REGULAMENTUL DE PUNERE ÎN APLICARE (UE) 2019/1604 AL COMISIEI

din 27 septembrie 2019

de modificare a Regulamentului (CEE) nr. 2568/91 privind caracteristicile uleiurilor de măsline și ale uleiurilor din resturi de măsline, precum și metodele de analiză a acestora

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene,

având în vedere Regulamentul (UE) nr. 1308/2013 al Parlamentului European și al Consiliului din 17 decembrie 2013 de instituire a unei organizări comune a piețelor produselor agricole și de abrogare a Regulamentelor (CEE) nr. 922/72, (CEE) nr. 234/79, (CE) nr. 1037/2001 și (CE) nr. 1234/2007 ale Consiliului ([1]), în special articolul 91 primul paragraf litera (d),

întrucât:

(1) Regulamentul (CEE) nr. 2568/91 al Comisiei ([2]) definește caracteristicile fizico-chimice și organoleptice ale uleiului de măsline și ale uleiului din resturi de măsline și stabilește metodele de evaluare a caracteristicilor respective.

(2) Metodele și valorile-limită pentru caracteristicile uleiurilor sunt actualizate periodic în temeiul opiniilor experților chimiști și în concordanță cu rezultatele lucrărilor Consiliului Oleicol Internațional (IOC).

(3) Pentru a se asigura punerea în aplicare la nivelul Uniunii a celor mai recente standarde internaționale stabilite de IOC, este necesară actualizarea anumitor metode de analiză prevăzute în Regulamentul (CEE) nr. 2568/91.

(4) Standardul comercial al IOC a fost modificat în ceea ce privește exprimarea limitei pentru aciditatea liberă, indicele de peroxid, evaluarea organoleptică (mediana defectului și mediana atributului fructat) și diferența dintre ECN42 (HPLC) și ECN42 (calcul teoretic), din motive de coerență cu valorile de precizie ale metodei analitice.

(5) În conformitate cu articolul 2a alineatul (5) din Regulamentul (CEE) nr. 2568/91, statele membre trebuie să verifice dacă o probă de ulei de măsline este conformă cu categoria declarată, verificând caracteristicile stabilite în anexa I la regulamentul respectiv, fie în ordine aleatorie, fie respectând ordinea prevăzută într-un arbore decizional prezentat în anexa Ib.

(6) Având în vedere evoluțiile recente, este oportun să se actualizeze tabelele din anexa Ib la Regulamentul (CEE) nr. 2568/91 și din apendicele acesteia, după caz. De asemenea, se pare că termenul „diagramă” este mai adecvat decât termenul „arbore decizional”, având în vedere conținutul anexei Ib.

(7) Punctul 9.4 din anexa XII la Regulamentul (CEE) nr. 2568/91 definește mediana defectelor ca fiind mediana defectului perceput cu cea mai mare intensitate. În contextul contraanalizelor și având în vedere faptul că conformitatea uleiului trebuie să fie evaluată de diferite comisii, ar trebui să se clarifice faptul că decizia referitoare la conformitatea caracteristicilor unui ulei cu categoria declarată este legată exclusiv de valoarea medianei defectului principal, indiferent de natura acestuia.

(8) Prin urmare, Regulamentul (CEE) nr. 2568/91 ar trebui modificat în consecință.

(9) Măsurile prevăzute în prezentul regulament sunt conforme cu avizul Comitetului pentru organizarea comună a piețelor agricole,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

Regulamentul (CEE) nr. 2568/91 se modifică după cum urmează:

1. Articolul 2 se modifică după cum urmează:

(a) la alineatul (1), litera (l) se înlocuiește cu următorul text:

„(l) pentru determinarea compoziției și a conținutului de steroli și pentru determinarea compușilor alcoolici prin cromatografie în fază gazoasă cu coloană capilară, metoda prevăzută în anexa XIX”;

([1]) JO L 347, 20.12.2013, p. 671.
([2]) Regulamentul (CEE) nr. 2568/91 al Comisiei din 11 iulie 1991 privind caracteristicile uleiurilor de măsline și ale uleiurilor din resturi de măsline, precum și metodele de analiză a acestora (JO L 248, 5.9.1991, p. 1).

(b) alineatul (2) al treilea paragraf se înlocuiește cu următorul text:

„În cazul în care comisia nu confirmă categoria declarată în ceea ce privește caracteristicile organoleptice, autoritățile naționale sau reprezentanții acestora dispun, la cererea părții interesate, să se efectueze fără întârziere două contraanalize de către alte comisii aprobate. Cel puțin una dintre comisii trebuie să fie o comisie aprobată de statul membru producător în cauză. Se consideră că respectivele caracteristici sunt conforme cu caracteristicile declarate dacă cele două contraanalize confirmă clasificarea declarată. În caz contrar, indiferent de tipul defectelor determinate în timpul contraanalizelor, clasificarea este declarată neconformă cu caracteristicile, iar costurile contraanalizelor sunt suportate de partea interesată."

2. Textul de la articolul 2a alineatul (5) litera (b) se înlocuiește cu următorul:

„(b) respectând ordinea prevăzută de diagrama din anexa Ib, până se ajunge la una dintre deciziile menționate în diagramă."

3. Tabelul ANEXE – Cuprins se înlocuiește cu tabelul din anexa I la prezentul regulament.

4. Anexa I se înlocuiește cu textul din anexa II la prezentul regulament.

5. În anexa Ia, punctul 2.1 se înlocuiește cu următorul text:

„2.1. Fiecare probă primară trebuie să se împartă în probe de laborator, în conformitate cu punctul 2.5 din standardul EN ISO 5555, și trebuie să se analizeze urmându-se ordinea prezentată în diagrama prevăzută în anexa Ib sau în orice altă ordine aleatorie."

6. Anexa Ib se înlocuiește cu textul din anexa III la prezentul regulament.

7. Anexa V se elimină.

8. Punctul 4.2 din anexa VII se înlocuiește cu următorul text:

„4.2. n-hexan (pentru cromatografie). Hexanul poate fi înlocuit cu izooctan (2,2,4-trimetilpentan pentru cromatografie), cu condiția să se atingă valori de precizie comparabile."

9. Anexa XII se modifică în conformitate cu anexa IV la prezentul regulament.

10. Anexa XVII se modifică în conformitate cu anexa V la prezentul regulament.

11. Anexa XVIII se modifică în conformitate cu anexa VI la prezentul regulament.

12. Anexa XIX se înlocuiește cu textul din anexa VII la prezentul regulament.

13. Punctul 4.2 din anexa XX se înlocuiește cu următorul text:

„4.2. n-hexan, pentru cromatografie sau analiza reziduurilor. Hexanul poate fi înlocuit cu izooctan (2,2,4-trimetil pentan pentru cromatografie), cu condiția să se atingă valori de precizie comparabile. Solvenții cu punct de fierbere mai ridicat decât n-hexanul necesită mai mult timp pentru a se evapora. Cu toate acestea, ei sunt preferați, dată fiind toxicitatea hexanului. Puritatea trebuie verificată; de exemplu, reziduul rezultat după evaporarea a 100 ml de solvent poate fi controlat.

AVERTISMENT – Gazele de evacuare se pot aprinde. A se ține la distanță de surse de căldură, scântei sau flăcări deschise. A se verifica întotdeauna etanșeitatea recipientelor. A se asigura ventilarea corespunzătoare în timpul utilizării. A se evita acumularea gazelor de evacuare și a se lua măsuri de eliminare a oricăror surse de incendiu, precum radiatoarele sau aparatele electrice care nu sunt fabricate din materiale neinflamabile. Toxic la inhalare, deoarece poate cauza deteriorarea celulelor sistemului nervos. A se evita inspirarea gazelor de evacuare. A se utiliza, dacă este necesar, un aparat de respirat adecvat. A se evita contactul cu ochii și cu pielea.

Izooctanul este un lichid inflamabil care prezintă un pericol de incendiu. Limitele de explozie în aer sunt de 1,1 % până la 6,0 % (fracție volumică). Este toxic în caz de ingerare și de inhalare. Utilizați o hotă de ventilare în stare bună de funcționare pentru a lucra cu acest solvent."

Articolul 2

Prezentul regulament intră în vigoare în a douăzecea zi de la data publicării în *Jurnalul Oficial al Uniunii Europene*.

Prezentul regulament este obligatoriu în toate elementele sale și se aplică direct în toate statele membre.

Adoptat la Bruxelles, 27 septembrie 2019.

Pentru Comisie

Președintele

Jean-Claude JUNCKER

ANEXA I

„*ANEXE*

CUPRINS

Anexa I	Caracteristicile uleiurilor de măsline
Anexa Ia	Eșantionarea uleiului de măsline sau a uleiului din resturi de măsline livrat în ambalaje imediate
Anexa Ib	Diagrama pentru verificarea conformității unei probe de ulei de măsline cu categoria declarată
Anexa II	Determinarea acizilor grași liberi, metoda la rece
Anexa III	Determinarea indicelui de peroxid
Anexa IV	Determinarea conținutului de ceară cu ajutorul cromatografiei în fază gazoasă cu coloană capilară
Anexa VII	Determinarea procentului de monopalmitat de 2-gliceril
Anexa IX	Analiza spectrofotometrică în ultraviolet
Anexa X	Determinarea esterilor metilici ai acizilor grași prin cromatografie în fază gazoasă
Anexa XI	Determinarea conținutului de solvenți halogenați volatili din uleiul de măsline
Anexa XII	Metoda Consiliului Oleicol Internațional pentru evaluarea organoleptică a uleiurilor de măsline virgine
Anexa XV	Conținutul de ulei al resturilor de măsline
Anexa XVI	Determinarea indicelui de iod
Anexa XVII	Metodă de determinare a conținutului de stigmastadiene din uleiurile vegetale
Anexa XVIII	Determinarea diferenței dintre conținutul real și conținutul teoretic de trigliceride cu NEC 42
Anexa XIX	Determinarea compoziției și a conținutului de steroli și de compuși alcoolici prin cromatografie în fază gazoasă cu coloană capilară
Anexa XX	Metoda pentru determinarea conținutului de ceruri, esteri metilici ai acizilor grași și esteri etilici ai acizilor grași prin cromatografie în fază gazoasă cu coloană capilară
Anexa XXI	Rezultatele verificărilor conformității efectuate în cazul uleiurilor de măsline menționate la articolul 8 alineatul (2)”

ANEXA II

„*ANEXA I*

CARACTERISTICILE ULEIURILOR DE MĂSLINE

Caracteristici de calitate

Categorie	Aciditate (%) (*)	Indice de peroxid (mEq O_2/kg)	K_{232}	K_{268} sau K_{270}	Delta-K	Evaluare organoleptică		Esteri etilici ai acizilor grași (mg/kg)
						Mediana defectului (Md) (*)	Mediana atributului fructat (Mf)	
1. Ulei de măsline extravirgin	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Ulei de măsline virgin	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Ulei de măsline lampant	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 (1)	—	—
4. Ulei de măsline rafinat	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Ulei de măsline compus din ulei de măsline rafinat și uleiuri de măsline virgine	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Ulei brut din resturi de măsline	—	—	—	—	—		—	—
7. Ulei rafinat din resturi de măsline	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Ulei din resturi de măsline	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

(1) Mediana defectului poate fi mai mică sau egală cu 3,5 dacă mediana atributului fructat este egală cu 0,0.

Caracteristici de puritate

Categorie	Compoziția de acizi grași [1]						Suma izomerilor trans ai acidului oleic (%)	Suma izomerilor trans ai acidului linoleic și ai acidului linolenic (%)	Stigmastadiene (mg/kg) [2]	Diferență: ECN42 (HPLC) și ECN42 (calcul teoretic)	Monopalmitat de 2-gliceril (%)
	Miristic (%)	Linolenic (%)	Arahidic (%)	Eicosenoic (%)	Behenic (%)	(%)					
1. Ulei de măsline extravirgin	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9 dacă procentul de acid palmitic total ≤ 14,00 % ≤ 1,0 dacă procentul de acid palmitic total > 14,00 %
2. Ulei de măsline virgin	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9 dacă procentul de acid palmitic total ≤ 14,00 % ≤ 1,0 dacă procentul de acid palmitic total > 14,00 %
3. Ulei de măsline lampant	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ |0,30|	≤ 0,9 dacă procentul de acid palmitic total ≤ 14,00 % ≤ 1,1 dacă procentul de acid palmitic total > 14,00 %
4. Ulei de măsline rafinat	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9 dacă procentul de acid palmitic total ≤ 14,00 % ≤ 1,1 dacă procentul de acid palmitic total > 14,00 %
5. Ulei de măsline compus din ulei de măsline rafinat și uleiuri de măsline virgine	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9 dacă procentul de acid palmitic total ≤ 14,00 % ≤ 1,0 dacă procentul de acid palmitic total > 14,00 %
6. Ulei brut din resturi de măsline	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ |0,60|	≤ 1,4
7. Ulei rafinat din resturi de măsline	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,4
8. Ulei din resturi de măsline	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,2

[1] Conținutul de alți acizi grași (%): palmitic: 7,50-20,00; palmitoleic: 0,30-3,50; heptadecanoic: ≤ 0,40; heptadecenoic ≤ 0,60; stearic: 0,50-5,00; oleic: 55,00-83,00; linoleic: 2,50-21,00.

[2] Suma izomerilor care ar putea să fie (sau să nu fie) separați prin coloana capilară.

Categorie	Compoziția de steroli						Steroli totali (mg/kg)	Eritrodiol și uvaol (%) (**)	Ceruri mg/kg (**)
	Colesterol (%)	Brasicasterol (%)	Campesterol (1) (%)	Stigmasterol (%)	β-Sitosterol ap (2) (%)	Delta-7-stig-mastenol (1) (%)			
1. Ulei de măsline extravirgin	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Ulei de măsline virgin	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Ulei de măsline lampant	≤ 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. Ulei de măsline rafinat	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
5. Ulei de măsline compus din ulei de măsline rafinat și uleiuri de măsline virgine	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Ulei brut din resturi de măsline	≤ 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. Ulei rafinat din resturi de măsline	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Ulei din resturi de măsline	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

(1) A se vedea apendicele la prezenta anexă.

