VYKONÁVACIE NARIADENIE KOMISIE (EÚ) 2019/1604

z 27. septembra 2019,

ktorým sa mení nariadenie (EHS) č. 2568/91 o charakteristikách olivového oleja a oleja z olivových zvyškov a o príslušných analytických metódach

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

so zreteľom na nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) č. 1308/2013 zo 17. decembra 2013, ktorým sa vytvára spoločná organizácia trhov s poľnohospodárskymi výrobkami a ktorým sa zrušujú nariadenia Rady (EHS) č. 922/72, (EHS) č. 234/79, (ES) č. 1037/2001 a (ES) č. 1234/2007 ([1]), a najmä na jeho článok 91 prvý odsek písm. d),

keďže:

(1) Nariadením Komisie (EHS) č. 2568/91 ([2]) sa vymedzujú fyzikálno-chemické a organoleptické vlastnosti olivového oleja a oleja z olivových výliskov a stanovujú metódy posudzovania týchto vlastností.

(2) Dané metódy, ako aj limitné hodnoty charakteristík olejov sa pravidelne aktualizujú na základe stanoviska odborníkov v oblasti chémie a v súlade s činnosťou vykonanou na pôde Medzinárodnej rady pre olivy (International Olive Council, IOC).

(3) S cieľom na úrovni Únie zabezpečiť uplatňovanie najnovších medzinárodných štandardov, ktoré stanovila IOC, by sa mali aktualizovať určité analytické metódy stanovené v nariadení (EHS) č. 2568/91.

(4) Zmenila sa obchodná norma IOC vzhľadom na vyjadrenie limitnej hodnoty obsahu voľných kyselín, peroxidového čísla, organoleptického hodnotenia (medián defektoru a medián atribútu ovocnosti) a rozdiel medzi ECN42 (HPLC) a ECN42 (teoretický výpočet) na účely súladu s hodnotami presnosti analytickej metódy.

(5) Členské štáty sú podľa článku 2a ods. 5 nariadenia (EHS) č. 2568/91 povinné overiť, či vzorka olivového oleja je v súlade s deklarovanou kategóriou a na tento účel skontrolovať vlastnosti stanovené v prílohe I k uvedenému nariadeniu v ľubovoľnom poradí alebo v poradí stanovenom v rozhodovacom strome v prílohe Ib k uvedenému nariadeniu.

(6) Vzhľadom na aktuálne trendy je vhodné náležite aktualizovať tabuľky v prílohe Ib k nariadeniu (EHS) č. 2568/91 a v dodatku k nej. Takisto je vzhľadom na obsah predmetnej prílohy Ib podľa všetkého pojem „vývojový diagram“ vhodnejší než pojem „rozhodovací strom“.

(7) V bode 9.4 prílohy XII k nariadeniu (EHS) č. 2568/91 sa medián defektorov vymedzuje ako medián defektoru vnímaného s najväčšou intenzitou. V súvislosti s kontrolnými posúdeniami a vzhľadom na skutočnosť, že súlad oleja s deklarovanou kategóriou musia posúdiť rôzne degustačné poroty, malo by sa objasniť, že rozhodnutie o súlade charakteristík oleja s deklarovanou kategóriou vychádza len z hodnoty mediánu hlavného defektoru, bez ohľadu na jeho povahu.

(8) Nariadenie (EHS) č. 2568/91 by sa preto malo zodpovedajúcim spôsobom zmeniť.

(9) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom Výboru pre spoločnú organizáciu poľnohospodárskych trhov,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

Nariadenie (EHS) č. 2568/91 sa mení takto:

1. Článok 2 sa mení takto:

   a) V odseku 1 sa písmeno l) nahrádza takto:

      „l) na stanovenie zloženia a obsahu sterolov a stanovenie alkoholových zlúčenín kapilárnou plynovou chromatografiou – metóda uvedená v prílohe XIX“;

([1]) Ú. v. EÚ L 347, 20.12.2013, s. 671.
([2]) Nariadenie Komisie (EHS) č. 2568/91 z 11. júla 1991 o charakteristikách olivového oleja a oleja z olivových zvyškov a o príslušných analytických metódach (Ú. v. ES L 248, 5.9.1991, s. 1).

b) Odsek 2 tretí pododsek sa nahrádza takto:

„V prípade, že by degustačná porota nepotvrdila deklarovanú kategóriu, pokiaľ ide o organoleptické vlastnosti, vnútroštátne orgány alebo ich zástupcovia na žiadosť zainteresovanej strany bezodkladne zadajú vykonanie dvoch kontrolných posúdení iným schváleným porotám. Aspoň jedna z týchto porôt je porotou schválenou dotknutým členským štátom vyrábajúcim olivový olej. Príslušné vlastnosti sa považujú za zhodné s deklarovanými vlastnosťami, ak dané dve kontrolné posúdenia potvrdia deklarované zatriedenie. Ak sa tak nestane, bez ohľadu na typ defektorov zistených pri kontrolných posúdeniach, zatriedenie sa vyhlási za nezhodujúce sa s predmetnými charakteristikami a zainteresovaná strana znáša náklady na kontrolné posúdenia.“

2. V článku 2a ods. 5 sa písmeno b) nahrádza takto:

„b) postupne v poradí stanovenom v prílohe Ib vo vývojovom diagrame, až kým nedosiahnu jedno z riešení nachádzajúcich sa vo vývojovom diagrame.“;

3. Tabuľka „PRÍLOHY Obsah“ sa nahrádza tabuľkou uvedenou v prílohe I k tomuto nariadeniu;

4. Príloha I sa nahrádza znením prílohy II k tomuto nariadeniu;

5. Bod 2.1 prílohy Ia sa nahrádza takto:

„2.1. Každá primárna vzorka sa musí v súlade s bodom 2.5 normy EN ISO 5555 rozdeliť na laboratórne vzorky, ktoré sa musia analyzovať v poradí podľa vývojového diagramu uvedeného v prílohe Ib alebo v akomkoľvek inom náhodnom poradí.“;

6. Príloha Ib sa nahrádza znením v prílohe III k tomuto nariadeniu;

7. Príloha V sa vypúšťa;

8. Bod 4.2 prílohy VII sa nahrádza takto:

„4.2. n-hexán (na chromatografiu). Hexán možno nahradiť izo-oktánom (2,2,4-trimetylpentánom na chromatografiu) pod podmienkou dosahovania porovnateľných hodnôt presnosti.“;

9. Príloha XII sa mení v súlade s prílohou IV k tomuto nariadeniu;

10. Príloha XVII sa mení v súlade s prílohou V k tomuto nariadeniu;

11. Príloha XVIII sa mení v súlade s prílohou VI k tomuto nariadeniu;

12. Príloha XIX sa nahrádza znením uvedeným v prílohe VII k tomuto nariadeniu;

13. Bod 4.2 prílohy XX sa nahrádza takto:

„4.2. n-hexán, na chromatografiu alebo analýzu zvyškov. Hexán možno nahradiť izo-oktánom (2,2,4-trimetylpentánom na chromatografiu) pod podmienkou dosahovania porovnateľných hodnôt presnosti. Rozpúšťadlá s vyššou teplotou varu než n-hexán sa odparujú dlhšie. Uprednostňujú sa však z dôvodu toxicity hexánu. Čistota musí byť overená; napríklad možno kontrolovať rezíduum po odparení 100 ml rozpúšťadla.

VAROVANIE – Výpary sa môžu vznietiť. Chráňte pred zdrojom tepla, iskrami alebo otvoreným ohňom. Uistite sa, že fľaše sú vždy dobre uzatvorené. Počas použitia zaistite riadnu ventiláciu. Zabráňte hromadeniu výparov a odstráňte všetky príčiny možného vzniku požiaru, ako sú ohrievacie telesá alebo elektrické zariadenia, ktoré nie sú vyrobené z nehorľavého materiálu. Vdýchnutie je škodlivé, lebo môže spôsobiť poškodenie nervových buniek. Zabráňte vdýchnutiu výparov. V prípade potreby použite vhodný dýchací prístroj. Zabráňte kontaktu s očami a pokožkou.

Izo-oktán je horľavá kvapalina, ktorá predstavuje nebezpečenstvo vzniku požiaru. Limit výbušnosti vo vzduchu je 1,1 % až 6,0 % (objemový zlomok). Je toxický pri požití a vdýchnutí. Pri práci s týmto rozpúšťadlom používajte dobre fungujúci ventilovaný digestor.“

Článok 2

Toto nariadenie nadobúda účinnosť dvadsiatym dňom po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 27. septembra 2019

Za Komisiu

predseda

Jean-Claude JUNCKER

PRÍLOHA I

„PRÍLOHY

OBSAH

Príloha I	Charakteristiky olivových olejov
Príloha Ia	Odber vzoriek olivového oleja alebo oleja z olivových výliskov dodávaných v bezprostrednom obale
Príloha Ib	Vývojový diagram na overenie súladu vzorky olivového oleja s deklarovanou kategóriou
Príloha II	Stanovenie voľných mastných kyselín, studená metóda
Príloha III	Stanovenie peroxidového čísla
Príloha IV	Stanovenie obsahu voskov kapilárnou plynovou chromatografiou
Príloha VII	Stanovenie percentuálneho obsahu 2-glyceryl-monopalmitátu
Príloha IX	Spektrofotometrické skúmanie v ultrafialovej oblasti
Príloha X	Stanovenie metylesterov mastných kyselín plynovou chromatografiou
Príloha XI	Stanovenie prchavých halogenovaných rozpúšťadiel v olivovom oleji
Príloha XII	Metóda medzinárodnej rady pre olivy na organoleptické hodnotenie panenských olivových olejov
Príloha XV	Obsah oleja v olivových zvyškoch
Príloha XVII	Stanovenie jódového čísla
Príloha XVII	Metóda stanovenia stigmastadiénov v rastlinných olejoch
Príloha XVIII	Stanovenie rozdielu medzi skutočným a teoretickým obsahom triglyceridov s ECN 42
Príloha XIX	Stanovenie skladby a obsahu sterolov a alkoholových zlúčenín kapilárnou plynovou chromatografiou
Príloha XX	Metóda na stanovenie obsahu voskov, metylesterov mastných kyselín a etylesterov mastných kyselín kapilárnou plynovou chromatografiou
Príloha XXI	Výsledky kontrol zhody vykonaných na olivovom oleji podľa článku 8 ods. 2“

PRÍLOHA II

„PRÍLOHA I

CHARAKTERISTIKY OLIVOVÝCH OLEJOV

Kvalitatívne znaky

Kategória	Kyslosť (%) (*)	Peroxidové číslo (mEq O_2/kg)	K_{232}	K_{268} alebo K_{270}	Delta-K	Organoleptické hodnotenie		Etylestery mastných kyselín (mg/kg)
						Medián defektoru (Md) (*)	Medián ovocnosti (Mf)	
1. Extra panenský olivový olej	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Panenský olivový olej	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Lampantový olivový olej	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 (1)	—	—
4. Rafinovaný olivový olej	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Olivový olej zložený z rafinovaných a panenských olivových olejov	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Surový olej z olivových výliskov	—	—	—	—	—		—	—
7. Rafinovaný olej z olivových výliskov	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Olej z olivových výliskov	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

(1) Medián defektoru môže byť 3,5 alebo nižší ak medián ovocnosti je rovný 0,0.

Znaky čistoty

Kategória	Zloženie mastných kyselín ([1])						Celkový obsah trans- izomérov kyseliny olejovej (%)	Celkový obsah trans- izomérov kyseliny linolovej + kyseliny linolénovej (%)	Stigmastadiény (mg/kg) ([2])	Rozdiel: ECN42 (HPLC) a ECN42 (teoretický výpočet)	2-glyceryl monopalmitát (%)
	Myristová (%)	Linolénová (%)	Arachidová (%)	Eikosenová (%)	Behenová (%)	Lignocerová (%)					
1. Extra panenský olivový olej	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9, ak je % kyseliny palmitovej celkovo ≤ 14,00 % ≤ 1,0, ak je % kyseliny palmitovej celkovo > 14,00 %
2. Panenský olivový olej	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9, ak je % kyseliny palmitovej celkovo ≤ 14,00 % ≤ 1,0, ak je % kyseliny palmitovej celkovo > 14,00 %
3. Lampantový olivový olej	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ |0,30|	≤ 0,9, ak je % kyseliny palmitovej celkovo ≤ 14,00 % ≤ 1,1 ak je % kyseliny palmitovej celkovo > 14,00 %
4. Rafinovaný olivový olej	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9, ak je % kyseliny palmitovej celkovo ≤ 14,00 % ≤ 1,1, ak je % kyseliny palmitovej celkovo > 14,00 %
5. Olivový olej zložený z rafinovaných a panenských olivových olejov	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9, ak je % kyseliny palmitovej celkovo ≤ 14,00 % ≤ 1,0, ak je % kyseliny palmitovej celkovo > 14,00 %
6. Surový olej z olivových výliskov	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ |0,60|	≤ 1,4
7. Rafinovaný olej z olivových výliskov	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,4
8. Olej z olivových výliskov	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,2

([1]) Obsah ostatných mastných kyselín (%): palmitovej: 7,50 – 20,00; palmitoolejovej: 0,30 – 3,50; heptadekánovej: ≤ 0,40; heptadecénovej: ≤ 0,60; stearovej: 0,50 – 5,00; olejovej: 55,00 – 83,00; linolovej: 2,50 – 21,00.

([2]) Celkový obsah izomérov, ktoré by sa (ne-)dali separovať pomocou kapilárnej kolóny.

Kategória	Skladba sterolov						Celkový obsah sterolov (mg/kg)	Erytrodiol a uvaol (%) (**)	Vosky (mg/kg) (**)
	Cholesterol (%)	Brasikasterol (%)	Kampesterol (1) (%)	Stigmasterol (%)	App beta-sitosterol (2) (%)	Delta-7-stigmastenol (1) (%)			
1. Extra panenský olivový olej	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Panenský olivový olej	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Lampantový olivový olej	≤ 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. Rafinovaný olivový olej	≤ 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. Olivový olej zložený z rafinovaných a panenských olivových olejov	≤ 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. Surový olej z olivových výliskov	≤ 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. Rafinovaný olej z olivových výliskov	≤ 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. Olej z olivových výliskov	≤ 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) Pozri dodatok k tejto prílohe.

