjećaja karakterističan za ulja, koji podsjeća na zeleno voće, ovisi o sorti masline i nastaje od zelenih, zdravih i svježih maslina. Zapaža se izravno i/ili u stražnjem dijelu nosa.

Zrela voćnost Skup mirisnih osjećaja karakterističan za ulja, koji podsjeća na zrelo voće, ovisi o sorti masline i nastaje od zdravih i svježih maslina. Zapaža se izravno i/ili u stražnjem dijelu nosa.

Skladno Ulje koje ne pokazuje neuravnoteženost, čime se misli na mirisno-okusni i osjetilni doživljaj kod kojeg su medijan za svojstvo gorčine i medijan za svojstvo oštrine veći od medijana voćnosti za najviše 2,0 bodova.

Blago ulje Ulje čiji je medijan za svojstva gorčine i oštrine 2,0 ili manji.

Popis izraza prema intenzitetu percepcije:

Izrazi za koje je potrebno dostaviti certifikat o organoleptičkom ocjenjivanju	Medijan svojstva
voćnost	—
zrela voćnost	—
zelena voćnost	—
blaga voćnost	$\leq 3,0$
srednja voćnost	$3,0 < Me \leq 6,0$
intenzivna voćnost	$> 6,0$
blaga zrela voćnost	$\leq 3,0$
srednja zrela voćnost	$3,0 < Me \leq 6,0$
intenzivna zrela voćnost	$> 6,0$
blaga zelena voćnost	$\leq 3,0$
srednja zelena voćnost	$3,0 < Me \leq 6,0$
intenzivna zelena voćnost	$> 6,0$

Izrazi za koje je potrebno dostaviti certifikat o organoleptičkom ocjenjivanju	Medijan svojstva
blaga gorčina	≤ 3,0
srednja gorčina	3,0 < Me ≤ 6,0
intenzivna gorčina	> 6,0
blaga oštrina	≤ 3,0
srednja oštrina	3,0 < Me ≤ 6,0
intenzivna oštrina	> 6,0
skladno ulje	Medijan za svojstvo gorčine i medijan za svojstvo oštrine veći su od medijana voćnosti za najviše 2,0 bodova.
blago ulje	Medijan za svojstvo gorčine i medijan za svojstvo oštrine nisu veći od 2,0.”

(2) Točka 9.4. zamjenjuje se sljedećim:

„9.4. **Klasifikacija ulja**

Ulje se razvrstava kako slijedi u skladu s medijanom mana i medijanom svojstva voćnosti. Medijan mana definiran je kao medijan mane koja se osjeća najvećim intenzitetom. Medijan mana i medijan svojstva voćnosti iskazuju se do jednog decimalnog mjesta.

Ulje se razvrstava uspoređujući vrijednost medijana mana i medijana svojstva voćnosti s referentnim intervalima navedenima u nastavku. U obzir je uzeta i pogreška metode pri utvrđivanju ograničenja tih intervala koji se stoga smatraju apsolutnima. Programskim paketima omogućuje se prikaz razvrstavanja u obliku statističke tablice ili grafa.

(a) Ekstra djevičansko maslinovo ulje: medijan mana je 0,0, a medijan svojstva voćnosti je veći od 0,0;

(b) Djevičansko maslinovo ulje: medijan mana je veći od 0,0, ali nije veći od 3,5, dok je medijan svojstva voćnosti veći od 0,0;

(c) Djevičansko maslinovo ulje lampante: medijan mana veći je od 3,5 ili je manji od ili jednak 3,5, dok je medijan voćnosti jednak 0,0.

Napomena 1.: Kad je medijan svojstva oštrine i/ili gorčine veći od 5,0, predsjednik komisije to navodi u potvrdi o ocjenjivanju.

Za ocjenjivanja koja su namijenjena nadziranju sukladnosti provodi se jedno ispitivanje. U slučaju protuocjenjivanja moraju se organizirati dvije usporedne analize u različitim sesijama. Rezultati dvije usporedne analize moraju biti statistički homogeni (vidjeti točku 9.5.). Ako to nije slučaj, uzorak se mora ponovno dvaput analizirati. Konačna vrijednost medijana svojstava na kojima se temelji klasifikacija izračunan će se na temelju prosjeka obaju medijana.”

PRILOG V.

Prilog XVII. mijenja se kako slijedi:

(1) Točka 5.1. zamjenjuje se sljedećim:

„5.1. Heksan ili smjesa alkana intervala vrelišta od 65 do 70 °C, destilirani kolonom za ispravljanje. Heksan se može zamijeniti izo-oktanom (2,2,4-trimetilpentan u kromatografskom stupnju) pod uvjetom da se postignu usporedive mjere preciznosti. Mogu se provjeriti ostatci nakon isparavanja 100 ml otapala. Otapala s vrelištem višim od vrelišta n-heksana dulje isparavaju. Međutim, daje im se prednost zbog toksičnosti heksana.”;

(2) U točki 6.3.3. dodaje se sljedeći tekst:

„Napomena 10.: Kad su koncentracije stigmastadiena veće od 4 mg/kg, ako je potrebno provesti kvantificiranje, mora se primijeniti metoda Međunarodnog vijeća za masline za određivanje sterena u rafiniranom ulju.”.

PRILOG VI.

Prilog XVIII. mijenja se kako slijedi:

(1) Točka 4.2.1. zamjenjuje se sljedećim:

„4.2.1. Petroleter 40–60 °C kromatografskog stupnja ili heksan. Heksan se može zamijeniti izo-oktanom (2,2,4-trimetilpentan u kromatografskom stupnju) pod uvjetom da se postignu usporedive mjere preciznosti. Otapala s vrelištem višim od vrelišta n-heksana dulje isparavaju. Međutim, daje im se prednost zbog toksičnosti heksana.”;

(2) Dodaje se sljedeća točka 4.2.12.:

„4.2.12 Heptan, kromatografske čistoće. Heptan se može zamijeniti izo-oktanom 2,2,4-trimetilpentan u kromatografskom stupnju).”.

PRILOG VII.

„*PRILOG XIX.*

ODREĐIVANJE SASTAVA I SADRŽAJA STEROLA I ALKOHOLNIH SPOJEVA KAPILARNOM PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. PODRUČJE PRIMJENE

Metoda opisuje postupak za određivanje udjela pojedinačnih i ukupnih alkoholnih spojeva u maslinovim uljima i uljima komine maslina, te u mješavini tih dvaju ulja.

Alkoholni spojevi u maslinovim uljima i uljima komine maslina sačinjeni su od alifatskih alkohola, sterola i triterpenskih dialkohola.