(2) β-Sitosterol ap: delta-5,23-stigmastadienol+clerosterol+betasitosterol+sitostanol+delta-5-avenasterol+delta-5,24-stigmastadienol.

(3) Uleiurile cu un conținut de ceară cuprins între 300 mg/kg și 350 mg/kg sunt considerate drept ulei de măsline lampant în cazul în care cantitatea de alcooli alifatici totali este mai mică sau egală cu 350 mg/kg sau procentul de eritrodiol și uvaol este mai mic sau egal cu 3,5 %.

(4) Uleiurile cu un conținut de ceară cuprins între 300 mg/kg și 350 mg/kg sunt considerate uleiuri brute din resturi de măsline dacă conținutul total de alcooli alifatici depășește 350 mg/kg și dacă conținutul de eritrodiol și uvaol depășește 3,5 %.

Note:

(a) Rezultatele analizelor trebuie exprimate cu același număr de zecimale ca cele indicate pentru fiecare caracteristică. Ultima cifră trebuie mărită cu o unitate în cazul în care cifra următoare este mai mare de 4.

(b) Este de ajuns ca o singură caracteristică să nu fie conformă cu valorile indicate pentru ca uleiul să fie încadrat într-o altă categorie sau să fie declarat neconform, în sensul prezentului regulament.

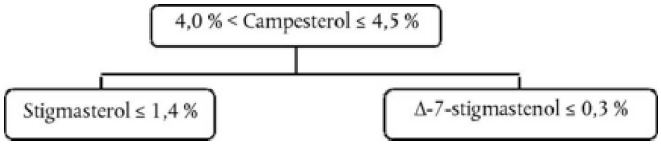
(c) Pentru uleiul de măsline lampant, cele două caracteristici de calitate marcate cu un asterisc (*) pot fi diferite în mod simultan de limitele stabilite pentru această categorie.

(d) Caracteristicile marcate cu două asteriscuri (**) implică faptul că, pentru uleiurile brute din resturi de măsline, cele două limite aplicabile pot fi diferite de valorile indicate în mod simultan. Pentru uleiul din resturi de măsline și uleiul rafinat din resturi de măsline, una dintre limitele aplicabile poate fi diferită de valorile indicate.

Apendice

Arbori decizionali

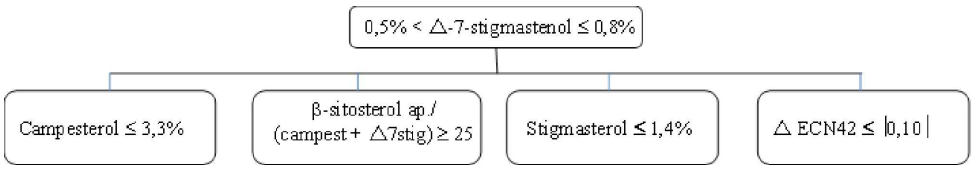
Arborele decizional referitor la **campesterol** pentru uleiurile de măsline virgine și extravirgine:



Ceilalți parametri trebuie să respecte limitele stabilite în prezentul regulament.

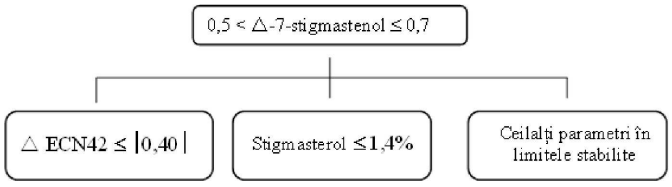
Arborele decizional referitor la **Delta-7-stigmastenol**:

— Uleiuri de măsline extravirgine și virgine



Ceilalți parametri trebuie să respecte limitele stabilite în prezentul regulament.

— Uleiuri din resturi de măsline (brute și rafinate)



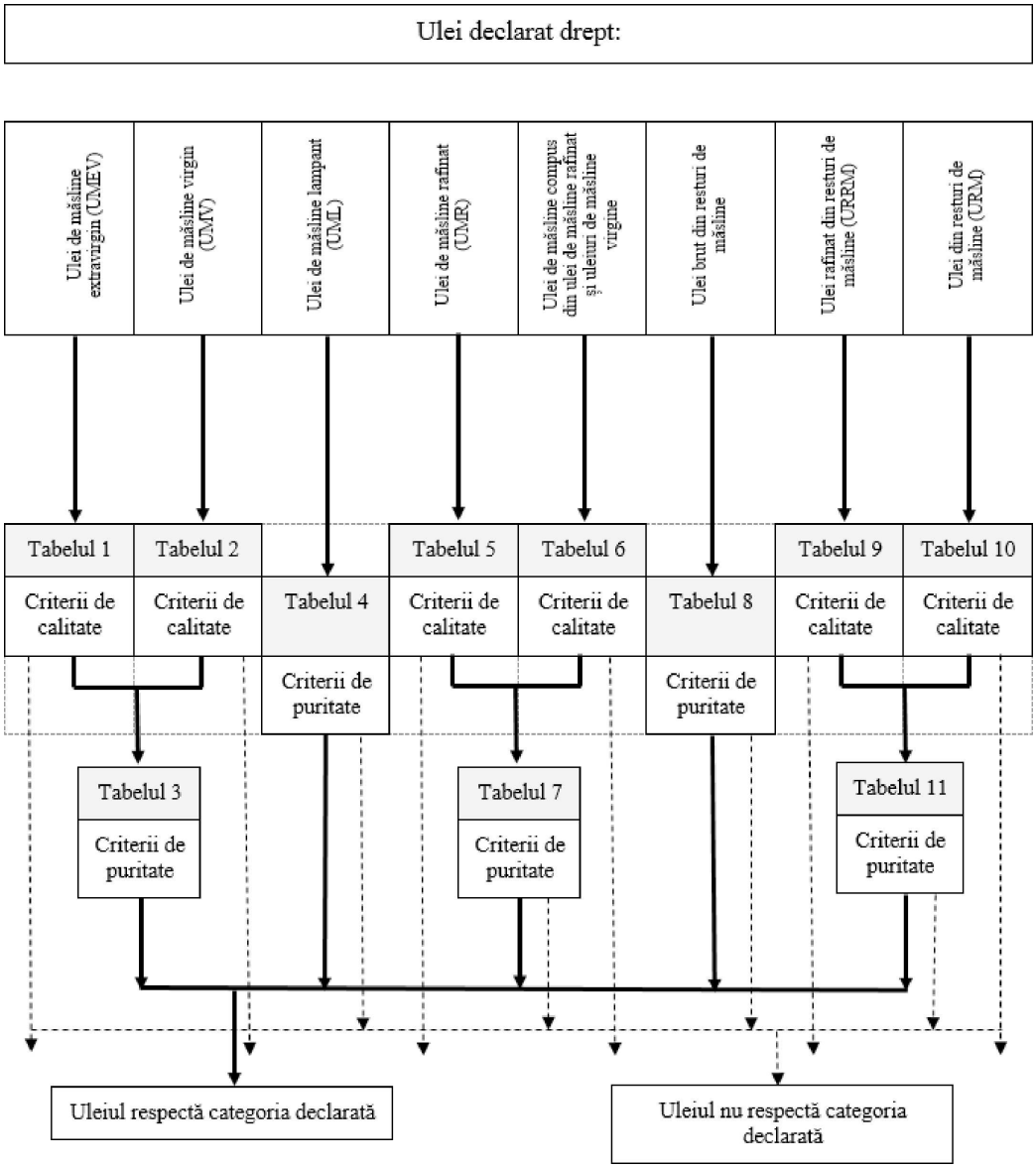
Ceilalți parametri trebuie să respecte limitele stabilite în prezentul regulament.”

