IZVEDBENA UREDBA KOMISIJE (EU) 2019/1604

z dne 27. septembra 2019

o spremembi Uredbe (EGS) št. 2568/91 o značilnostih oljčnega olja in olja iz oljčnih tropin ter o ustreznih analiznih metodah

EVROPSKA KOMISIJA JE –

ob upoštevanju Pogodbe o delovanju Evropske unije,

ob upoštevanju Uredbe (EU) št. 1308/2013 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 17. decembra 2013 o vzpostavitvi skupne ureditve trgov kmetijskih proizvodov in razveljavitvi uredb Sveta (EGS) št. 922/72, (EGS) št. 234/79, (ES) št. 1037/2001 in (ES) št. 1234/2007 ([1]) ter zlasti točke (d) prvega odstavka člena 91 Uredbe,

ob upoštevanju naslednjega:

(1) Uredba Komisije (EGS) št. 2568/91 ([2]) opredeljuje fizikalno-kemijske in organoleptične značilnosti oljčnega olja in olja iz oljčnih tropin ter določa metode za ocenjevanje navedenih značilnosti.

(2) Metode in mejne vrednosti za značilnosti olj se redno posodabljajo na podlagi mnenja strokovnjakov za kemijo in v skladu z opravljenim delom v Mednarodnem svetu za oljke (IOC).

(3) Za zagotovitev izvajanja najnovejših mednarodnih standardov, ki jih je določil IOC, na ravni Unije bi bilo treba posodobiti nekatere analizne metode iz Uredbe (EGS) št. 2568/91.

(4) Trgovinski standard IOC je bil spremenjen glede izražanja mejne vrednosti prostih kislin, peroksidnega števila, organoleptične ocene (mediana napake in mediana lastnosti sadežno) ter razlike med ECN42 (HPLC) in ECN42 (teoretični izračun), da bi se uskladil z vrednostmi natančnosti analizne metode.

(5) Po členu 2a(5) Uredbe (EGS) št. 2568/91 morajo države članice preveriti, ali je vzorec oljčnega olja skladen z deklarirano kategorijo, tako da preverijo značilnosti iz Priloge I k navedeni uredbi po katerem koli vrstnem redu ali po vrstnem redu iz drevesa odločanja iz Priloge Ib k Uredbi.

(6) Glede na nedavni razvoj dogodkov je primerno ustrezno posodobiti tabele iz Priloge Ib k Uredbi (EGS) št. 2568/91 in njen dodatek. Prav tako se zdi, da je glede na vsebino Priloge Ib izraz „diagram poteka“ primernejši od izraza „drevo odločanja“.

(7) Točka 9.4 Priloge XII k Uredbi (EGS) št. 2568/91 opredeljuje mediano napak kot mediano napake, ki se zazna z največjo intenzivnostjo. Za ponovljene ocene in zato, ker morajo različne ocenjevalne komisije oceniti skladnost olja, bi bilo treba pojasniti, da je odločitev o skladnosti značilnosti olja z deklarirano kategorijo izključno povezana z vrednostjo mediane glavne napake, ne glede na njeno naravo.

(8) Uredbo (EGS) št. 2568/91 bi bilo zato treba ustrezno spremeniti.

(9) Ukrepi iz te uredbe so v skladu z mnenjem Odbora za skupno ureditev kmetijskih trgov –

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

Člen 1

Uredba (EGS) št. 2568/91 se spremeni:

(1) člen 2 se spremeni:

(a) točka (l) odstavka (1) se nadomesti z naslednjim:

„(l) za določanje sestave in vsebnosti sterolov in za določanje alkoholnih spojin s kapilarno plinsko kromatografijo po metodi, določeni v Prilogi XIX“;

([1]) UL L 347, 20.12.2013, str. 671.

([2]) Uredba Komisije (EGS) št. 2568/91 z dne 11. julija 1991 o značilnostih oljčnega olja in olja iz oljčnih tropin ter o ustreznih analiznih metodah (UL L 248, 5.9.1991, str. 1).

(b) tretji pododstavek odstavka (2) se nadomesti z naslednjim:

„Če ocenjevalna komisija ne potrdi deklarirane kategorije v zvezi z organoleptičnimi značilnostmi, nacionalni organi ali njihovi zastopniki na zahtevo zainteresirane strani nemudoma opravijo dve ponovljeni oceni, pri čemer ju izvedejo druge odobrene ocenjevalne komisije. Vsaj ena od ocenjevalnih komisij je ocenjevalna komisija, ki jo odobri zadevna država članica proizvajalka. Zadevne značilnosti se štejejo za skladne z deklariranimi značilnostmi, če obe ponovljeni oceni potrdita deklarirano razvrstitev. V nasprotnem primeru se ne glede na vrsto napak, ugotovljenih med ponovljenimi ocenami, razvrstitev deklarira kot neskladna z značilnostmi, stroške ponovljenih ocen pa krije zainteresirana stran.“;

(2) točka (b) člena 2a(5) se nadomesti z naslednjim:

„(b) z upoštevanjem vrstnega reda iz Priloge Ib o diagramu poteka, dokler se ne sprejme ena od odločitev iz diagrama poteka.“;

(3) tabela v „PRILOGE Vsebina“ se nadomesti s tabelo iz Priloge I k tej uredbi;

(4) Priloga I se nadomesti z besedilom iz Priloge II k tej uredbi;

(5) točka 2.1 Priloge Ia se nadomesti z naslednjim:

„2.1 Vsak primarni vzorec je treba razdeliti na laboratorijske vzorce v skladu s točko 2.5 standarda EN ISO 5555 in analizirati po vrstnem redu iz diagrama poteka iz Priloge Ib ali po kakršnem koli drugem naključnem vrstnem redu.“;

(6) Priloga Ib se nadomesti z besedilom iz Priloge III k tej uredbi;

(7) Priloga V se črta;

(8) točka 4.2 Priloge VII se nadomesti z naslednjim:

„4.2 N-heksan (kromatografske stopnje). Heksan se lahko nadomesti z izo-oktanom (2,2,4-trimetilpentan kromatografske stopnje) pod pogojem, da se dosežejo primerljive vrednosti natančnosti.“;

(9) Priloga XII se spremeni v skladu s Prilogo IV k tej uredbi;

(10) Priloga XVII se spremeni v skladu s Prilogo V k tej uredbi;

(11) Priloga XVIII se spremeni v skladu s Prilogo VI k tej uredbi;

(12) Priloga XIX se nadomesti z besedilom iz Priloge VII k tej uredbi;

(13) točka 4.2 Priloge XX se nadomesti z naslednjim:

„4.2 N-heksan, kromatografske stopnje ali stopnje ostanka. Heksan se lahko nadomesti z izo-oktanom (2,2,4-trimetilpentan kromatografske stopnje) pod pogojem, da se dosežejo primerljive vrednosti natančnosti. Topila z višjim vreliščem kot n-heksan imajo daljši čas odparevanja, vendar imajo zaradi toksičnosti heksana prednost. Čistost je treba preveriti; nadzoruje se lahko na primer ostanek po izparevanju 100 ml topila.

OPOZORILO – Hlapi se lahko vnamejo. Ne približujte virom toplote, iskram ali neposrednemu ognju. Prepričajte se, da so steklenice vedno dobro zaprte. Med uporabo zagotovite ustrezno prezračevanje. Preprečiti je treba zbiranje hlapov in odstraniti vsa možna tveganja za izbruh ognja, ki jih povzročajo na primer grelniki ali električni aparati, ki niso proizvedeni iz nevnetljivih materialov. Škodljivi pri vdihavanju, ker lahko poškodujejo živčne celice. Ne vdihavajte hlapov. Če je potrebno, za dihanje uporabite ustrezen pripomoček. Preprečite stik z očmi ali poškodovano kožo.

Izo-oktan je vnetljiva tekočina in je nevaren za nastanek požara. Meje eksplozivnosti v zraku znašajo od 1,1 % do 6,0 % (volumski odstotek). Strupen je ob zaužitju in vdihavanju. Pri delu s tem topilom uporabljajte ventilator v dobrem obratovalnem stanju.“.

Člen 2

Ta uredba začne veljati dvajseti dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

Ta uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

V Bruslju, 27. septembra 2019

Za Komisijo
Predsednik
Jean-Claude JUNCKER

PRILOGA I

„*PRILOGE*

POVZETEK

Priloga I	Značilnosti oljčnega olja
Priloga Ia	Vzorčenje oljčnega olja ali olja iz oljčnih tropin, dostavljenega v izvirnem pakiranju
Priloga Ib	Diagram poteka za preverjanje, ali je vzorec oljčnega olja v skladu z deklarirano kategorijo
Priloga II	Določanje prostih maščobnih kislin, metoda v hladnem
Priloga III	Določanje peroksidnega števila
Priloga IV	Določanje vsebnosti voskov s kapilarno kolonsko plinsko kromatografijo
Priloga VII	Določanje deleža 2-gliceril monopalmitata
Priloga IX	Spektrofotometrično merjenje v UV področju
Priloga X	Določanje metilnih estrov maščobnih kislin s plinsko kromatografijo
Priloga XI	Določanje hlapnih halogeniranih topil v oljčnem olju
Priloga XII	Metoda mednarodnega sveta za oljke za organoleptično ocenjevanje deviškega oljčnega olja
Priloga XV	Vsebnost olja v oljčnih tropinah
Priloga XVI	Določanje jodnega števila
Priloga XVII	Metoda za določanje stigmastadienov v rastlinskih oljih
Priloga XVIII	Določanje razlike med dejansko in teoretično vsebnostjo triacilglicerolov z ekvivalentnim ogljikovim številom (ECN) 42
Priloga XIX	Določanje sestave in vsebnosti sterola ter alkoholnih spojin s kapilarno plinsko kromatografijo
Priloga XX	Metoda za določanje vsebnosti voskov, metilnih estrov maščobnih kislin in etilnih estrov maščobnih kislin s kapilarno plinsko kromatografijo
Priloga XXI	Rezultati preverjanj skladnosti oljčnega olja iz člena 8(2)“

PRILOGA II

„PRILOGA I

ZNAČILNOSTI OLJČNEGA OLJA

Značilnosti kakovosti

Kategorija	Vsebnost kislin (%) (*)	Peroksidno število (mEq O_2/kg)	K_{232}	K_{268} ali K_{270}	Delta-K	Organoleptična ocena		Etilni estri maščobnih kislin [mg/kg]
						Mediana napake (Md) (*)	Mediana sadežnosti (Mf)	
1. Ekstra deviško oljčno olje	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Deviško oljčno olje	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Lampantno oljčno olje	> 2,0	—	—	—	—	Md> 3,5 (1)	—	—
4. Rafinirano oljčno olje	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Oljčno olje, sestavljeno iz rafiniranih oljčnih olj in deviških oljčnih olj	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Surovo olje iz oljčnih tropin	—	—	—	—	—		—	—
7. Rafinirano olje iz oljčnih tropin	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Olje iz oljčnih tropin	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

(1) Mediana napake je lahko manjša ali enaka 3,5, kadar je mediana sadežnosti enaka 0,0.

Značilnosti čistosti

Kategorija	Sestava maščobnih kislin [1]						Vsota transizomerov oleinske kisline (%)	Vsota transizomerov linolne in linolenske kisline (%)	Stigmastadieni (mg/kg) [2]	Razlika: ECN42 (HPLC) in ECN42 (teoretični izračun)	2-gliceril monopalmitat (%)
	Miristinska (%)	Linolenska (%)	Arahidonska (%)	Eikozanojska (%)	Behenska (%)	Lignocerinska (%)					
1. Ekstra deviško oljčno olje	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9, če je skupni % palmitinske kisline ≤ 14,00 % ≤ 1,0, če je skupni % palmitinske kisline > 14,00 %
2. Deviško oljčno olje	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9, če je skupni % palmitinske kisline ≤ 14,00 % ≤ 1,0, če je skupni % palmitinske kisline > 14,00 %
3. Lampantno oljčno olje	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ |0,30|	≤ 0,9, če je skupni % palmitinske kisline ≤ 14,00 % ≤ 1,1, če je skupni % palmitinske kisline > 14,00 %
4. Rafinirano oljčno olje	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9, če je skupni % palmitinske kisline ≤ 14,00 % ≤ 1,1, če je skupni % palmitinske kisline > 14,00 %
5. Oljčno olje, sestavljeno iz rafiniranih oljčnih olj in deviških oljčnih olj	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9, če je skupni % palmitinske kisline ≤ 14,00 % ≤ 1,0, če je skupni % palmitinske kisline > 14,00 %
6. Surovo olje iz oljčnih tropin	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ |0,60|	≤ 1,4
7. Rafinirano olje iz oljčnih tropin	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,4
8. Olje iz oljčnih tropin	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,2

[1] Vsebnost drugih maščobnih kislin (%): palmitinske: 7,50–20,00; palmitoleinske: 0,30–3,50; heptadekanojske: ≤ 0,40; heptadekanojske ≤ 0,60; stearinske: 0,50–5,00; oleinske: 55,00–83,00; linolne: 2,50–21,00.