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

(3) Oleje s obsahom voskov od 300 mg/kg do 350 mg/kg sa považujú za lampantový olivový olej, ak celkovo obsahujú maximálne 350 mg/kg alifatických alkoholov alebo ak obsahujú maximálne 3,5 % erytrodiolu a uvaolu.

(4) Oleje s obsahom voskov od 300 mg/kg do 350 mg/kg sa považujú za surový olej z olivových výliskov, ak celkovo obsahujú viac ako 350 mg/kg alifatických alkoholov a ak je obsah erytrodiolu a uvaolu vyšší ako 3,5 %.

Poznámky:

a) Výsledky analýz sa musia uvádzať s rovnakým počtom desatinných miest, aký je určený pre jednotlivé charakteristiky. Číslica na poslednom desatinnom mieste sa musí zaokrúhliť smerom nahor, ak je nasledujúca číslica väčšia ako 4.

b) Ak hoci len jediná charakteristika nezodpovedá určeným hodnotám, tento olivový olej možno zaradiť do inej kategórie alebo sa olej označí za nespĺňajúci predpisy na účely tohto nariadenia.

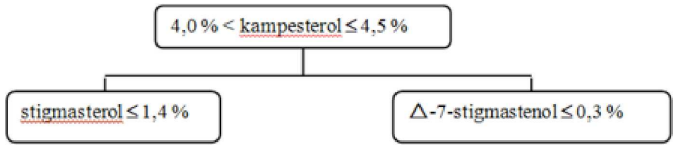
c) V prípade lampantového olivového oleja sa oba kvalitatívne znaky označené hviezdičkou (*) môžu odlišovať od limitov stanovených pre predmetnú kategóriu súčasne.

d) Ak je znak označený dvoma hviezdičkami (**), znamená to, že v prípade surového oleja z olivových výliskov sa oba príslušné limity môžu líšiť od stanovených hodnôt súčasne. V prípade olivového oleja z olivových výliskov a rafinovaného olivového oleja z olivových výliskov sa jeden z relevantných limitov môže líšiť od stanovených hodnôt.

Dodatok

Rozhodovacie stromy

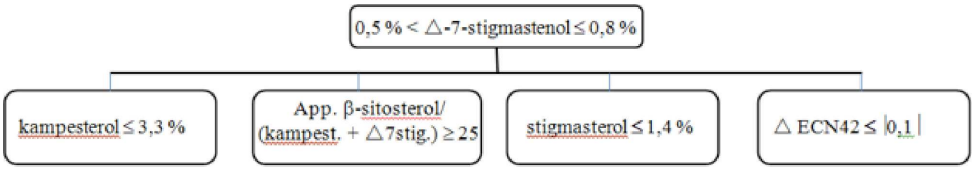
Rozhodovací strom pre **kampesterol** v panenských a extra panenských olivových olejoch:



Ostatné parametre musia spĺňať limity stanovené v tomto nariadení.

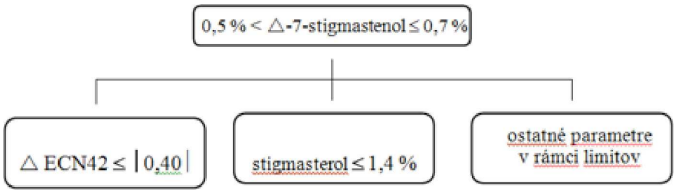
Rozhodovací strom pre **delta-7-stigmastenol**:

— Extra panenské a panenské olivové oleje



Ostatné parametre musia spĺňať limity stanovené v tomto nariadení.

— Oleje z olivových výliskov (surové a rafinované)



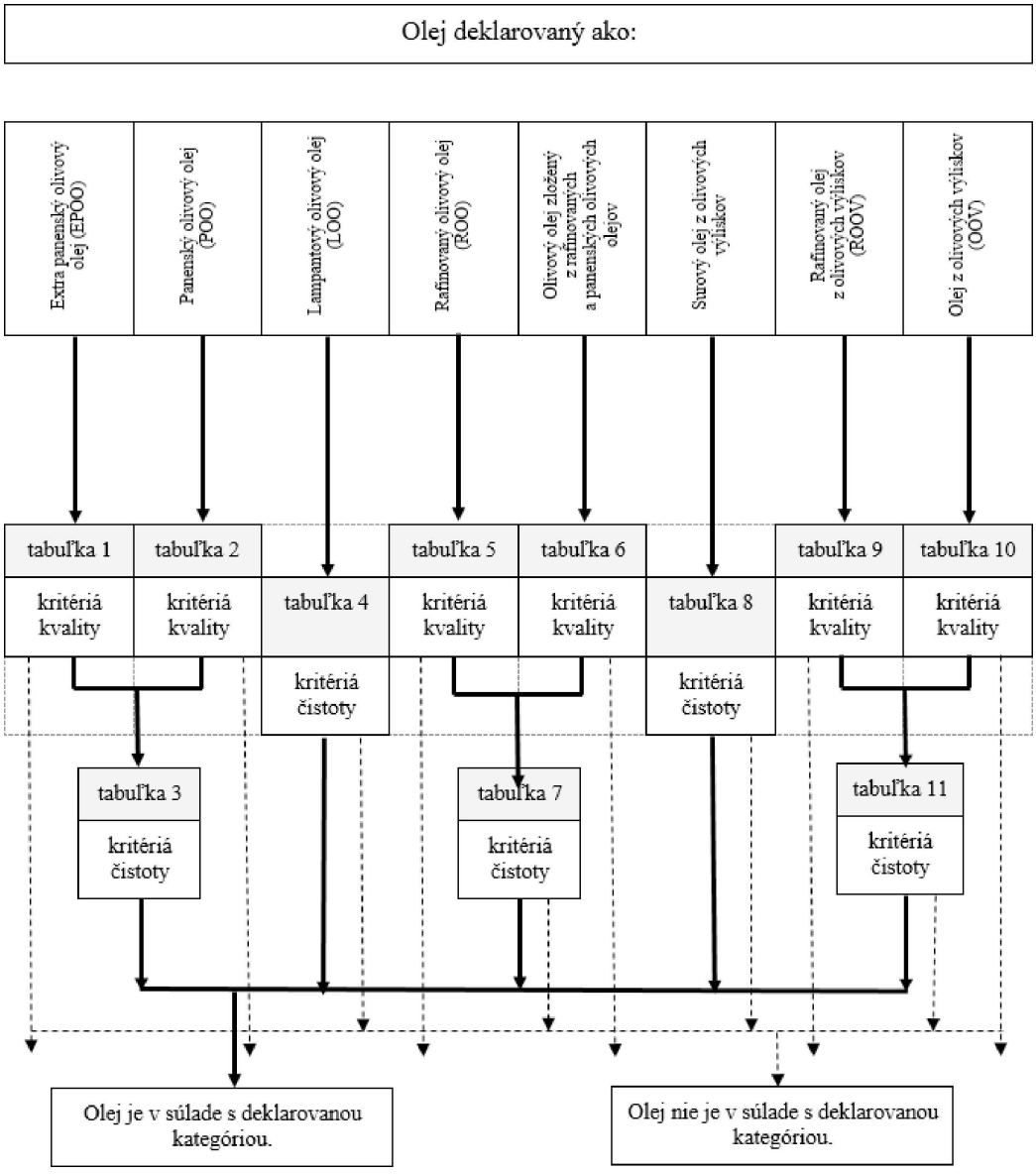
Ostatné parametre musia spĺňať limity stanovené v tomto nariadení.“