ANEXA III

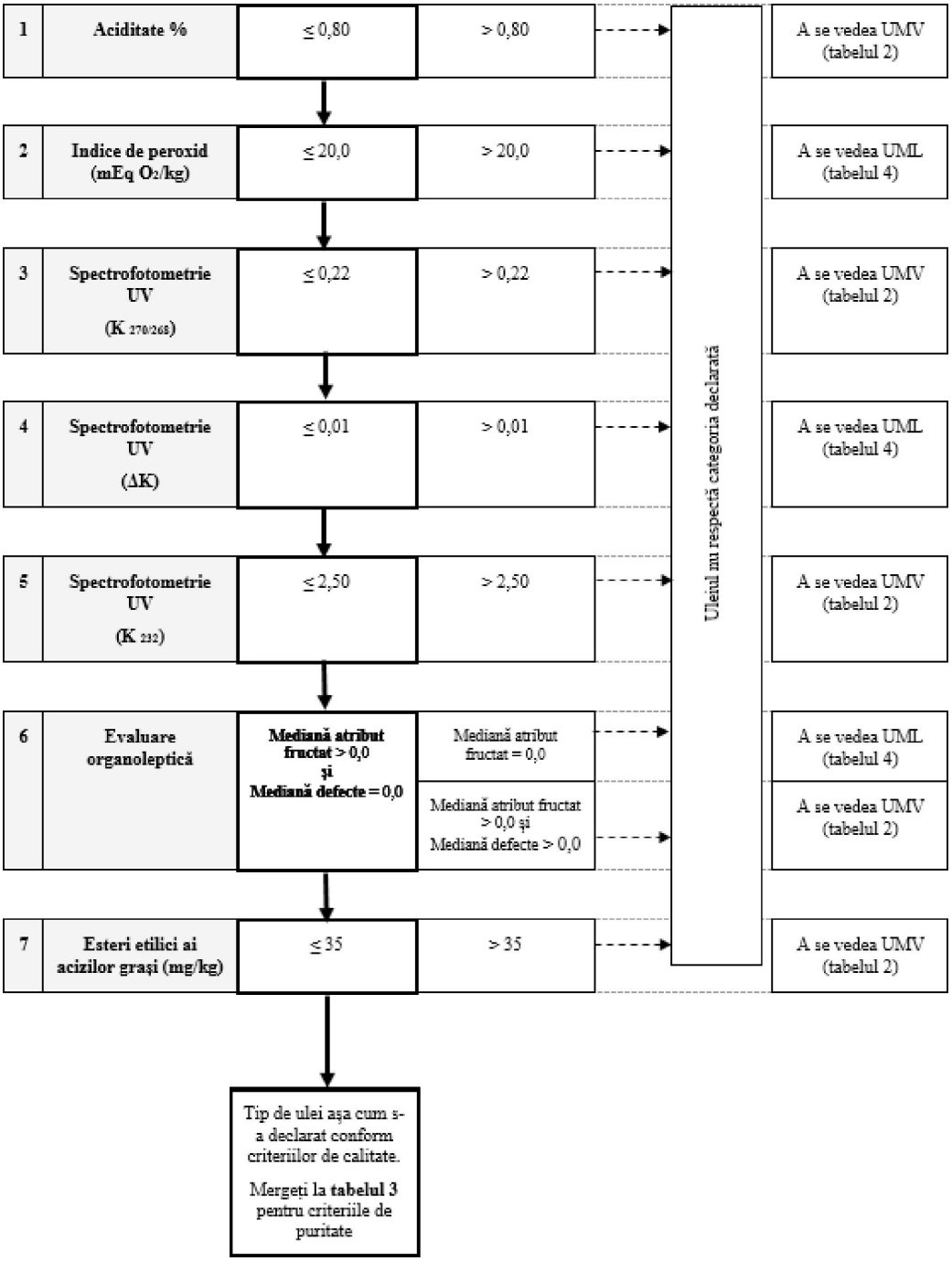
„ANEXA Ib

DIAGRAMA PENTRU VERIFICAREA CONFORMITĂȚII UNEI PROBE DE ULEI DE MĂSLINE CU CATEGORIA DECLARATĂ

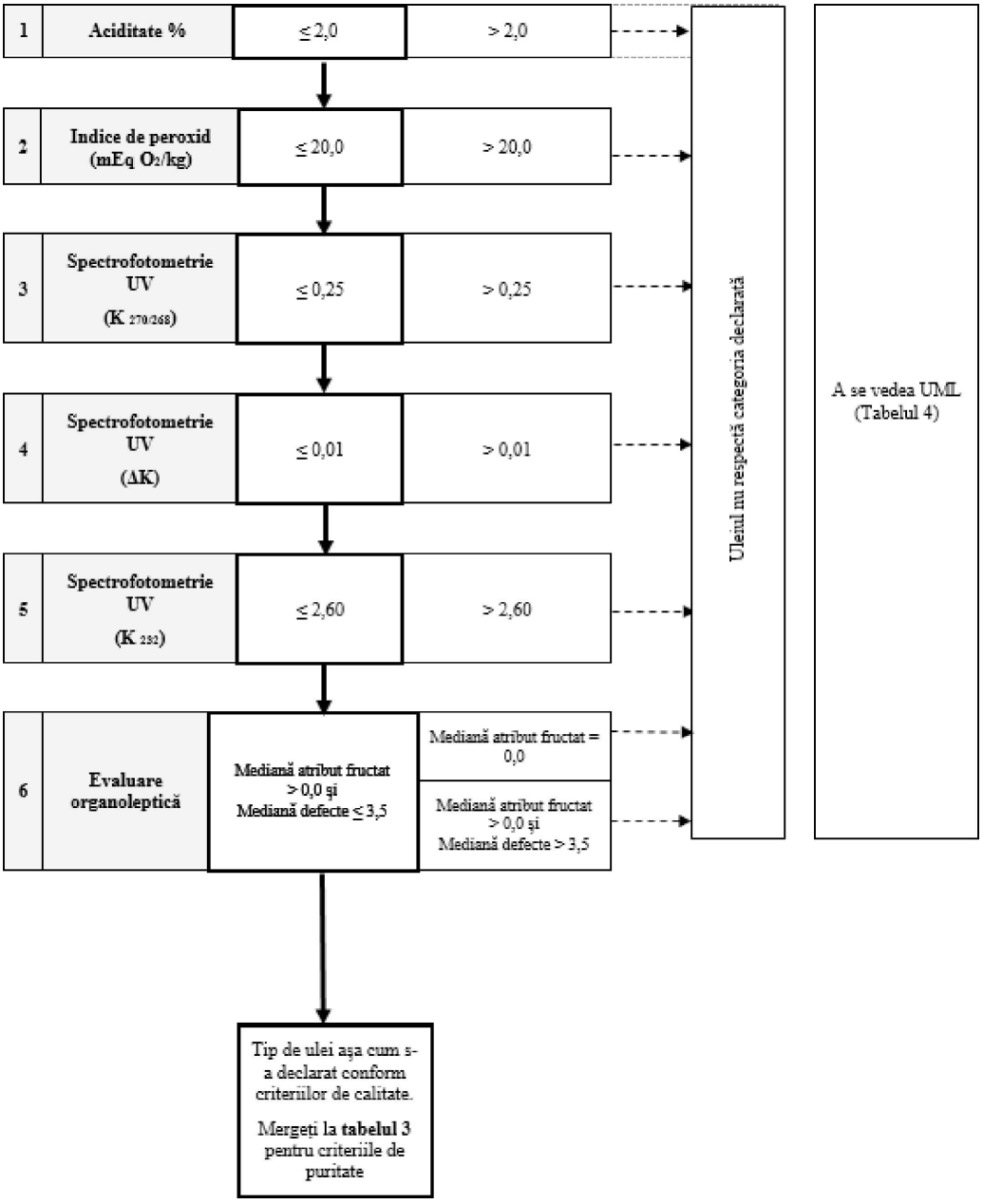
Tabel general



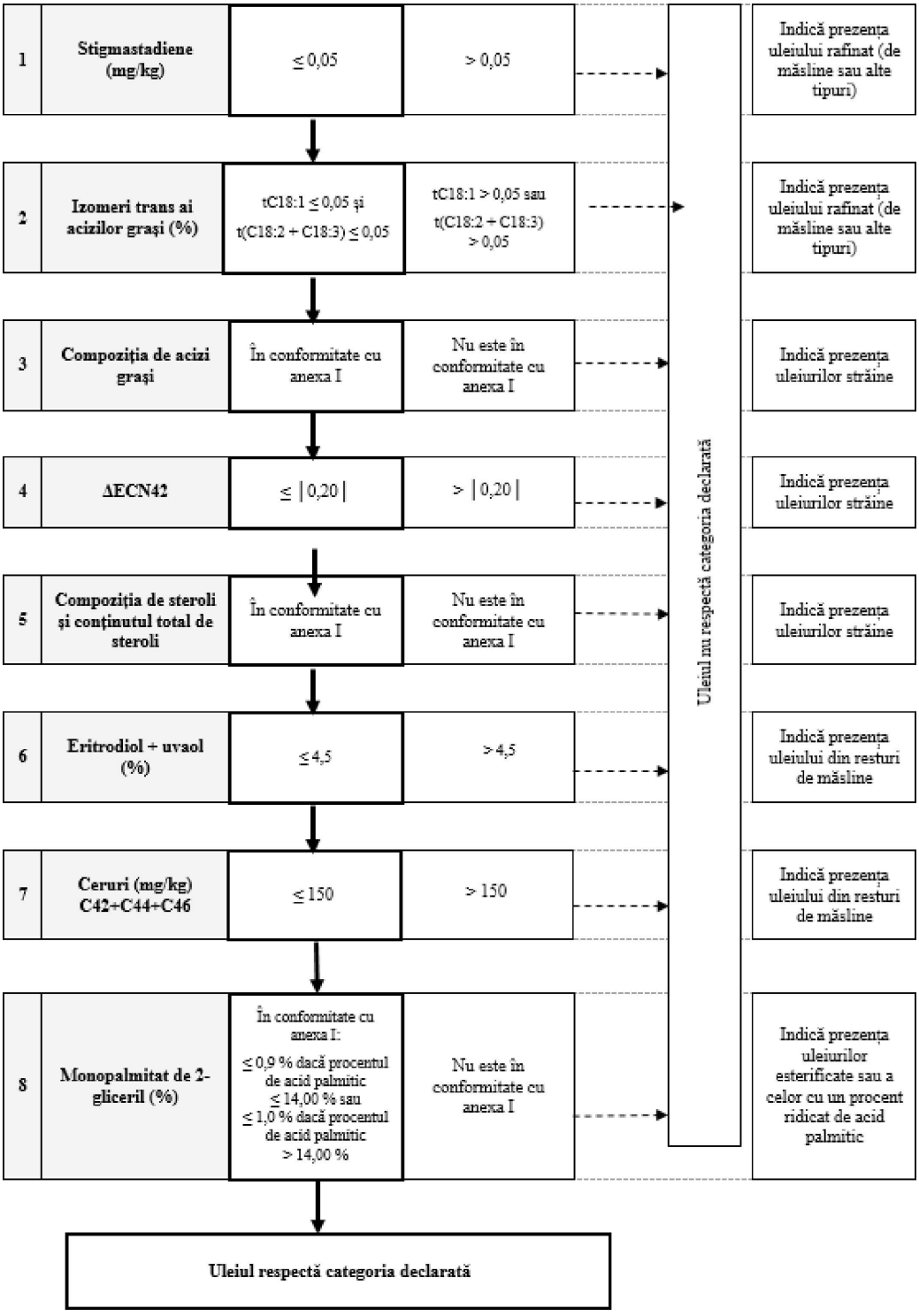
Tabelul 1 – Ulei de măsline extravirgin – Criterii de calitate



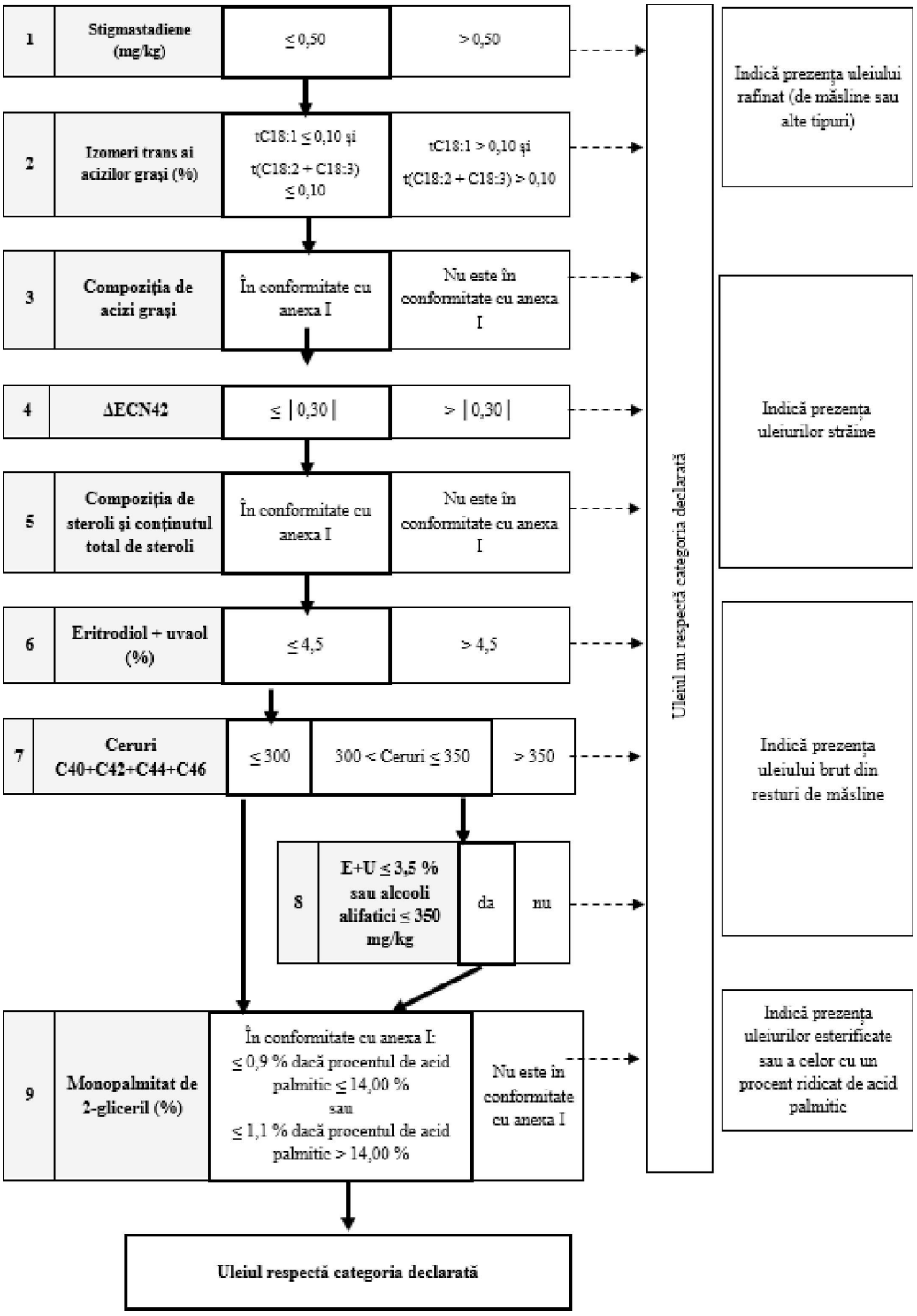
Tabelul 2 – Uleiuri de măsline virgine – Criterii de calitate



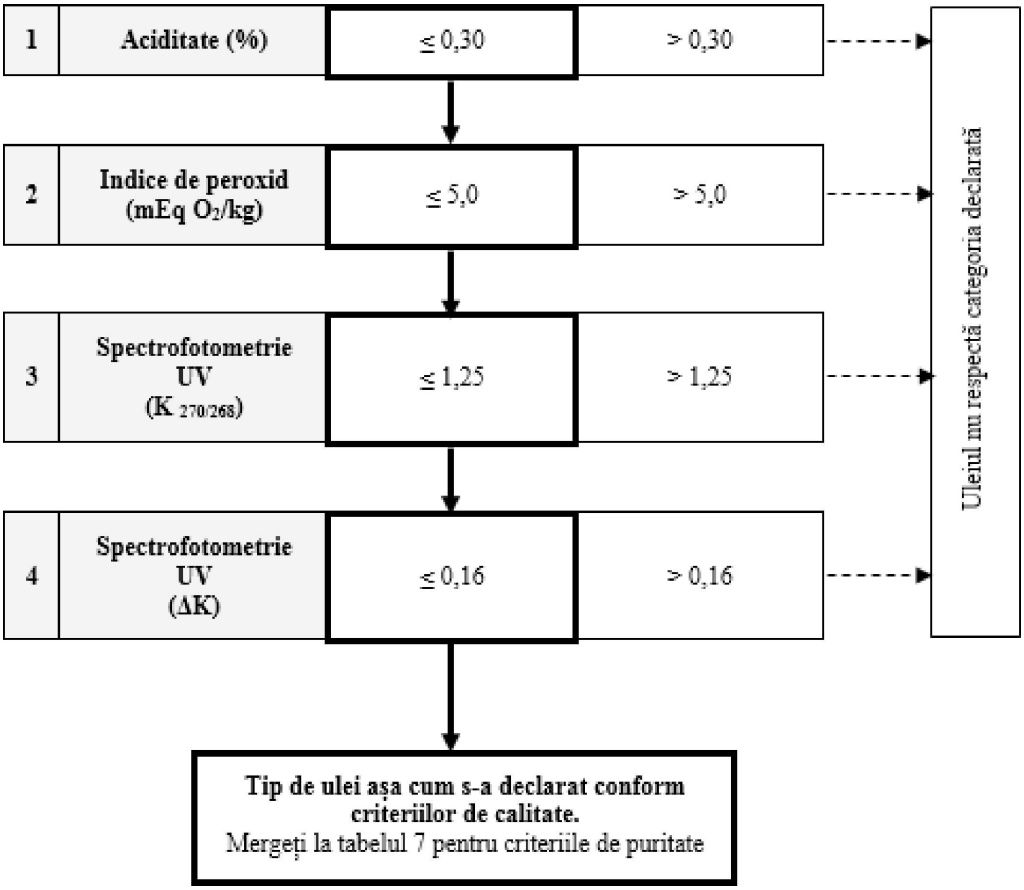
Tabelul 3 – Ulei de măsline extravirgin și virgin – Criterii de puritate



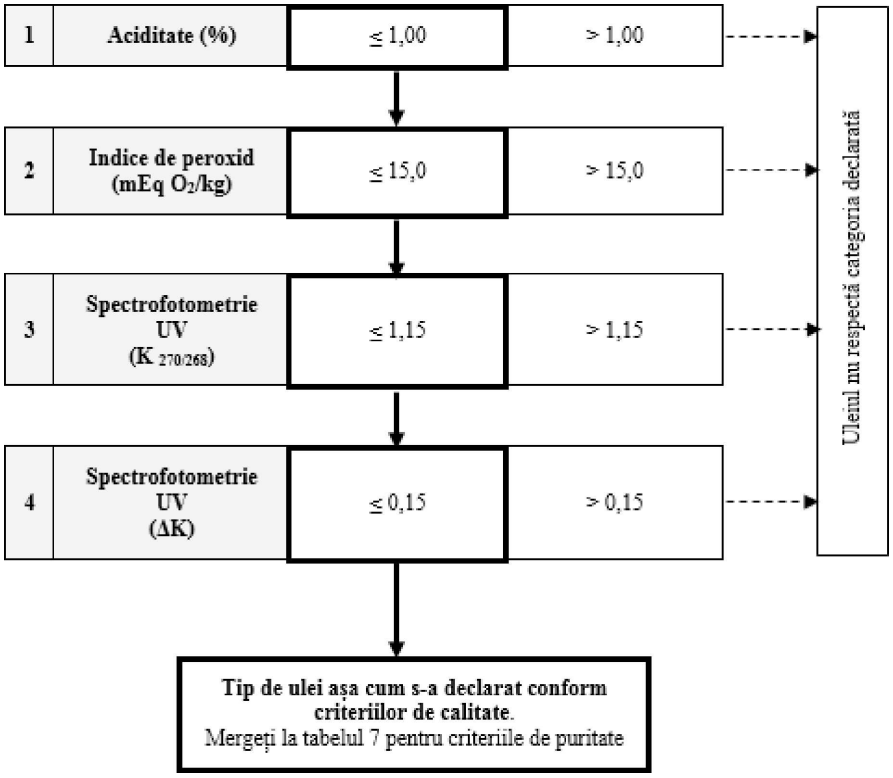
Tabelul 4 – Ulei de măsline lampant – Criterii de puritate