[2] Vsota izomerov, ki jih je mogoče (ali ne) ločiti s kapilarno kolono.

Kategorija	Sestava sterolov						Steroli skupaj [mg/kg]	Eritrodiol in uvaol (%) (**)	Voski (mg/kg) (**)
	Holesterol (%)	Brasikasterol (%)	Kampesterol (1) (%)	Stigmasterol (%)	Navidezni β-sitosterol (2) (%)	Delta-7-stigmastenol (1) (%)			
1. Ekstra deviško oljčno olje	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Deviško oljčno olje	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Lampantno oljčno olje	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (3)	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 300$ (3)
4. Rafinirano oljčno olje	≤ 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. Oljčno olje, sestavljeno iz rafiniranih oljčnih olj in deviških oljčnih olj	≤ 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. Surovo olje iz oljčnih tropin	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (4)	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ (4)
7. Rafinirano olje iz oljčnih tropin	≤ 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. Olje iz oljčnih tropin	≤ 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) Glej Dodatek k tej prilogi.

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

(3) Olja z vsebnostjo voskov med 300 mg/kg in 350 mg/kg se uvrščajo med lampantna oljčna olja, če je skupna vsebnost alifatskih alkoholov nižja ali enaka 350 mg/kg ali je vsebnost eritrodiola in uvaola nižja ali enaka 3,5 %.

(4) Olja z vsebnostjo voskov med 300 mg/kg in 350 mg/kg se uvrščajo med surova olja iz oljčnih tropin, če je skupna vsebnost alifatskih alkoholov višja od 350 mg/kg ter je vsebnost eritrodiola in uvaola višja od 3,5 %.

Opombe:

(a) Rezultate analiz je treba navesti na enako število decimalnih mest natančno, kot je določeno za posamezno značilnost. Zadnjo številko v številki je treba povečati za ena, če je naslednja številka večja od 4.

(b) Če samo ena značilnost ni skladna z navedenimi vrednostmi, se lahko olje razvrsti v drugo kategorijo ali se označi kot neskladno za namene te uredbe.

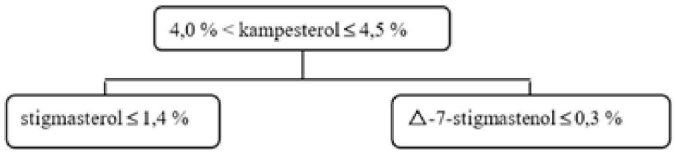
(c) Za lampantno oljčno olje sta lahko obe značilnosti kakovosti, označeni z zvezdico (*), hkrati različni od mejnih vrednosti, določenih za navedeno kategorijo.

(d) Značilnosti, označene z dvema zvezdicama (**), pomenijo, da sta za surovo olje iz oljčnih tropin lahko obe ustrezni mejni vrednosti hkrati različni od navedenih vrednosti. Za olje iz oljčnih tropin in rafinirano olje iz oljčnih tropin se lahko ena od ustreznih mejnih vrednosti razlikuje od navedenih vrednosti.

Dodatek

Drevesi odločanja

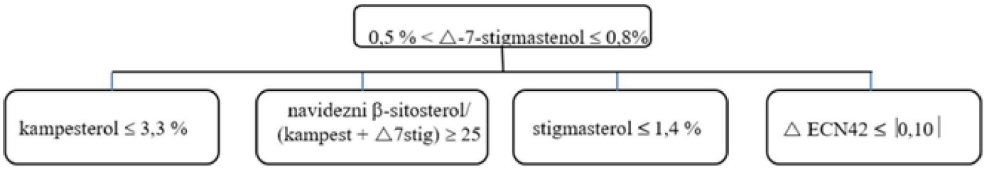
Drevo odločanja za vsebnost **kampesterola** v deviških in ekstra deviških oljčnih oljih:



Drugi parametri so skladni z mejnimi vrednostmi, določenimi v tej uredbi.

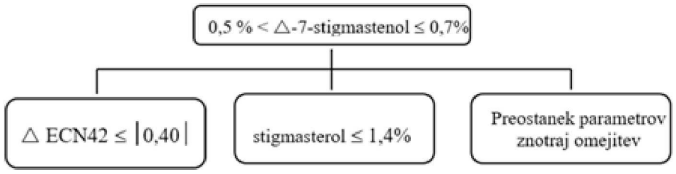
Drevo odločanja za vsebnost **delta-7-stigmastenola** v:

— ekstra deviških in deviških oljčnih oljih



Drugi parametri so skladni z mejnimi vrednostmi, določenimi v tej uredbi.

— oljih iz oljčnih tropin (surovih in rafiniranih)



Drugi parametri so skladni z mejnimi vrednostmi, določenimi v tej uredbi.“

PRILOGA III

„PRILOGA Ib

DIAGRAM POTEKA ZA PREVERJANJE, ALI JE VZOREC OLJČNEGA OLJA V SKLADU Z DEKLARIRANO KATEGORIJO

Splošna tabela

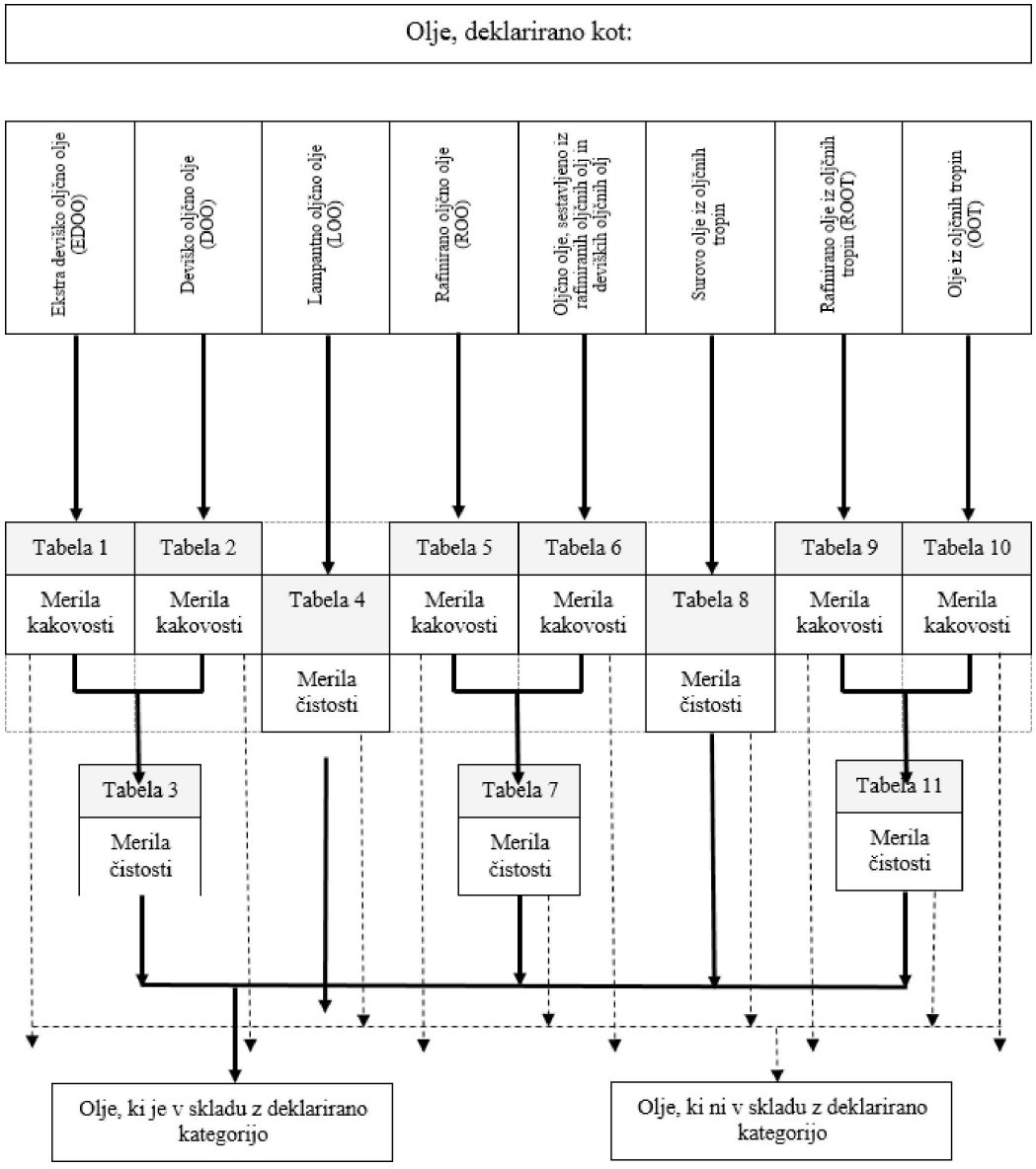


Tabela 1 – Ekstra deviško oljčno olje (merila kakovosti)

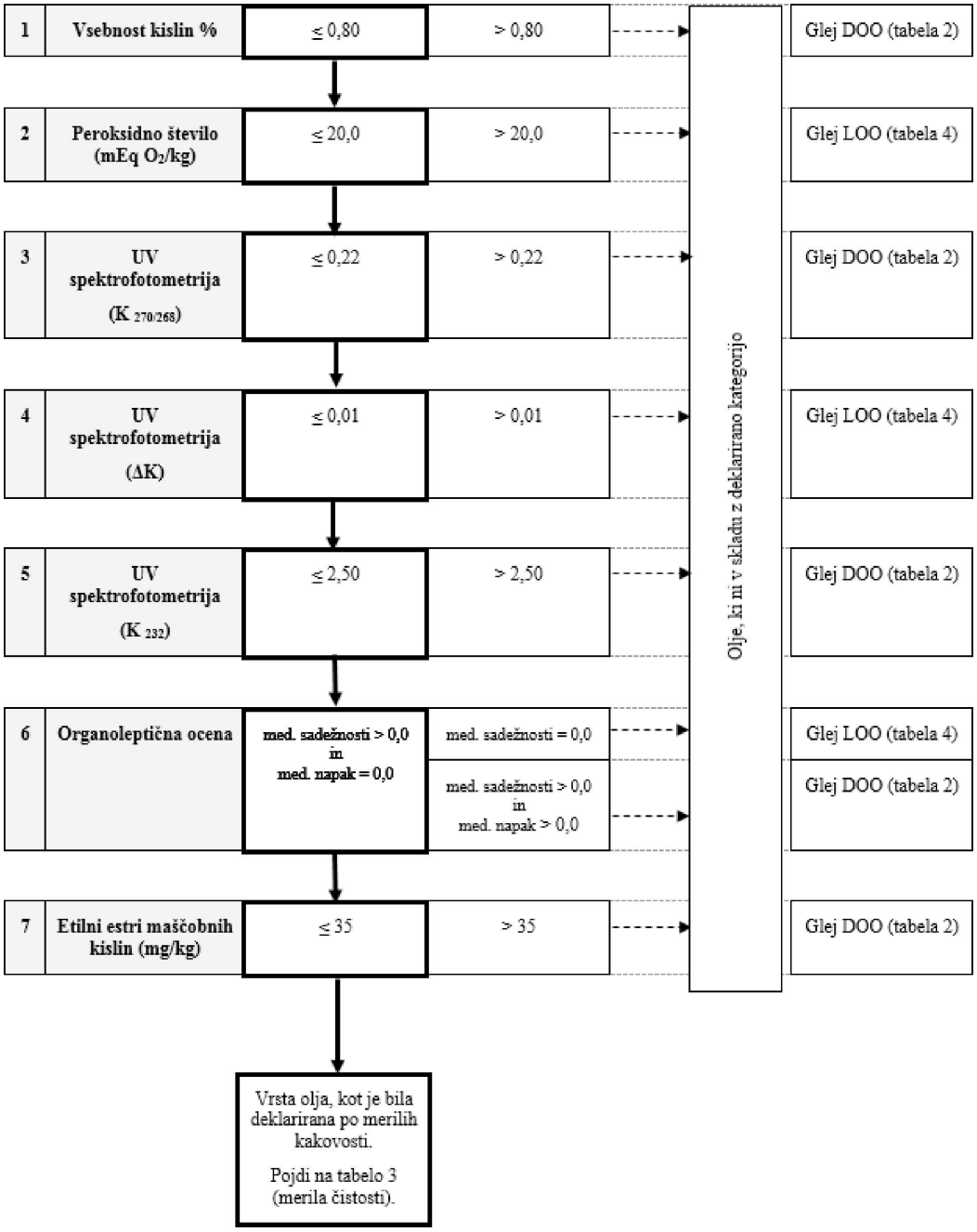


Tabela 2 – Deviško oljčno olje (merila kakovosti)