PRÍLOHA III

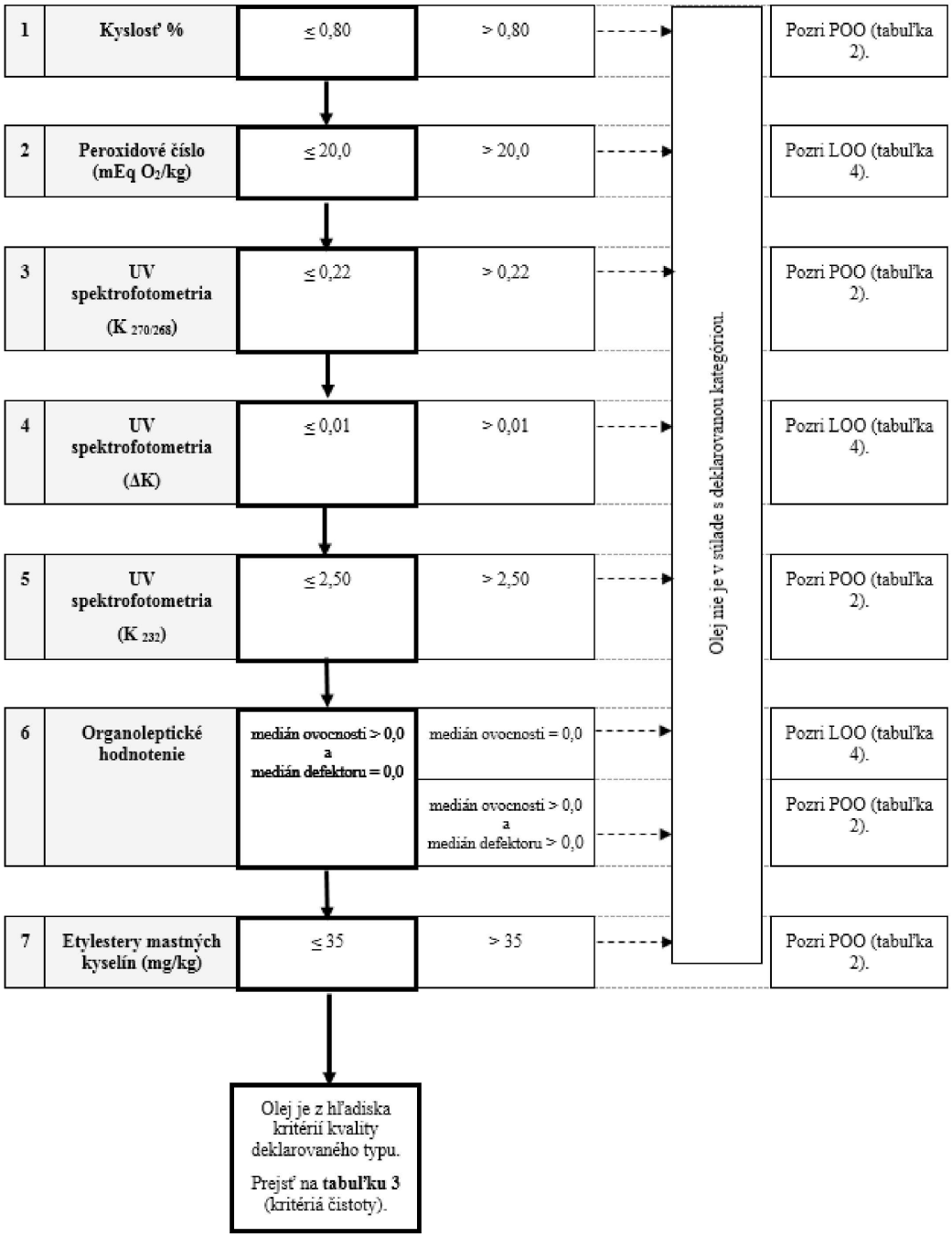
„PRÍLOHA Ib

VÝVOJOVÝ DIAGRAM NA OVERENIE SÚLADU VZORKY OLIVOVÉHO OLEJA S DEKLAROVANOU KATEGÓRIOU

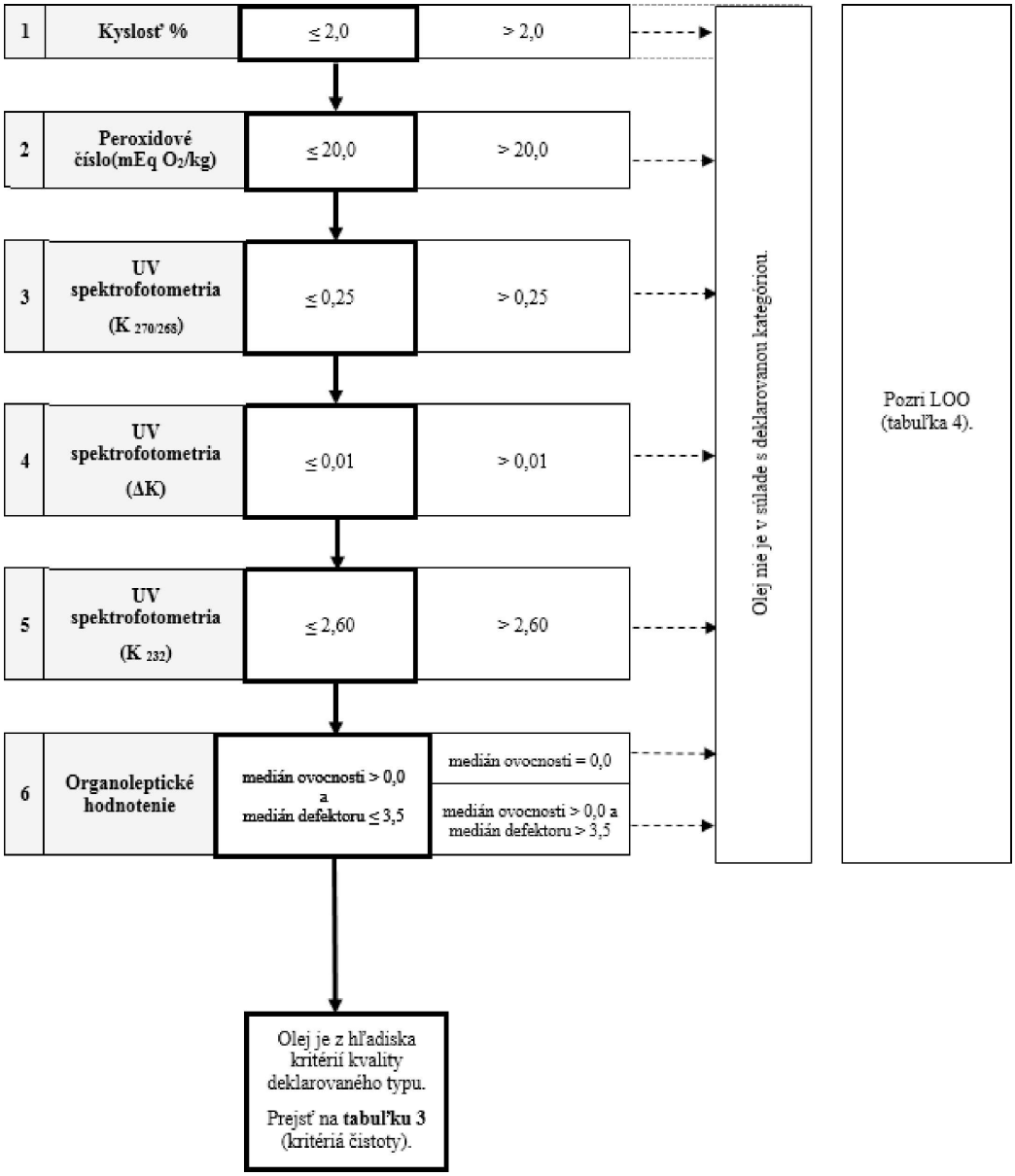
Všeobecná tabuľka



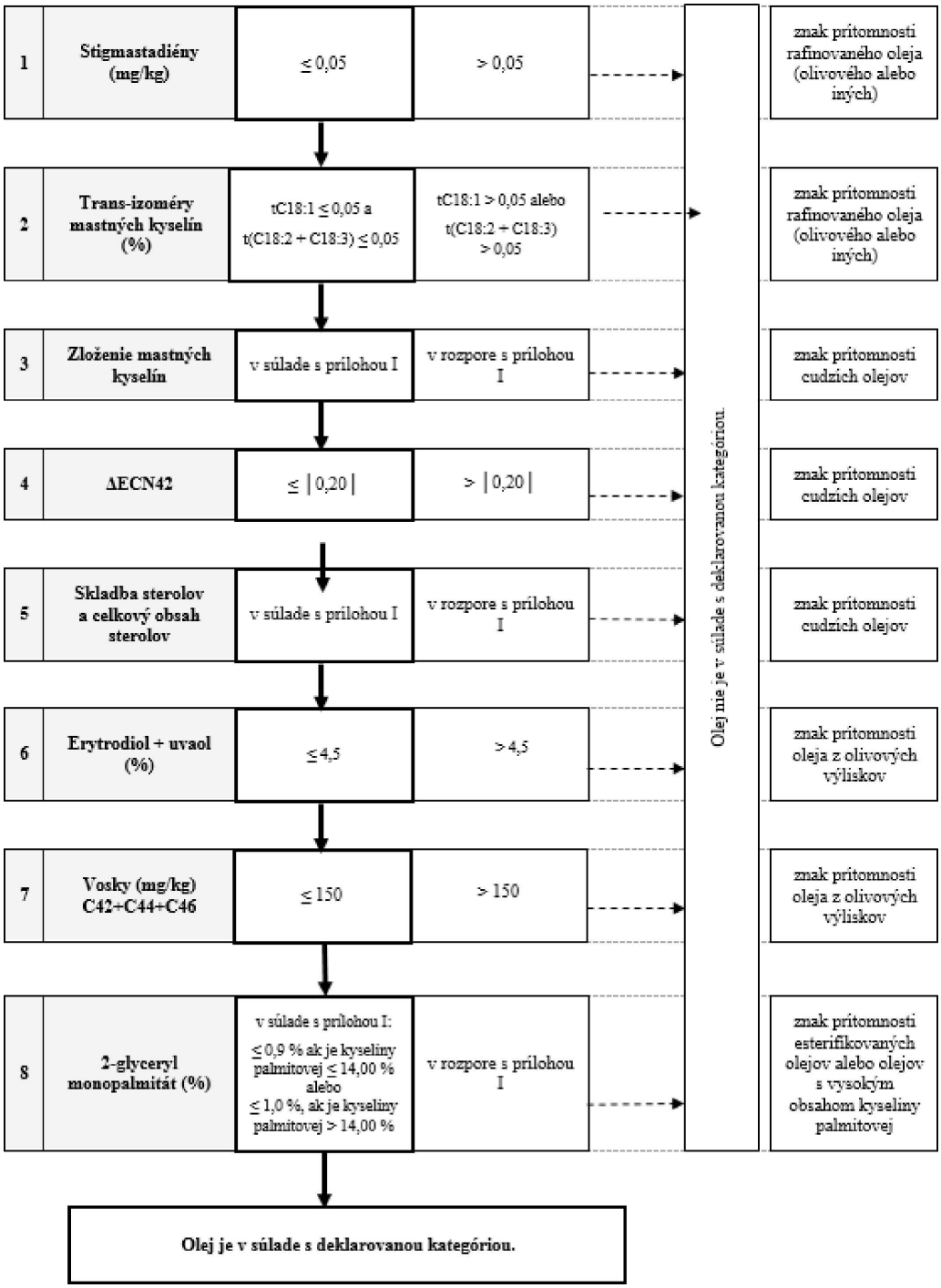
Tabuľka 1 – extra panenský olivový olej – kritériá kvality



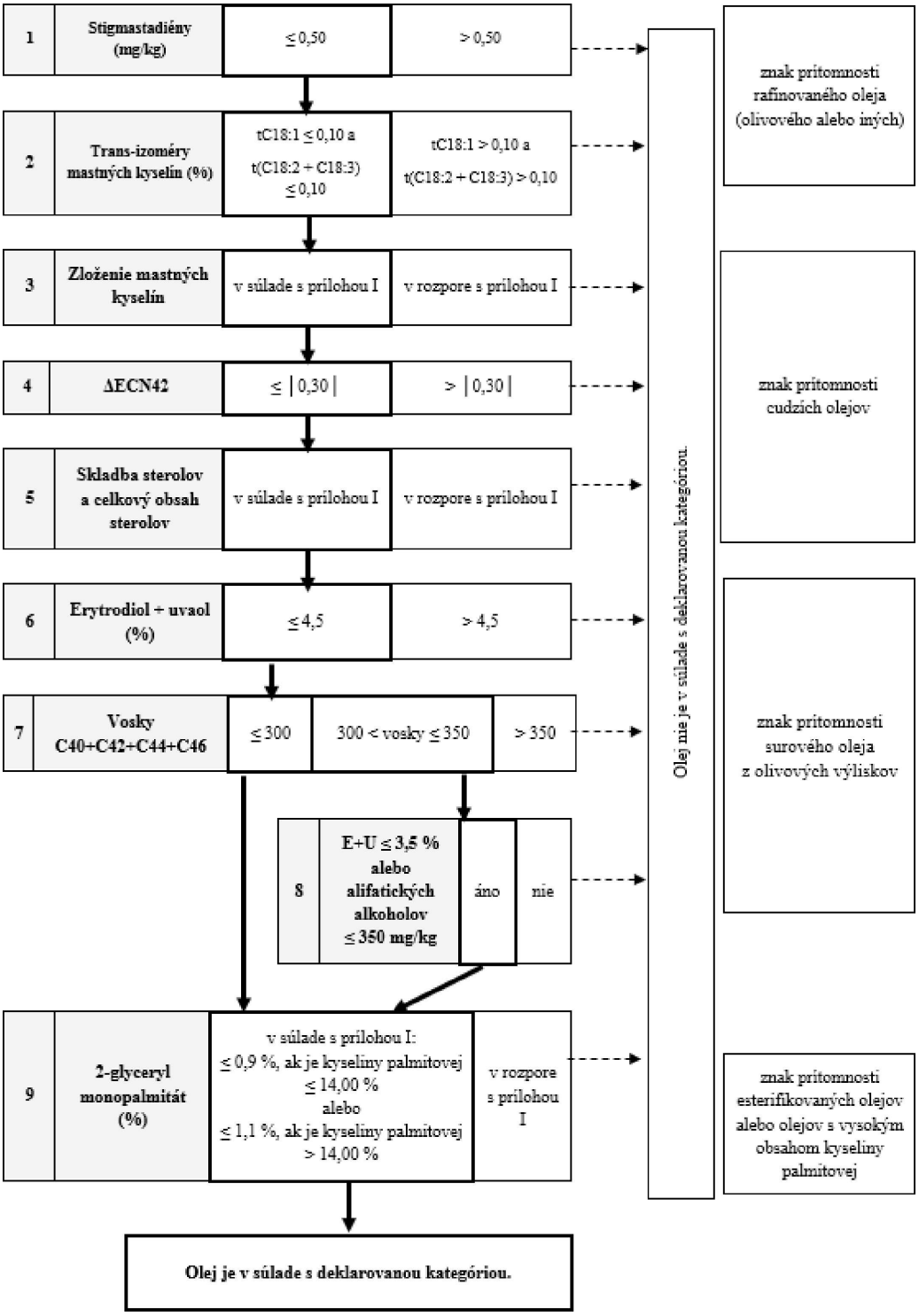
Tabuľka 2 – panenský olivový olej – kritériá kvality



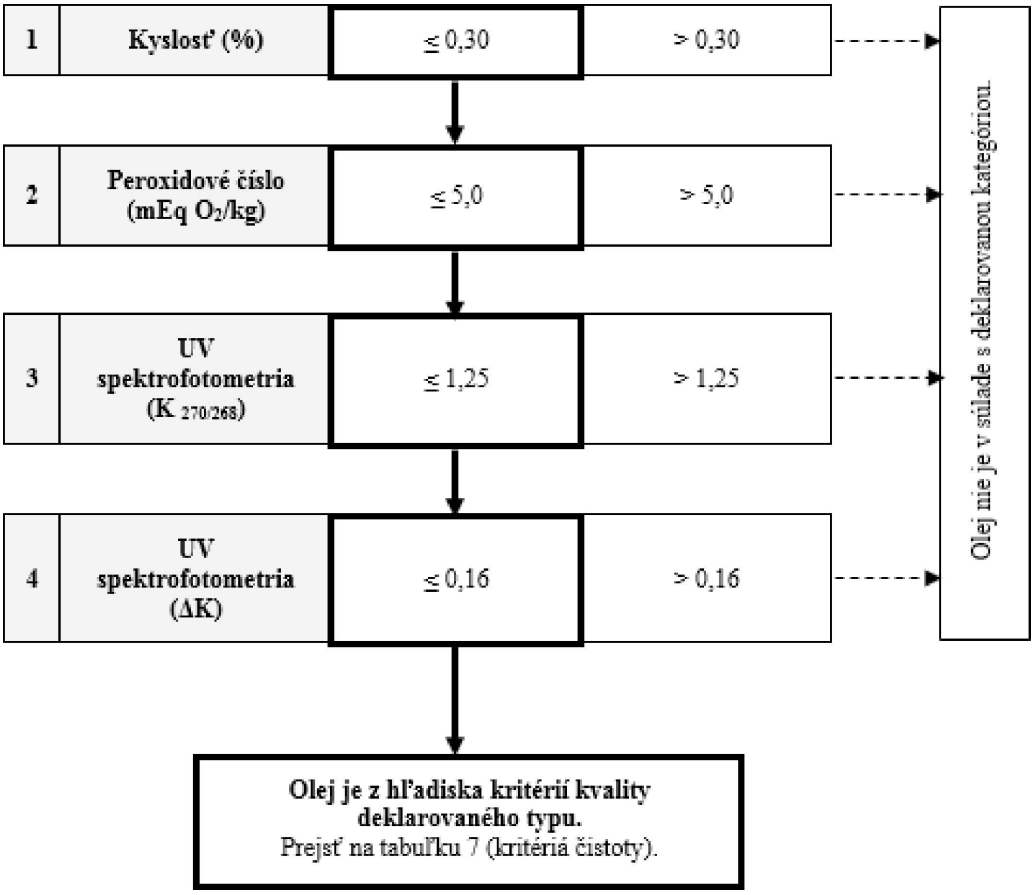
Tabuľka 3 – extra panenský olivový olej a panenský olivový olej – kritériá čistoty



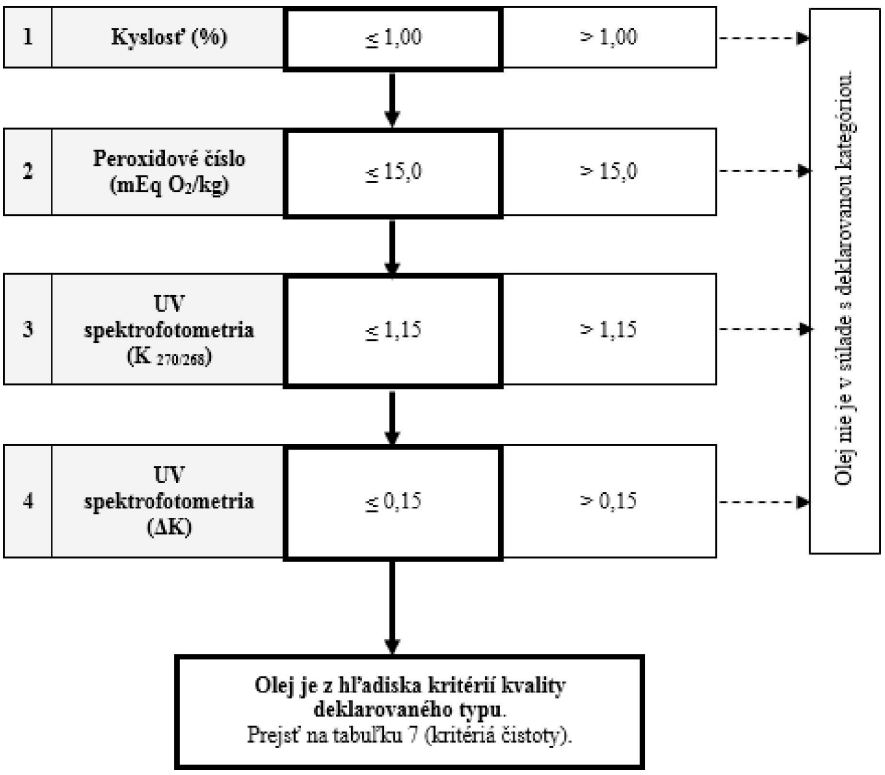
Tabuľka 4 – lampantový olivový olej – kritériá čistoty