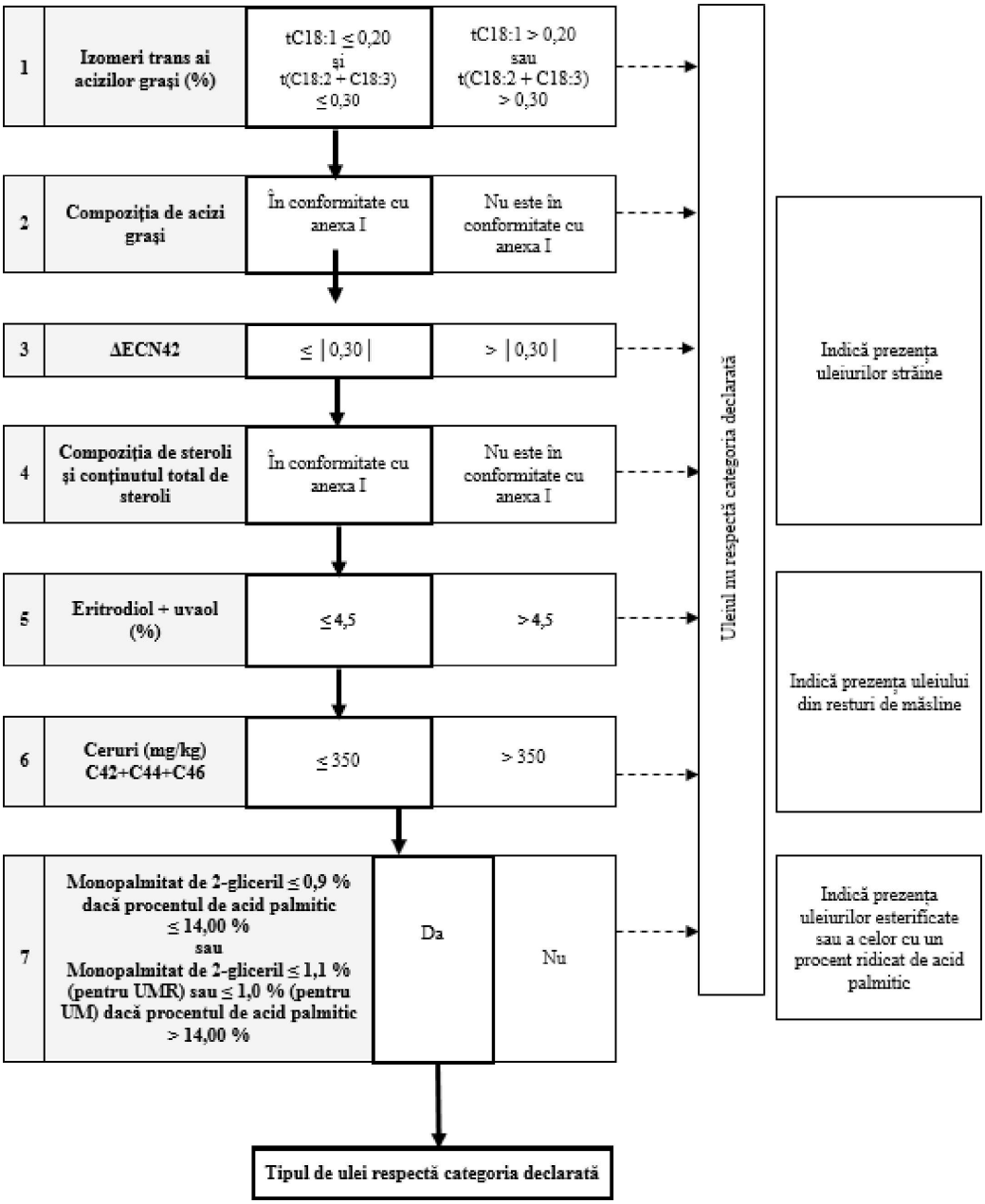
Tabelul 5 – Ulei de măsline rafinat – Criterii de calitate



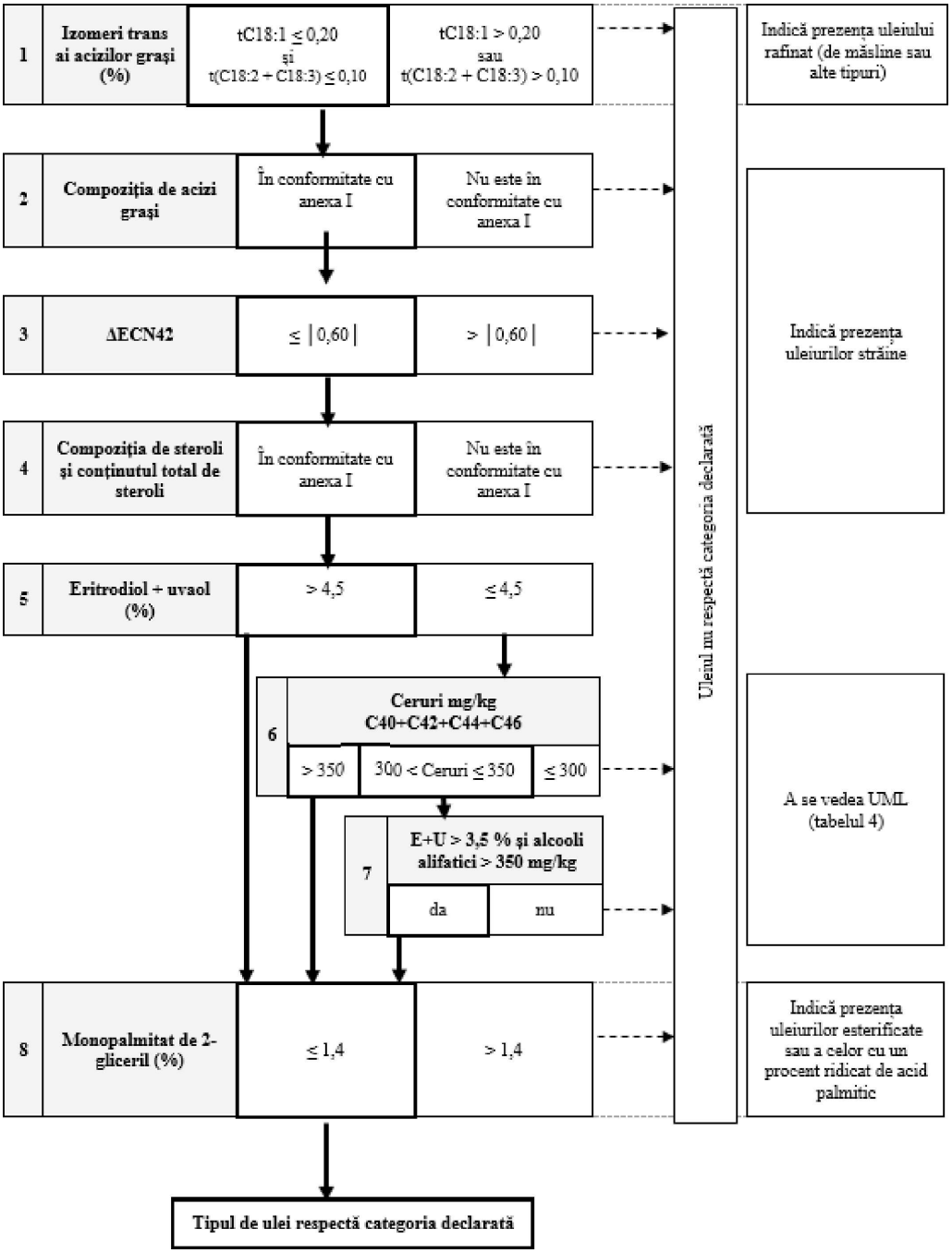
Tabelul 6 – Ulei de măsline (compus din ulei de măsline rafinat și uleiuri de măsline virgine) – Criterii de calitate



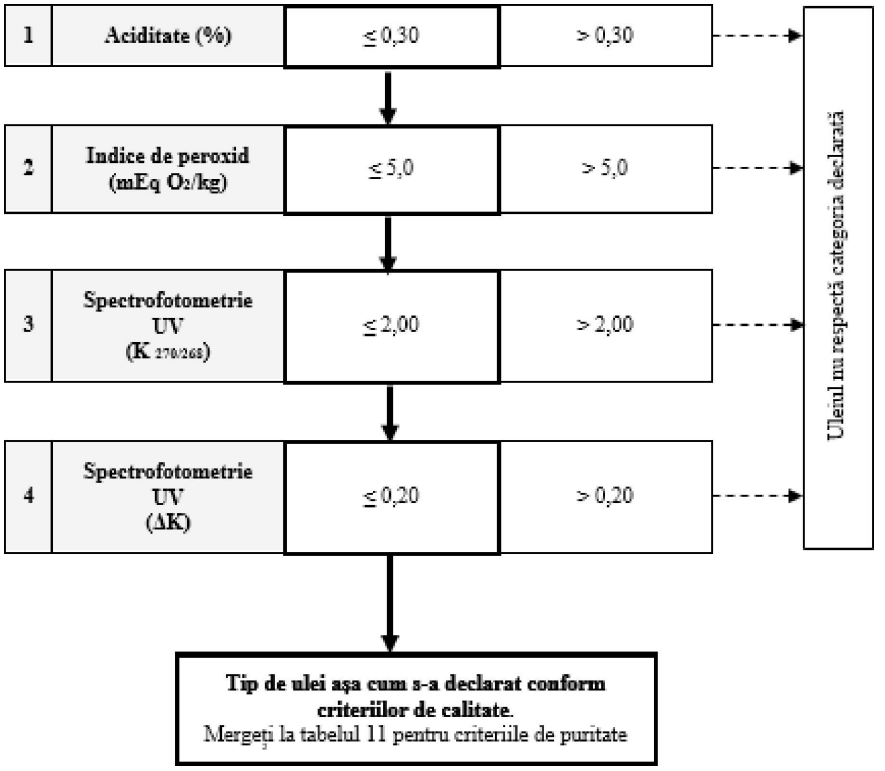
Tabelul 7 – Ulei de măsline rafinat și ulei de măsline compus din ulei de măsline rafinat și uleiuri de măsline virgine – Criterii de puritate



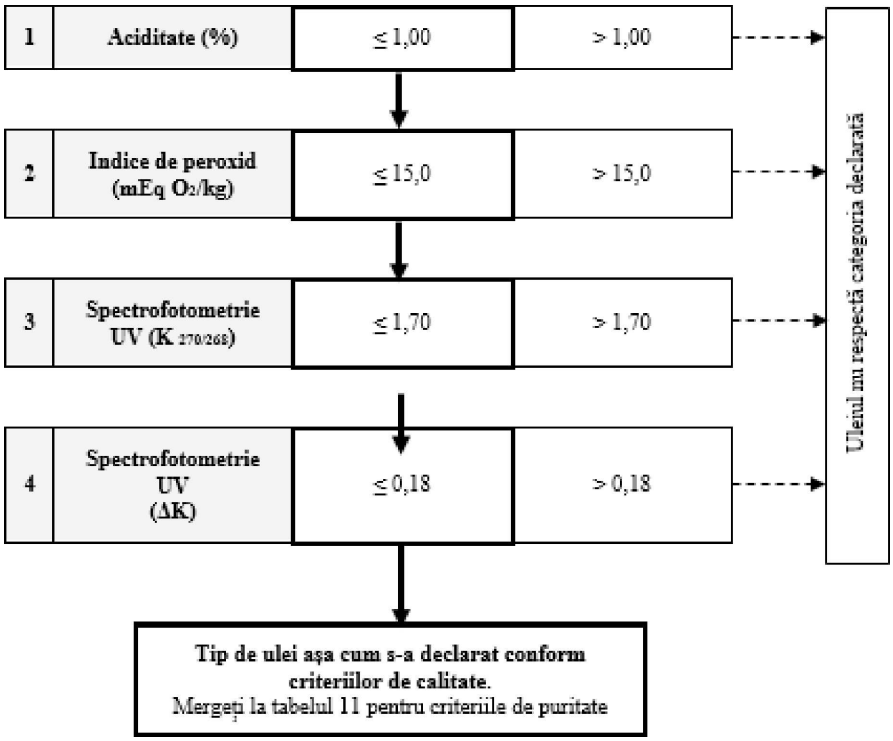
Tabelul 8 – Ulei brut din resturi de măsline – Criterii de puritate