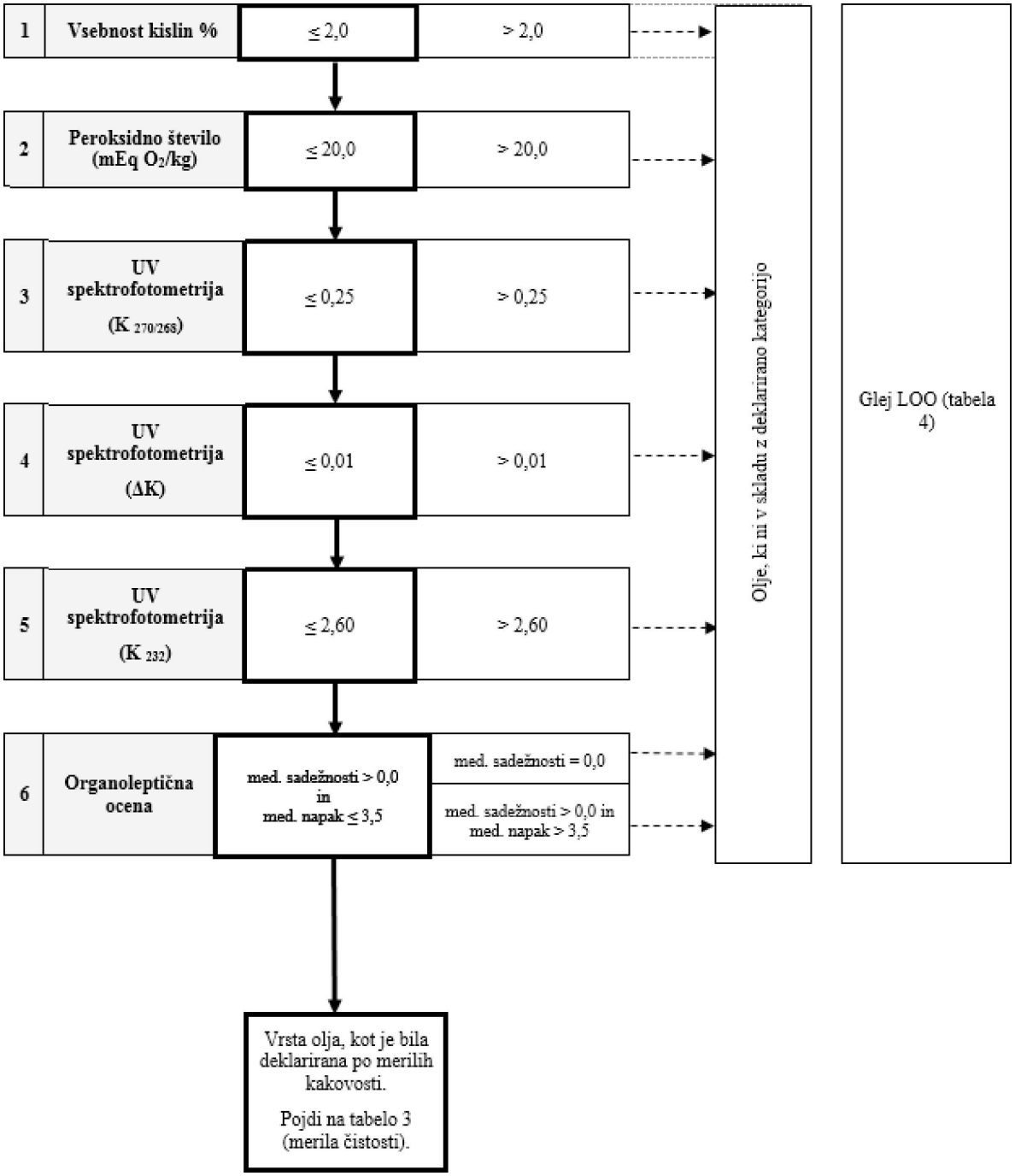


Tabela 3 – Ekstra deviško oljčno olje in deviško oljčno olje (merila čistosti)

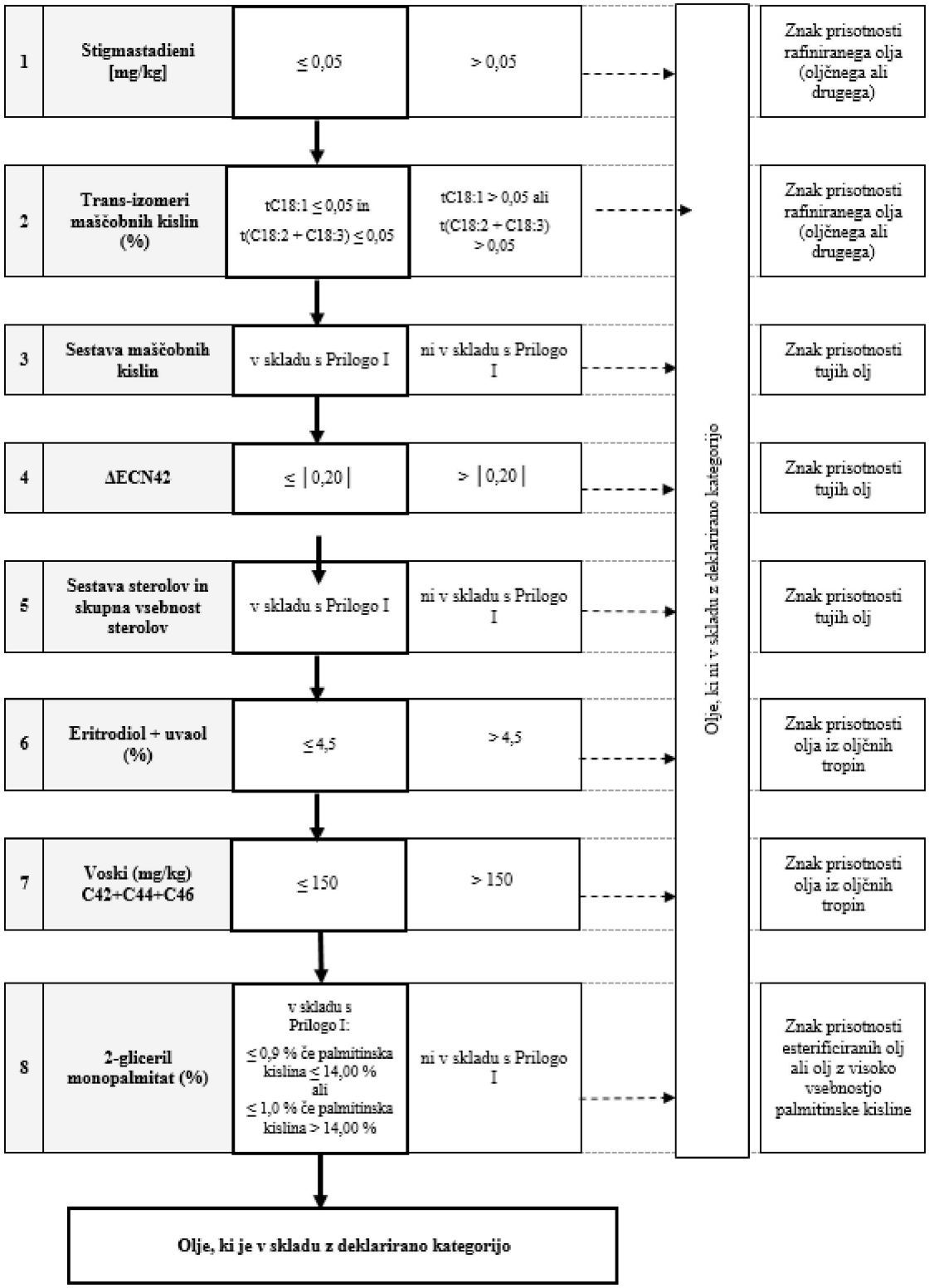


Tabela 4 – Lampantno oljčno olje (merila čistosti)

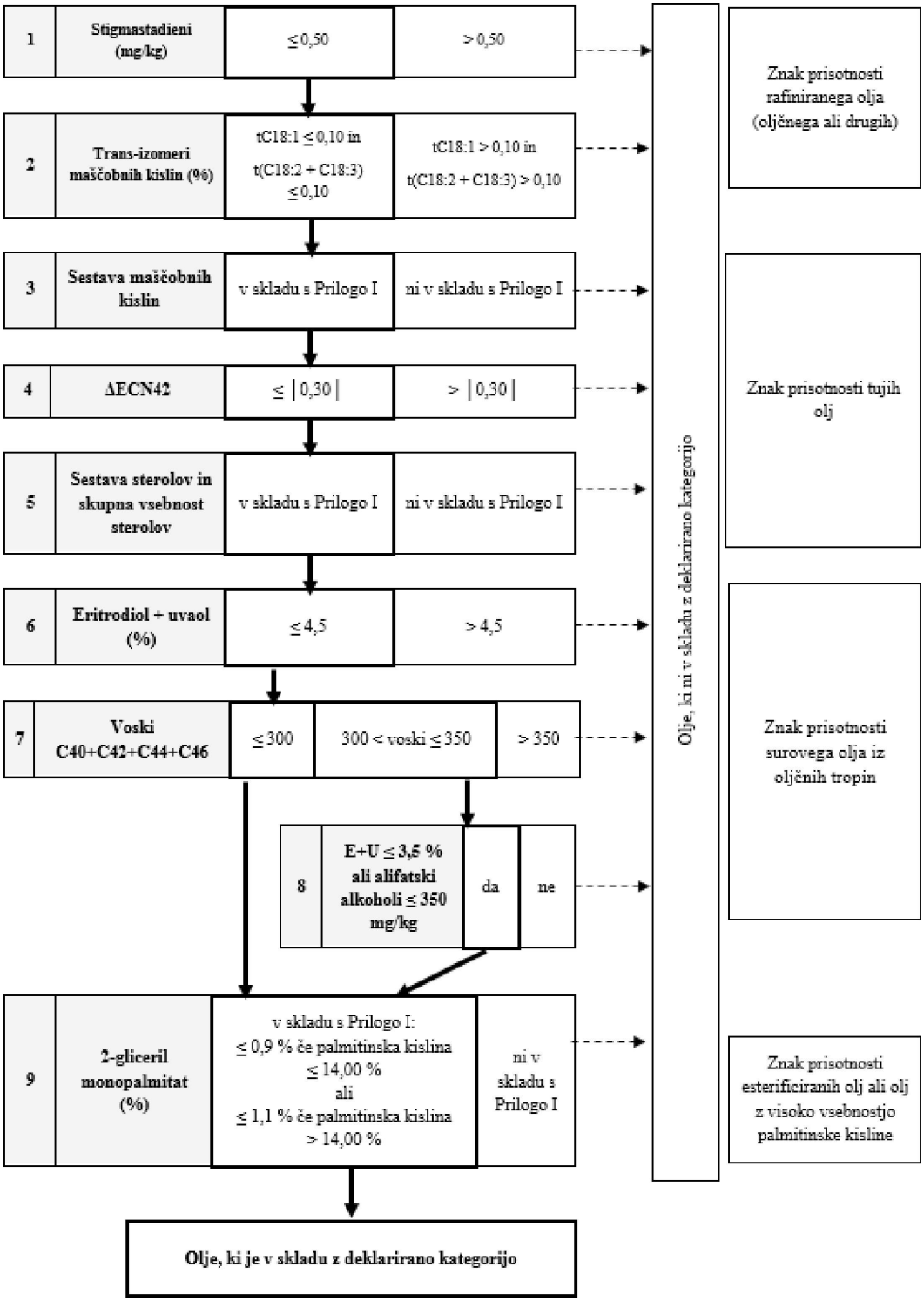


Tabela 5 – Rafinirano oljčno olje (merila kakovosti)