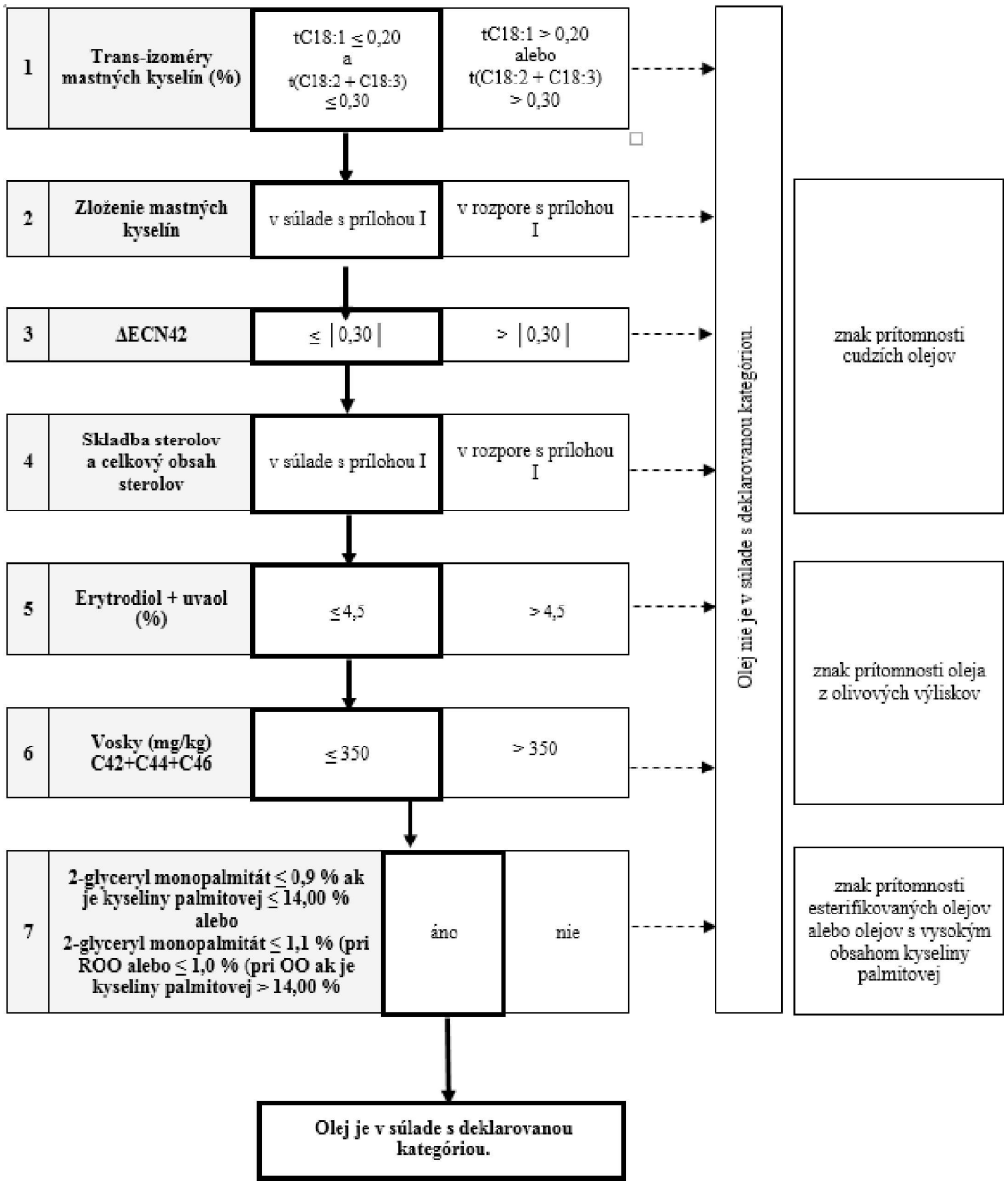
Tabuľka 5 – rafinovaný olivový olej – kritériá kvality



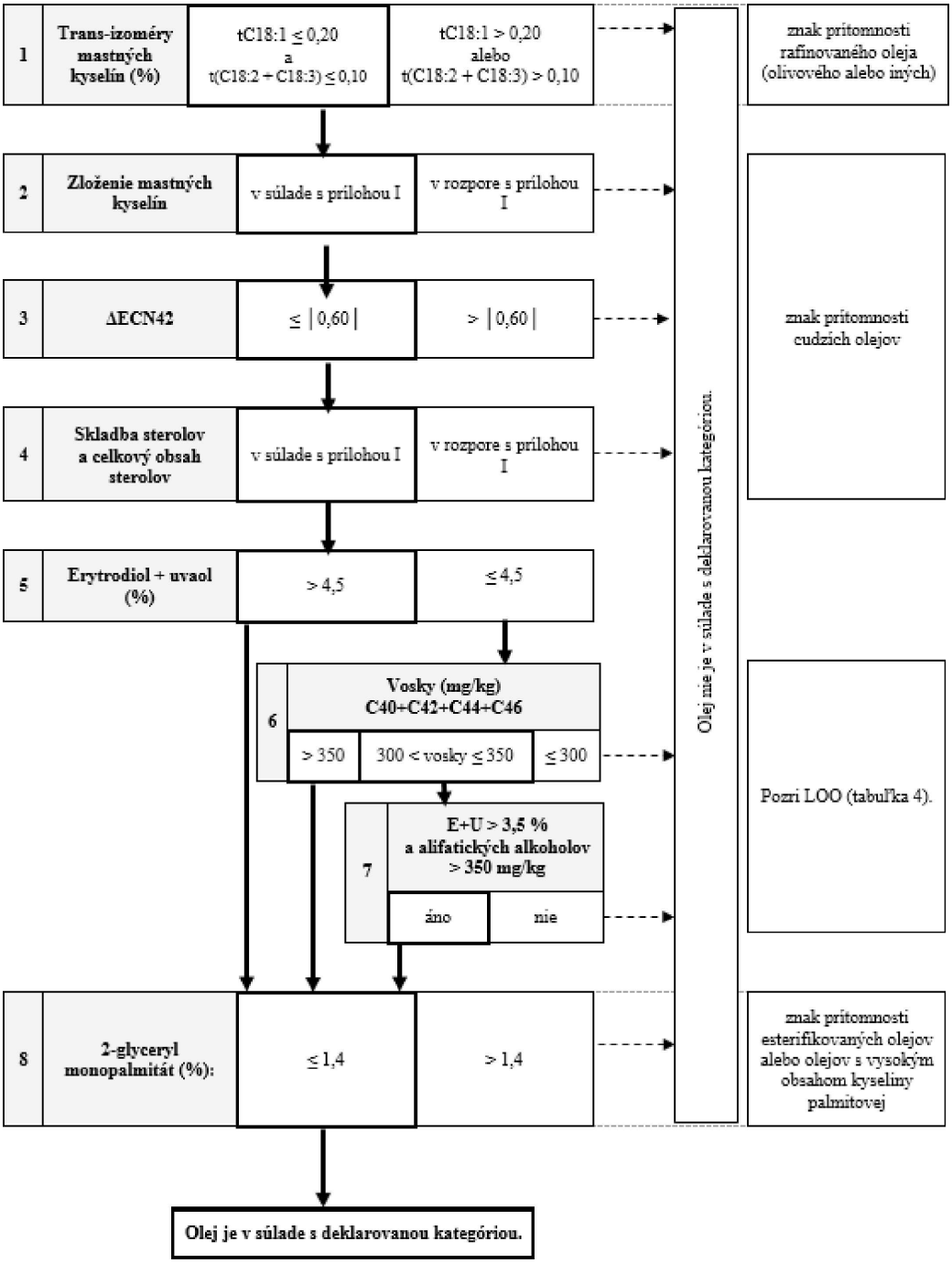
Tabuľka 6 – olivový olej (zložený z rafinovaných a panenských olivových olejov) – kritériá kvality



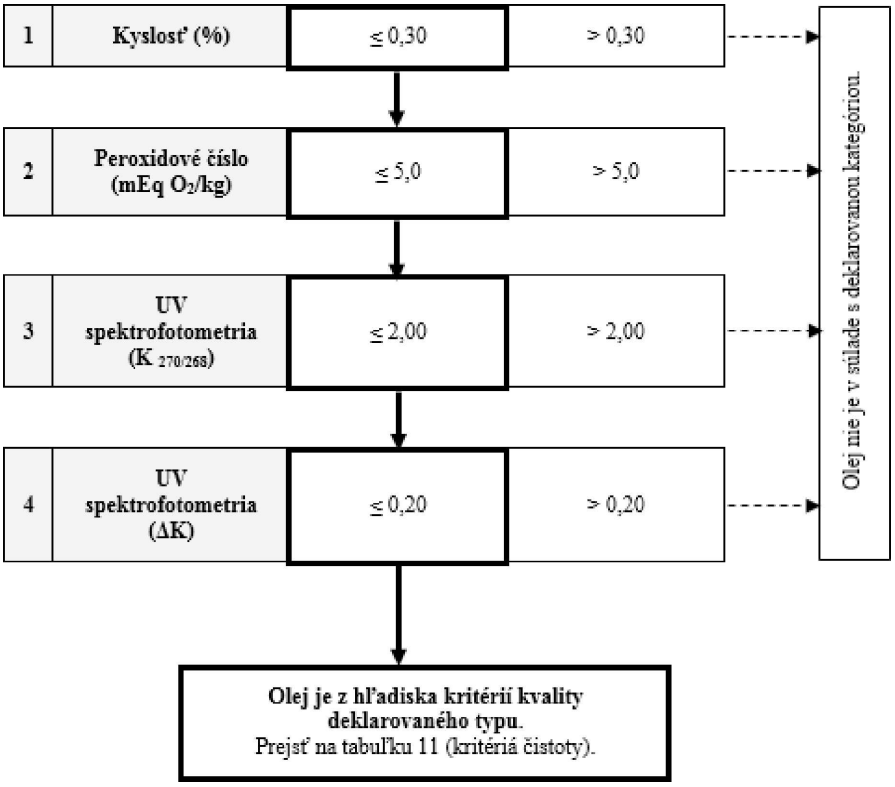
Tabuľka 7 – rafinovaný olivový olej a olivový olej zložený z rafinovaných a panenských olivových olejov – kritériá čistoty



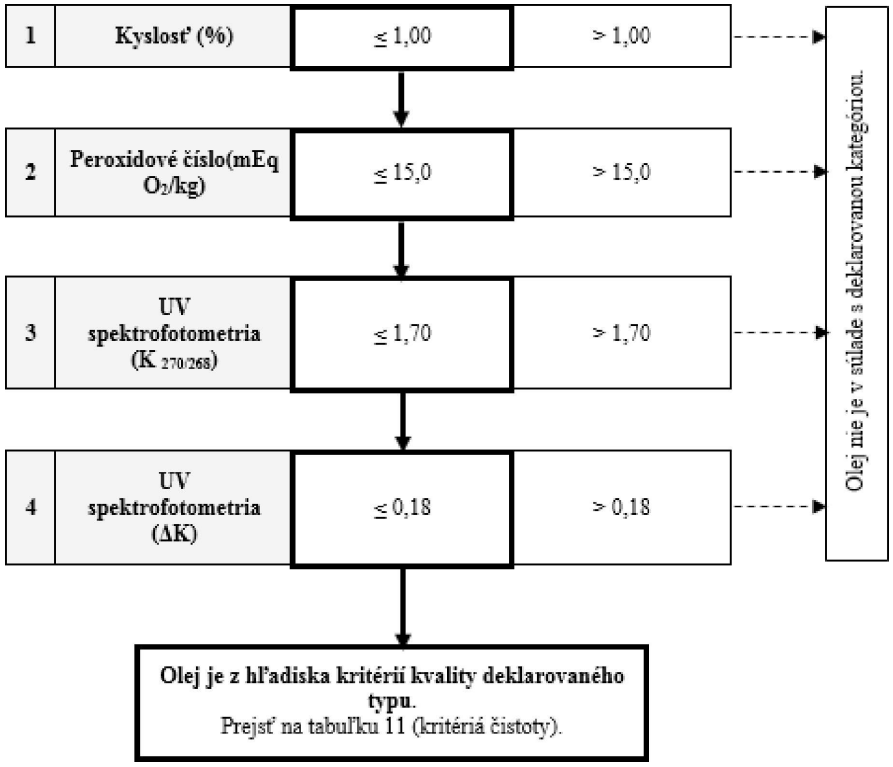
Tabuľka 8 – surový olej z olivových výliskov – kritériá čistoty