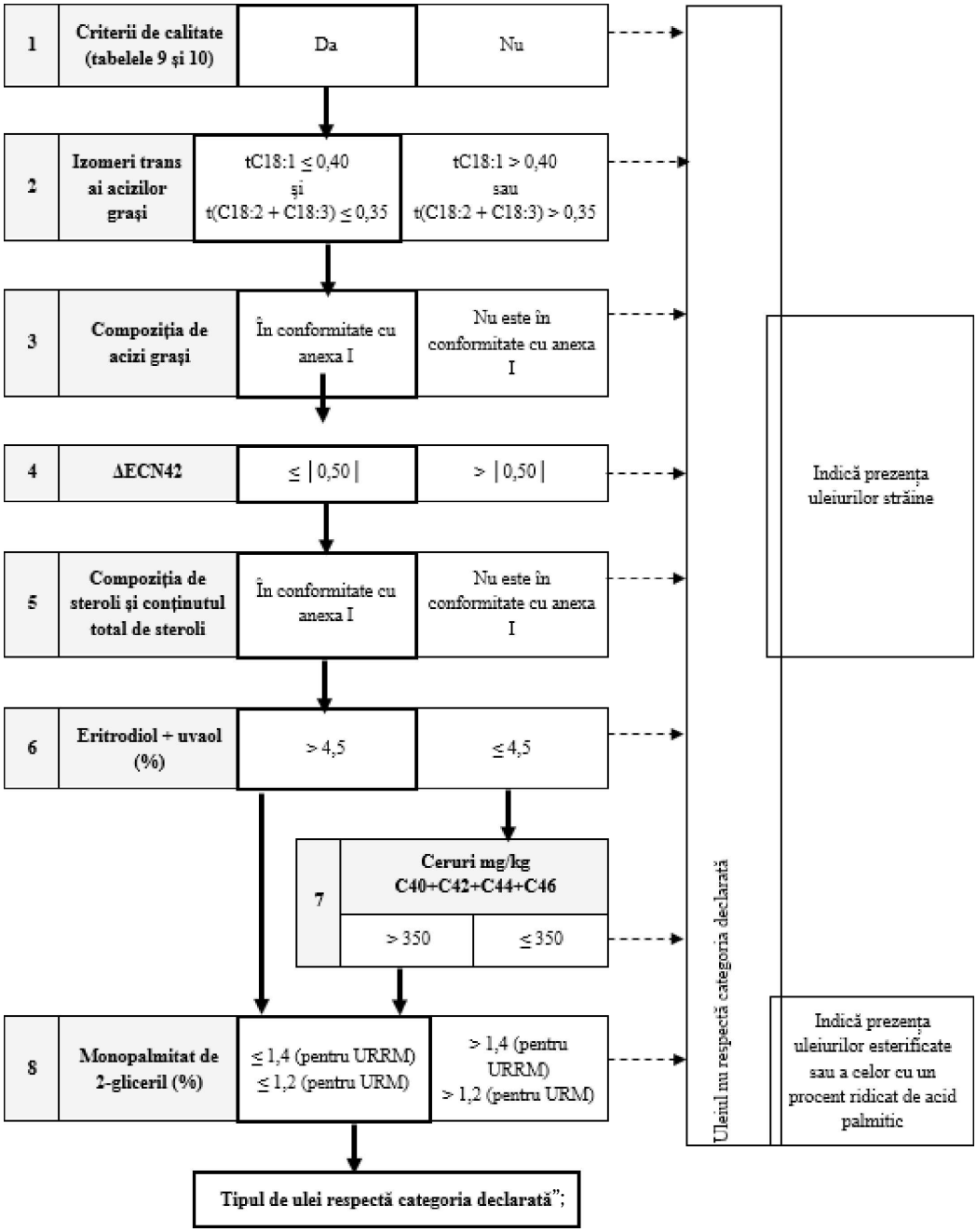
Tabelul 9 – Ulei rafinat din resturi de măsline – Criterii de calitate



Tabelul 10 – Ulei din resturi de măsline – Criterii de calitate



Tabelul 11 – Ulei rafinat din resturi de măsline și ulei din resturi de măsline – Criterii de puritate



ANEXA IV

Anexa XII se modifică după cum urmează:

1. Punctul 3.3 se înlocuiește cu următorul text:

„3.3. **Terminologie opțională în scopul etichetării**

La cerere, președintele comisiei poate atesta faptul că uleiurile evaluate respectă definițiile și intervalele care corespund doar termenilor următori, în funcție de intensitatea și de percepția atributelor.

Atributele pozitive (fructat, amar și picant): în funcție de intensitatea percepției:

— *robust*, atunci când mediana atributului este mai mare decât 6,0;

— *mediu*, atunci când mediana atributului este mai mare decât 3,0 și mai mică sau egală cu 6,0;

— *delicat*, atunci când mediana atributului este mai mică sau egală cu 3,0.

Fructat Ansamblul senzațiilor olfactive caracteristice ale uleiului, care depinde de soiul măslinelor și care provine de la fructe sănătoase și proaspete, în care nu predomină nici atributul fructat verde și nici atributul fructat copt. Senzațiile sunt percepute direct și/sau retronazal.

Fructat verde Set de senzații olfactive caracteristice uleiului, amintind de cele ale fructelor verzi, care depind de soiul măslinelor și provin de la fructe verzi, sănătoase și proaspete. Senzațiile sunt percepute direct și/sau retronazal.

Fructat copt Set de senzații olfactive caracteristice uleiului, amintind de cele ale fructelor coapte, care depind de soiul măslinelor și provin de la fructe sănătoase și proaspete. Senzațiile sunt percepute direct și/sau retronazal.

Echilibrat Un ulei care nu este dezechilibrat, adică senzația olfactivă, gustativă și tactilă generată de un ulei în cazul căruia mediana atributului amar și mediana atributului picant nu depășesc cu mai mult de 2,0 puncte mediana atributului fructat.

Ulei dulce Un ulei în cazul căruia mediana atributului amar și cea a atributului picant sunt mai mici sau egale cu 2,0.

Lista termenilor în funcție de intensitatea percepției:

Termeni care fac obiectul prezentării unui certificat de test organoleptic	Mediana atributului
Fructat	—
Fructat copt	—
Fructat verde	—
Fructat delicat	≤ 3,0
Fructat mediu	3,0 < Me ≤ 6,0
Fructat robust	> 6,0
Fructat copt delicat	≤ 3,0
Fructat copt mediu	3,0 < Me ≤ 6,0
Fructat copt robust	> 6,0
Fructat verde delicat	≤ 3,0
Fructat verde mediu	3,0 < Me ≤ 6,0
Fructat verde robust	> 6,0

Termeni care fac obiectul prezentării unui certificat de test organoleptic	Mediana atributului
Amar delicat	≤ 3,0
Amar mediu	3,0 < Me ≤ 6,0
Amar robust	> 6,0
Picant delicat	≤ 3,0
Picant mediu	3,0 < Me ≤ 6,0
Picant robust	> 6,0
Ulei echilibrat	Mediana atributului amar și mediana atributului picant nu depășesc cu mai mult de 2,0 puncte mediana atributului fructat.
Ulei dulce	Mediana atributului amar și mediana atributului picant nu sunt mai mari de 2,0.”

2. Punctul 9.4 se înlocuiește cu următorul text:

„9.4. **Clasarea uleiului**

Uleiul se clasează în categoriile de mai jos, în funcție de mediana defectelor și de mediana atributului fructat. Mediana defectelor se definește ca mediana defectului perceput cu cea mai mare intensitate. Mediana defectelor și mediana atributului fructat sunt exprimate cu o precizie de o zecimală.

Clasarea uleiului se efectuează prin compararea valorii medianei defectelor și a medianei atributului fructat cu intervalele de referință prezentate în cele ce urmează. Întrucât limitele acestor intervale s-au stabilit ținându-se cont de eroarea metodei, acestea sunt considerate absolute. Pachetele de software permit să se afișeze clasarea într-un tabel de date statistice sau ca grafic.

(a) În cazul uleiului de măsline extravirgin, mediana defectelor este egală cu 0,0, iar mediana atributului fructat este mai mare de 0,0.

(b) În cazul uleiului de măsline virgin, mediana defectelor este mai mare de 0,0 și mai mică sau egală cu 3,5, iar mediana atributului fructat este mai mare de 0,0.

(c) În cazul uleiului de măsline virgin lampant, mediana defectelor depășește 3,5 sau mediana defectelor este mai mică sau egală cu 3,5, iar mediana atributului fructat este egală cu 0,0.

Nota 1: Atunci când mediana atributului amar și/sau a atributului picant depășește 5,0, președintele comisiei trebuie să declare acest lucru pe certificatul de test.

Pentru evaluările care au ca scop monitorizarea conformității, trebuie efectuat un singur test. În cazul contraevaluărilor, analiza trebuie să se desfășoare în duplicat, în sesiuni de testare diferite. Rezultatele analizei duplicat trebuie să fie omogene din punct de vedere statistic (a se vedea punctul 9.5). În caz contrar, proba trebuie analizată din nou de încă două ori. Valoarea finală a medianei atributelor de clasare se va calcula pe baza valorii medii a ambelor mediane.”

ANEXA V

Anexa XVII se modifică după cum urmează:

1. Punctul 5.1 se înlocuiește cu următorul text:

„5.1. Hexan sau amestec de alcani cu intervalul de fierbere între 65 și 70 °C, distilat cu coloană de rectificare. Hexanul poate fi înlocuit cu izooctan (2,2,4-trimetil pentan pentru cromatografie), cu condiția să fie atinse valori de precizie comparabile. Reziduul rămas în urma evaporării a 100 ml de solvent poate fi controlat. Solvenții cu punct de fierbere mai ridicat decât n-hexanul au un timp de evaporare mai lung. Cu toate acestea sunt preferați, dată fiind toxicitatea hexanului."

2. La punctul 6.3.3 se adaugă următorul text:

„Nota 10: În cazul în care concentrația de stigmastadiene este mai mare de 4 mg/kg, dacă este necesară cuantificarea, trebuie aplicată metoda Consiliului Oleicol Internațional pentru determinarea sterenilor în uleiul rafinat."

ANEXA VI

Anexa XVIII se modifică după cum urmează:

1. Punctul 4.2.1 se înlocuiește cu următorul text:

„4.2.1. Eter de petrol, 40-60 °C, de puritate pentru cromatografie sau hexan. Hexanul poate fi înlocuit cu izooctan (2,2,4-trimetil pentan pentru cromatografie), cu condiția să fie atinse valori de precizie comparabile. Solvenții cu punct de fierbere mai ridicat decât n-hexanul au un timp de evaporare mai lung. Cu toate acestea sunt preferați, dată fiind toxicitatea hexanului."

2. Se adaugă punctul 4.2.12 următor:

„4.2.12. Heptan, de calitate cromatografică. Heptanul poate fi înlocuit cu izooctan (2,2,4-trimetil pentan pentru cromatografie)."

ANEXA VII

„ANEXA XIX

DETERMINAREA COMPOZIȚIEI ȘI A CONȚINUTULUI DE STEROLI ȘI DE COMPUȘI ALCOOLICI PRIN CROMATOGRAFIE ÎN FAZĂ GAZOASĂ CU COLOANĂ CAPILARĂ

1. OBIECT

Metoda descrie o procedură de determinare a conținutului de compuși alcoolici, individual și total, al uleiurilor de măsline și al uleiurilor din resturi de măsline, precum și al amestecurilor acestor două uleiuri.

Compușii alcoolici ai uleiului de măsline și ai uleiului din resturi de măsline includ alcooli alifatici, steroli și dialcooli triterpenici.

2. PRINCIPIU

Uleiurile, la care s-a adăugat α-colestanol și 1-eicosanol ca etaloane interne, sunt saponificate cu hidroxid de potasiu în soluție etanolică, apoi se extrage substanța nesaponificabilă cu eter etilic.

Diferitele fracțiuni ale compușilor alcoolici sunt separate de substanța nesaponificabilă fie prin cromatografie în strat subțire pe o placă bazică de silicagel (metoda de referință), fie prin HPLC cu o coloană de silicagel. Fracțiunea recuperată în urma separării pe silicagel se transformă în trimetilsilileteri și apoi se analizează prin cromatografie în fază gazoasă cu coloană capilară.

PARTEA 1

PREPARAREA SUBSTANȚEI NESAPONIFICABILE

1. OBIECT

Prezenta parte descrie prepararea și extragerea substanței nesaponificabile. Aceasta include prepararea și extragerea substanței nesaponificabile din uleiurile de măsline și din uleiurile din resturi de măsline.

2. PRINCIPIU

O mostră este saponificată prin fierbere la reflux cu o soluție etanolică de hidroxid de potasiu. Substanța nesaponificabilă se extrage cu eter dietilic.

3. APARATURĂ

Aparatura obișnuită de laborator și, în special, următoarele:

3.1. Balon cu fundul rotund de 250 ml echipat cu un condensator cu reflux cu racordurile din sticlă rodată.

3.2. Pâlnie de separare de 500 ml.

3.3. Baloane de 250 ml.

3.4. Microseringi de 100 µL și de 500 µL.

3.5. Pâlnie cilindrică de filtrare cu membrană poroasă G 3 (porozitate 15-40 µm) cu un diametru de aproximativ 2 cm și o înălțime de 5 cm, adaptată pentru filtrarea în vid cu un racord tată din sticlă rodată.

3.6. Balon conic de 50 ml, cu un racord mamă din sticlă rodată, adaptabil la pâlnia de filtrare (punctul 3.5).

3.7. Eprubetă cu fund conic de 10 ml, prevăzută cu dop ermetic din sticlă.

3.8. Exsicator cu diclorură de calciu

4. REACTIVI

4.1. Hidroxid de potasiu, titru minim 85 %.

4.2. Hidroxid de potasiu în soluție etanolică, la aproximativ 2 M.

Se dizolvă, prin răcire, 130 g de hidroxid de potasiu (punctul 4.1) în 200 ml de apă distilată, apoi se completează până la un litru cu etanol (punctul 4.7). Soluția se păstrează în vase de sticlă opacă bine închise și se depozitează maximum două zile.

4.3. Eter etilic, de calitate analitică.

4.4. Sulfat de sodiu anhidru, de calitate analitică.

4.5. Acetonă, de calitate cromatografică.

4.6. Eter etilic, de calitate cromatografică.

4.7. Etanol, de calitate analitică.

4.8. Acetat de etil, de calitate analitică.

4.9. Etalon intern, α-colestanol, cu puritate de peste 99 % (puritatea trebuie să fie controlată prin analiză GC).

4.10. Soluție etalon intern de α-colestanol, 0,2 soluție (m/V) în acetat de etil (punctul 4.8).

4.11. Soluție de fenolftaleină, 10 g/l în etanol (punctul 4.7).

4.12. O soluție de 0,1 % (m/v) de 1-eicosanol în acetat de etil (etalon intern).

5. PROCEDURĂ

În balonul de 250 ml (punctul 3.1) se introduce, cu ajutorul microseringii de 500 µl (punctul 3.4), un volum de soluție etalon intern de α-colestanol (punctul 4.10) și un volum de 1-eicosanol (punctul 4.12) care conțin o cantitate de colestanol și de eicosanol ce corespunde aproximativ cu 10 % din conținutul de steroli și alcool ai probei. De exemplu, pentru 5 g de probă de ulei de măsline trebuie să se adauge 500 µl de soluție de α-colestanol (punctul 4.10) și 250 µl de soluție de 1-eicosanol (punctul 4.12). Pentru uleiurile din resturi de măsline trebuie să se adauge 1 500 µl de soluție de α-colestanol (punctul 4.10) și aceeași cantitate de 1-eicosanol (punctul 4.12). Se evaporă până la uscare cu un curent ușor de azot într-o baie caldă de aburi. După răcirea balonului, se cântăresc 5,00 ± 0,01 g de probă uscată și filtrată în același balon.