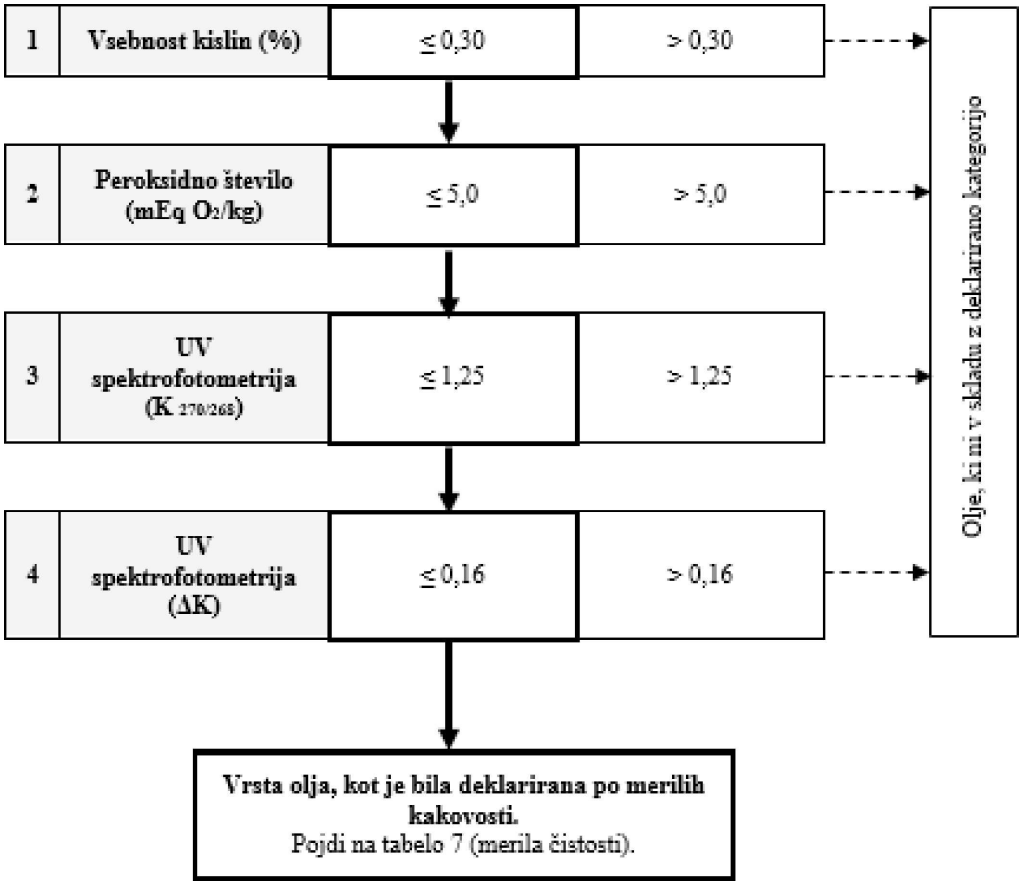


Tabela 6 – Oljčno olje (sestavljeno iz rafiniranega oljčnega olja in deviških oljčnih olj) (merila kakovosti)

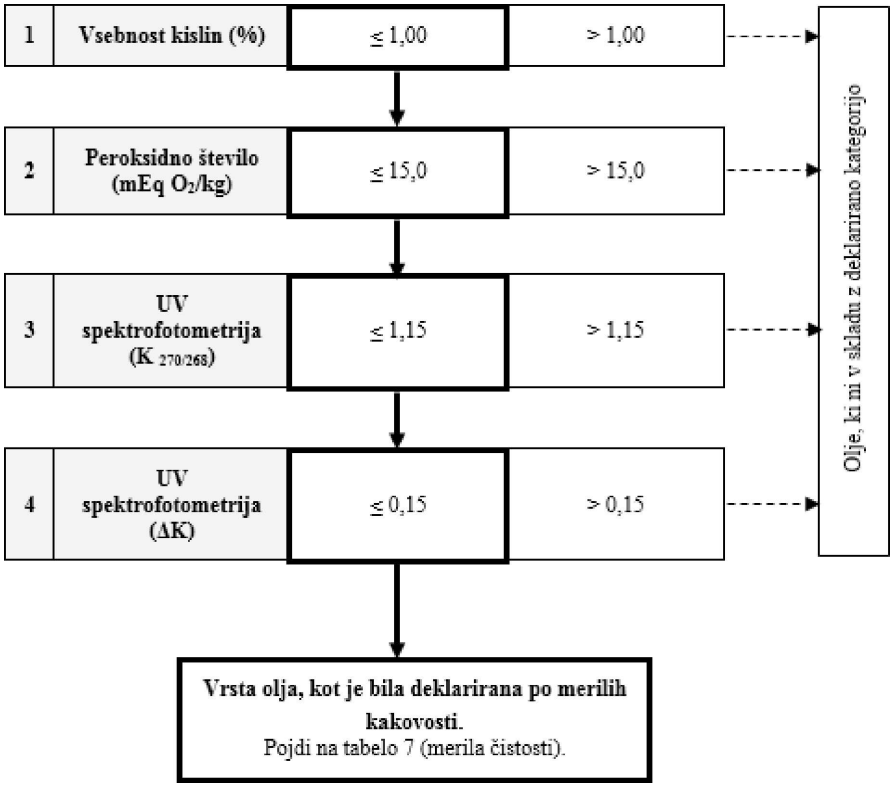


Tabela 7 – Rafinirano oljčno olje in oljčno olje, sestavljeno iz rafiniranega oljčnega olja in deviških oljčnih olj (merila čistosti)

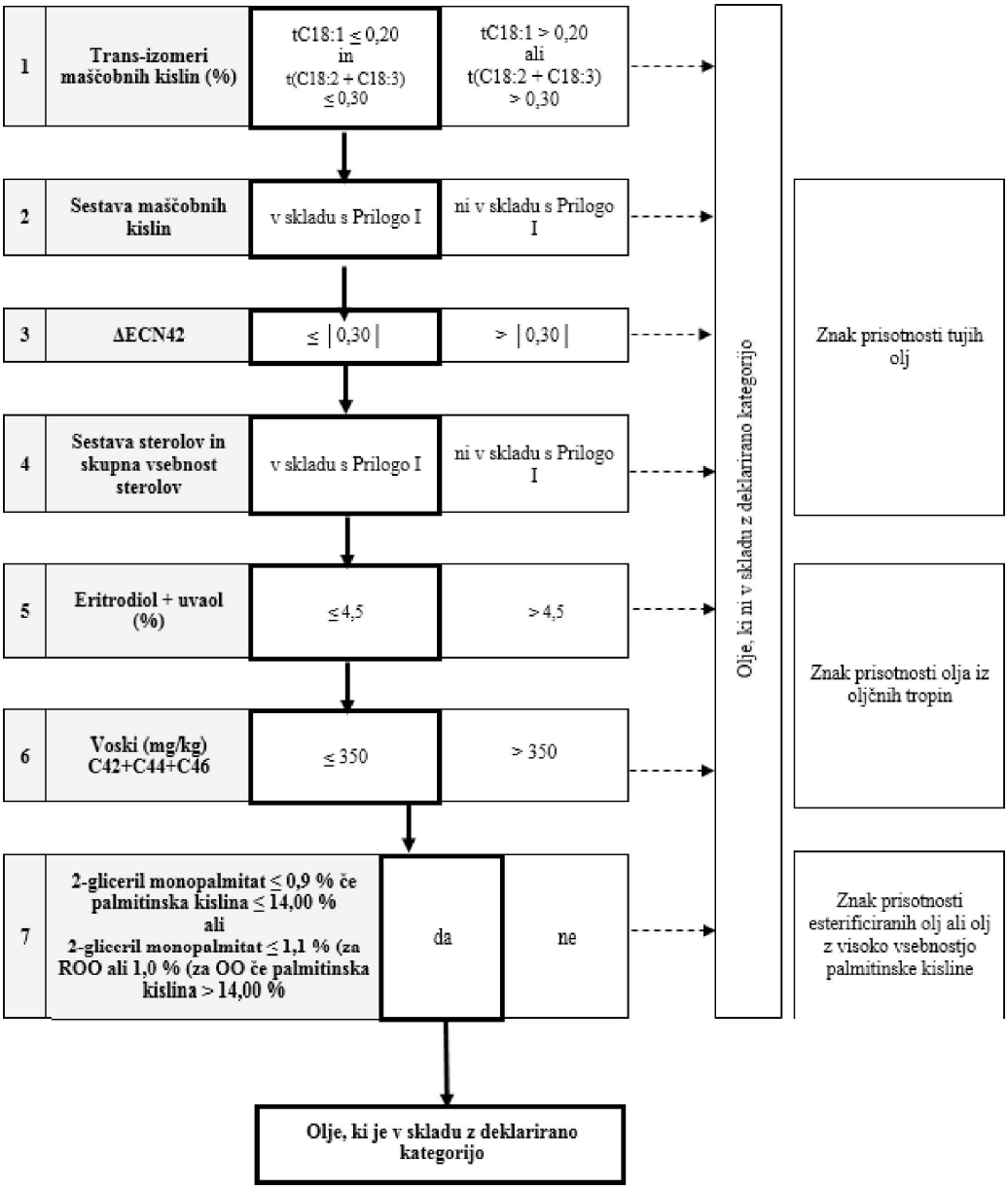


Tabela 8 – Surovo olje iz oljčnih tropin (merila čistosti)

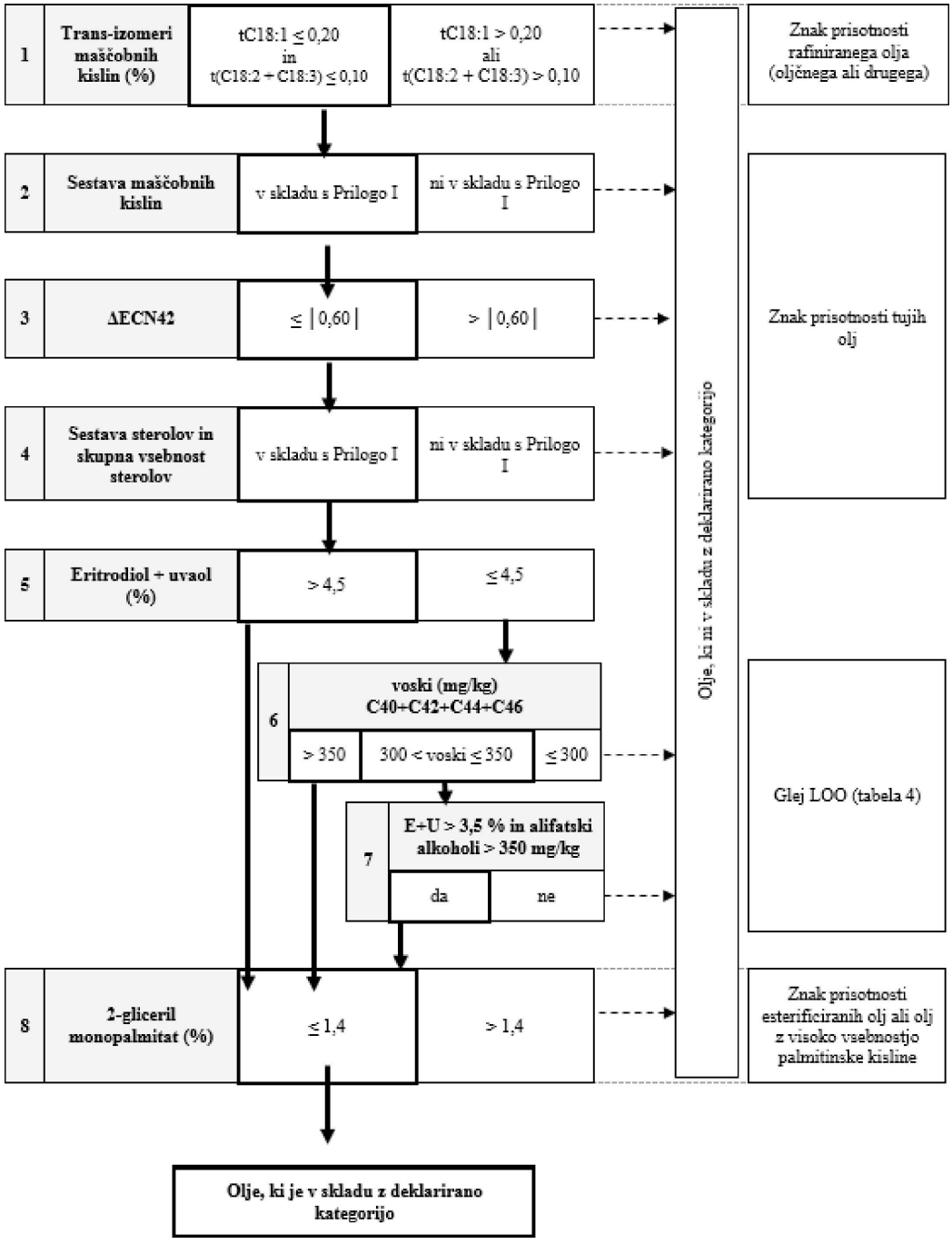


Tabela 9 – Rafinirano olje iz oljčnih tropin – Merila kakovosti

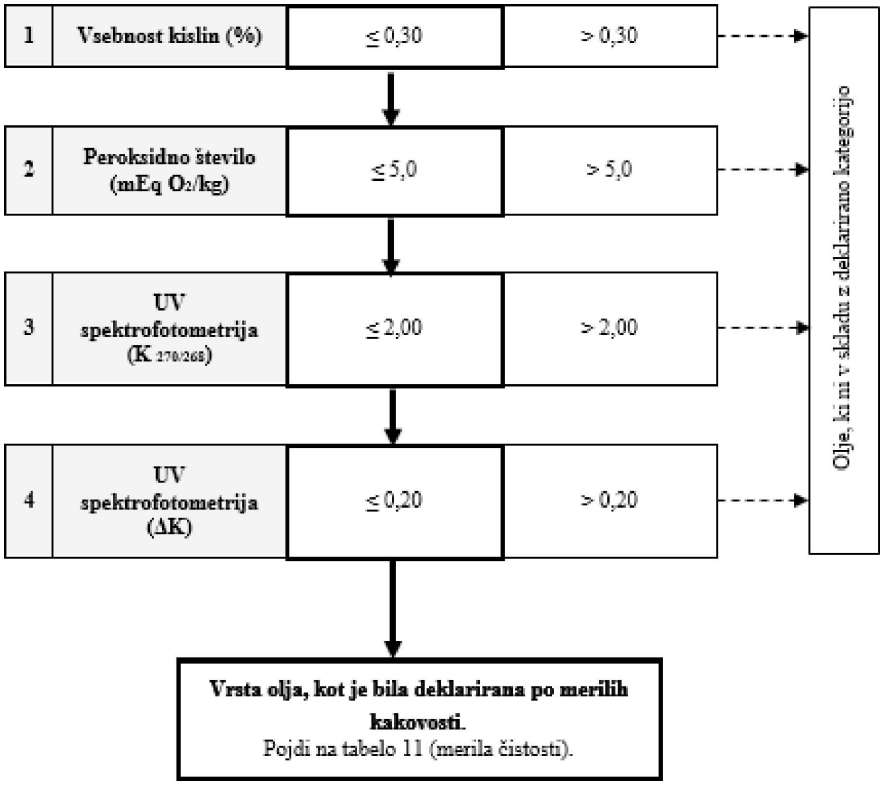


Tabela 10 – Olje iz oljčnih tropin (merila kakovosti)