2. NAČELO

Ulja s dodatkom α-kolestanola i 1-eikosanola kao internih standarda saponificiraju se otopinom kalijeva hidroksida u etanolu i zatim se neosapunjiva tvar ekstrahira etil eterom.

Različite frakcije alkoholnih spojeva odvajaju se od neosapunjive tvari tankoslojnom kromatografijom na osnovnoj silikagel ploči (referentna metoda) ili HPLC metodom na koloni silikagela. Frakcija koja se dobije odvajanjem silikagelom pretvara se u trimetilsilil etere i zatim analizira kapilarnom plinskom kromatografijom.

DIO 1.

PRIPREMA NEOSAPUNJIVE TVARI

1. PODRUČJE PRIMJENE

U ovom se dijelu opisuju priprema i ekstrakcija neosapunjive tvari. Uključuje pripremu i ekstrakciju neosapunjive tvari iz maslinovih ulja i ulja komine maslina.

2. NAČELO

Uzorak za ispitivanje saponificira se vrenjem pod povratnim hladilom s otopinom kalijeva hidroksida u etanolu. Neosapunjiva tvar ekstrahira se s pomoću dietil etera.

3. OPREMA

Uobičajena laboratorijska oprema, a posebno sljedeće:

3.1 Tikvica s okruglim dnom opremljena povratnim hladilom i nastavcima od brušenog stakla, 250 ml.

3.2 Lijevak za odjeljivanje, 500 ml.

3.3 Tikvice, 250 ml.

3.4 Mikroštrcaljke, 100 µl i 500 µl.

3.5 Cilindrični lijevak za filtriranje s poroznom pločom G 3 (poroznost između 15 i 40 µm) približnog promjera 2 cm i visine 5 cm, primjeren za filtriranje pod vakuumom s muškim spojem od brušenog stakla.

3.6 Erlenmeyerova tikvica sa ženskim spojem od brušenog stakla, 50 ml, koja se može pričvrstiti na lijevak za filtriranje (točka 3.5.).

3.7 Epruveta s konusnim dnom i brtvenim staklenim čepom, 10 ml.

3.8 Eksikator s kalcijevim kloridom.

4. REAGENSI

4.1 Kalijev hidroksid, minimalne koncentracije 85 %.

4.2 Otopina kalijeva hidroksida u etanolu, približno 2 M.

Otopiti 130 g kalijeva hidroksida (točka 4.1.), uz hlađenje, u 200 ml destilirane vode, a zatim nadopuniti etanolom do jedne litre (točka 4.7.). Otopinu treba čuvati najviše dva dana u dobro začepljenim bocama od tamnog stakla.

4.3 Etil eter, analitičke kvalitete.

4.4 Bezvodni natrijev sulfat, analitičke kvalitete.

4.5 Aceton, za kvalitetu kromatografije.

4.6 Etil eter, za kvalitetu kromatografije.

4.7 Etanol analitičke kvalitete.

4.8 Etil acetat analitičke kvalitete.

4.9 Interni standard, α-kolestanol, čistoće veće od 99 % (čistoća se mora provjeriti plinskom kromatografijom).

4.10 Interni standard, otopina α-kolestanola, 0,2 %-tna otopina (m/v) u etil acetatu (točka 4.8.).

4.11 Otopina 10 g/l fenolftaleina u etanolu (točka 4.7.).

4.12 0,1 %-tna (m/v) otopina 1-eikosanola u etil acetatu (interni standard).

5. POSTUPAK

S pomoću mikroštrcaljke od 500 µl (točka 3.4.) u tikvicu volumena 250 ml (točka 3.1.) injektirati onu količinu otopine α-kolestanola internog standarda (točka 4.10.) i količinu 1-eikosanola (točka 4.12.) koja sadržava količinu kolestanola i eikosanola koja je približno jednaka 10 % sadržaja sterola i alkohola u uzorku. Na primjer, na 5 g uzorka maslinova ulja treba dodati 500 µl otopine α-kolestanola (točka 4.10.) i 250 µl otopine 1-eikosanola (točka 4.12.). U slučaju ulja komine maslina treba dodati 1 500 µl otopine α-kolestanola (točka 4.10.) i otopine 1-eikosanola (točka 4.12.). Upariti do suha pod blagom strujom dušika u toploj vodenoj kupelji. Nakon što se tikvica ohladi, izvagati 5,00 ± 0,01 g suhog filtriranog uzorka u istu tikvicu.

Napomena 1.: Ulja i masti životinjskog ili biljnog podrijetla koja sadržavaju znatne količine kolesterola mogu dati pik s retencijskim vremenom koje je identično onome kolestanola. U tom slučaju frakcija sterola treba se analizirati dvostruko – s internim standardom i bez njega.

Dodati 50 ml 2 M otopine kalijeva hidroksida u etanolu (točka 4.2.) i malo plovućca, namjestiti povratno hladilo i zagrijavati do točke slabog vrenja dok se ne završi saponificiranje (otopina postane bistra). Nastaviti zagrijavanje još 20 minuta, zatim dodati 50 ml destilirane vode kroz vrh hladila, odvojiti hladilo i ohladiti tikvicu na oko 30 °C.

Kvantitativno prenijeti sadržaj tikvice u lijevak za odjeljivanje od 500 ml (točka 3.2.) s nekoliko obroka destilirane vode (50 ml). Dodati oko 80 ml etil etera (točka 4.6.), snažno protresati oko 60 sekundi, povremeno ispuštajući pritisak okretanjem lijevka za odjeljivanje i otvaranjem zaustavnog pipca. Odložiti dok se dvije faze potpuno ne odvoje (Napomena 2.). Odvojiti sapunastu otopinu što je moguće potpunije u drugi lijevak za odjeljivanje. Provesti još dvije ekstrakcije na vodeno-alkoholnoj fazi na jednak način, uz upotrebu između 60 i 70 ml etil etera (točka 4.6.).

Napomena 2.: Svaka se emulzija može uništiti dodavanjem malih količina etanola (točka 4.7.).

Kombinirati tri ekstrakta etera u jednom lijevku za odjeljivanje koji sadržava 50 ml vode. Nastaviti ispirati s vodom (50 ml) sve dok se u vodi kojom se ispiralo više ne pojavljuje ružičasto obojenje pri dodavanju kapljica otopine fenolftaleina (točka 4.11.). Nakon uklanjanja vode kojom se ispiralo profiltrirati kroz bezvodni natrijev sulfat (točka 4.4.) u prethodno izvaganoj tikvici od 250 ml, ispirajući lijevak i filtar malim količinama etil etera (točka 4.6.).