Nota 1: În cazul uleiurilor și grăsimilor animale sau vegetale care conțin cantități considerabile de colesterol, poate fi prezentă o valoare de vârf cu un timp de retenție identic cu cel al colestanolului. În astfel de cazuri, trebuie să se analizeze fracțiunea de steroli în duplicat, cu și fără etalon intern.

Se adaugă 50 ml de soluție etanolică de hidroxid de potasiu la 2 M (punctul 4.2) și câteva granule de piatră ponce, se pune în funcțiune condensatorul cu reflux și se încălzește până la o ușoară fierbere până când se produce saponificarea (soluția devine limpede). Se continuă încălzirea timp de 20 de minute, apoi se adaugă 50 ml de apă distilată provenită din partea de sus a condensatorului, se deconectează condensatorul și se răcește balonul la aproximativ 30 °C.

Se transvazează cantitativ conținutul balonului într-o pâlnie de separare de 500 ml (punctul 3.2), adăugând apă distilată de mai multe ori (50 ml). Se adaugă aproximativ 80 ml de eter etilic (punctul 4.6), se agită energic timp de aproximativ 60 de secunde și se eliberează presiunea periodic, prin inversarea pâlniei de separare și deschiderea robinetului. Se lasă în repaus până la separarea completă a celor două faze (nota 2). Apoi se extrage soluția de săpun cât mai complet posibil într-o a doua pâlnie de separare. Se fac încă două extracții pe fază de apă-alcool, în același mod, utilizând 60-70 ml de eter etilic (punctul 4.6).

Nota 2: Eventualele emulsii pot fi eliminate adăugând cantități mici de etanol (punctul 4.7).

Se combină cele trei extracte eterice într-o pâlnie de separare care conține 50 ml de apă. Se continuă spălarea cu apă (50 ml) până când apa de spălare nu mai prezintă o culoare roz la adăugarea unei picături de soluție de fenolftaleină (punctul 4.11). După ce s-a eliminat apa de spălare, se filtrează pe sulfat de sodiu anhidru (punctul 4.4) într-un balon de 250 ml cântărit în prealabil, spălând pâlnia și filtrul cu mici cantități de eter etilic (punctul 4.6).

Se evaporă solventul prin distilare sub vid într-un evaporator rotativ la 30 °C. Se adaugă 5 ml de acetonă (punctul 4.5) și se elimină complet solventul volatil într-un curent ușor de azot. Se usucă reziduul în cuptor la 103 ± 2 °C timp de 15 minute. Se răcește în exsicator și se cântărește cu o precizie de 0,1 mg.

PARTEA 2

SEPARAREA FRACȚIUNILOR DE COMPUȘI ALCOOLICI

1. OBIECT

Substanța nesaponificabilă preparată în partea 1 este fracționată în diferiți compuși alcoolici, alcooli alifatici, steroli și dialcooli triterpenici (eritrodiol și uvaol).

2. PRINCIPIU

Fracționarea substanței nesaponificabile prin metoda de bază a cromatografiei în strat subțire (metoda de referință), evidențierea, răzuirea benzilor corespunzătoare și extracția. Ca metodă alternativă de separare, HPLC utilizând o coloană de silicagel și detector UV și colectând diferitele fracțiuni. Alcoolii alifatici și triterpenici, precum și sterolii și dialcoolii triterpenici sunt izolați împreună.

3. APARATURĂ

Aparatura obișnuită de laborator și, în special, următoarele:

3.1. Echipament complet pentru analiză prin cromatografie în strat subțire cu plăci de sticlă de 20 × 20 cm.

3.2. Lampă cu lumină ultravioletă cu o lungime de undă de 366 sau 254 nm.

3.3. Microseringi de 100 µL și de 500 µL.

3.4. Pâlnie cilindrică de filtrare cu membrană poroasă G 3 (porozitate 15-40 µm) cu un diametru de aproximativ 2 cm și o înălțime de 5 cm, adaptată pentru filtrarea în vid cu un racord tată din sticlă rodată.

3.5. Balon conic de 50 ml, cu un racord mamă din sticlă rodată, adaptabil la pâlnia de filtrare (punctul 3.4).

3.6. Eprubetă cu fund conic de 10 ml, prevăzută cu dop ermetic din sticlă.

3.7. Exsicator cu diclorură de calciu

3.8. Sistem HPLC format din:

3.8.1. Pompă binară.

3.8.2. Injector manual sau automat, echipat cu o buclă de injecție de 200 µL.

3.8.3. Degazor în linie.

3.8.4. Detector UV-Vis sau IR

3.9. Coloană HPLC (diametru interior 25 cm x 4 mm) cu silicagel 60 (particule de 5 µm).

3.10. Filtru pentru seringă, 0,45 µm.

3.11. Balon conic de 25 ml.

4. REACTIVI

4.1. Hidroxid de potasiu, titru minim 85 %.

4.2. Hidroxid de potasiu în soluție etanolică, la aproximativ 2 M.

Se dizolvă, prin răcire, 130 g de hidroxid de potasiu (punctul 4.1) în 200 ml de apă distilată, apoi se completează până la un litru cu etanol (punctul 4.9). Soluția se păstrează în vase de sticlă opacă bine închise și se depozitează maximum două zile.

4.3. Eter etilic, de calitate analitică.

4.4. Hidroxid de potasiu în soluție etanolică, la aproximativ 0,2 M.

Se dizolvă 13 g de hidroxid de potasiu (punctul 4.1) în 20 ml de apă distilată și se completează până la un litru cu etanol (punctul 4.9).

4.5. Plăci de sticlă (20 × 20 cm) acoperite cu silicagel, fără indicator de fluorescență, cu o grosime de 0,25 mm (acestea sunt disponibile în comerț gata pentru utilizare).

4.6. Acetonă, de calitate cromatografică.

4.7. n-Hexan, de calitate cromatografică.

4.8. Eter etilic, de calitate cromatografică.

4.9. Etanol, de calitate analitică.

4.10. Acetat de etil, de calitate analitică.

4.11. Soluție de referință pentru cromatografie în strat subțire: colesterol, fitosteroli, alcooli și soluție de eritrodiol de 5 % în acetat de etil (punctul 4.10).

4.12. Soluție de 2,7-diclorfluoresceină, soluție etanolică de 0,2 %. Aceasta este făcută ușor bazică prin adăugarea câtorva picături de soluție alcoolică de hidroxid de potasiu la 2 M (punctul 4.2).

4.13. n-Hexan (punctul 4.7)/eter etilic (punctul 4.8) amestec de 65:35 (V/V).

4.14. fază mobilă pentru HPLC: amestec 1:1 (V/V) de n-Hexan (punctul 4.7) și eter etilic (punctul 4.8).

5. METODA DE REFERINȚĂ: SEPARAREA COMPUȘILOR ALCOOLICI CU AJUTORUL PLĂCII BAZICE PENTRU CROMATOGRAFIA ÎN STRAT SUBȚIRE (TLC)

Pregătirea plăcilor bazice pentru cromatografia în strat subțire. Se imersează sau se scufundă plăcile de silicagel (punctul 4.5) la aproximativ 4 cm în soluția etanolică de hidroxid de potasiu la 0,2 M (punctul 4.4) timp de 10 secunde, se lasă apoi să acționeze închise, sub hotă, timp de două ore și se pun, în final, în etuvă la 100 °C timp de o oră.

Se scot din etuvă și se păstrează într-un exsicator cu clorură de calciu (punctul 3.7) până în momentul folosirii (plăcile astfel tratate trebuie să fie folosite în termen de 15 zile).

Se introduce în cuva de developare amestecul de hexan/eter etilic (punctul 4.13) (Nota 3) până la o adâncime de aproximativ 1 cm. Se închide cuva folosind un capac corespunzător și se lasă astfel timp de cel puțin o jumătate de oră, la rece, în așa fel încât echilibrul lichid/vapori să se stabilizeze. Pe suprafețele interioare ale cuvei se pot fixa benzi de hârtie de filtru care se cufundă în eluent. Astfel se reduce cu aproximativ o treime timpul de developare și se obține o eluare mai uniformă a componentelor.

Nota 3: Pentru a avea condiții de eluare perfect reproductibile, amestecul trebuie să fie schimbat la fiecare test. Se poate utiliza un solvent alternativ de n-hexan/eter etilic 50:50 (V/V).

Se prepară o soluție de aproximativ 5 % de substanță nesaponificabilă preparată în partea 1 în acetat de etil (punctul 4.10) și se depun, utilizând microseringa de 100 µl (punctul 3.3), 0,3 ml de soluție într-o linie fină și uniformă pe capătul inferior (2 cm) al plăcii cromatografice (punctul 4.5). În paralel cu linia de depozit, se depun 2–3 µl de soluție de referință (punctul 4.11), în scopul identificării benzilor de steroli, dialcooli triterpenici și alcooli după developare.

Se pune placa în cuva de developare (punctul 3.1). Temperatura ambiantă trebuie să fie menținută între 15 și 20 °C (nota 4). Se închide imediat cu capacul și se eluează până când nivelul solventului ajunge la aproximativ 1 cm de marginea superioară a plăcii. Se scoate placa din cuva de developare și se trece la evaporarea solventului într-un curent de aer cald sau prin menținerea plăcii scurt timp sub hotă.

Nota 4: Temperatura mai mare ar putea afecta separarea.

Se vaporizează placa ușor și uniform cu soluție de 2,7-diclorfluoresceină (punctul 4.12) și apoi se lasă să se usuce. Atunci când placa se observă la lumină ultravioletă (punctul 3.2), se pot identifica benzile de steroli, dialcooli triterpenici și alcooli prin alinierea cu petele obținute cu soluția de referință (punctul 4.11). Se delimitează benzile cu un creion negru de-a lungul marginilor de fluorescență (a se vedea placa de cromatografie în strat subțire din figura 1).

Cu o spatulă metalică, se curăță silicagelul din zona delimitată. Materialul extras, sfărâmat fin, se introduce în pâlnia de filtrare (punctul 3.4). Se adaugă 10 ml de acetat de etil cald (punctul 4.10), se amestecă cu grijă cu o spatulă metalică și se filtrează, cu ajutorul vidului, dacă este necesar, apoi se colectează filtratul în balonul conic (punctul 3.5) conectat la pâlnia de filtrare.

Se spală reziduul din balon de trei ori cu eter etilic (punctul 4.3) (aproximativ 10 ml de fiecare dată) și se colectează filtratul în același balon conectat la pâlnia de filtrare, se evaporă filtratul până la obținerea unui volum de 4-5 ml, se transvazează soluția reziduală în eprubeta de 10 ml (punctul 3.6) cântărită în prealabil, se evaporă la sec încălzind-o ușor într-un ușor curent de azot și se continuă cu câteva picături de acetonă (punctul 4.6), evaporând din nou la sec. Reziduul din eprubetă se compune din fracțiunile de steroli și de dialcooli triterpenici sau din fracțiunile de alcooli și de alcooli triterpenici.

6. SEPARAREA FRACȚIUNII ALCOOLICE PRIN HPLC

Substanța nesaponificabilă din partea 1 se dizolvă în 3 ml de fază mobilă (punctul 4.14), se filtrează soluția cu ajutorul unui filtru pentru seringă (punctul 3.10) și se lasă deoparte.

Se injectează 200 µl de soluție de substanță nesaponificabilă filtrată în HPLC (punctul 3.8).

Se efectuează separarea prin HPLC la 0,8 ml/min, se elimină eluatul din primele 5 minute și se colectează eluatul în baloane conice de 25 ml (punctul 3.11), între 5 și 10 minute pentru alcooli alifatici și triterpenici și între 11 și 25 de minute pentru steroli, eritrodiol și uvaol (nota 5).

Separarea poate fi monitorizată cu un detector UV la o lungime de undă de 210 nm sau cu un detector de indice de refracție (a se vedea figura 6).

Fracțiunile sunt evaporate până la uscare și sunt pregătite pentru analiza cromatografică.

Nota 5: Trebuie controlată atent presiunea pompei HPLC, deoarece eterul etilic poate crește presiunea; reglați debitul pentru a menține presiunea sub control.

PARTEA 3

ANALIZA CROMATOGRAFICĂ ÎN FAZĂ GAZOASĂ A FRACȚIUNILOR DE COMPUȘI ALCOOLICI

1. OBIECT

Această parte oferă orientări generale pentru aplicarea cromatografiei în fază gazoasă cu coloană capilară pentru a se determina compoziția calitativă și cantitativă a compușilor alcoolici izolați conform metodei specificate în partea 2 a acestei metode.

2. PRINCIPIU

Fracțiunile colectate din substanța nesaponificabilă utilizând TLC sau HPLC sunt derivate în trimetilsilileteri și analizate prin cromatografie în fază gazoasă cu coloană capilară cu injectare cu splitare și cu detector cu ionizare în flacără.