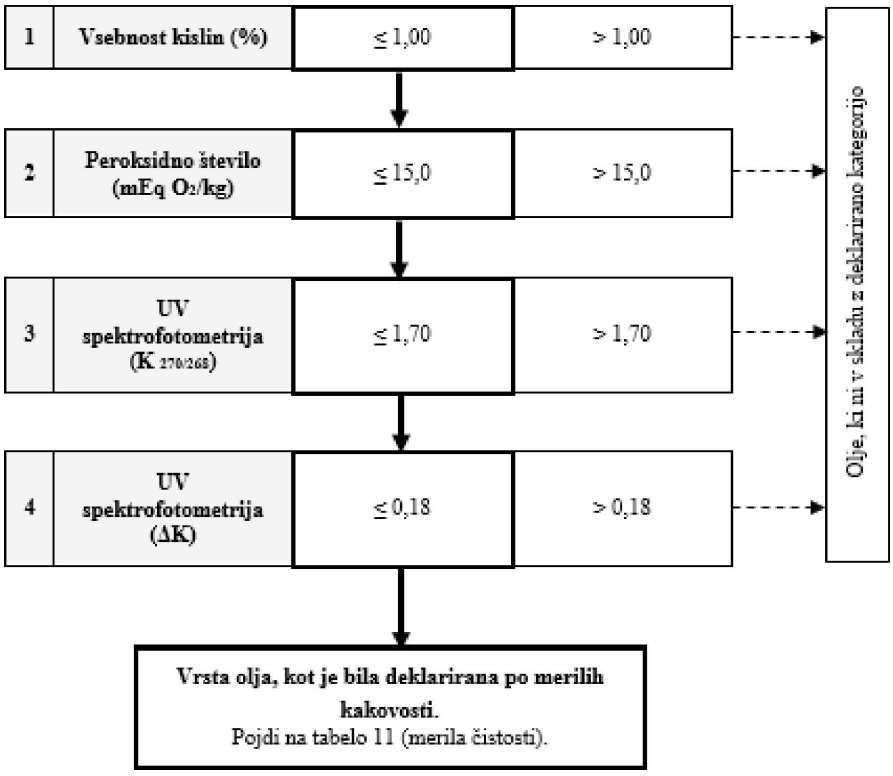
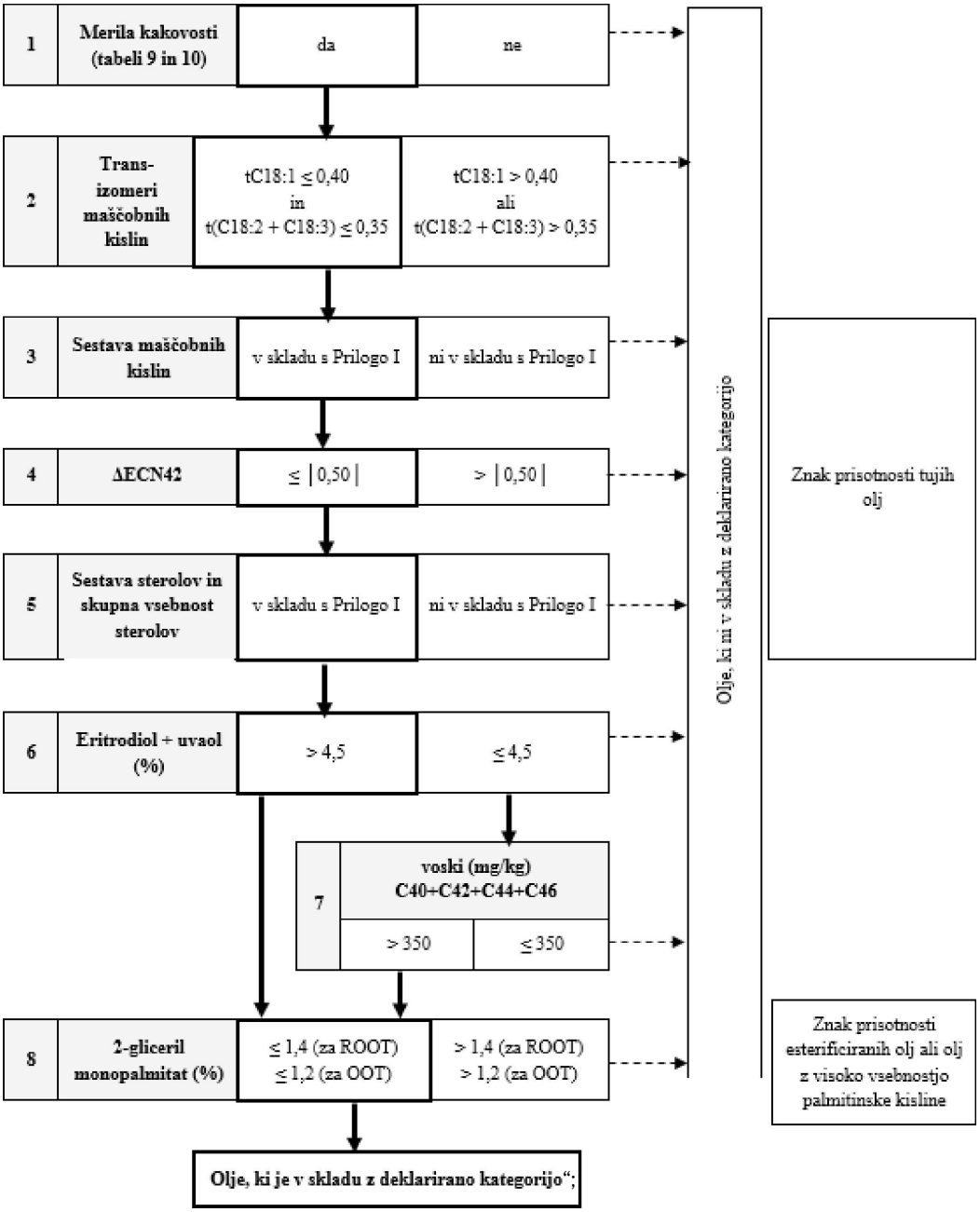


Tabela 11 – Rafinirano olje iz oljčnih tropin in olje iz oljčnih tropin (merila čistosti)



PRILOGA IV

Priloga XII se spremeni:

(1) točka 3.3 se nadomesti z naslednjim:

„3.3. **Neobvezna terminologija za etiketiranje**

Vodja ocenjevalne komisije lahko na zahtevo potrdi, da so ocenjena olja skladna z opredelitvami in razponi, ki glede intenzivnosti in zaznavanja lastnosti ustrezajo izrazom v nadaljevanju.

Pozitivne lastnosti (sadežno, grenko in pikantno): glede na intenzivnost zaznavanja:

— *močno*, če je mediana lastnosti višja od 6,0;

— *srednje*, če je mediana lastnosti višja od 3,0 in nižja ali enaka 6,0;

— *blago*, če je mediana lastnosti nižja od ali enaka 3,0.

Sadežnost Skupek vonjev, ki je odvisen od sorte oljk ter izhaja iz zdravih in svežih oljk, pri katerih ne prevladuje niti sadežnost zelenih oljk niti sadežnost zrelih oljk. Zaznava se neposredno in/ali retronazalno.

Zelena sadežnost Skupek vonjev, ki spominja na zelene sadeže, je odvisen od sorte oljk ter izhaja iz zdravih in svežih zelenih oljk. Zaznava se neposredno in/ali retronazalno.

Zrela sadežnost Skupek vonjev, ki spominja na zrele sadeže, je odvisen od sorte oljk ter izhaja iz zdravih in svežih oljk. Zaznava se neposredno in/ali retronazalno.

Uravnoteženo Olje, ki ni neuravnoteženo po vonju, okusu in tipnem občutku v ustih ter pri katerem mediana lastnosti grenko in mediana lastnosti pikantno nista več kot za dve (2,0) točki višji od mediane sadežnosti.

Zelo blago olje Olje, pri katerem znaša mediana lastnosti grenko in pikantno 2,0 ali manj.

Seznam izrazov glede na intenzivnost zaznavanja:

Izrazi, za katere je treba predložiti potrdilo organoleptičnega preskusa	Mediana lastnosti
Sadežnost	—
Zrela sadežnost	—
Zelena sadežnost	—
Blaga sadežnost	$\leq 3,0$
Srednja sadežnost	$3,0 < Me \leq 6,0$
Močna sadežnost	$> 6,0$
Blaga zrela sadežnost	$\leq 3,0$
Srednja zrela sadežnost	$3,0 < Me \leq 6,0$
Močna zrela sadežnost	$> 6,0$
Blaga zelena sadežnost	$\leq 3,0$
Srednja zelena sadežnost	$3,0 < Me \leq 6,0$
Močna zelena sadežnost	$> 6,0$

Izrazi, za katere je treba predložiti potrdilo organoleptičnega preskusa	Mediana lastnosti
Blaga grenkost	≤ 3,0
Srednja grenkost	3,0 < Me ≤ 6,0
Močna grenkost	> 6,0
Blaga pikantnost	≤ 3,0
Srednja pikantnost	3,0 < Me ≤ 6,0
Močna pikantnost	> 6,0
Dobro uravnoteženo olje	Mediana lastnosti grenko in mediana lastnosti pikantno nista več kot 2,0 točki višji od mediane sadežnosti.
Blago olje	Mediana lastnosti grenko in mediana lastnosti pikantno znašata 2,0 ali manj.“

(2) točka 9.4 se nadomesti z naslednjim:

„9.4. **Razvrstitev olja**

Olje se razvrsti v skladu s spodaj navedenimi opisi na podlagi mediane napak in mediane lastnosti sadežno. Mediana napak je mediana napake, ki se zazna z največjo intenzivnostjo. Mediana napak in mediana lastnosti sadežno sta izraženi na eno decimalno mesto natančno.

Razvrstitev olja se izvede s primerjavo vrednosti mediane napak in mediane lastnosti sadežno z referenčnimi razponi, navedenimi spodaj. Ker so bile meje razponov določene ob upoštevanju napak metode, veljajo za absolutne. Programska oprema omogoča prikaz razvrstitve v obliki tabele s statističnimi podatki ali grafa.

(a) Ekstra deviško oljčno olje: mediana napak je enaka 0,0, mediana lastnosti sadežno pa je višja od 0,0;

(b) deviško oljčno olje: mediana napak je višja od 0,0 in enaka ali nižja od 3,5, mediana lastnosti sadežno pa je višja od 0,0;

(c) lampantno deviško oljčno olje: mediana napak je višja od 3,5 oziroma mediana napak je nižja ali enaka 3,5 in mediana sadežnosti je enaka 0,0.

Opomba 1: Če je mediana lastnosti grenko in/ali pikantno višja od 5,0, vodja ocenjevalne komisije to navede na potrdilu o pokušnji.

Pri ocenah, katerih namen je spremljanje skladnosti, se opravi ena pokušnja. V primeru ponovljene ocene se ocena izvede dvakrat pri različnih pokušnjah. Rezultati dvakratne analize morajo biti statistično homogeni (glej točko 9.5). Če niso, je treba vzorec spet dvakrat analizirati. Končna vrednost mediane razvrstitvenih lastnosti se izračuna iz povprečja obeh median.“

PRILOGA V

Priloga XVIII se spremeni:

(1) točka 5.1 se nadomesti z naslednjim:

„5.1. Heksan ali mešanica alkanov z intervalom vrelišč 65 do 70 °C, destiliran z ločevalno kolono. Heksan se lahko nadomesti z izo-oktanom (2,2,4-trimetilpentan kromatografske stopnje) pod pogojem, da se dosežejo primerljive vrednosti natančnosti. Nadzoruje se lahko ostanek po izparevanju 100 ml topila. Topila z višjim vreliščem kot n-heksan imajo daljši čas odparevanja, vendar imajo zaradi toksičnosti heksana prednost.";

(2) v točki 6.3.3 se doda naslednje besedilo:

„Opomba 10. Če se pojavijo stigmastadieni v koncentracijah, večjih od 4 mg/kg, in je potrebna količinska opredelitev, je treba uporabiti metodo mednarodnega sveta za oljke za določanje sterenov v rafiniranem olju."