Otapalo ispariti destiliranjem pod vakuumom u rotirajućem isparivaču na 30 °C. Dodati 5 ml acetona (točka 4.5.) i potpuno odstraniti hlapivo otapalo pod blagom strujom dušika. Ostatak 15 minuta sušiti u peći na 103 ± 2 °C. Ohladiti u eksikatoru i izvagati uz odstupanje do 0,1 mg.

DIO 2.

ODVAJANJE FRAKCIJA ALKOHOLNIH SPOJEVA

1. PODRUČJE PRIMJENE

Neosapunjiva tvar pripremljena u dijelu 1. frakcionira se u različitim alkoholnim spojevima, alifatskim alkoholima, sterolima i triterpenskim dialkoholima (eritrodiol i uvaol).

2. NAČELO

Neosapunjiva tvar može se frakcionirati s pomoću tankoslojne kromatografije (referentna metoda), otkriti te se odgovarajuće vrpce mogu sastrugati i ekstrahirati. Kao alternativna metoda odvajanja može se primijeniti HPLC metoda uz upotrebu silikagel kolone i UV detektora i različitih prikupljenih frakcija. Alifatski i triterpenski alkoholi te steroli i triterpenski dialkoholi izoliraju se zajedno.

3. OPREMA

Uobičajena laboratorijska oprema, a posebno sljedeće:

3.1 Cjeloviti instrument za analizu tankoslojnom kromatografijom, s pomoću staklenih ploča veličine 20 × 20 cm.

3.2 Ultraljubičasta svjetiljka valne duljine 366 ili 254 nm.

3.3 Mikroštrcaljke, 100 µl i 500 µl.

3.4 Cilindrični lijevak za filtriranje s poroznom pločom G 3 (poroznost između 15 i 40 µm) približnog promjera 2 cm i visine 5 cm, primjeren za filtriranje pod vakuumom s muškim spojem od brušenog stakla.

3.5 Erlenmeyerova tikvica sa ženskim spojem od brušenog stakla, 50 ml koja se može pričvrstiti na lijevak za filtriranje (3.4.).

3.6 Epruveta s konusnim dnom i brtvenim staklenim čepom, 10 ml.

3.7 Eksikator s kalcijevim kloridom.

3.8 HPLC sustav koji se sastoji od sljedećeg:

3.8.1 Binarne pumpe.

3.8.2 Ručnog ili automatiziranog injektora opremljenog petljama za injektiranje od 200 µl.

3.8.3 Linijski otplinjač.

3.8.4 UV-VIS ili IR detektor.

3.9 HPLC kolona (25 cm x 4 mm unutarnjeg promjera) sa silikagelom 60 (veličine čestica 5 µm).

3.10 Filtar za štrcaljke, 0,45 µm.

3.11 Erlenmeyerova tikvica, 25 ml.

4. REAGENSI

4.1 Kalijev hidroksid, minimalne koncentracije 85 %.

4.2 Otopina kalijeva hidroksida u etanolu, približno 2 M.

Otopiti 130 g kalijevog hidroksida (točka 4.1.), uz hlađenje, u 200 ml destilirane vode, a zatim nadopuniti etanolom do jedne litre (točka 4.9.). Otopinu treba čuvati najviše dva dana u dobro začepljenim bocama od tamnog stakla.

4.3 Etil eter, analitičke kvalitete.

4.4 Otopina kalijeva hidroksida u etanolu, približno 0,2 M.

Otopiti 13 g kalijeva hidroksida (točka 4.1.) u 20 ml destilirane vode i nadopuniti etanolom do jedne litre (točka 4.9.).

4.5 Staklene ploče dimenzija 20 × 20 cm sa slojem silikagela, bez indikatora fluorescencije, debljine 0,25 ml (na tržištu su dostupne ploče spremne za uporabu).

4.6 Aceton, za kvalitetu kromatografije.

4.7 N-heksan, za kvalitetu kromatografije.

4.8 Etil eter, za kvalitetu kromatografije.

4.9 Etanol analitičke kvalitete.

4.10 Etil acetat analitičke kvalitete.

4.11 Referentna otopina za tankoslojnu kromatografiju: 5 %-tna otopina kolesterola, fitosterola, alkohola i eritrodiola u etil acetatu (točka 4.10.).

4.12 0,2 %-tna otopina 2,7-diklorofluoresceina u etanolu. Može se učiniti blago lužnatim dodavanjem nekoliko kapi otopine 2 mol/l kalijeva hidroksida u alkoholu (točka 4.2.).

4.13 Smjesa n-heksana (točka 4.7.) i etil etera (točka 4.8.) 65:35 (V/V).

4.14 Mobilna faza n-heksana (točka 4.7.) i etil etera (točka 4.8.), 1:1 (V/V).

5. REFERENTNA METODA: ODVAJANJE ALKOHOLNIH SPOJEVA OSNOVNIM PLOČAMA ZA TANKOSLOJNU KROMATOGRAFIJU (TLC)

Priprema osnovnih ploča za tankoslojnu kromatografiju. Uroniti ili umočiti silikagel ploče (točka 4.5.) do oko 4 cm u otopinu 0,2 mol/l kalijeva hidroksida u etanolu (točka 4.4.) na 10 sekundi, zatim ih ostaviti da se dva sata suše u digestoru i na kraju ih staviti u peć na 100 °C na jedan sat.

Izvaditi ploče iz peći i pohraniti u eksikator s kalcijevim kloridom (točka 3.7.) do upotrebe (ploče obrađene na ovaj način moraju se upotrijebiti u roku od 15 dana).

Staviti smjesu heksana i etil etera (točka 4.13.) (napomena 3.) u komoru za razvijanje, do dubine od oko 1 cm. Zatvoriti komoru odgovarajućim poklopcem i ostaviti tako na najmanje pola sata, na hladnom mjestu, kako bi se uspostavila ravnoteža tekućine i pare. Trake filtar-papira namočene u eluens mogu se postaviti na unutarnje površine komore. Time se skraćuje vrijeme razvijanja za otprilike jednu trećinu i dobiva jednoličnija, pravilna elucija komponenata.

Napomena 3.: Mješavina za razvijanje trebala bi se zamijeniti za svako ispitivanje da bi se postigli reproducibilni uvjeti elucije. Može se upotrijebiti alternativno otapalo u obliku n-heksana i etil etera u omjeru 50:50 (V/V).