3. APARATURĂ

Aparatura obișnuită de laborator și, în special, următoarele:

3.1. Eprubetă cu fund conic de 10 ml, prevăzută cu dop ermetic din sticlă.

3.2. Cromatograf cu gaz care poate fi utilizat cu coloană capilară, prevăzut cu un dispozitiv de injectare cu splitare, format din următoarele:

3.2.1. Etuvă cu termostat pentru coloane, care poate menține temperatura dorită cu o precizie de ± 1 °C;

3.2.2. Unitate de injectare termoreglabilă cu element vaporizator din sticlă tratată cu persilan și cu dispozitiv de splitare;

3.2.3. Detector cu ionizare în flacără (FID);

3.2.4. Sistem de culegere a datelor care poate fi utilizat cu detectorul FID (punctul 3.10.3.) și care poate efectua integrare manuală.

3.3. Coloană capilară de sticlă de siliciu cu o lungime de 20–30 m și un diametru interior de 0,25-0,32 mm, acoperită în interior cu 5 % difenil - 95 % dimetilpolisiloxan (faza staționară SE-52 sau SE-54 sau echivalent), cu o grosime uniformă cuprinsă între 0,10 și 0,30 µm.

3.4. Microseringă cu o capacitate de 10 µl, pentru cromatografie în fază gazoasă, cu ac cimentat, adecvată pentru injectarea cu splitare.

4. REACTIVI

4.1. Piridină anhidră, de calitate cromatografică.

4.2. Hexametil-disilazan, de calitate analitică.

4.3. Trimetilclorosilan, de calitate analitică.

4.4. Soluție de probă de trimetilsilileteri de steroli. Se prepară în momentul folosirii din steroli și eritrodiol extrași din uleiurile care le conțin.

4.5. Soluții standard de trimetilsilileteri ai alcoolilor alifatici de la C20 la C28. Pot fi preparate din amestecuri de alcooli puri atunci când sunt necesari pentru utilizare.

4.6. Gaz purtător: hidrogen sau heliu, puritate pentru cromatografie în fază gazoasă.

4.7. Gaze auxiliare: hidrogen, heliu, azot și aer, puritate pentru cromatografie în fază gazoasă.

4.8. Reactiv de sililare, constituit dintr-un amestec de 9:3:1 (V/V/V) de piridină/hexametil-disilazan/trimetilclorosilan.

4.9. n-Hexan, de calitate cromatografică.

5. PREPARAREA TRIMETILSILILETERILOR

Se adaugă, în eprubeta (punctul 3.1) care conține fracțiunea de compus alcoolic, reactivul de sililare (punctul 4.8) (nota 6) într-o proporție de 50 µl pe miligram de compus alcoolic, evitând toate absorbțiile de umiditate (nota 7).

Nota 6: Soluțiile utilizabile ca atare sunt disponibile în comerț. De asemenea, sunt disponibili și alți reactivi de sililare, cum ar fi, de exemplu, bitrimetilsililtrifluoracetamida + 1 % trimetilclorosilan care trebuie să se dilueze cu un volum egal de piridină anhidră. Piridina poate fi înlocuită cu aceeași cantitate de acetonitril.

Nota 7: Eventuala formare a unei opalescențe ușoare este normală și nu provoacă nicio anomalie. Formarea unei floculații albe sau apariția unei colorații roz indică prezența umidității sau alterarea reactivului. În acest caz, trebuie să se repete testul (numai dacă se utilizează hexametildisilazan/trimetilclorosilan).

Se închide eprubeta (punctul 3.1), se agită cu grijă (fără a o răsturna) până la solubilizarea completă a compușilor. Se lasă în repaus minimum 15 minute la temperatura ambiantă, apoi se centrifughează timp de câteva minute. Soluția limpede este gata pentru analiza prin cromatografie în fază gazoasă.

6. ANALIZA PRIN CROMATOGRAFIE ÎN FAZĂ GAZOASĂ

6.1. Operațiuni preliminare, condiționarea coloanei capilare

Se instalează coloana (punctul 3.3) în cromatograful în fază gazoasă, legând extremitatea de intrare la injectorul cu splitare și extremitatea de ieșire la detector.

Se efectuează controalele generale ale complexului de cromatografie în fază gazoasă (etanșeitatea circuitului de gaz, eficacitatea detectorului, eficacitatea sistemului de splitare și a sistemului de înregistrare etc.).

În cazul în care se utilizează coloana pentru prima dată, se recomandă să se efectueze condiționarea sa: se trece un ușor flux de gaz de-a lungul acesteia, apoi se conectează complexul de cromatografie în fază gazoasă și se începe o încălzire treptată până când se atinge o temperatură cu cel puțin 20 °C mai mare decât cea de funcționare (nota 8). Se menține această temperatură timp de minimum două ore, apoi se asigură condițiile de funcționare pentru complex (reglarea fluxului gazos și a splitării, aprinderea flăcării, conectarea la sistemul de culegere a datelor, reglarea temperaturii coloanei, a detectorului și a injectorului etc.) și se înregistrează semnalul la o sensibilitate de cel puțin două ori mai mare decât cea prevăzută pentru executarea analizelor. Traseul liniei de bază obținute trebuie să fie liniar, fără valori de vârf de orice natură și nu trebuie să prezinte abateri. O abatere rectilinie negativă indică o etanșeitate imperfectă a conexiunilor coloanei, o abatere pozitivă indică o condiționare insuficientă a coloanei.

Nota 8: Temperatura de condiționare trebuie să fie totdeauna cu cel puțin 20 °C mai mică decât temperatura maximă prevăzută pentru faza staționară folosită.

6.2. Condiții de funcționare

Optimizarea programului de temperatură și a debitului de gaz purtător, astfel încât să se obțină cromatograme similare cu figurile 3-6.

Următorii parametri au fost testați și sunt considerați utili:

6.2.1. Alcooli alifatici

Programul etuvei	180 °C (8 min.) → 260 °C (la 5 °C/min) → 260 °C (15 min)
Temperatura injectorului	280 °C
Temperatura detectorului	290 °C
Viteza liniară a gazului purtător	heliu 20-30 cm/s; hidrogen 30-50 cm/s
Raportul de splitare	1:50-1:100
Volumul injectat	0,5-1 µl de soluție de TMSE

6.2.2. Steroli și dialcooli triterpenici

Programul etuvei	260 ± 5 °C în condiții izoterme
Temperatura injectorului	280 – 300 °C
Temperatura detectorului	280 – 300 °C
Viteza liniară a gazului purtător	heliu 20-30 cm/s; hidrogen 30-50 cm/s
Raportul de splitare	1:50-1:100
Volumul injectat	0,5-1 µl de soluție de TMSE

Aceste condiții pot fi modificate în funcție de caracteristicile coloanei și ale cromatografului în fază gazoasă, pentru a se obține cromatograme care îndeplinesc următoarele cerințe:

— timpul de retenție a alcoolului C26 este 18 ± 5 minute;

— valoarea de vârf a alcoolului C22 trebuie să fie 80 ± 20 % din valoarea maximă admisibilă la citire pentru uleiul de măsline și de 40 ± 20 % din valoarea maximă admisibilă la citire pentru uleiul din resturi de măsline;

— timpul de retenție pentru valoarea de vârf a β-sitosterolului trebuie să fie de 20 ± 5 minute;

— valoarea de vârf pentru campesterol trebuie să fie: în cazul uleiului de măsline (conținut mediu 3 %), 20 ± 5 % din scara totală;

— toți sterolii prezenți trebuie să fie separați. Valorile de vârf separate trebuie să fie, de asemenea, complet rezolvate, ceea ce înseamnă că traseul valorii de vârf trebuie să se unească cu linia de bază înainte de ieșirea pentru valoarea de vârf următoare. Cu toate acestea, o rezolvare incompletă este tolerată cu condiția ca valoarea de vârf la RRT 1,02 (sitostanol) să fie cuantificabilă folosind perpendiculara.

6.3. Protocolul de analiză

Se prelevează, cu microseringa de 10 µl (punctul 3.4), 1 µl de hexan, se aspiră 0,5 µl de aer și apoi 0,5-1 µl din soluția de probă. Se trage pistonul seringii în așa fel încât acul să fie gol. Se introduce acul prin membrana injectorului și, după 1–2 secunde, se injectează rapid și apoi se extrage lent acul, după aproximativ 5 secunde. Se poate utiliza și un injector automat.

Se efectuează înregistrarea până la eluarea completă a TMSE al compușilor alcoolici corespunzători prezenți. Linia de bază trebuie să continue să îndeplinească cerințele privind condițiile de funcționare corespunzătoare (punctul 6.2.1 sau 6.2.2).

6.4. Identificarea valorilor de vârf

Identificarea valorilor de vârf individuale se efectuează pe baza timpilor de retenție și prin comparație cu TMSE al amestecului de alcooli alifatici și triterpenici sau de dialcooli triterpenici și steroli, analizați în aceleași condiții. În figura 3 este prezentată o cromatogramă pentru fracțiunea de alcooli alifatici și triterpenici, iar cromatogramele corespunzătoare pentru steroli și dialcooli triterpenici sunt prezentate în figura 2.

Alcoolii alifatici sunt supuși procesului de eluare în următoarea ordine: C20-ol (I.S.), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol și C28-ol.

Sterolii și dialcoolii triterpenici sunt supuși procesului de eluare în următoarea ordine: colesterol, brasicasterol, ergosterol, 24-metilen-colesterol, campesterol, campestanol, stigmasterol, Δ7-campesterol, Δ5,23-stigmastadienol, clerosterol, β-sistosterol, sitostanol, Δ5-avenasterol, Δ5,24-stigmastadienol, Δ7-stigmastenol, Δ7-avenasterol, eritrodiol și uvaol.

6.5. Evaluare cantitativă

Cu ajutorul sistemului de culegere a datelor, se procedează la calculul ariilor valorilor de vârf pentru 1-eicosanol și pentru alcoolii alifatici C22, C24, C26, C28. Coeficientul de răspuns pentru 1-eicosanol se consideră a fi egal cu 1.

Cu ajutorul sistemului de culegere a datelor, se procedează la calculul ariilor valorilor de vârf pentru α-colestanol și steroli și dialcoolii triterpenici. Nu se iau în considerare valorile de vârf eventuale ale compușilor care nu sunt incluși (ergosterolul nu trebuie calculat) printre cei enumerați în tabelul 1. Coeficientul de răspuns pentru α-colestanol se consideră a fi egal cu 1.

Se calculează concentrația pentru fiecare compus alcoolic, în mg/kg de materie grasă, după cum urmează:

$$\textit{Compus alcoolic } x = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

unde:

A_x = aria valorii de vârf pentru compusul alcoolic x, în unități ale sistemului de culegere a datelor;

A_s = aria valorii de vârf a 1-eicosanolului/α-colestanolului, în unități ale sistemului de culegere a datelor;

m_s = masa 1-eicosanolului/α-colestanolului adăugat, în miligrame;

m = masa probei utilizate pentru determinare, în grame.

7. EXPRIMAREA REZULTATELOR

Se raportează concentrația fiecărui alcool alifatic și triterpenic în mg/kg de substanță grasă și suma lor drept „conținut total de alcool alifatic”. Conținutul total este suma dintre C22, C24, C26 și C28.

Compoziția fiecărui compus alcoolic se exprimă cu o zecimală.

Concentrația de steroli totali trebuie să fie exprimată fără zecimale.

Se calculează procentul fiecărui sterol pornind de la raportul dintre aria valorii de vârf corespondente și suma ariilor valorilor de vârf pentru steroli:

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

unde:

A_x = aria valorii de vârf pentru sterolul x;

ΣA = suma ariilor valorilor de vârf pentru steroli.

β-Sitosterol aparent: Δ5,23-stigmastadienol + clerosterol + β-sitosterol + sitostanol + Δ5-avenasterol + Δ5,24-stigmastadienol.

Se calculează procentul de eritrodiol și uvaol:

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

unde:

A_{Er} = aria pentru eritrodiol, în unități ale sistemului de culegere a datelor;

A_{Uv} = aria pentru uvaol, în unități ale sistemului de culegere a datelor;

ΣA_T = suma ariei pentru sterol + eritrodiol + uvaol, în unități ale sistemului de culegere a datelor.

Pe lângă calculul procentului relativ de steroli și de dialcooli triterpenici individuali și al concentrației totale de steroli, trebuie calculate concentrația de eritrodiol și de uvaol și suma acestora, în mg/kg de materie grasă, conform formulelor următoare:

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

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

unde:

A_{Er} = aria valorii de vârf pentru eritrodiol, în unități ale sistemului de culegere a datelor;

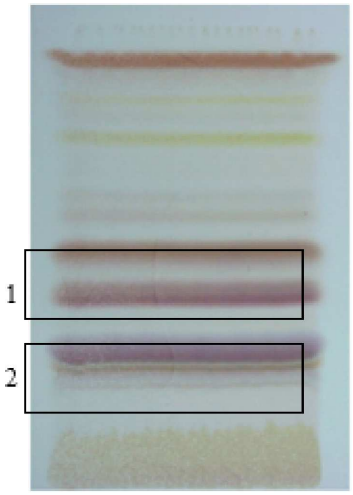
A_{Uv} = aria pentru uvaol, în unități ale sistemului de culegere a datelor;

A_s = aria valorii de vârf a α-colestanolului, în unități ale sistemului de culegere a datelor;

m_s = masa α-colestanolului adăugat, în miligrame;

m = masa probei utilizate pentru determinare, în grame.

Apendice



1 Hidrocarburi
2 α-Tocoferol
3 Prenoli
4 Alcooli triterpenici
5 Alcooli alifatici
6 Steroli metilici
7 Steroli
8 Dialcooli triterpenici

Figura 1 – TLC a fracțiunii nesaponificabile a uleiului din resturi de măsline eluată de două ori cu un amestec de hexan și eter dietilic (65:35), developată cu SO4H2 (50 %) și încălzită. Benzile care trebuie curățate sunt cele din interiorul dreptunghiurilor: 1 desemnează benzile alcoolilor alifatici și 2 desemnează benzile sterolilor și ale dialcoolilor triterpenici.