PRILOGA VI

Priloga XVIII se spremeni:

(1) točka 4.2.1 se nadomesti z naslednjim:

„4.2.1. Petroleter 40–60 °C za kromatografijo ali heksan. Heksan se lahko nadomesti z izo-oktanom (2,2,4-trimetilpentan kromatografske stopnje) pod pogojem, da se dosežejo primerljive vrednosti natančnosti. Topila z višjim vreliščem kot n-heksan imajo daljši čas odparevanja, vendar imajo zaradi toksičnosti heksana prednost.“;

(2) doda se naslednja točka 4.2.12:

„4.2.12. Heptan kromatografske čistoče. Heptan se lahko nadomesti z izo-oktanom (2,2,4-trimetilpentan kromatografske stopnje).“

PRILOGA VII

„PRILOGA XIX

DOLOČANJE SESTAVE IN VSEBNOSTI STEROLA TER ALKOHOLNIH SPOJIN S KAPILARNO PLINSKO KROMATOGRAFIJO

1. PODROČJE UPORABE

Metoda opisuje postopek za določanje posamezne in skupne vsebnosti alkoholnih spojin v oljčnem olju in olju iz oljčnih tropin ter v mešanici obeh.

Alkoholne spojine v oljčnem olju in olju iz oljčnih tropin so alifatski alkoholi, steroli in triterpenski dialkoholi.

2. PRINCIP

Olja z dodanima α-holestanolom in 1-eikozanolom kot internima standardoma se umilijo s kalijevim hidroksidom v etanolni raztopini, neumiljive snovi pa se nato ekstrahirajo z etilnim etrom.

Različne frakcije alkoholnih spojin se ločijo od neumiljivih snovi bodisi s tankoplastno kromatografijo na z lugom obdelani silikagelni plošči (referenčna metoda) bodisi s HPLC s silikagelno kolono. Frakcije, dobljene iz ločitve silikagela, se pretvorijo v trimetilsililne etre in se nato analizirajo s kapilarno kolonsko plinsko kromatografijo.

DEL 1

PRIPRAVA NEUMILJIVIH SNOVI

1. PODROČJE UPORABE

Ta del opisuje pripravo in ekstrakcijo neumiljivih snovi. Vključuje pripravo in ekstrakcijo neumiljivih snovi iz oljčnega olja in olja iz oljčnih tropin.

2. PRINCIP

Testni vzorec se umili z vrenjem pod povratnim hladilnikom z raztopino etanolnega kalijevega hidroksida. Neumiljive snovi se ekstrahirajo z dietil etrom.

3. OPREMA

Običajna laboratorijska oprema in zlasti:

3.1 250-ml bučka z okroglim dnom s povratnim hladilnikom s priključki iz steklenih obrusov.

3.2 500-ml lij ločnik.

3.3 250-ml bučke.

3.4 100- in 500-µl mikrobrizgalki.

3.5 Cilindrični filtrirni lij s porozno frito G3 (poroznosti 15–40 µm), premera približno 2 cm in globine 5 cm, z nastavkom, primernim za filtriranje v vakuumu, in priključkom z zunanjim obrusom.

3.6 50-ml erlenmajerica s priključkom z notranjim obrusom za uporabo s filtrirnim lijem (točka 3.5).

3.7 10-ml epruveta s koničnim dnom in steklenim zamaškom.

3.8 Eksikator, napolnjen s kalcijevim dikloridom.

4. REAGENTI

4.1 Kalijev hidroksid (minimalne koncentracije 85 %).

4.2 Etanolna raztopina kalijevega hidroksida, približno 2 M.

Raztopite 130 g kalijevega hidroksida (4.1) s hlajenjem v 200 ml destilirane vode in potem do enega litra dodajte etanol (4.7). Raztopino hranite v dobro zamašenih temnih steklenicah, in sicer največ dva dni.

4.3 Etilni eter čistoče za analizo.

4.4 Brezvodni natrijev sulfat čistoče za analizo.

4.5 Aceton kromatografske čistoče.

4.6 Etilni eter kromatografske čistoče.

4.7 Etanol čistoče za analizo.

4.8 Etilacetat čistoče za analizo.

4.9 Interni standard α-holestanol več kot 99-odstotne čistoče (čistočo je treba preveriti s plinskokromatografsko analizo).

4.10 Interna standardna raztopina α-holestanola, 0,2-odstotna raztopina (m/V) v etilacetatu (4.8).

4.11 Raztopina 10 g/l fenolftaleina v etanolu (4.7).

4.12 0,1-odstotna (m/v) raztopina 1-eikozanola v etilacetatu (interni standard).

5. POSTOPEK

S 500-µl mikrobrizgalko (3.4) vnesite v 250-ml bučko (3.1) interno standardno raztopino α-holestanola (4.10) in 1-eikozanol (4.12), in sicer takšno količino holestanola in eikozanola, ki ustreza približno 10 % vsebnosti sterolov in alkoholov v vzorcu. Na primer za 5 g vzorca oljčnega olja dodajte 500 µl raztopine α-holestanola (4.10) in 250 µL raztopine 1-eikozanola (4.12). Za olja iz oljčnih tropin dodajte 1 500 µl tako raztopine α-holestanola (4.10) kot tudi 1-eikozanola (4.12). Odparite do suhega z blagim tokom dušika na parni kopeli. Po ohladitvi bučke vanjo natehtajte 5,00 ± 0,01 g suhega filtriranega vzorca.

Opomba 1: Olja in masti živalskega ali rastlinskega izvora, ki vsebujejo precejšnje količine holesterola, lahko dajo vrh, ki ima retenzijski čas enak holestanolu. V takem primeru je treba sterolno frakcijo analizirati dvakrat, in sicer z internim standardom in brez njega.

Dodajte 50 ml 2M etanolne raztopine kalijevega hidroksida (4.2) in nekaj plovca, namestite povratni hladilnik in segrejte na rahlo vretje do končanega umiljenja (raztopina postane bistra). S segrevanjem nadaljujte še nadaljnjih 20 minut in potem z vrha hladilnika dodajte 50 ml destilirane vode, snemite hladilnik in ohladite bučko na približno 30 °C.

Kvantitativno prenesite vsebino bučke v 500-ml lij ločnik (3.2), in sicer z večkratnim spiranjem z destilirano vodo (50 ml). Dodajte približno 80 ml etilnega etra (4.6), močno tresite približno 60 sekund ter postopoma sproščajte pritisk, tako da obrnete lij ločnik in odprete petelinček. Pustite mirovati, dokler fazi nista popolnoma ločeni (opomba 2). Nato milnico v celoti prelijte v drug lij ločnik. Iz vodno-alkoholne faze še dvakrat ekstrahirajte, in sicer z uporabo 60 do 70 ml etilnega etra (4.6).

Opomba 2: Emulzijo je mogoče odstraniti z dodajanjem majhnih količin etanola (4.7).

Združite vse tri etrske ekstrakte v skupnem liju ločniku, ki vsebuje 50 ml vode. Nadaljujte z izpiranjem (50 ml), dokler izpiralna voda ob dodatku kapljice raztopine fenolftaleina ni več rožnato obarvana (4.11). Potem ko je izpiralna voda odstranjena, filtrirajte skozi brezvodni natrijev sulfat (4.4) v predhodno stehtani 250-ml bučki, pri tem pa lij in filter izperite z majhnimi količinami etilnega etra (4.6).

Topilo odparite z destilacijo na rotacijskem izparilniku pri 30 °C v vakuumu. Dodajte 5 ml acetona (4.5) in z blagim tokom dušika v celoti odstranite hlapno topilo. Ostanek sušite v peči 15 minut pri 103 ± 2 °C. Po ohladitvi v eksikatorju ga stehtajte z natančnostjo 0,1 mg.

DEL 2

LOČEVANJE FRAKCIJ ALKOHOLNIH SPOJIN

1. PODROČJE UPORABE

Neumiljive snovi, pripravljene v delu 1, se frakcionirajo v različne alkoholne spojine, alifatske alkohole, sterole in triterpenske dialkoalkohole (eritrodiole in uvaole).

2. PRINCIP

Neumiljiva snov se lahko frakcionira in prepozna z osnovno tankoplastno kromatografijo (referenčna metoda), ustrezni pasovi pa se lahko odstrgajo in ekstrahirajo. Kot alternativna metoda ločevanja se lahko uporabi HPLC s silikagelno kolono in UV-detektorjem ter zberejo različne frakcije. Alifatski in triterpenski alkoholi ter steroli in triterpenski dialkoalkoholi se izolirajo skupaj.

3. OPREMA

Običajna laboratorijska oprema in zlasti:

3.1 Celotna oprema za analizo s tankoplastno kromatografijo s steklenimi ploščami 20 × 20 cm.

3.2 Ultravijolična svetilka z valovno dolžino 366 ali 254 nm.

3.3 100- in 500-µl mikrobrizgalki.

3.4 Cilindrični filtrirni lij s porozno frito G3 (poroznosti 15–40 µm), premera približno 2 cm in globine 5 cm, z nastavkom, primernim za filtriranje v vakuumu, in priključkom z zunanjim obrusom.

3.5 50-ml erlenmajerica s priključkom z notranjim obrusom za uporabo s filtrirnim lijem (točka 3.4).

3.6 10-ml epruveta s koničnim dnom in steklenim zamaškom.

3.7 Eksikator, napolnjen s kalcijevim dikloridom.

3.8 Sistem HPLC, ki ga sestavljajo:

3.8.1 Binarna črpalka.

3.8.2 Ročni ali avtomatski injektor, opremljen z 200-µl injekcijskim zvitkom.

3.8.3 Integrirani razplinjevalnik.

3.8.4 UV-VIS-detektor ali IR-detektor.

3.9 Kolona HPCL (25 cm x 4 mm notranjega premera) s silikagelom 60 (velikost delcev 5 µm).

3.10 Filter za brizgalke, 0,45 µm.

3.11 Erlenmajerica, 25-ml.

4. REAGENTI

4.1 Kalijev hidroksid (minimalne koncentracije 85 %).

4.2 Etanolna raztopina kalijevega hidroksida, približno 2 M.

Raztopite 130 g kalijevega hidroksida (4.1) s hlajenjem v 200 ml destilirane vode in potem do enega litra dodajte etanol (4.9). Raztopino hranite v dobro zamašenih temnih steklenicah, in sicer največ dva dni.

4.3 Etilni eter čistoče za analizo.

4.4 Etanolna raztopina kalijevega hidroksida, približno 0,2 M.

Raztopite 13 g kalijevega hidroksida (4.1) v 20 ml destilirane vode in potem do enega litra dodajte etanol (4.9).

4.5 Steklene plošče, 20 x 20, premazane s silikagelom, brez indikatorja fluorescence, debeline 0,25 mm (na voljo v prodaji, pripravljene za uporabo).

4.6 Aceton kromatografske čistoče.

4.7 N-heksan kromatografske čistoče.

4.8 Etilni eter kromatografske čistoče.

4.9 Etanol čistoče za analizo.

4.10 Etilacetat čistoče za analizo.

4.11 Referenčna raztopina za tankoplastno kromatografijo: holesterol, fitosteroli, alkoholi in eritrodiol, 5-odstotna raztopina v etilacetatu (4.10).

4.12 0,2-odstotna raztopina 2,7-diklorofluorosceina v etanolni raztopini. Naredite rahlo bazično z dodatkom nekaj kapelj alkoholne raztopine 2 M kalijevega hidroksida (4.2).

4.13 Mešanica n-heksana (4.7) / etilnega etra (4.8) v razmerju 65:35 (V/V).

4.14 Mobilna faza HPLC, n-heksan (4.7) / etilni eter (4.8) (1:1) (V/V).

5. REFERENČNA METODA: LOČEVANJE ALKOHOLNIH SPOJIN Z UPORABO Z LUGOM OBDELANE PLOŠČE ZA TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO

Priprava z lugom obdelanih plošč za tankoplastno kromatografijo. Silikagelne plošče (4.5) za 10 sekund potopite ali približno 4 cm globoko namočite v raztopino 0,2 M kalijevega hidroksida (4.4) in jih potem pustite dve uri, da se sušijo v digestoriju, na koncu pa jih dajte v peč na 100 °C za eno uro.

Vzemite jih iz peči in jih do uporabe hranite v eksikatorju, napolnjenim s kalcijevim kloridom (3.7) (tako obdelane plošče je treba uporabiti v 15 dneh).