Pripremiti približno 5 %-tnu otopinu neosapunjivih tvari dobivenu u dijelu 1. u etil acetatu (točka 4.10.) i s pomoću mikroštrcaljke od 100 µl (točka 3.3.) nanijeti 0,3 ml te otopine u tankoj i ujednačenoj liniji na donji rub (2 cm) kromatografske ploče (točka 4.5.). U ravnini nanosa nanijeti između 2 i 3 µl referentne otopine tvari (točka 4.11.) tako da se vrpca sterola, triterpenskih dialkohola i alkohola može identificirati nakon razvijanja.

Staviti ploču u komoru za razvijanje (točka 3.1.). Sobnu temperaturu treba održavati između 15 i 20 °C (napomena 4.). Komoru odmah zatvoriti poklopcem i ostaviti da eluira dok prednji dio otapala ne dosegne približno 1 cm od gornjeg ruba ploče. Ploča se zatim vadi iz komore za razvijanje, a otapalo isparuje pod strujom vrućeg zraka ili se ploča ostavlja još neko kraće vrijeme u digestoru.

Napomena 4.: na višim temperaturama odjeljivanje se može pogoršati.

Blago i jednoliko pošpricati ploču otopinom 2,7-diklorofluoresceina (točka 4.12.) i zatim je ostaviti da se osuši. Kad se ploča promatra pod ultraljubičastom svjetiljkom (točka 3.2.), vrpce sterola, triterpenskih dialkohola i alkohola mogu se identificirati tako što su poravnane s mrljama dobivenima od referentne otopine (točka 4.11.). Označiti rubove trake uz rub fluorescencije crnom olovkom (vidjeti TLC ploču na slici 1.).

Silikagel koji se nalazi u označenom području sastruže se s pomoću metalne spatule. Tako dobiveni fino usitnjeni materijal unijeti u lijevak za filtriranje (3.4.). Dodati 10 ml vrućeg etil acetata (točka 4.10.), pažljivo izmiješati metalnom spatulom i filtrirati (prema potrebi pod vakuumom), skupljajući filtrat u Erlenmeyerovu tikvicu (točka 3.5.) spojenu na lijevak za filtriranje.

Ostatak u tikvici isprati tri puta etil eterom (točka 4.3.) (oko 10 ml svaki put), skupljajući filtrat u istu tikvicu spojenu na lijevak, ispariti filtrat do volumena od 4 do 5 ml, preostalu otopinu prenijeti u prethodno izvaganu epruvetu volumena 10 ml (točka 3.6.), upariti do suha laganim zagrijavanjem pod blagom strujom dušika, ponovno nadopuniti s nekoliko kapi acetona (točka 4.6.) i ponovno upariti do suha. Ostatak u epruveti sastoji se od frakcija sterola i triterpenskih dialkohola ili frakcija alkohola i triterpenskih alkohola.

6. ODVAJANJE FRAKCIJE ALKOHOLA HPLC METODOM

Otopiti neosapunjivu tvar dobivenu u dijelu 1. u 3 ml mobilne faze (točka 4.14.), otopinu filtrirati filtrom za štrcaljke (točka 3.10.) i čuvati.

Injektirati 200 µl filtrirane neosapunjive otopine u HPLC-u (točka 3.8.).

Izvršiti HPLC odvajanje pri 0,8 ml/min, ostaviti prvih 5 min. te sakupljati u Erlenmeyerovim tikvicama od 25 ml (točka 3.11.) od 5 do 10 min. za alifatske i triterpenske alkohole te od 11 do 25 min. za sterole i eritrodiol i uvaol (napomena 5.).

Odvajanje se može pratiti UV detektorom na valnoj duljini od 210 nm ili detektorom indeksa refrakcije (vidjeti sliku 6.).

Frakcije se uparuju do suha i pripremaju za kromatografsku analizu.

Napomena 5.: Pozorno kontrolirati tlak HPLC pumpe, etil eter može uzrokovati povećanje tlaka; prilagoditi protok da bi se tlak održavao pod kontrolom.

DIO 3.

ANALIZA FRAKCIJA ALKOHOLNIH SPOJEVA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. PODRUČJE PRIMJENE

U ovom se dijelu daju opće smjernice za primjenu kapilarne plinske kromatografije radi utvrđivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava alkoholnih spojeva izoliranih u skladu s metodom utvrđenom u dijelu 2. ove metode.

2. NAČELO

Frakcije prikupljene iz neosapunjive tvari s pomoću TLC-a ili HPLC-a derivatiziraju se u trimetilsilil etere i analiziraju kapilarnom plinskom kromatografijom uz razdjelno injektiranje i plameno-ionizacijski detektor.

3. OPREMA

Uobičajena laboratorijska oprema, a posebno sljedeće:

3.1 Epruveta s konusnim dnom i brtvenim staklenim čepom, 10 ml.

3.2 Plinski kromatograf koji se može koristiti s kapilarnom kolonom s razdjelnim sustavom za injektiranje koji se sastoji od:

3.2.1 Termostatska komora za kolone koja može održavati željenu temperaturu s točnošću od ± 1 °C;

3.2.2 Jedinica za injektiranje s mogućnošću podešavanja temperature, s elementom za uparavanje od persilaniziranog stakla i razdjelnim sustavom;

3.2.3 Plameno-ionizacijski detektor (FID);

3.2.4 Sustav za prikupljanje podataka koji se može koristiti s detektorom FID (točka 3.10.3.) i koji se može uključiti ručno.

3.3 Kvarcna kapilarna kolona duljine između 20 i 30 m, unutarnjeg promjera između 0,25 i 0,32 mm, sa slojem 5 % difenila – 95 % dimetilpolisiloksana (SE-52 ili SE-54 ili odgovarajućom stacionarnom fazom), s ujednačenom debljinom filma između 0,10 i 0,30 µm.

3.4 Mikroštrcaljka za plinsku kromatografiju volumena 10 µl s čvrsto učvršćenom iglom primjerenom za razdjelno injektiranje.

4. REAGENSI

4.1 Bezvodni piridin, za kvalitetu kromatografije.

4.2 Heksametildisilazan analitičke kvalitete.

4.3 Trimetilklorosilan analitičke kvalitete.

4.4 Otopine sterolnih trimetilsilil etera iz uzorka. Treba ih pripremiti neposredno prije korištenja od sterola i eritrodiola dobivenih iz ulja koja ih sadrže.

4.5 Standardne otopine trimetilsilil etera alifatskih alkohola od C20 do C28. Mogu se pripremiti iz mješavina čistih alkohola, neposredno prije upotrebe.

4.6 Plin nosač: vodik ili helij, plinsko-kromatografske čistoće.

4.7 Pomoćni plinovi: vodik, helij, dušik i zrak, plinsko-kromatografske čistoće.

4.8 Reagens za sililaciju koji se sastoji od smjese piridina, heksametildisilazana i trimetilklorosilana u omjeru 9:3:1 (V/V/V).