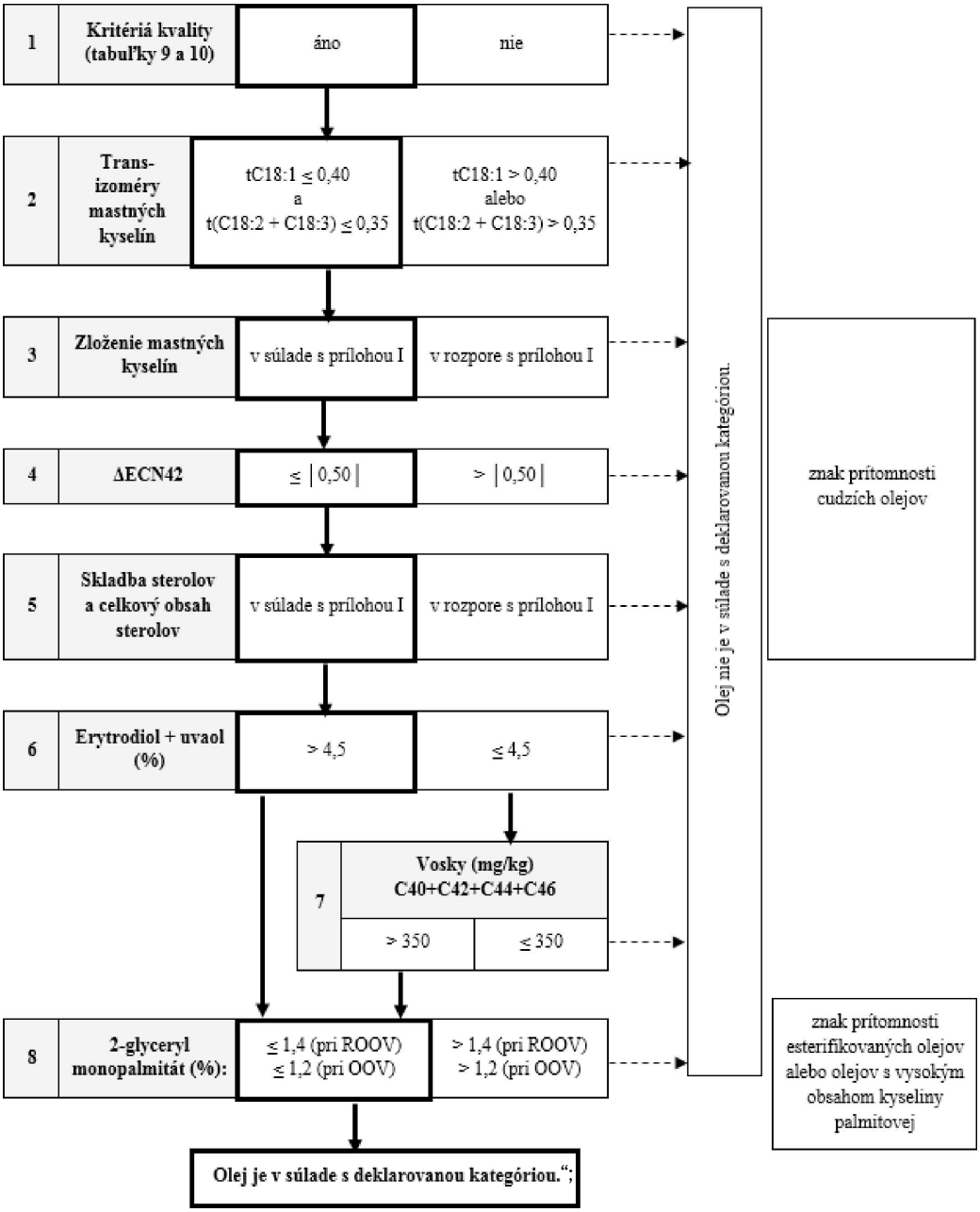
Tabuľka 9 – rafinovaný olej z olivových výliskov – kritériá kvality



Tabuľka 10 – olej z olivových výliskov – kritériá kvality



Tabuľka 11 – rafinovaný olej z olivových výliskov a olej z olivových výliskov – kritériá čistoty



PRÍLOHA IV

Príloha XII sa mení takto:

1. bod 3.3 sa nahrádza takto:

„3.3. **Nepovinná terminológia na účely označovania**

Predseda poroty môže na požiadanie potvrdiť, že hodnotené oleje spĺňajú vymedzenia a rozsahy zodpovedajúce výlučne týmto výrazom v závislosti od intenzity a vnímania atribútov:

Pozitívne atribúty (ovocný, horký a štipľavý): Podľa intenzity vnímania:

— *robustný*, ak je medián atribútu väčší ako 6,0,

— *stredný*, ak je medián atribútu viac než 3 a minimálne 6,0,

— *lahodný*, ak je medián atribútu maximálne 3,0.

Ovocnosť	súbor čuchových vnemových vlastností oleja, ktoré závisia od odrody olív a pochádzajú z nepoškodených, čerstvých olív, v ktorých nedominuje zelená ani zrelá ovocnosť. Pociťuje sa priamo a/alebo retronazálne.
Zelená ovocnosť	súbor čuchových vnemových vlastností oleja, ktoré pripomínajú zelené ovocie, závisia od odrody olív a pochádzajú zo zelených, nepoškodených, čerstvých olív. Pociťuje sa priamo a/alebo retronazálne.
Zrelá ovocnosť	súbor čuchových vnemových vlastností oleja, ktoré pripomínajú zrelé ovocie, závisia od odrody olív a pochádzajú z nepoškodených, čerstvých olív. Pociťuje sa priamo a/alebo retronazálne.
Dobre vyvážený	olej nevykazujúci žiadnu nevyváženosť, ktorou sa myslí čuchovo-chuťový a taktilný vnem a pri ktorej je medián atribútu horkosti a medián atribútu štipľavosti maximálne o 2,0 bodu vyšší ako medián ovocnosti.
Jemný olej	olej, ktorého medián atribútov horkosti a štipľavosti je maximálne 2,0.

Zoznam výrazov podľa intenzity vnímania:

Výrazy, ktoré treba použiť v protokole o organoleptickej skúške	Medián atribútu
Ovocnosť	—
Zrelá ovocnosť	—
Zelená ovocnosť	—
Lahodná ovocnosť	$\leq 3,0$
Stredná ovocnosť	$3,0 < Me \leq 6,0$
Robustná ovocnosť	$> 6,0$
Lahodná zrelá ovocnosť	$\leq 3,0$
Stredná zrelá ovocnosť	$3,0 < Me \leq 6,0$
Robustná zrelá ovocnosť	$> 6,0$
Lahodná zelená ovocnosť	$\leq 3,0$
Stredná zelená ovocnosť	$3,0 < Me \leq 6,0$
Robustná zelená ovocnosť	$> 6,0$

Výrazy, ktoré treba použiť v protokole o organoleptickej skúške	Medián atribútu
Lahodná horkosť	≤ 3,0
Stredná horkosť	3,0 < Me ≤ 6,0
Robustná horkosť	> 6,0
Lahodná štipľavosť	≤ 3,0
Stredná štipľavosť	3,0 < Me ≤ 6,0
Robustná štipľavosť	> 6,0
Dobre vyvážený olej	Medián atribútu horkosti a medián atribútu štipľavosti je maximálne o 2,0 bodu vyšší ako medián ovocnosti.
Jemný olej	Medián atribútu horkosti a medián atribútu štipľavosti je maximálne 2.“;

2. Bod 9.4 sa nahrádza takto:

„9.4. **Klasifikácia oleja**

Olej sa klasifikuje do niektorej z ďalej uvedených kategórií podľa mediánu defektorov a mediánu atribútu ovocnosti. Medián defektorov sa vymedzuje ako medián defektoru vnímaného s najväčšou intenzitou. Medián defektorov a medián atribútu ovocnosti sa uvádzajú s presnosťou na jedno desatinné číslo.

Olej sa klasifikuje na základe porovnania hodnoty mediánu defektorov a mediánu atribútu ovocnosti s ďalej uvedenými referenčnými intervalmi. Pri stanovovaní hraníc týchto intervalov sa zohľadnila chybnosť metódy, a preto sa tieto hranice považujú za absolútne. Počítačové programy umožňujú vizuálne zobrazenie klasifikácie vo forme tabuľky alebo grafu.

a) Extra panenský olivový olej: medián defektorov je 0 a medián atribútu ovocnosti je vyšší ako 0,0;

b) Panenský olivový olej: medián defektorov je vyšší ako 0,0, ale nie vyšší ako 3,5 a medián atribútu ovocnosti je vyšší ako 0,0;

c) Lampantový olivový olej: medián defektoru je vyšší ako 3,5 alebo medián defektoru je nižší alebo rovný 3,5 a medián ovocnosti je rovný 0,0.

Poznámka 1: Ak je medián atribútu horkosti a/alebo atribútu štipľavosti vyšší ako 5,0, predseda poroty túto skutočnosť uvedie v protokole o skúške.

V prípade hodnotení určených na monitorovanie súladu sa musí vykonať jedna skúška. V prípade kontrolných hodnotení sa analýza musí opakovane vykonať v ďalšej degustácii. Výsledky opakovanej analýzy musia byť štatisticky homogénne. (Pozri bod 9.5.) Ak nie sú, analýza vzorky sa ešte raz zopakuje. Konečná hodnota mediánu klasifikačných atribútov sa vypočíta na základe priemeru oboch mediánov.“

PRÍLOHA V

Príloha XVII sa mení takto:

1. Bod 5.1 sa nahrádza takto:

„5.1. Hexán alebo zmes alkánov s rozmedzím bodov varu 65 až 70 °C, destilované v rektifikačnej kolóne. Hexán možno nahradiť izo-oktánom (2,2,4-trimetylpentánom na chromatografiu) pod podmienkou dosahovania porovnateľných hodnôt presnosti. Rezíduum po odparení 100 ml rozpúšťadla možno kontrolovať. Rozpúšťadlá s vyššou teplotou varu než n-hexán sa odparujú dlhšie. Uprednostňujú sa však z dôvodu toxicity hexánu.“;

2. V bode 6.3.3 sa dopĺňa tento text:

„Poznámka 10: Ak sa stigmastidiény objavia v koncentráciách vyšších než 4 mg/kg a vyžaduje sa kvantifikácia, musí sa uplatniť metóda Medzinárodnej rady pre olivy na určenie sterénov v rafinovaných olejoch.“

PRÍLOHA VI

Príloha XVIII sa mení takto:

1. Bod 4.2.1 sa nahrádza takto:

„4.2.1. Petroléter 40 – 60 °C chromatografickej kvality alebo hexán. Hexán možno nahradiť izo-oktánom (2,2,4-trimetylpentánom na chromatografiu) pod podmienkou dosahovania porovnateľných hodnôt presnosti. Rozpúšťadlá s vyššou teplotou varu než n-hexán sa odparujú dlhšie. Uprednostňujú sa však z dôvodu toxicity hexánu.“;

2. Dopĺňa sa tento bod 4.2.12:

„4.2.12. Heptán, chromatografickej kvality. Heptán možno nahradiť izo-oktánom (2,2,4-trimetylpentánom na chromatografiu).“.

PRÍLOHA VII

„PRÍLOHA XIX

STANOVENIE SKLADBY A OBSAHU STEROLOV A ALKOHOLOVÝCH ZLÚČENÍN KAPILÁRNOU PLYNOVOU CHROMATOGRAFIOU

1. PREDMET ÚPRAVY

Táto metóda opisuje postup stanovovania obsahu jednotlivých alkoholových zlúčenín a ich celkového obsahu v olivových olejoch a olejoch z olivových výliskov, ako aj v zmesiach týchto dvoch druhov olejov.

K alkoholovým zlúčeninám v olivových olejoch a olejoch z olivových výliskov patria alifatické alkoholy, steroly a triterpénové dioly.

2. PODSTATA METÓDY

Oleje s pridaným α-cholestanolom a 1-eikosanolom ako vnútorným štandardom sa zmydelní etanolovým roztokom hydroxidu draselného a nezmydelniteľná látka sa extrahuje etyléterom.

Rôzne frakcie alkoholových zlúčenín sa separujú od nezmydelniteľnej látky buď tenkovrstvovou chromatografiou na základnej silikagélovej platni (referenčná metóda) alebo HPLC so silikagélovou kolónou. Frakcie získané zo separácie silikagélom sa transformujú na trimetylsilylétery a následne sa analyzujú kapilárnou plynovou chromatografiou.

ČASŤ 1

PRÍPRAVA NEZMYDELNITEĽNEJ LÁTKY

1. PREDMET ÚPRAVY

V tejto časti sa opisuje príprava a extrakcia nezmydelniteľnej látky. Zahŕňa prípravu a extrakciu nezmydelniteľnej látky z olivových olejov a olejov z olivových výliskov.

2. PODSTATA METÓDY

Skúšobná dávka sa zmydelní varom pod spätným chladičom s etanolovým roztokom hydroxidu draselného. Nezmydelniteľná látka sa extrahuje dietyléterom.

3. LABORATÓRNA TECHNIKA

Bežné laboratórne vybavenie, a najmä:

3.1. 250 ml banka s guľatým dnom so spätným chladičom a zábrusovými sklenenými spojmi.

3.2. 500 ml oddeľovací lievik.

3.3. 250 ml banky.

3.4. Mikrostriekačky s objemom 100 µl a 500 µl.

3.5. Valcovitý filtračný lievik s fritou G3 (pórovitosť 15 – 40 µm) s priemerom približne 2 cm a hĺbkou 5 cm, vhodný na filtrovanie vo vákuu, s vonkajším zábrusom.

3.6. 50 ml kónická banka s vnútorným zábrusom, vhodná na použitie s uvedeným filtračným lievikom (bod 3.5).

3.7. 10 ml skúmavka kónickým dnom a so zabrúsenou sklenenou zátkou.

3.8. Exsikátor s chloridom vápenatým.

4. ČINIDLÁ

4.1. Hydroxid draselný s minimálnou koncentráciou stanovenou titrovaním 85 %.

4.2. Hydroxid draselný, etanolový roztok približne 2 M.

130 g hydroxidu draselného (bod 4.1) sa rozpustí za chladenia v 200 ml destilovanej vody a potom sa doplní etanolom na objem 1 litra (4.7). Roztok sa môže skladovať v dobre uzatvorenej fľaši z tmavého skla najviac dva dni.

4.3. Dietyléter, analytickej kvality.

4.4. Bezvodý síran sodný, analytickej kvality.

4.5. Acetón, chromatografickej kvality.

4.6. Dietyléter, chromatografickej kvality.

4.7. Etanol, analytickej kvality.

4.8. Etylacetát, analytickej kvality.

4.9. Vnútorný štandard, α-cholestanol, s čistotou viac ako 99 % (čistota sa musí skontrolovať prostredníctvom plynovochromatografickej analýzy).

4.10. α-cholestanol, vnútorný štandardný roztok, 0,2 % roztok (m/V) v etylacetáte (bod 4.8).

4.11. Fenolftaleínový roztok, 10 g/l v etanole (bod 4.7).

4.12. 0,1 % (m/V) roztok 1-eikosanolu v etylacetáte (vnútorný štandard).