Tabelul I – Timpii de retenție relativi ai sterolilor

Vârf	Identificare		Timpi de retenție relativi	
			Coloană SE 54	Coloană SE 52
1	Colesterol	Δ-5-colesten-3ß-ol	0,67	0,63
2	Colestanol	5α-colestan-3ß-ol	0,68	0,64
3	Brasicasterol	[24S]-24-metil-Δ-5,22-colestadien-3β-ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S]-24-metil-Δ-5,7,22 colestatrien-3β-ol	0,78	0,76
4	24-metilen-colesterol	24-metilen-Δ-5,24-colestadien-3ß-o1	0,82	0,80
5	Campesterol	(24R)-24-metil-Δ-5-colesten-3ß-ol	0,83	0,81
6	Campestanol	(24R)-24-metil-colestan-3ß-ol	0,85	0,82
7	Stigmasterol	(24S)-24-etil-Δ-5,22-colestadien-3ß-ol	0,88	0,87
8	Δ-7-campesterol	(24R)-24-metil-Δ-7-colesten-3ß-ol	0,93	0,92
9	Δ-5,23-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil-Δ-5,23-coIestadien-3ß-ol	0,95	0,95
10	Clerosterol	(24S)-24-etil-Δ-5,25-colestadien-3ß-ol	0,96	0,96

Vârf	Identificare		Timpi de retenție relativi	
			Coloană SE 54	Coloană SE 52
11	ß-sitosterol	(24R)-24-etil-Δ-5-colesten-3ß-ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-etil-colestan-3ß-ol	1,02	1,02
13	Δ-5-avenasterol	(24Z)-24-etiliden-Δ-colesten-3ß-ol	1,03	1,03
14	Δ-5,24-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil-Δ-5,24-colestadien-3ß-ol	1,08	1,08
15	Δ-7-stigmastenol	(24R,S)-24-etil-Δ-7-colesten-3ß-ol	1,12	1,12
16	Δ-7-avenasterol	(24Z)-24-etiliden-Δ-7-colesten-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

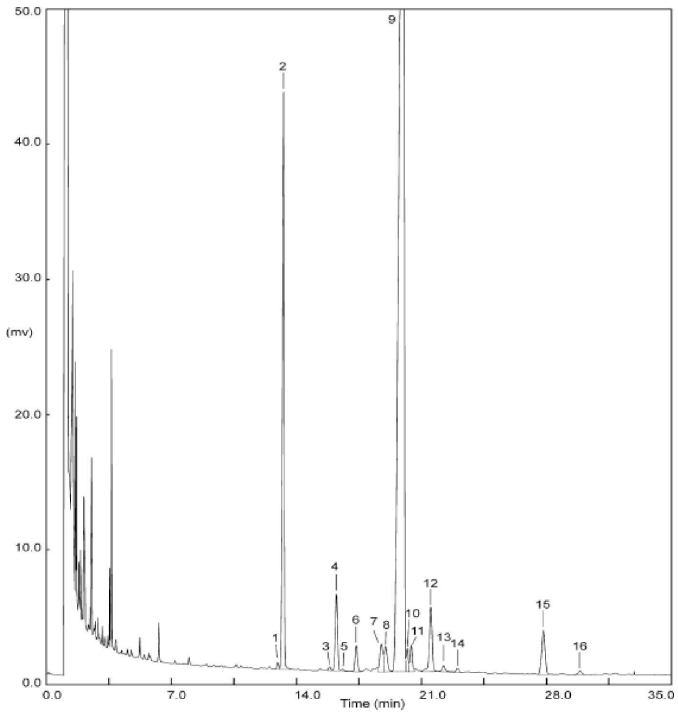


Figura 2 – Profilul cromatografic (cromatografie în fază gazoasă cu detector cu ionizare în flacără) al sterolilor și al dialcoolilor triterpenici dintr-un ulei de măsline rafinat. (1) Colesterol, (2) α-colestanol (I.S.), (3) 24-metilencolesterol, (4) campesterol, (5) campestanol, (6) stigmasterol, (7) Δ5,23-stigmastadienol, (8) clerosterol, (9) β-sitosterol, (10) sitostanol, (11) Δ5-avenasterol, (12) Δ5,24-stigmastadienol, (13) Δ7-stigmastenol, (14) Δ7-avenasterol, (15) eritrodiol, (16) uvaol.

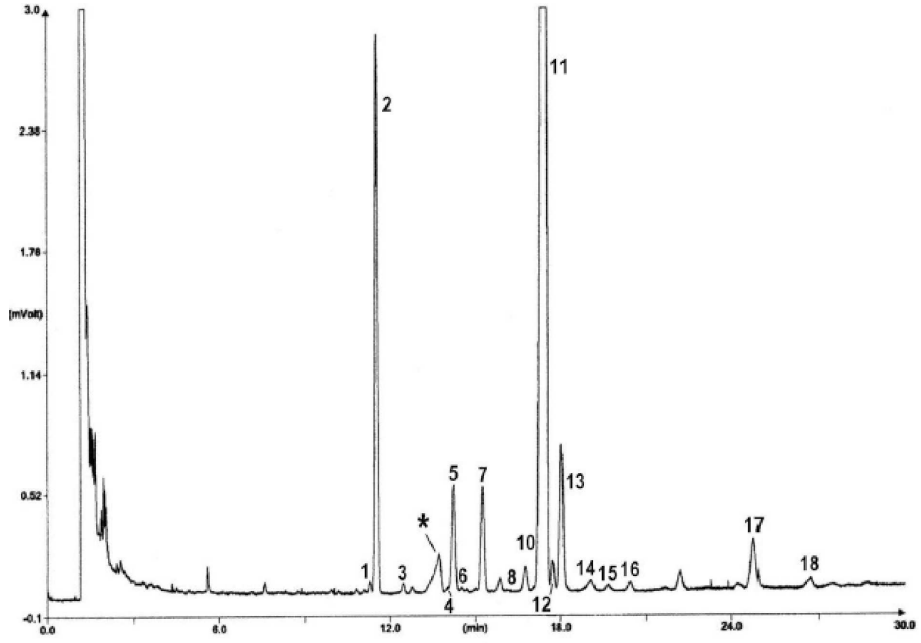


Figura 3 – Profilul cromatografic (cromatografie în fază gazoasă cu detector cu ionizare în flacără) al sterolilor și al dialcoolilor triterpenici dintr-un ulei de măsline lampant. (1) Colesterol, (2) α-colestanol, (3) brasicasterol, (4) 24-metilen-colesterol, (5) campesterol, (6) campestanol, (7) stigmasterol, (8) Δ7-campesterol, (9) Δ5,23-stigmastadienol, (10) clerosterol, (11) β-sitosterol, (12) sitostanol, (13) Δ5-avenasterol, (14) Δ5,24-stigmastadienol, (15) Δ7-stigmastenol, (16) Δ7-avenasterol, (17) eritrodiol, (18) uvaol.

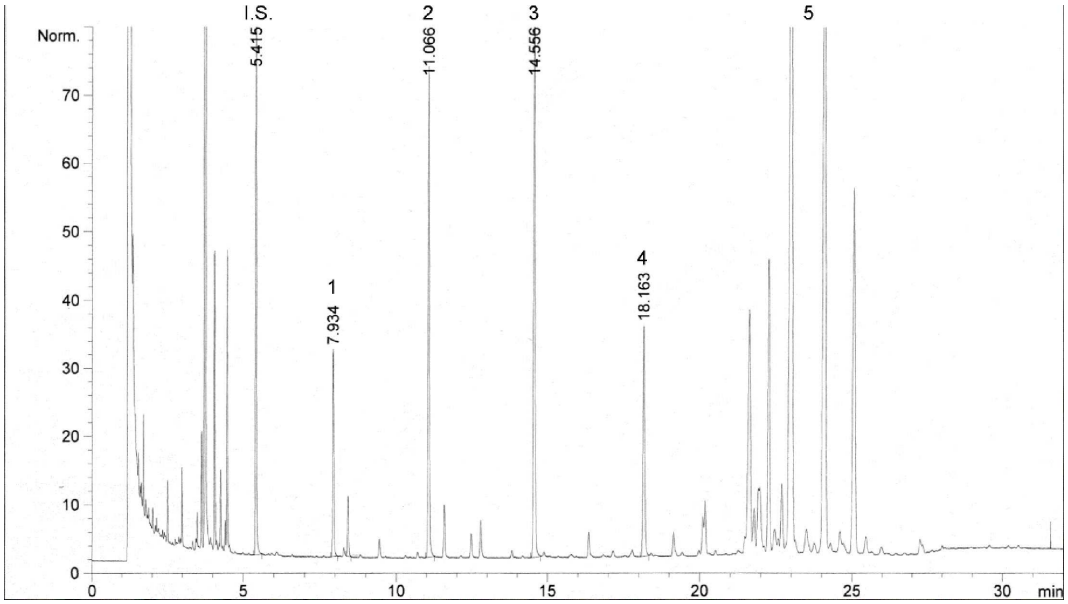


Figura 4 – Profilul cromatografic (cromatografie în fază gazoasă cu detector cu ionizare în flacără) al alcoolilor alifatici și al alcoolilor triterpenici dintr-un ulei de măsline. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) alcooli triterpenici.

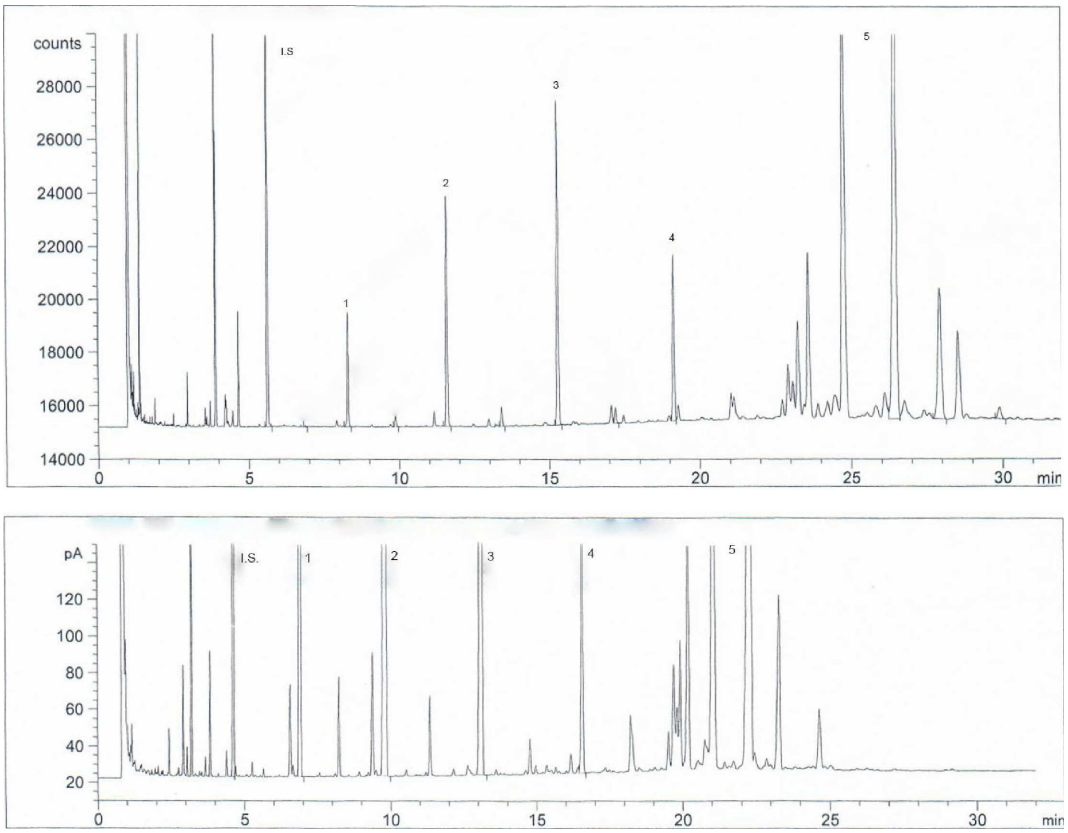


Figura 5 – Profilul cromatografic (cromatografie în fază gazoasă cu detector cu ionizare în flacără) al alcoolilor alifatici și al alcoolilor triterpenici dintr-un ulei de măsline rafinat și un ulei de măsline obținut la a doua centrifugare. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) alcooli triterpenici.

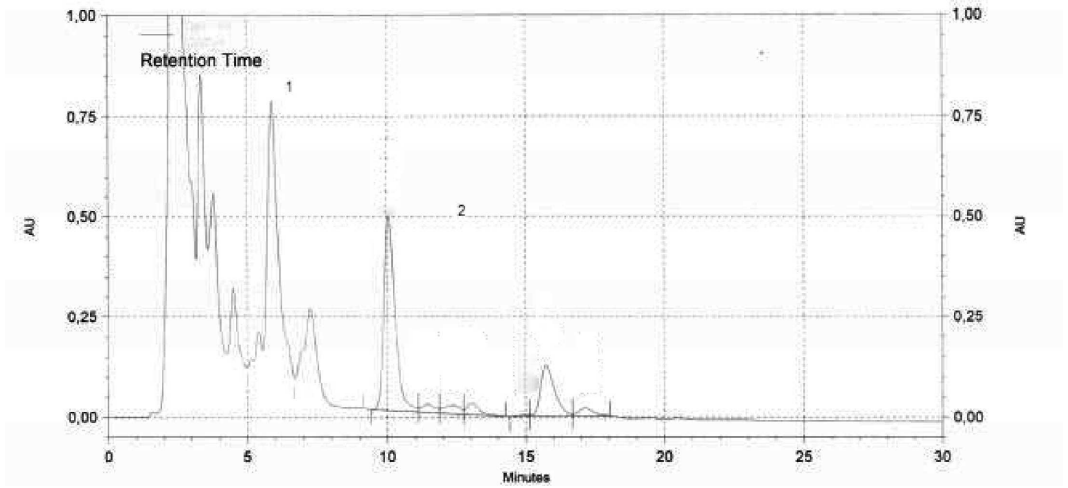


Figura 6 – Cromatograma HPLC a unei fracțiuni nesaponificabile a unui ulei de măsline, separată prin HPLC cu ajutorul unui detector UV. (1) Alcooli alifatici și triterpenici; (2) Steroli și dialcooli triterpenici.”