4.9 N-heksan, za kvalitetu kromatografije.

5. PRIPREMA TRIMETILSILIL ETERA

Dodati reagens za silaniziranje (točka 4.8.) (napomena 6.), u omjeru od po 50 µl na svaki miligram alkoholnog spoja, u epruvetu (točka 3.1.) koja sadržava frakciju alkoholnog spoja tako da se izbjegne bilo kakva apsorpcija vlage (napomena 7.)

Napomena 6.: Otopine spremne za upotrebu dostupne su na tržištu. Dostupni su i drugi reagensi za silaniziranje kao što su npr. bistrimetilsilil trifluor acetamid + 1 % trimetilklorosilan koji je potrebno razrijediti istim volumenom bezvodnog piridina. Piridin se može zamijeniti jednakom količinom acetonitrila.

Napomena 7.: Normalno je da dođe do blage opalescencije koja neće uzrokovati anomalije. Stvaranje bijelog floka ili pojava ružičastog obojenja znakovi su prisutnosti vlage ili propadanja reagensa. U tom slučaju treba ponoviti ispitivanje (samo ako se koristi heksametildisilazan ili trimetilklorosilan).

Epruvetu treba začepiti (točka 3.1.) i pažljivo protresti (bez preokretanja) sve dok se sastojci u potpunosti ne rastope. Ostaviti da odstoji najmanje 15 minuta na sobnoj temperaturi te zatim centrifugirati nekoliko minuta. Bistra otopina spremna je za analizu plinskim kromatografom.

6. ANALIZA PLINSKIM KROMATOGRAFOM

6.1 Pripremne djelatnosti i kondicioniranje kapilarne kolone

Namjestiti kolonu (točka 3.3.) u plinski kromatograf tako da se početak kolone spoji na razdjelni injektor, a izlazni kraj kolone na detektor.

Provesti opću provjeru stanja jedinice plinskog kromatografa (curenje iz plinskih tokova, učinkovitost detektora, učinkovitost sustava za razdvajanje i sustava za bilježenje itd.).

Ako se kapilarna kolona upotrebljava prvi put, preporučuje se da je se podvrgne kondicioniranju: kroz kolonu se pusti malo plina, a zatim se jedinica plinskog kromatografa uključi i postupno zagrijava dok se ne postigne temperatura koja je najmanje 20 °C iznad radne temperature (napomena 8.). Ta se temperatura treba održavati najmanje dva sata, zatim se cijela jedinica stavlja u radne uvjete (prilagođavanje protoka plina i razdvajanja, paljenja plamena, provjera spoja s računalnim sustavom, prilagođavanje komore za kolonu, temperature detektora i injektora itd.), a zatim se bilježi signal uz osjetljivost koja je najmanje dvostruko viša od razine predviđene za analizu. Bazna linija za praćenje treba biti linearna, bez pikova ikakve vrste i ne smije pokazivati nikakve znakove otklona. Negativan pravocrtni otklon ukazuje na to da je došlo do curenja iz spojeva kolone, a pozitivan otklon ukazuje na to da kolona nije kondicionirana na odgovarajući način.

Napomena 8.: Temperatura kondicioniranja mora uvijek biti najmanje 20 °C niža od maksimalne temperature utvrđene za primijenjenu stacionarnu fazu.

6.2 Uvjeti rada

Optimizirati temperaturno programiranje i protok plina nosača kako bi se postigli kromatogrami slični onima na slikama od 3. do 6.

Sljedeći su parametri ispitani i utvrđeni kao korisni:

6.2.1 Alifatski alkoholi

Program u peći	180 °C (8 min.) → 260 °C (pri 5 °C/min) → 260 °C (15 min.)
Temperatura injektora	280 °C
Temperatura detektora	290 °C
Linearna brzina plina nosača	helij (od 20 do 30 cm/s); vodik (od 30 do 50 cm/s)
Omjer razdvajanja	Od 1:50 do 1:100
Injektirana količina	Od 0,5 do 1 µl TMSE otopine

6.2.2 Steroli i triterpenski dialkoholi

Program u peći	260 ± 5 °C izotermalno
Temperatura injektora	280–300 °C
Temperatura detektora	280–300 °C
Linearna brzina plina nosača	helij (od 20 do 30 cm/s); vodik (od 30 do 50 cm/s)
Omjer razdvajanja	Od 1:50 do 1:100
Injektirana količina	Od 0,5 do 1 µl TMSE otopine

Prethodno navedeni uvjeti mogu se modificirati u skladu sa svojstvima kolone i svojstvima plinskog kromatografa ne bi li se dobili kromatogrami koji udovoljavaju sljedećim zahtjevima:

— retencijsko vrijeme alkohola C26 iznosi 18 ± 5 minuta,

— pik alkohola C22 iznosi 80 ± 20 % vrijednosti pune skale za maslinovo ulje, odnosno 40 ± 20 % vrijednosti pune skale za ulje komine maslina,

— retencijsko vrijeme pika β-sitosterola trebalo bi iznositi 20 ± 5 minuta,

— pik kampesterola trebao bi iznositi: za maslinovo ulje (prosječni udio 3 %) 20 ± 5 % vrijednosti pune skale,

— svi prisutni steroli moraju biti odijeljeni. Osim odjeljivanja, pikovi također moraju biti u potpunosti razdvojeni, odnosno trag pika mora se vratiti na baznu liniju prije no što krene stvarati novi pik. Međutim, nepotpuno razdvajanje tolerira se u slučaju da se pik pri RRT 1,02 (sitostanol) može kvantificirati upotrebom okomice.

6.3 Analitički postupak

S pomoću mikroštrcaljke volumena 10 µl (točka 3.4.) unijeti 1 µl heksana, usisati 0,5 µl zraka te zatim između 0,5 i 1 µl otopine uzorka. Pritom podignuti klip mikroštrcaljke da bi se igla ispraznila. Igla se uvodi kroz membranu injektora; nakon jedne do dvije sekunde otopina se brzo injektira, a nakon približno pet sekundi igla se polako izvlači. Može se upotrijebiti i automatski injektor.

Bilježenje treba provoditi sve dok se TMSE odgovarajućih prisutnih alkoholnih spojeva u potpunosti ne eluira. Bazna linija mora i dalje ispunjavati zahtjeve odgovarajućih uvjeta rada (točka 6.2.1. ili 6.2.2.).