5. POSTUP

Pomocou 500 µl mikrostriekačky (bod 3.4) sa do 250 ml banky (bod 3.1) zavedie taký objem vnútorného štandardného roztoku α-cholestanolu (bodu 4.10) a objem 1-eikosanolu (bod 4.12), ktorý obsahuje množstvo cholestanolu a eikosanolu zodpovedajúce približne 10 % obsahu sterolov a alkoholov vo vzorke. Napr. v prípade 5 g vzorky olivového oleja sa pridá 500 µl roztoku α-cholestanolu (bod 4.10) a 250 µL roztoku 1-eikosanolu (bod 4.12). V prípade olejov z olivových výliskov sa pridá 1500 µl roztoku α-cholestanolu (bod 4.10) a 1500 µl 1-eikosanolu (bod 4.12). V teplom vodnom kúpeli sa roztok pomocou jemného prúdu dusíka odparí dosucha. Po vychladení banky sa do tej istej banky naváži 5,00 ± 0,01 g suchej prefiltrovanej vzorky.

Poznámka 1: Živočíšne alebo rastlinné oleje a tuky s obsahom zistiteľných množstiev cholesterolu môžu vykazovať píky s retenčným časom identickým ako pri cholestanole. V takom prípade sa sterolová frakcia musí analyzovať raz s vnútorným štandardom a raz bez vnútorného štandardu.

Pridá sa 50 ml 2M etanolového roztoku hydroxidu draselného (bod 4.2) a trochu pemzy, nasadí sa spätný chladič a zariadenie sa zahrieva do mierneho varu, až kým neprebehne zmydelnenie (roztok sa vyčíri). Zahrieva sa ešte ďalších 20 minút a potom sa cez chladič prileje 50 ml destilovanej vody, chladič sa odpojí a banka sa ochladí na teplotu približne 30 °C.

Obsah banky sa pomocou niekoľkých dávok destilovanej vody (50 ml) kvantitatívne prenesie do 500 ml oddeľovacieho lievika (bod 3.2). Pridá sa približne 80 ml dietyléteru (bod 4.6) a obsah sa silno pretrepáva približne 60 sekúnd, pričom sa tlak pravidelne uvoľňuje prevracaním oddeľovacieho lievika a otváraním kohútika. Nechá sa stáť do úplného oddelenia oboch fáz (poznámka 2). Následne sa mydlový roztok čo najdokonalejšie oddelí do druhého oddeľovacieho lievika. Rovnakým spôsobom sa vykonajú dve ďalšie extrakcie z vodno-alkoholovej fázy, pričom sa použije 60 až 70 ml dietyléteru (bod 4.6).

Poznámka 2: Akákoľvek emulzia sa dá odstrániť pridaním malých množstiev etanolu (bod 4.7).

Získané tri éterové extrakty sa skombinujú v jednom oddeľovacom lieviku, ktorý obsahuje 50 ml vody. Extrakt sa opakovane premýva vodou (50 ml) dovtedy, kým sa premývacia voda po pridaní kvapky roztoku fenolftaleínu (bod 4.11) neprestane sfarbovať do ružova. Po odstránení premývacej vody sa zostávajúca vrstva prefiltruje cez bezvodý síran sodný (bod 4.4) do predtým odváženej 250 ml banky, pričom sa lievik a filter prepláchne malými množstvami dietyléteru (bod 4.6).

Rozpúšťadlo sa odparí destilovaním v rotačnej vákuovej odparke pri 30 °C. Pridá sa 5 ml acetónu (bod 4.5) a prchavé rozpúšťadlo sa úplne odstráni miernym prúdom dusíka. Zvyšok sa vysuší v peci pri 103 ± 2 °C počas 15 min. Nechá sa vychladiť v exsikátore a odváži sa s presnosťou na 0,1 mg.

ČASŤ 2

SEPARÁCIA FRAKCIÍ ALKOHOLOVÝCH ZLÚČENÍN

1. PREDMET ÚPRAVY

Nezmydelniteľná látka pripravená podľa postupu v časti 1 sa frakcionuje na rôzne alkoholové zlúčeniny, alifatické alkoholy, steroly a triterpénové dioly (erytrodiol + uvaol).

2. PODSTATA METÓDY

Nezmydelniteľnú látku možno frakcionovať pomocou tenkovrstvovej chromatografie na základnej platni (referenčná metóda), zviditeľniť a zodpovedajúce pásma možno zoškrabať a extrahovať. Alternatívnou metódou separácie je HPLC s použitím silikagélovej kolóny a detektora UV a zber jednotlivých frakcií. Alifatické a triterpénové alkoholy, ako aj steroly a triterpénové dioly sa izolujú spoločne.

3. LABORATÓRNA TECHNIKA

Bežné laboratórne vybavenie, a najmä:

3.1. Kompletná zostava na analýzu tenkovrstvovou chromatografiou so sklenenými platňami s rozmermi 20 × 20 cm.

3.2. UV lampa s vlnovou dĺžkou 366 alebo 254 nm.

3.3. Mikrostriekačky s objemom 100 µl a 500 µl.

3.4. Valcovitý filtračný lievik s fritou G3 (pórovitosť 15 – 40 µm) s priemerom približne 2 cm a hĺbkou 5 cm, vhodný na filtrovanie vo vákuu, s vonkajším zábrusom.

3.5. 50 ml kónická banka s vnútorným zábrusom, vhodná na použitie s uvedeným filtračným lievikom (bod 3.4).

3.6. 10 ml skúmavka kónickým dnom a so zabrúsenou sklenenou zátkou.

3.7. Exsikátor s chloridom vápenatým.

3.8. Systém HPLC, ktorý tvorí:

3.8.1. Binárne čerpadlo.

3.8.2. Manuálny alebo automatický injektor vybavený 200 µl dávkovacou slučkou.

3.8.3. Integrovaný odplyňovač.

3.8.4. Detektor UV-VIS alebo IR.

3.9. Kolóna HPLC (25 cm × 4 mm vnútorný priemer) so silikagélom 60 (veľkosť častíc 5 µm).

3.10. Injekčný filter, 0,45 µm.

3.11. 25 ml kónická banka.

4. ČINIDLÁ

4.1. Hydroxid draselný s minimálnou koncentráciou stanovenou titrovaním 85 %.

4.2. Hydroxid draselný, etanolový roztok približne 2 M.

130 g hydroxidu draselného (bod 4.1) sa rozpustí za chladenia v 200 ml destilovanej vody a potom sa doplní etanolom na objem 1 litra (bod 4.9). Roztok sa môže skladovať v dobre uzatvorenej fľaši z tmavého skla najviac dva dni.

4.3. Dietyléter, analytickej kvality.

4.4. Hydroxid draselný, etanolový roztok približne 0,2 M.

13 g hydroxidu draselného (bod 4.1) sa rozpustí v 20 ml destilovanej vody a potom sa doplní etanolom na objem 1 litra (bod 4.9).

4.5. Silikagélové tenkovrstvé sklenené platne (20 × 20 cm), bez fluorescenčného detektora, s hrúbkou 0,25 mm (komerčne dostupné a vhodné na okamžité použitie).

4.6. Acetón, chromatografickej kvality.

4.7. n-hexán, chromatografickej kvality.

4.8. Dietyléter, chromatografickej kvality.

4.9. Etanol, analytickej kvality.

4.10. Etylacetát, analytickej kvality.

4.11. Referenčný roztok na tenkovrstvovú chromatografiu: cholesterol, fytosteroly, alkoholy a 5 % roztok erytrodiolu v etylacetáte (bod 4.10).

4.12. 0,2 % roztok 2,7-dichlórfluóresceínu v etanolovom roztoku. Slabo alkalický roztok získame pridaním niekoľkých kvapiek 2 M alkoholového roztoku hydroxidu draselného (bod 4.2).

4.13. n-hexán (bod 4.7)/dietyléter (bod 4.8) – zmes v pomere 65:35 (V/V).

4.14. mobilná fáza HPLC, n-hexán (bod 4.7)/dietyléter (bod 4.8) (pomer 1:1) (V/V).

5. REFERENČNÁ METÓDA: SEPARÁCIA ALKOHOLOVÝCH ZLÚČENÍN POMOCOU TENKOVRSTVOVEJ CHROMATOGRAFIE NA ZÁKLADNEJ PLATNI

Príprava základných platní pre tenkovrstvovú chromatografiu. Silikagélové platne (bod 4.5) sa ponoria asi 4 cm na 10 sekúnd do 0,2 M etanolového roztoku hydroxidu draselného (bod 4.4), potom sa nechajú dve hodiny sušiť v digestore a nakoniec sa umiestnia na jednu hodinu do pece vyhriatej na 100 °C.

Platne sa po vybratí z pece uložia až do ďalšieho použitia do eksikátora s chloridom vápenatým (bod 3.7) (takto ošetrené platne sa musia použiť do 15 dní).

Do vyvíjacej komory sa naleje zmes hexánu/dietyléteru (bod 4.13) (Poznámka 3) do výšky asi 1 cm. Komora sa uzatvorí vhodným krytom a nechá sa aspoň pol hodinu na chladnom mieste tak, aby sa dosiahla rovnováha nasýtených pár nad hladinou. Na vnútorné povrchy komory možno umiestniť prúžky filtračného papiera siahajúceho do eluentu (vyvíjacej zmesi). Tým sa zníži elučný čas približne o tretinu a elúcia zložiek bude jednotnejšia a pravidelnejšia.

Poznámka 3: Elučná zmes by sa mala vymeniť pri každej skúške, aby sa dosiahli dokonale reprodukovateľné elučné podmienky. Možno pri tom použiť aj alternatívne rozpúšťadlo, a to zmes n-hexánu/dietyléteru v pomere 50:50 (V/V).

Pripraví sa približne 5 % roztok nezmydelniteľnej látky pripravenej podľa postupu v časti 1 v etylacetáte (bod 4.10) a pomocou 100 µl mikrostriekačky (bod 3.3) sa na spodný okraj (2 cm) chromatografickej platne (bod 4.5) nanesie 0,3 ml roztoku v úzkom a rovnomernom prúžku. V línii s týmto prúžkom sa nanesú 2 až 3 µl referenčného roztoku látky (bod 4.11) tak, aby sa pásmo sterolov, triterpénových diolov a alkoholov dalo po vyvolaní identifikovať.

Platňa sa umiestni do vyvíjacej komory (bod 3.1). Teplota okolia by sa mala udržiavať v rozmedzí 15 až 20 °C (poznámka 4). Komora sa ihneď uzatvorí krytom a vzorka sa nechá eluovať, kým čelo rozpúšťadla nedosiahne vzdialenosť približne 1 cm od horného okraja platne. Potom sa platňa vyberie z vyvíjacej komory a rozpúšťadlo sa nechá odpariť prúdom horúceho vzduchu alebo krátkym ponechaním platne v digestore.

Poznámka 4: Pri vyššej teplote sa separácia môže zhoršovať.

Platňa sa zľahka rovnomerne postrieka roztokom 2,7-dichlórfluóresceínu (bod 4.12) a nechá sa vyschnúť. Keď sa platňa sleduje pod ultrafialovou lampou (bod 3.2), pásma sterolov, triterpénových diolov a alkoholov sa dajú identifikovať podľa škvŕn získaných z referenčného roztoku, s ktorými sú zarovno (bod 4.11). Hranice pásiem sa označia čiernou ceruzkou pozdĺž okrajov fluorescencie (pozri TLC platňu na obrázku 1).

Pomocou kovovej škrabky (kopistky) sa silikagél zoškriabe z označenej plochy. Následne získaný jemne rozotretý materiál sa umiestni do filtračného lievika (3.4). Pridá sa 10 ml horúceho etylacetátu (bod 4.10), opatrne sa premieša kovovou kopistkou a prefiltruje sa (v prípade potreby vo vákuu), pričom sa filtrát zbiera do kónickej banky (bod 3.5) pripojenej k filtračnému lieviku.

Zvyšok v banke sa trikrát premyje dietyléterom (bod 4.3) (použije sa približne 10 ml pri každom oplachovaní), pričom sa filtrát zbiera do tej istej banky pripojenej k lieviku, filtrát sa odparí na objem 4 až 5 ml, zvyšný roztok sa prenesie do predtým odváženej 10 ml skúmavky (bod 3.6), odparí sa dosucha miernym teplom pomocou jemného prúdu dusíka, následne sa opäť skvapalní pridaním niekoľkých kvapiek acetónu (bod 4.6) a opäť sa nechá dosucha odpariť. Zvyšok vo vnútri skúmavky pozostáva z frakcie sterolov a triterpénových diolov alebo frakcie alkoholov a triterpénových alkoholov.

6. SEPARÁCIA FRAKCIE ALKOHOLOV POMOCOU HPLC

Nezmydelniteľná látka získaná podľa postupu v časti 1 sa rozpustí v 3 ml mobilnej fázy (bod 4.14), roztok sa filtruje pomocou injekčného filtra (bod 3.10) a zachová.

Do HPLC (bod 3.8) sa vstrekne 200 µl prefiltrovaného nezmydelniteľného roztoku.

Nechá sa prebehnúť separácia v HPLC pri toku 0,8 ml/min, do úvahy sa neberie prvých päť minút a do 25 ml kónických baniek (bod 3.11) sa zachytávajú alifatické a triterpénové alkoholy odseparované medzi 5. a 10. minútou a steroly a erytrodiol a uvaol odseparované medzi 11. a 25. minútou (poznámka 5).

Separáciu možno monitorovať pomocou detektoru UV pri vlnovej dĺžke 210 mm alebo detektoru indexu lomu (pozri obrázok 6).

Frakcie sa odparia do sucha a pripravia na chromatografickú analýzu.

Poznámka 5: Je potrebné starostlivo kontrolovať tlak čerpadla HPLC, pretože dietyléter môže spôsobiť zvýšenie tlaku, tok sa musí prispôsobiť, aby sa tlak udržal pod kontrolou.

ČASŤ 3

PLYNOVOCHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA FRAKCIÍ ALKOHOLOVÝCH ZLÚČENÍN

1. PREDMET ÚPRAVY

Táto časť poskytuje všeobecné usmernenia týkajúce sa používania kapilárnej plynovej chromatografie na určenie kvalitatívneho a kvantitatívneho zloženia alkoholových zlúčenín izolovaných metódou uvedenou v časti 2.