Mešanico heksana in etilnega etra (4.13) (opomba 3) vstavite v razvijalno komoro na globino približno 1 cm. Komoro zaprite z ustreznim pokrovom in jo tako pustite najmanj pol ure na hladnem, da se lahko med hlapi in tekočino ustvari ravnotežje. Trakovi filtrirnega papirja, namočeni v eluent, se lahko položijo na notranje površine komore. To skrajša razvijalni čas za približno eno tretjino ter omogoča bolj enakomerno elucijo sestavin.

Opomba 3: Razvijalno mešanico je treba zamenjati za vsak preskus, zato da se dosežejo popolnoma ponovljivi pogoji elucije. Kot alternativa se lahko uporabi mešanica n-heksana in etilnega etra v razmerju 50:50 (V/V).

Pripravite približno 5-odstotno raztopino neumiljivih snovi, pripravljenih v delu 1 v etilacetatu (4.10), ter z uporabo 100-µl mikrobrizgalke (3.3) nanesite 0,3 ml raztopine na tanko in homogeno progo na nižjem koncu (2 cm) kromatografske plošče (4.5). Vzporedno s progo nanesite 2 do 3 µl materialne referenčne raztopine (4.11), tako da se po razvijanju sterolni, triterpenski dialkoholni in alkoholni pasovi lahko identificirajo.

Ploščo vstavite v razvijalno komoro (3.1). Temperaturo okolja je treba vzdrževati med 15 in 20 °C (opomba 4). Komoro takoj zaprite s pokrovom in pustite, da poteka eluiranje, dokler fronta topila ne doseže razdalje 1 cm od vrhnjega roba plošče. Vzemite ploščo iz razvijalne komore in odparite topilo s tokom vročega zraka ali tako, da ploščo nekaj časa pustite v digestoriju.

Opomba 4: Višja temperatura lahko negativno vpliva na ločevanje.

Rahlo in enakomerno napršite ploščo z raztopino 2,7-diklorofluorosceina (4.12) ter pustite, da se posuši. Če se plošča opazuje pod ultravijolično svetlobo (3.2), se sterolni, triterpenski dialkoholni in alkoholni pasovi lahko identificirajo tako, da se poravnajo s pikami, dobljenimi iz referenčne raztopine (4.11). S črnim svinčnikom označite meje pasov vzdolž roba fluorescence (glej ploščo za tankoplastno kromatografijo na sliki 1).

S kovinsko žličko odstrgajte silikagel na označeni površini. Odstranjen, v fin prah zdrobljeni material vnesite v filtrirni lij (3.4). Dodajte 10 ml vročega etilacetata (4.10), s kovinsko žličko previdno zmešajte in (po potrebi v vakuumu) filtrirajte, tako da filtrat zberete v erlenmajerici (3.5), ki je pritrjena na filtrirni lij.

Ostanek v erlenmajerici trikrat izperite z etilnim etrom (4.3) (vsakokrat približno z 10 ml), tako da zberete filtrat v isti erlenmajerici, ki je pritrjena na lij. Odparite filtrat do prostornine 4 do 5 ml, prenesite preostanek raztopine v predhodno stehtano 10-ml epruveto (3.6), odparite do suhega z rahlim segrevanjem v blagem toku dušika, ponovno dolijte nekaj kapelj acetona (4.6) in spet odparite do suhega. Ostanek v epruveti je sestavljen iz sterolnih in triterpenskih dialkoholnih ali alkoholnih in triterpenskih dialkoholnih frakcij.

6. LOČEVANJE ALKOHOLNIH FRAKCIJ S HPLC

Neumiljiva snov, pridobljena v delu 1, se raztopi v 3 ml mobilne faze (4.14); filtrirajte raztopino s filtrom za brizgalke (3.10) in shranite.

Vbrizgajte 200 µL filtrirane neumiljive raztopine v HPLC (3.8).

Izvedite ločevanje s HPLC pri 0,8 ml/min, ne upoštevajte eluata prvih 5 minut in zberite v 25-ml erlenmajericah (3.11) med 5. in 10. minuto eluat za alifatske in triterpenske alkohole ter med 11. in 25. minuto eluat za sterole ter eritrodiole in uvaole (opomba 5).

Ločevanje se lahko spremlja z UV-detektorjem pri valovni dolžini 210 nm ali z detektorjem lomnega količnika (glej sliko 6).

Frakcije se odparijo do suhega in pripravijo za kromatografsko analizo.

Opomba 5: Previdno nadzorujte tlak črpalke HPLC, saj ga lahko etilni eter poveča; prilagodite pretok tako, da bo tlak pod nadzorom.

DEL 3

ANALIZA FRAKCIJ ALKOHOLNIH SPOJIN S PLINSKO KROMATOGRAFIJO

1. PODROČJE UPORABE

Ta del vsebuje splošne smernice za uporabo kapilarne kolonske plinske kromatografije pri določitvi kakovostne in količinske sestave alkoholnih spojin, izoliranih v skladu z metodo iz dela 2 te metode.

2. PRINCIP

Frakcije, zbrane iz neumiljivih snovi z uporabo TLC ali HPLC, se derivatizirajo v trimetilsililne etre in analizirajo s kapilarno kolonsko plinsko kromatografijo z vbrizgavanjem z deljenjem vzorca in s plamensko-ionizacijskim detektorjem.

3. OPREMA

Običajna laboratorijska oprema in zlasti:

3.1 10-ml epruveta s koničnim dnom in steklenim zamaškom.

3.2 Plinski kromatograf, primeren za uporabo s kapilarno kolono, s sistemom za vbrizgavanje z deljenjem vzorca, ki ga sestavljajo:

3.2.1 termostatirana komora za kolone, ki lahko ohranja želeno temperaturo do ± 1 °C natančno;

3.2.2 temperaturno nastavljiv injektor z uparjalnim elementom iz persilaniziranega stekla in sistemom za vbrizgavanje z deljenjem vzorca;

3.2.3 plamensko-ionizacijski detektor;

3.2.4 sistem za zajemanje podatkov, ki je primeren za uporabo s plamensko-ionizacijskim detektorjem (3.10.3) in omogoča ročno integracijo.

3.3 Kvarčna kapilarna kolona dolžine 20 do 30 m, notranjega premera 0,25 do 0,32 mm, pokrita s 5 % difenil- in 95 % dimetilpolisiloksana (stacionarna faza SE-52 ali SE-54 ali podobno) enakomerne debeline med 0,10 in 0,30 µm.

3.4 10-µl mikrobrizgalka za plinsko kromatografijo z nesnemljivo iglo, primerno za vbrizgavanje z deljenjem vzorca.

4. REAGENTI

4.1 Brezvodni piridin kromatografske čistoče.

4.2 Heksametil disilazan čistoče za analizo.

4.3 Trimetilklorosilan čistoče za analizo.

4.4 Vzročne raztopine sterolnih trimetilsililnih etrov. Pripravite jih tik pred uporabo iz sterolov in eritrodiola iz olj, ki jih vsebujejo.

4.5 Standardne raztopine trimetilsililnih etrov alifatskih alkoholov od C20 do C28. Pripravijo se lahko iz mešanic čistih alkoholov, ko so potrebne.

4.6 Nosilni plin: vodik ali helij plinskokromatografske čistoče.

4.7 Pomožni plini: vodik, helij, dušik in zrak plinskokromatografske čistoče.

4.8 Reagent za sililiranje, sestavljen iz mešanice piridina, heksametildisilizana in trimetilklorosilana v razmerju 9: 3: 1 (V/V/V).

4.9 N-heksan kromatografske čistoče.

5. PRIPRAVA TRIMETILSILILNIH ETROV

Reagent za sililiranje (4.8) (opomba 6), v razmerju 50 µl za vsak miligram alkoholne spojine, dodajte v epruveto (3.1), ki vsebuje frakcijo alkoholne spojine, tako da se izognete kakršnemu koli vnosu vlage (opomba 7).

Opomba 6: Raztopine, pripravljene za uporabo, se dobijo v prodaji. Na voljo so tudi drugi reagenti za sililiranje, kot je na primer bis-trimetilsilil trifluoroacetamid + 1-odstoten trimetilklorosilan, ki ga je treba razredčiti z enako količino brezvodnega piridina. Piridin se lahko zamenja z enako količino acetonitrila.

Opomba 7: Rahla opalescenca, ki lahko nastane, je normalna in ne povzroča nobenih nepravilnost. Tvorjenje belega flokulata ali pojav rožnate obarvanosti sta znaka prisotnosti vlage ali pokvarjenosti reagenta. V takem primeru je treba preskus ponoviti (le če se uporabi heksametildisilizan/trimetilklorosilan).

Zamašite epruveto (3.1) in jo previdno pretresite (ne da bi jo prevračali), dokler niso sestavine popolnoma raztopljene. Pustite jo pri sobni temperaturi najmanj 15 minut, nato pa nekaj minut centrifugirajte. Prozorna raztopina je pripravljena za plinskokromatografsko analizo.

6. PLINSKOKROMATOGRAFSKA ANALIZA

6.1 Predhodni postopki, kondicioniranje kapilarne kolone

Kolono (3.3) pritrdite na plinski kromatograf, in sicer vstopni del na injektor z deljenjem vzorca, izhodnega pa na detektor.

Opravite splošne preglede plinskega kromatografa (tesnjenje tokokroga plinov, učinkovitost detektorja, učinkovitost sistema za vbrizgavanje z deljenjem vzorca in sistema beleženja itd.).

Če kolono uporabljate prvič, je priporočljivo, da jo kondicionirate, in sicer tako, da skozi kapilarno kolono spustite blag tok plina, nato pa vključite plinski kromatograf in začnete postopno segrevanje do temperature najmanj 20 °C nad delovno temperaturo (opomba 8). To temperaturo vzdržujte najmanj dve uri, nato pa vzpostavite delovne pogoje (nastavitev pretoka plina in deljenja vzorca, vžig plamena, priključitev na računalniški sistem, prilagoditev temperature kolone, detektorja in injektorja itd.) in beležite signal z občutljivostjo, ki je najmanj dvakrat večja od tiste, ki je predvidena za analize. Potek bazne linije mora biti linearen, brez kakršnih koli vrhov, in ne sme imeti odklona. Negativen premočrtni odklon pomeni slabo tesnjenje med kolono in instrumentom, pozitiven odklon pa slabo kondicionirano kolono.

Opomba 8: Temperatura kondicioniranja mora vedno biti najmanj 20 °C nižja od najvišje temperature, določene za uporabljeno stacionarno fazo.

6.2 Delovni pogoji

Optimizirajte program temperature in pretok nosilnega plina tako, da dobite kromatograme, podobne tistim s slik 3 do 6.

Preskušeni so bili naslednji parametri, ki so se izkazali kot uporabni:

6.2.1 Alifatski alkoholi

Program peči	180 °C (8 min.) → 260 °C (pri 5 °C/min.) → 260 °C (15 min.)
Temperatura injektorja	280 °C
Temperatura detektorja	290 °C
Linearna hitrost nosilnega plina	helij (20 do 30 cm/s); vodik 30 do 50 cm/s)
Delilno razmerje	1:50 do 1:100
Vbrizgana količina	0,5 do 1 µl raztopine TMSE

6.2.2 Steroli in triterpenski dialkoholi

Program peči	260 ± 5 °C, izotermična
Temperatura injektorja	280–300 °C
Temperatura detektorja	280–300 °C
Linearna hitrost nosilnega plina	helij (20 do 30 cm/s); vodik 30 do 50 cm/s)
Delilno razmerje	1:50 do 1:100
Vbrizgana količina	0,5 do 1 µl raztopine TMSE

Ti pogoji se lahko spremenijo glede na značilnosti kolone in plinskega kromatografa, tako da se dobijo kromatogrami, ki izpolnjujejo naslednje zahteve:

— retenzijski čas alkohola C26 je 18 ± 5 minut;

— vrh alkohola C22 je 80 ± 20 % vrednosti celotne skale za oljčno olje in 40 ± 20 % vrednosti celotne skale za olje iz oljčnih tropin;

— retenzijski čas vrha β-sitosterola bi moral biti 20 ± 5 minut;

— vrh za kampesterol bi moral biti: za oljčno olje (povprečna vsebnost 3 %) 20 ± 5 % celotne skale;

— vsi prisotni steroli morajo biti ločeni. Poleg tega, da so ločeni, morajo biti vrhovi tudi popolnoma razdvojeni, tj. signal vrha se mora pred začetkom novega vrha vrniti na bazno linijo. Nepopolna resolucija je sprejemljiva pod pogojem, da se vrh pri TRR 1,02 (sitostanol) lahko količinsko opredeli pravokotnico.

6.3 Analizni postopek

Z 10 µl mikrobrizgalko (3.4) odmerite 1 µl heksana, 0,5 µl zraka in 0,5 do 1 µl vzorčne raztopine. Dvignite bat mikrobrizgalke, tako da se igla izprazni. Iglo potisnite skozi membrano injektorja in po eni do dveh sekundah raztopino hitro vbrizgajte in potem po približno petih sekundah iglo počasi izvlecite. Uporabi se lahko tudi avtomatski injektor.