6.4 Identificiranje pikova

Identificirati pojedinačne pikove na temelju retencijskog vremena i uspoređivanjem s mješavinom alifatskih i triterpenskih alkohola ili sterola i triterpenskih dialkohola TMSE, analiziranom u istim uvjetima. Kromatogram frakcije alifatskih i triterpenskih alkohola prikazan je na slici 3., a odgovarajući kromatogrami za sterole i triterpenske dialkohole na slici 2.

Alifatski alkoholi eluiraju se sljedećim redoslijedom: C20-ol (I.S.), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol i C28-ol.

Steroli i triterpenski dialkoholi eluiraju se sljedećim redoslijedom: kolesterol, brasikasterol, ergosterol, 24-metilen kolesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ7-kampesterol, Δ5,23-stigmastadienol, klerosterol, β-sistosterol, sitostanol, Δ5-avenasterol, Δ5,24-stigmastadienol, Δ7-stigmasterol, Δ7-avenasterol, eritrodiol i uvaol.

6.5 Kvantitativna ocjena

Površine pikova 1-eikosanola i alifatskih alkohola C22, C24, C26, C28 izračunavaju se s pomoću sustava za prikupljanje podataka. Koeficijent odziva za 1-eikosanol trebao bi biti jednak 1.

Površine pikova α-kolestanola i sterola i triterpenskih dialkohola izračunavaju se s pomoću računalnog sustava. Pikove bilo kojega od spojeva koji nisu uključeni među one navedene u tablici 1. (ergosterol se ne smije izračunavati) ne treba uzimati u obzir. Koeficijent odziva za α-kolestanol treba biti jednak 1.

Izračunati koncentraciju svakog pojedinačnog alkoholnog spoja u mg/kg masnog materijala kako slijedi:

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

pri čemu je:

A_x = površina pika alkoholnog spoja x, u izračunima računalnog sustava.

A_s = površina pika 1-eikosanola/α-kolestanola, u izračunima računalnog sustava.

m_s = masa dodanog 1-eikosanola/α-kolestanola, u miligramima.

m = masa uzorka upotrijebljenog za određivanje, u gramima.

7. IZRAŽAVANJE REZULTATA

Koncentracije pojedinačnih alifatskih i triterpenskih alkohola iskazuju se kao mg/kg masnog materijala, a njihov zbroj kao ‚ukupni sadržaj alifatskih alkohola'. Ukupni je sadržaj zbroj C22, C24, C26 i C28.

Sastav svakog pojedinačnog alkoholnog spoja trebao bi se iskazivati do jednog decimalnog mjesta.

Ukupna koncentracija trebala bi se iskazivati bez ijednog decimalnog mjesta.

Izračunati postotak svakog pojedinačnog sterola iz omjera površine relevantnog pika prema ukupnoj površini pikova za sterole:

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

pri čemu je:

A_x = površina pika za sterol x.

ΣA = ukupna površina pikova za sterole.

β-sitosterol: Δ5,23-stigmastadienol + klerosterol + β-sitosterol + sitostanol + Δ5-avenasterol + Δ5,24-stigmastadienol.

Izračunavanje postotka eritrodiola i uvaola:

$$Eritrodiol + \ Uvaol = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

pri čemu je:

A_{Er} = površina eritrodiola u izračunima računalnog sustava.

A_{Uv} = površina uvaola u izračunima računalnog sustava.

Σ_{AT} = ukupna površina sterola + eritrodiola + uvaola u izračunima računalnog sustava.

Osim izračuna relativnog postotka pojedinačnih sterola i triterpenskih dialkohola te ukupne koncentracije sterola, potrebno je izračunati koncentraciju eritrodiola i uvaola te njihov zbroj, u mg/kg masnog materijala, na sljedeći način:

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

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

pri čemu je:

A_{Er} = površina pika eritrodiola u izračunima računalnog sustava.

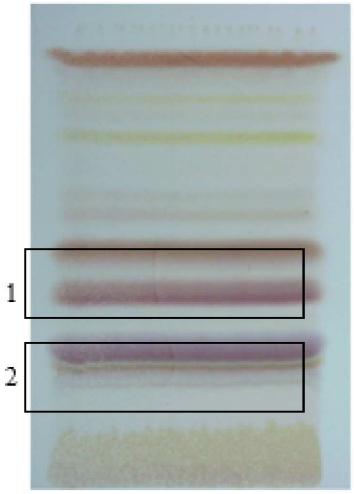
A_{Uv} = površina uvaola u izračunima računalnog sustava.

A_s = površina pika α-kolestanola; u izračunima računalnog sustava.

m_s = masa dodanog α-kolestanola, u miligramima.

m = masa uzorka upotrijebljenog za određivanje, u gramima.

Dodatak



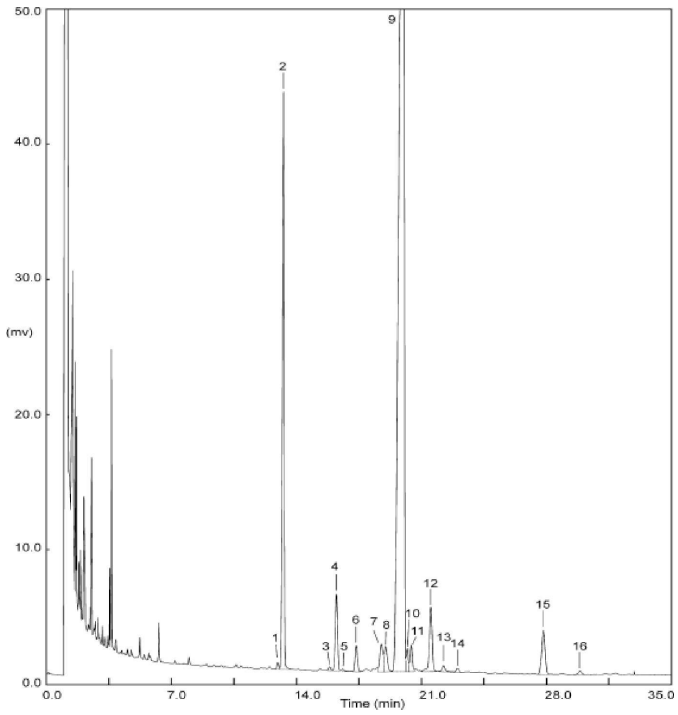
1. Ugljikovodici
2. α-tokoferol
3. Prenoli
4. Triterpenski alkoholi
5. Alifatski alkoholi
6. Metil steroli
7. Steroli
8. Triterpenski dialkoholi

Slika 1. – TLC neosapunjive frakcije ulja komine maslina dvaput eluirane heksanom: dietil eter (65:35), razvijen s pomoću SO4H2 (50 %) i zagrijan. Vrpce koje treba sastrugati su one unutar pravokutnika, pod brojem 1 su vrpce alifatskih alkohola, a pod brojem 2 one sterola i triterpenskih dialkohola.