2. PODSTATA METÓDY

Frakcie získané z nezmydelniteľnej látky pomocou TLC alebo HPLC sa derivatizujú na trimetylsilylétery a analyzujú pomocou kapilárnej plynovej chromatografie s injekčným systémom s deličom a plameňovým ionizačným detektorom.

3. LABORATÓRNA TECHNIKA

Bežné laboratórne vybavenie, a najmä:

3.1. 10 ml skúmavka kónickým dnom a so zabrúsenou sklenenou zátkou.

3.2. Plynový chromatograf vhodný na použitie s kapilárnou kolónou vybavený injekčným systémom s deličom a pozostávajúci z/zo:

3.2.1. termostatickej komory pre kolóny schopnej udržiavať požadovanú teplotu s presnosťou ± 1 °C,

3.2.2. dávkovacej jednotky s nastaviteľnou teplotou so silylovaným skleneným odparovacím prvkom a deličom,

3.2.3. plameňovoionizačného detektora (FID),

3.2.4. systému získavania údajov vhodného na použitie s detektorom FID (bod 3.10.3) s možnosťou manuálnej integrácie.

3.3. Kapilárna kolóna z taveného kremeňa s dĺžkou 20 až 30 m, s vnútorným priemerom 0,25 až 0,32 mm, potiahnutá vrstvou skladajúcou sa z 5 % difenylu a 95 % dimetylpolysiloxánu (SE-52 alebo SE-54 stacionárnou fázou alebo ekvivalentnou fázou) s jednotnou hrúbkou filmu od 0,10 do 0,30 µm.

3.4. Mikrostriekačka s kapacitou 10 µl na plynovú chromatografiu s cementovanou ihlou vhodnou pre injekčný systém s deličom.

4. ČINIDLÁ

4.1. Bezvodný pyridín, chromatografickej kvality.

4.2. Hexametyldisilazán, analytickej kvality.

4.3. Trimetylchlórsilán, analytickej kvality.

4.4. Skúšobné roztoky sterol trimetylsilyléterov. Pripraví sa priamo pred použitím zo sterolov a erytrodiolu získaných z olejov, ktoré ich obsahujú.

4.5. Štandardné roztoky trimetylsilyléterov a alifatických alkoholov od C20 po C28. Môžu sa pripraviť zo zmesí čistých alkoholov priamo pred použitím.

4.6. Nosný plyn: vodík alebo hélium, čistoty vhodnej na plynovú chromatografiu.

4.7. Pomocné plyny: vodík, hélium, dusík a vzduch, čistoty vhodnej na plynovú chromatografiu.

4.8. Silylačné činidlo, pozostávajúce zo zmesi pyridínu/hexametyldisilazánu/trimetylchlórsilánu v pomere 9:3:1 (V/V/V).

4.9. n-hexán, chromatografickej kvality.

5. PRÍPRAVA TRIMETYLSILYLÉTEROV

Do skúmavky (bod 3.1), v ktorej sa nachádza frakcia alkoholovej zlúčeniny, sa pridá silylačné činidlo (bod 4.8) (poznámka 6) v pomere 50 µl na každý miligram alkoholovej zlúčeniny, pričom sa bráni navlhnutiu (poznámka 7).

Poznámka 6: Hotové roztoky sú komerčne dostupné. Dostupné sú takisto iné silylačné činidlá, ako napr. bis-trimetylsilyl trifluóracetamid + 1 % trimetylchlórsilán, ktorý sa musí riediť rovnakým objemom bezvodého pyridínu. Pyridín možno nahradiť rovnakým množstvom acetonitrilu.

Poznámka 7: Slabá opalescencia, ktorá sa prípadne vytvorí, je bežný jav a nespôsobuje žiadnu anomáliu. Vznik bielych vločiek alebo ružového zafarbenia sú znaky prítomnosti vlhkosti alebo znehodnotenia činidla. Ak sa vyskytnú, skúška sa musí zopakovať (jedine, ak sa použil hexametyldisilazán/trimetylchlórsilán).

Skúmavka (bod 3.1) sa zazátkujte a opatrne pretrepáva (bez obracania), až kým sa zlúčeniny úplne nerozpustia. Potom sa skúmavka nechá aspoň 15 minút stáť pri izbovej teplote a následne sa niekoľko minút odstreďuje. Číry roztok je pripravený na plynovochromatografickú analýzu.

6. PLYNOVOCHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA

6.1. Prípravné práce, kondiciovanie kapilárnej kolóny.

Kolóna (bod 3.3) sa upevní do plynového chromatografu tak, že vstupný koniec kolóny sa pripevní k injektoru s deličom a výstupný koniec k detektoru.

Vykoná sa celková kontrola jednotky plynového chromatografu (netesnosti v plynových okruhoch, výkonnosť detektora, výkonnosť deliaceho systému a zapisovača atď.).

Ak sa kolóna používa prvýkrát, odporúča sa jej kondiciovanie: cez samotnú kolónu sa púšťa jemný prúd plynu a následne sa prepne na plynovochromatografickú jednotku a postupne sa zahrieva na teplotu aspoň o 20 °C vyššiu, ako je prevádzková teplota (poznámka 8). Táto teplota sa udržiava aspoň dve hodiny, potom sa jednotka nastaví na prevádzkový režim (upravia sa prietoky plynov a delič, zapáli sa plamienok, pripojí sa počítačový systém, upraví sa teplota kolóny, detektora a injektora atď.) a nakoniec sa zaznamená signál s citlivosťou, ktorá je aspoň dvakrát vyššia ako citlivosť určená pre analýzu. Základná línia musí byť lineárna, bez akýchkoľvek píkov, a nesmie vykazovať žiadne výkyvy (drifty). Negatívny priamočiary drift základnej línie znamená nedokonalú tesnosť kolónových spojov, kým pozitívny drift znamená nedostatočné kondiciovanie kolóny.

Poznámka 8: Teplota kondiciovania musí byť vždy aspoň o 20 °C nižšia, ako je maximálna teplota špecifikovaná pre používanú stacionárnu fázu.

6.2. Prevádzkové podmienky

Optimalizovať teplotný program a tok nosného plynu tak, aby sa získavali chromatogramy podobné zobrazeniam na obrázkoch 3 až 6.

Preskúmali sa a ako užitočné sa zistili tieto parametre:

6.2.1. Alifatické alkoholy

Program pece	180 °C (8 min.) → 260 °C (pri 5 °C/min) → 260 °C (15 min.)
Teplota injektora	280 °C
Teplota detektora	290 °C
Lineárna rýchlosť nosného plynu	hélium (20 až 30 cm/s), vodík (30 až 50 cm/s)
Deliaci pomer	1:50 až 1:100
Objem nástreku	0,5 až 1 µl TMSE roztoku

6.2.2. Sterol a triterpénové dioly

Program pece	260 ± 5 °C izotermický
Teplota injektora	280 – 300 °C
Teplota detektora	280 – 300 °C
Lineárna rýchlosť nosného plynu	hélium (20 až 30 cm/s), vodík (30 až 50 cm/s)
Deliaci pomer	1:50 až 1:100
Objem nástreku	0,5 až 1 µl TMSE roztoku

Tieto podmienky možno upraviť podľa vlastností kolóny a plynového chromatografu tak, aby sa získali chromatogramy spĺňajúce tieto požiadavky:

— retenčný čas alkoholu C26 má byť 18 ± 5 minút.

— pík alkoholu C22 má predstavovať 80 ± 20 % hodnoty celého rozsahu v prípade olivového oleja a 40 ± 20 % hodnoty celého rozsahu v prípade oleja z olivových výliskov.

— retenčný čas píku ß-sitosterolu by mal byť pri 20 ± 5 min.

— pík kampesterolu by mal byť: v prípade olivového oleja (priemerný obsah 3 %) 20 ± 5 % celého rozsahu.

— všetky prítomné steroly sa musia separovať. Okrem toho, že píky musia byť oddelené, musia byť aj úplne rozlíšené, t. j. záznam píku by sa mal vrátiť na základnú líniu pred vykreslením ďalšieho píku. Neúplné rozlíšenie sa však toleruje, pod podmienkou, že pík možno pri relatívnom retenčnom čase 1,02 (sitostanol) kvantifikovať použitím kolmice.

6.3. Postup analýzy

Do 10 µl mikrostriekačky (bod 3.4) sa natiahne 1 µl hexánu, potom sa natiahne 0,5 µl vzduchu a následne 0,5 až 1 µl roztoku vzorky. Piest mikrostriekačky sa vytiahne natoľko, aby sa ihla vyprázdnila. Ihla sa zavedie cez membránu injektora a po jednej až dvoch sekundách sa roztok rýchlo vstrekne a ihla sa približne po piatich sekundách pomaly vytiahne. Namiesto striekačky možno použiť aj automatický dávkovač.

Zaznamenávanie sa uskutočňuje do úplnej eluácie TMSE zodpovedajúcich prítomných alkoholových zlúčenín. Základná línia musí naďalej spĺňať zodpovedajúce prevádzkové podmienky (bod 6.2.1 alebo 6.2.2).

6.4. Identifikácia píku

Identifikácia jednotlivých píkov sa vykoná podľa retenčných časov a porovnaním so zmesou TSME alifatických a triterpénových alkoholov alebo sterolov a triterpénových diolov analyzovanou za rovnakých podmienok. Chromatogram frakcie alifatických a triterpénových alkoholov je na obrázku 3 a zodpovedajúce chromatogramy sterolov a triterpénových diolov na obrázku 2.

Alifatické alkoholy sa eluujú v tomto poradí: C20-ol (V.S.), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol a C28-ol.

Steroly a triterpénové dioly sa eluujú v tomto poradí: cholesterol, brasikasterol, ergosterol, 24-metylén-cholesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ7-kampesterol, Δ5,23-stigmastadienol, klerosterol, β-sistosterol, sitostanol, Δ5-avenasterol, Δ5,24-stigmastadienol, Δ7-stigmastenol, Δ7-avenasterol, erytrodiol a uvaol.

6.5. Kvantitatívne hodnotenie

Plocha píku 1-eikosanolu a alifatických alkoholov C22, C24, C26, C28 sa počíta pomocou systému získavania údajov. Odozvový faktor 1-eikosanolu by sa mal považovať za rovný 1.

Pomocou počítačového systému sa vypočítajú plochy píkov α-cholestanolu, sterolov a triterpénových diolov. Vynechajú sa píky všetkých zlúčenín, ktoré nie sú zahrnuté (ergosterol sa nemusí počítať) medzi zlúčeninami uvedenými v tabuľke 1. Odozvový faktor α-cholestanolu by sa mal považovať za rovný 1.

Koncentrácia každej jednotlivej alkoholovej zlúčeniny vyjadrená v mg/kg tukových látok sa vypočíta takto:

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

kde:

A_x = plocha píku alkoholovej zlúčeniny x vypočítaná počítačovým systémom.

A_s = plocha píku 1-eikosanolu/α-cholestanolu vypočítaná počítačovým systémom.

m_s = hmotnosť dodaného 1-eikosanolu/α-cholestanolu v miligramoch.

m = hmotnosť vzorky použitej pri stanovení v gramoch.

7. VYJADRENIE VÝSLEDKOV

Uvedú sa jednotlivé koncentrácie alifatických a triterpénových alkoholov vyjadrené v mg/kg tukových látok a ich súčet ako ‚obsah alifatického alkoholu spolu'. Celkový obsah je súčet C22, C24, C26 a C28.

Skladba každej jednotlivej alkoholovej zlúčeniny by sa mala vyjadriť na jedno desatinné miesto.

Celková koncentrácia sterolov by sa mala vyjadriť v celých číslach.

Percentuálny obsah jednotlivých sterolov sa vypočíta z pomeru plochy príslušného píku k celkovej ploche píkov sterolov:

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

kde:

A_x = plocha píku sterolu x.

ΣA = celková plocha píkov sterolov.

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

Percentuálny obsah erytrodiolu a uvaolu sa vypočíta:

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

kde:

A_{Er} = plocha píku erytrodiolu vypočítaná počítačovým systémom.

A_{Uv} = plocha píku uvaolu vypočítaná počítačovým systémom.

Σ_{AT} = súčet plôch píkov sterolov + erytrodiolu + uvaolu vypočítaných počítačovým systémom.

Okrem výpočtu relatívneho percentuálneho podielu jednotlivých sterolov a triterpénových diolov a celkovej koncentrácie sterolov sa musí vypočítať aj koncentrácia erytrodiolu a uvaolu a ich súčet v mg/kg tukových látok, a to podľa týchto vzorov:

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

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

kde:

A_{Er} = plocha píku erytrodiolu vypočítaná počítačovým systémom.

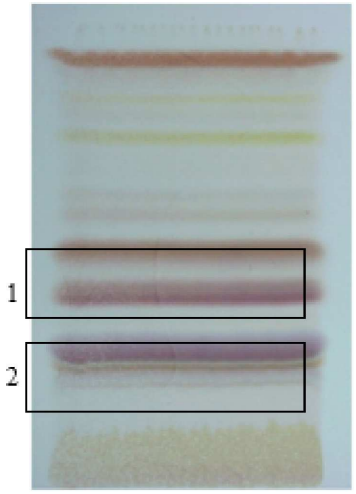
A_{Uv} = plocha píku uvaolu vypočítaná počítačovým systémom.

A_s = plocha píku α-cholestanolu vypočítaná počítačovým systémom.

m_s = hmotnosť α-cholestanolu v miligramoch.

m = hmotnosť vzorky použitej pri stanovení v gramoch.

Dodatok



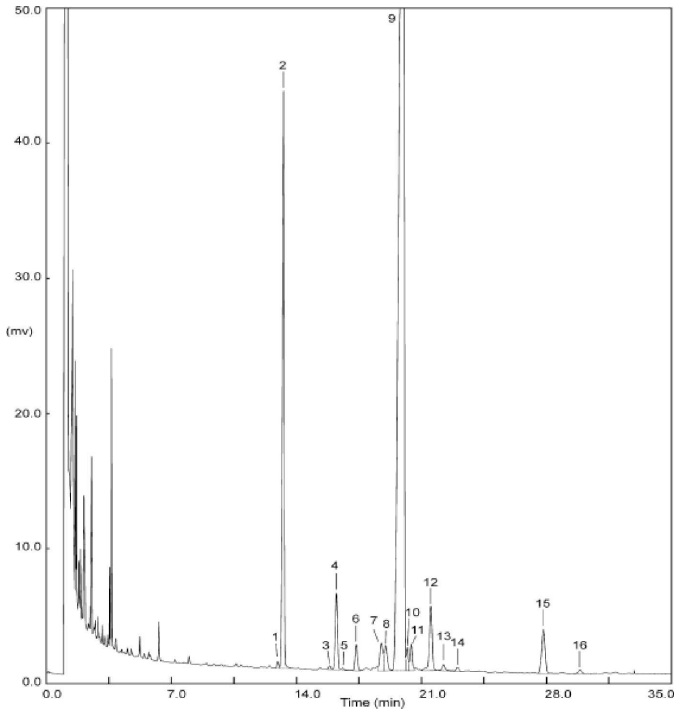
1 Uhľovodíky
2 α-Tokoferol
3 Prenoly
4 Triterpénové alkoholy
5 Alifatické alkoholy
6 Metylsteroly
7 Steroly
8 Triterpénové dioly

Obrázok 1 – TLC nezmydelniteľnej látky z oleja z olivových výliskov eluovanej dvakrát s hexánom:dietyléterom (65:35), vyvinutej so SO4H2 (50 %) a zahriatej. Pásma, ktoré treba zoškrabať, sú označené v obdĺžniku, 1 sú pásma alifatických alkoholov a 2 sterolov a triterpénových diolov.

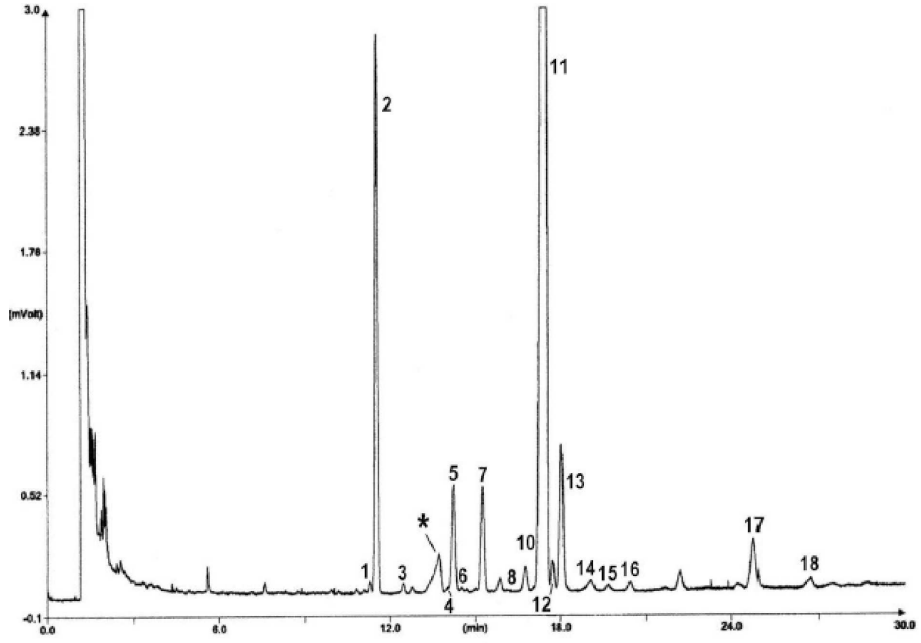
Tabuľka I – Relatívne retenčné časy sterolov

Pík	Identifikácia		Relatívny retenčný čas	
			SE 54 kolóna	SE 52 kolóna
1	Cholesterol	Δ-5-cholestén-3ß-ol	0,67	0,63
2	Cholestanol	5α-cholestan-3ß-ol	0,68	0,64
3	Brasikasterol	[24S]-24-metyl-Δ-5,22-cholestadién-3β-ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S]-24-metyl-Δ-5,7,22 cholestatrién -3β-ol	0,78	0,76
4	24-metylén-cholesterol	24-metylén-Δ-5,24-cholestadién-3ß-o1	0,82	0,80
5	Kampesterol	(24R)-24-metyl-Δ-5-cholestén-3ß-ol	0,83	0,81
6	Kampestanol	(24R)-24-metyl-cholestan-3ß-ol	0,85	0,82
7	Stigmasterol	(24S)-24-etyl-Δ-5,22-cholestadién-3ß-ol	0,88	0,87
8	Δ-7-kampesterol	(24R)-24-metyl-Δ-7-cholestén-3ß-ol	0,93	0,92
9	Δ-5,23-stigmastadienol	(24R,S)-24-etyl-Δ-5,23-cholestadién-3ß-ol	0,95	0,95
10	Klerosterol	(24S)-24-etyl-Δ-5,25-cholestadién-3ß-ol	0,96	0,96

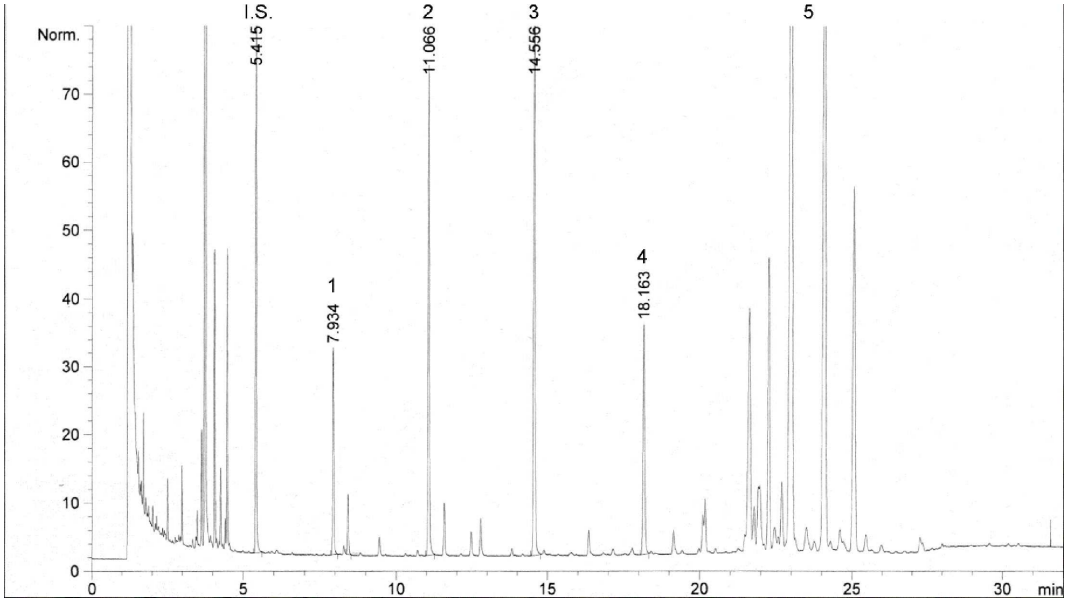
Pík	Identifikácia		Relatívny retenčný čas	
			SE 54 kolóna	SE 52 kolóna
11	ß-sitosterol	(24R)-24-etyl-Δ-5-cholestén-3ß-ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-etyl-cholestan-3ß-ol	1,02	1,02
13	Δ-5-avenasterol	(24Z)-24-etylidén-Δ-cholestén-3ß-ol	1,03	1,03
14	Δ-5,24-stigmastadienol	(24R,S)-24-etyl-Δ-5,24-cholestadién-3ß-ol	1,08	1,08
15	Δ-7-stigmastenol	(24R,S)-24-etyl-Δ-7-cholestén-3ß-ol	1,12	1,12
16	Δ-7-avenasterol	(24Z)-24-etylidén-Δ-7-cholestén-3ß-ol	1,16	1,16
17	Erytrodiol	5α-oleán-12-én-3β,28-diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ12-ursen-3β,28-diol	1,52	1,52



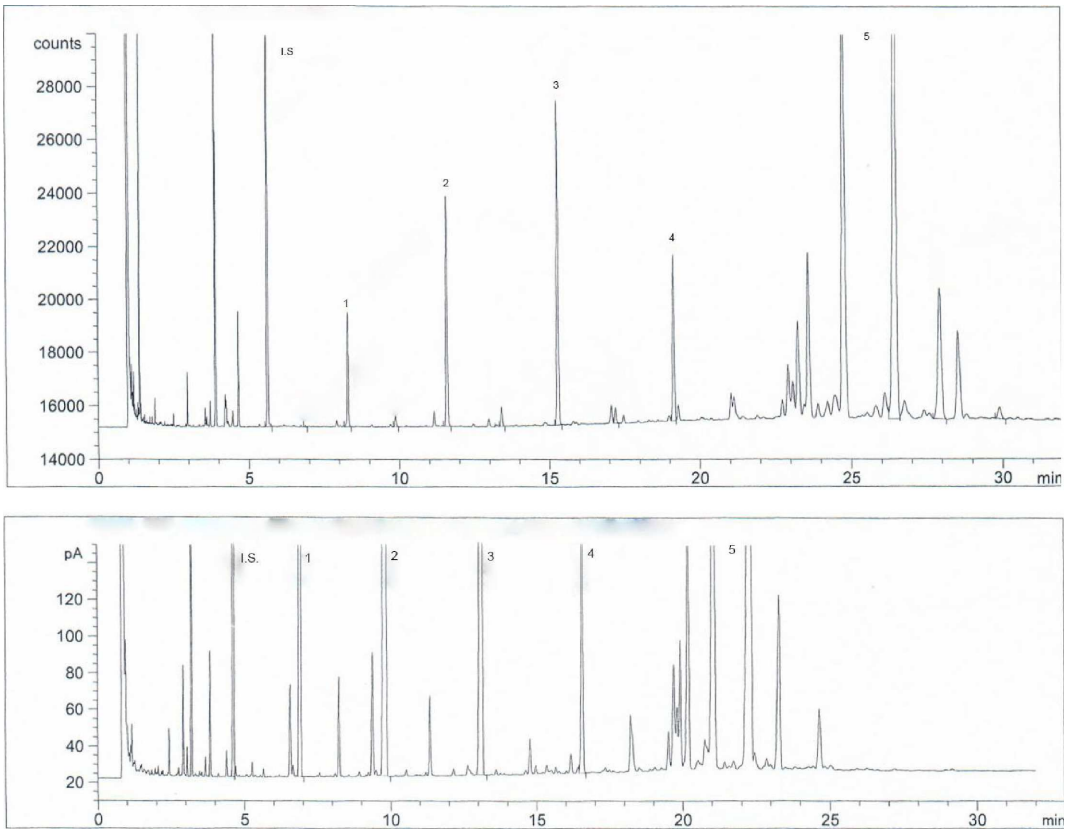
Obrázok 2 – GC-FID chromatografický profil sterolu a triterpénových diolov rafinovaného olivového oleja. (1) Cholesterol, (2) α-cholestanol (V.S.), (3) 24-metylén-cholesterol, (4) kampesterol, (5) kampestanol, (6) stigmasterol, (7) Δ5,23-stigmastadienol, (8) klerosterol, (9) β-sitosterol, (10) sitostanol, (11) Δ5-avenasterol, (12) Δ5,24-stigmastadienol, (13) Δ7-stigmastenol, (14) Δ7-avenasterol, (15) erytrodiol, (16) uvaol.



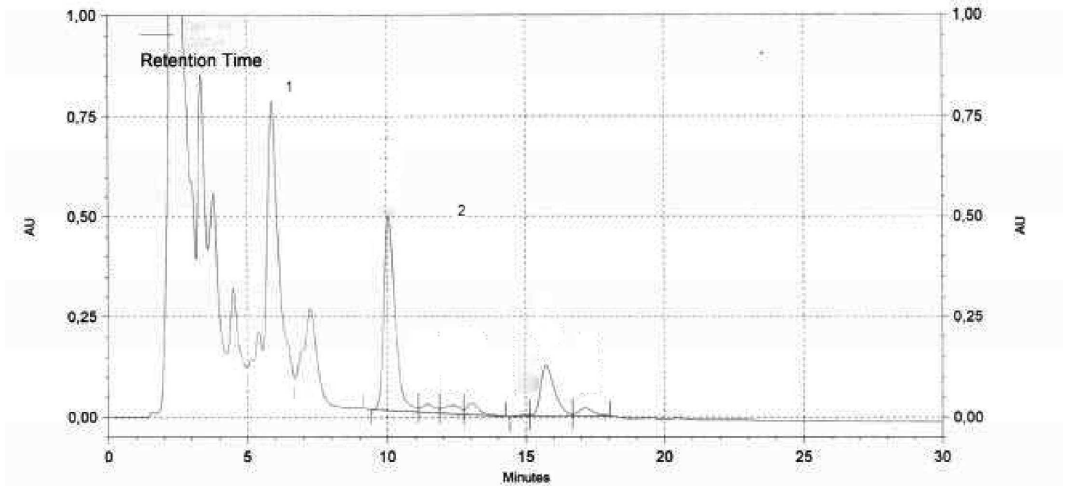
Obrázok 3 – GC-FID chromatografický profil sterolu triterpénových diolov lampantového olivového oleja. (1) Cholesterol, (2) α-cholestanol, (3) brasikasterol, (4) 24-metylén-cholesterol, (5) kampesterol, (6) kampestanol, (7) stigmasterol, (8) Δ7-kampesterol, (9) Δ5,23-stigmastadienol, (10) klerosterol, (11) β-sitosterol, (12) sitostanol, (13) Δ5-avenasterol, (14) Δ5,24-stigmastadienol, (15) Δ7-stigmastenol, (16) Δ7-avenasterol, (17) erytrodiol, (18) uvaol.



Obrázok 4 – GC-FID chromatografický profil alifatických alkoholov a triterpénových alkoholov olivového oleja. (V.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) triterpenové alkoholy.



Obrázok 5 – GC-FID chromatografický profil alifatických alkoholov a triterpénových alkoholov rafinovaného olivového oleja a olivového oleja po druhom odstredení. (V.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) triterpenové alkoholy.



Obrázok 6 – HPLC Chromatogram nezmydelniteľných látok olivového oleja separovaných HPLC s použitím detektoru UV. (1) Alifatické a triterpénové alkoholy, (2) Steroly a triterpénové dioly.“