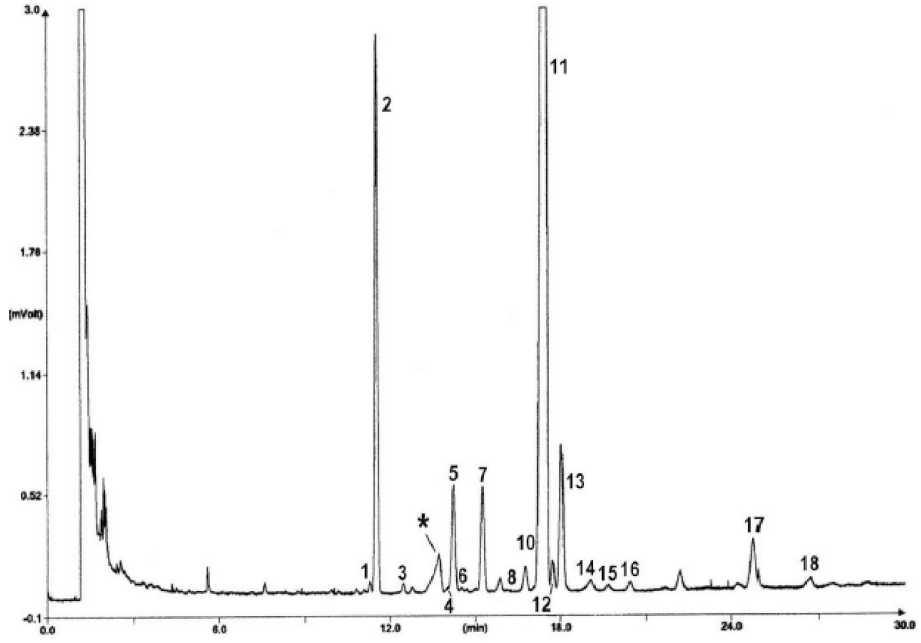
Tablica I. – Relativna retencijska vremena za sterole

Pik	Identifikacijska oznaka		Relativno retencijsko vrijeme	
			SE 54 kolona	SE 52 kolona
1.	Kolesterol	Δ-5-kolesten-3ß-ol	0,67	0,63
2.	Kolestanol	5α-kolestan-3ß-ol	0,68	0,64
3.	Brasikasterol	[24S]-24-methil-Δ-5,22-kolestadien-3β-ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S]-24-methil-Δ-5,7,22 kolestatrien-3β-ol	0,78	0,76
4.	24-metilen-kolesterol	24-metilen-Δ-5,24-kolestadien-3ß-o1	0,82	0,80.
5.	Kampesterol	(24R)-24-metil-Δ-5-kolesten-3ß-ol	0,83	0,81
6.	Kampestanol	(24R)-24-metil-kolestan-3ß-ol	0,85	0,82
7.	Stigma-sterol	(24S)-24-etil-Δ-5,22-kolestadien-3ß-ol	0,88	0,87
8.	Δ-7-kampesterol	(24R)-24-metil-Δ-7-kolesten-3ß-ol	0,93	0,92
9.	Δ-5,23-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil-Δ-5,23-kolestadien-3ß-ol	0,95	0,95
10.	Klerosterol	(24S)-24-etil-Δ-5,25-kolestadien-3ß-ol	0,96	0,96

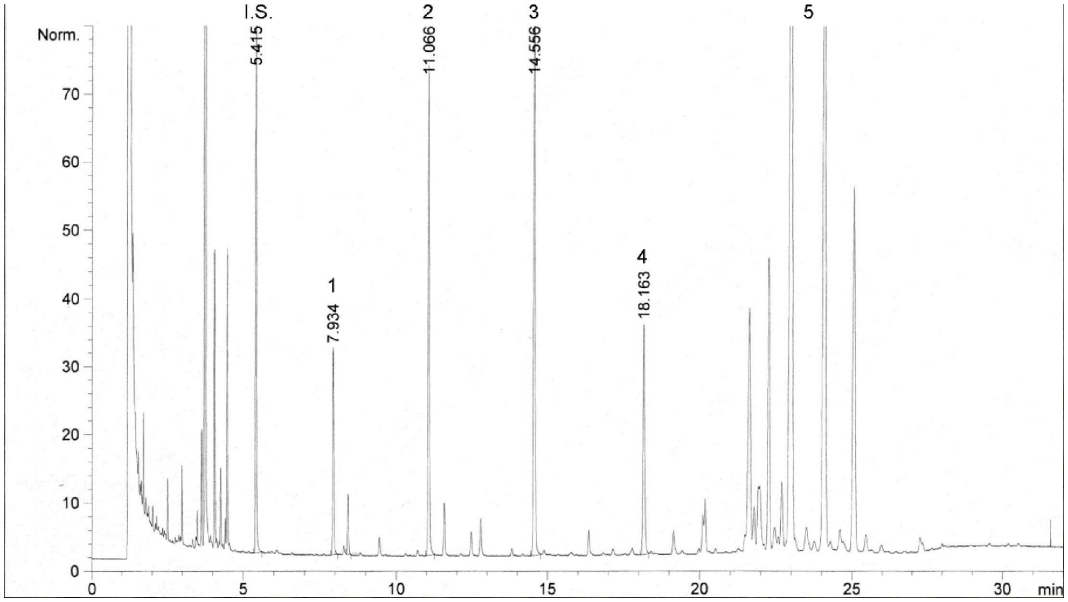
Pik	Identifikacijska oznaka		Relativno retencijsko vrijeme	
			SE 54 kolona	SE 52 kolona
11.	ß-sitosterol	(24R)-24-etil-Δ-5-kolesten-3ß-ol	1,00	1,00
12.	Sitostanol	24-etil-kolestan-3ß-ol	1,02	1,02
13.	Δ-5-avenasterol	(24Z)-24-etiliden-Δ-kolesten-3ß-ol	1,03	1,03
14.	Δ-5,24-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil-Δ-5,24-kolestadien-3ß-ol	1,08	1,08
15.	Δ-7-stigmastenol	(24R,S)-24-etil-Δ-7-kolesten-3ß-ol	1,12	1,12
16.	Δ-7-avenasterol	(24Z)-24-etiliden-Δ-7-kolesten-3ß-ol	1,16	1,16
17.	Eritrodiol	5α-olean-12-en-3β,28-diol	1,41	1,41
18.	Uvaol	Δ12-ursen-3β,28-diol	1,52	1,52



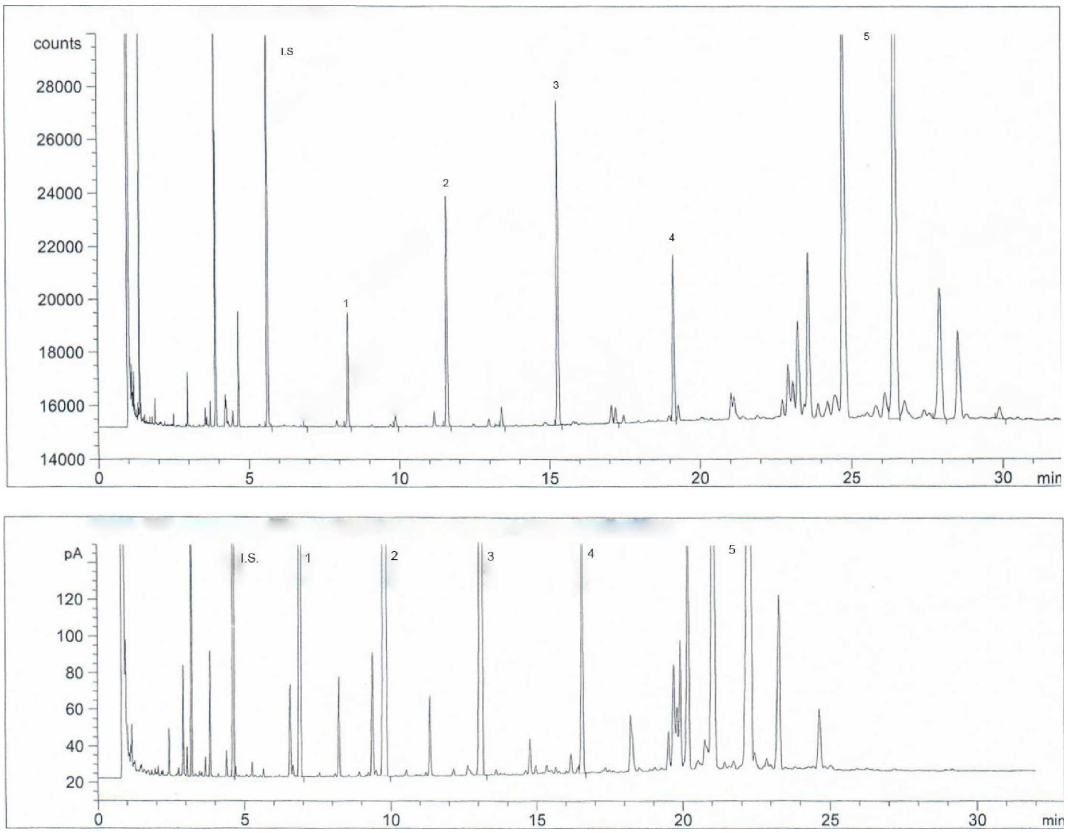
Slika 2. – GC-FID kromatografski profil sterola i triterpenskih dialkohola u rafiniranom maslinovu ulju. (1) Kolesterol, (2) α-kolestanol (I.S.), (3) 24-metilenkolesterol, (4) kampesterol, (5) kampestanol, (6) stigmasterol, (7) Δ5,23-stigmastadienol, (8) klerosterol, (9) β-sitosterol, (10) sitostanol, (11) Δ5-avenasterol, (12) Δ5,24-stigmastadienol, (13) Δ7-stigmastenol, (14) Δ7-avenasterol, (15) eritrodiol, (16) uvaol.



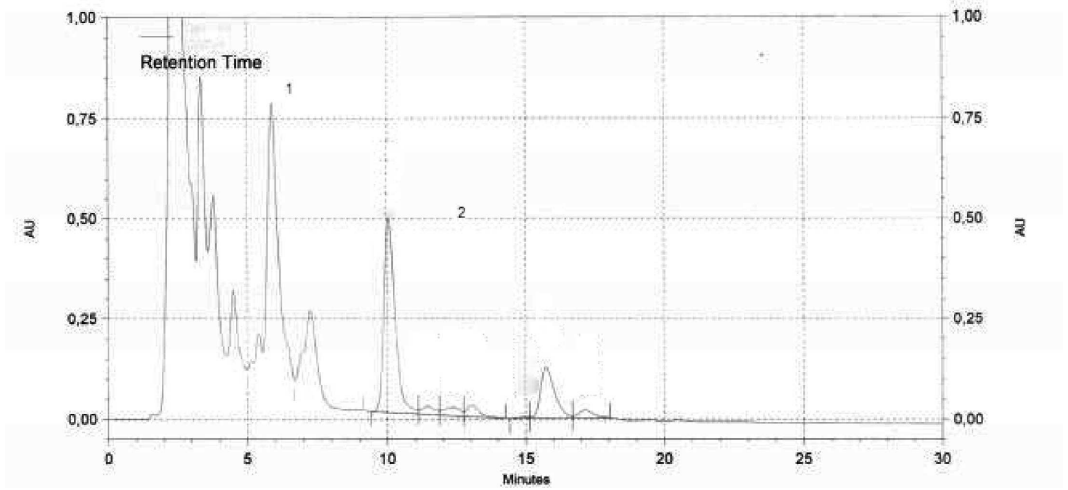
Slika 3. – GC-FID kromatografski profil sterola i triterpenskih dialkohola u maslinovu ulju lampante. (1) Kolesterol, (2) α-kolestanol, (3) brasikasterol, (4) 24-metilenkolesterol, (5) kampesterol, (6) kampestanol, (7) stigmasterol, (8) Δ7-kampesterol, (9) Δ5,23-stigmastadienol, (10) klerosterol, (11) β-sitosterol, (12) sitostanol, (13) Δ5-avenasterol, (14) Δ5,24-stigmastadienol, (15) Δ7-stigmastenol, (16) Δ7-avenasterol, (17) eritrodiol, (18) uvaol.



Slika 4. – GC-FID kromatografski profil alifatskih alkohola i triterpenskih dialkohola u maslinovu ulju. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) triterpenski alkoholi.



Slika 5. – GC-FID kromatografski profil alifatskih alkohola i triterpenskih dialkohola u rafiniranom maslinovu ulju i maslinovu ulju koje je podvrgnuto dvostrukom centrifugiranju. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) triterpenski alkoholi.



Slika 6. – HPLC kromatogram neosapunjivog maslinova ulja odvojenog HPLC metodom uz upotrebu UV detektora. (1) Alifatski i triterpenski alkoholi; (2) Steroli i triterpenski dialkoholi”