Beležite, dokler TMSE ustreznih prisotnih alkoholnih spojin ne eluirajo popolnoma. Bazna linija mora še naprej izpolnjevati zahteve za ustrezne delovne pogoje (6.2.1 ali 6.2.2).

6.4 Identifikacija vrhov

Identificirajte posamezne vrhove na podlagi retenzijskih časov in s primerjavo z mešanico alifatskih in triterpenskih alkoholnih ali sterolnih in triterpenskih dialkoholnih TMSE, analiziranih v enakih pogojih. Kromatogram frakcij alifatskih in triterpenskih alkoholov je prikazan na sliki 3, ustrezni kromatogrami za sterole in triterpenske dialkohole pa so prikazani na sliki 2.

Alifatski alkoholi eluirajo v naslednjem zaporedju: C20-ol (I.S.), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol in C28-ol.

Steroli in triterpenski dialkoholi eluirajo v naslednjem zaporedju: holesterol, brasikasterol, ergosterol, 24-metilen holesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ7-kampesterol, Δ5,23-stigmastadienol, klerosterol, β-sistosterol, sitostanol, Δ5-avenasterol, Δ5,24-stigmastadienol, Δ7-stigmastenol, Δ7-avenasterol, eritrodiol in uvaol.

6.5 Kvantitativna ocena

Območja vrhov 1-eikozanola in alifatskih alkoholov C22, C24, C26 in C28 se izračunajo s sistemom za zajemanje podatkov. Za odzivni faktor 1-eikozanola je treba šteti, da je enak 1.

Z računalniškim sistemom izračunajte površine vrhov za α-holestanol ter sterole in triterpenske dialkohole. Ne upoštevajte vrhov za tiste spojine, ki niso vključene v tabelo 1 (ergosterol se ne računa). Za odzivni faktor α-holestanola je treba šteti, da je enak 1.

Izračunajte koncentracijo vsake posamezne alkoholne spojine v mg/kg maščobe:

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

pri čemer:

A_x = površina vrha za alkoholno spojino x, izračunana z računalniškim sistemom;

A_s = površina vrha za 1-eikozanol/α-holestanol, izračunana z računalniškim sistemom;

m_s = masa dodanega 1-eikozanola/α-holestanola, v miligramih;

m = masa vzorca, uporabljenega za določanje, v gramih.

7. IZRAŽANJE REZULTATOV

Zabeležite posamezne koncentracije alifatskih in triterpenskih alkoholov kot mg/kg maščobe in njihovo vsoto kot „skupno vsebnost alifatskih alkoholov“. Skupna vsebnost je vsota C22, C24, C26 in C28.

Sestavo vsake posamezne alkoholne spojine bi bilo treba izraziti na eno decimalno mesto natančno.

Skupno koncentracijo sterola je treba izraziti brez decimalk.

Izračunajte delež za vsak posamezni sterol iz razmerja med ustrezno površino vrha in površino vseh vrhov za sterol:

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

pri čemer:

A_x = površina vrha za sterol x;

ΣA = površina vseh vrhov za sterol.

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

Izračunajte delež eritrodiola in uvaola:

$$eritrodiol + \ uvaol = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

pri čemer:

A_{Er} = površina vrha za eritrodiol, izračunana z računalniškim sistemom;

A_{Uv} = površina vrha za uvaol, izračunana z računalniškim sistemom;

Σ_{AT} = površina vseh vrhov za sterol + eritrodiol + uvaol, izračunana z računalniškim sistemom.

Poleg izračuna relativnega deleža posameznih sterolov in triterpenskih dialkoholov ter skupne koncentracije sterolov je treba izračunati koncentracijo eritrodiola in uvaola ter njuno vsoto v mg/kg maščobe po naslednjih enačbah:

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

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

pri čemer:

A_{Er} = površina vrha za eritrodiol, izračunana z računalniškim sistemom;

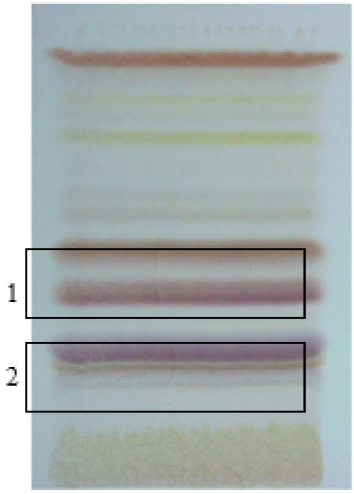
A_{Uv} = površina vrha za uvaol, izračunana z računalniškim sistemom;

A_s = površina vrha za α-holestanol, izračunana z računalniškim sistemom;

m_s = masa dodanega α-holestanola, v miligramih;

m = masa vzorca, uporabljenega za določanje, v gramih.

Dodatek



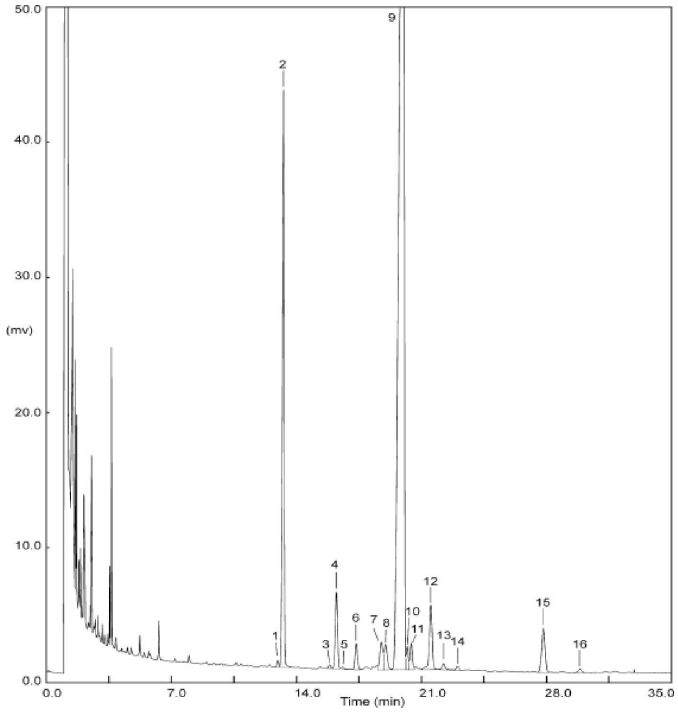
1 Ogljikovodiki
2 α-tokoferol
3 Prenoli
4 Triterpenski alkoholi
5 Alifatski alkoholi
6 Metilsteroli
7 Steroli
8 Triterpenski dialkoholi

Slika 1 – TLC neumiljive frakcije iz olja iz oljčnih tropin, eluirane dvakrat s heksanom:dietil etrom (65:35), razvite s SSO4H2 (50 %) in segrete. Pasovi, s katerih je treba odstrgati silikagel, so v pravokotniku; 1 so pasovi za alifatske alkohole in 2 so pasovi za sterole in triterpenske dialkohole.

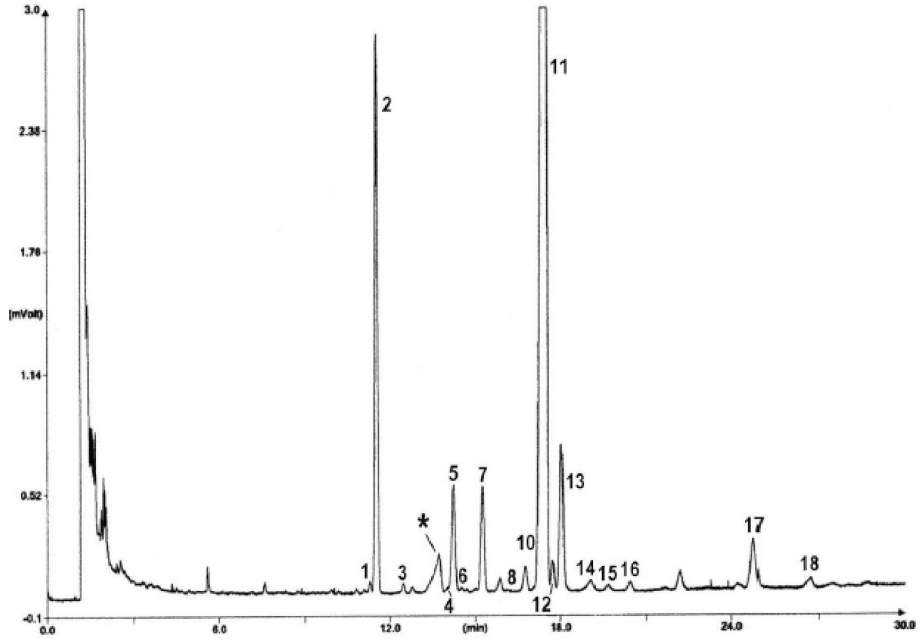
Tabela I – Relativni retenzijski časi sterolov

Vrh	Identifikacija		Relativni retenzijski čas	
			Kolona SE 54	Kolona SE 52
1	Holesterol	Δ-5-holesten-3β-ol	0,67	0,63
2	Holestanol	5α-holestan-3β-ol	0,68	0,64
3	Brasikasterol	[24S]-24-metil-Δ-5,22-holestadien-3β-ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S]-24-metil-Δ-5,7,22 holestatrien-3β-ol	0,78	0,76
4	24-metilen-holesterol	24-metilen-Δ-5,24-holestadien-3β-o1	0,82	0,80
5	Kampesterol	(24R)-24-metil-Δ-5-holesten-3β-ol	0,83	0,81
6	Kampestanol	(24R)-24-metil-holestan-3β-ol	0,85	0,82
7	Stigmasterol	(24S)-24-etil-Δ-5,22-holestadien-3β-ol	0,88	0,87
8	Δ-7-kampesterol	(24R)-24-metil-Δ-7-holesten-3β-ol	0,93	0,92
9	Δ-5,23-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil-Δ-5,23-hoIestadien-3β-ol	0,95	0,95
10	Klerosterol	(24S)-24-etil-Δ-5,25-holestadien-3β-ol	0,96	0,96

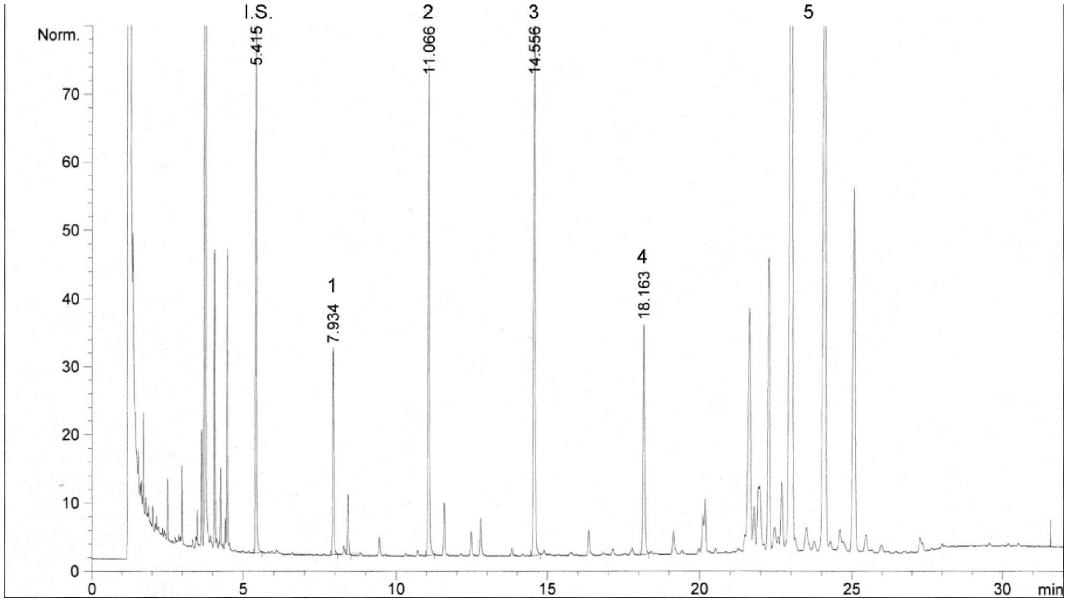
Vrh	Identifikacija		Relativni retenzijski čas	
			Kolona SE 54	Kolona SE 52
11	β-sitosterol	(24R)-24-etil-Δ-5-holesten-3β-ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-etil-holestan-3β-ol	1,02	1,02
13	Δ-5-avenasterol	(24Z)-24-etiliden-Δ-holesten-3β-ol	1,03	1,03
14	Δ-5,24-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil-Δ-5,24-holestadien-3β-ol	1,08	1,08
15	Δ-7-stigmastenol	(24R,S)-24-etil-Δ-7-holesten-3β-ol	1,12	1,12
16	Δ-7-avenasterol	(24Z)-24-etiliden-Δ-7-holesten-3β-ol	1,16	1,16
17	Eitrodiol	5α-olean-12-en-3β,28-diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ12-ursen-3β,28-diol	1,52	1,52



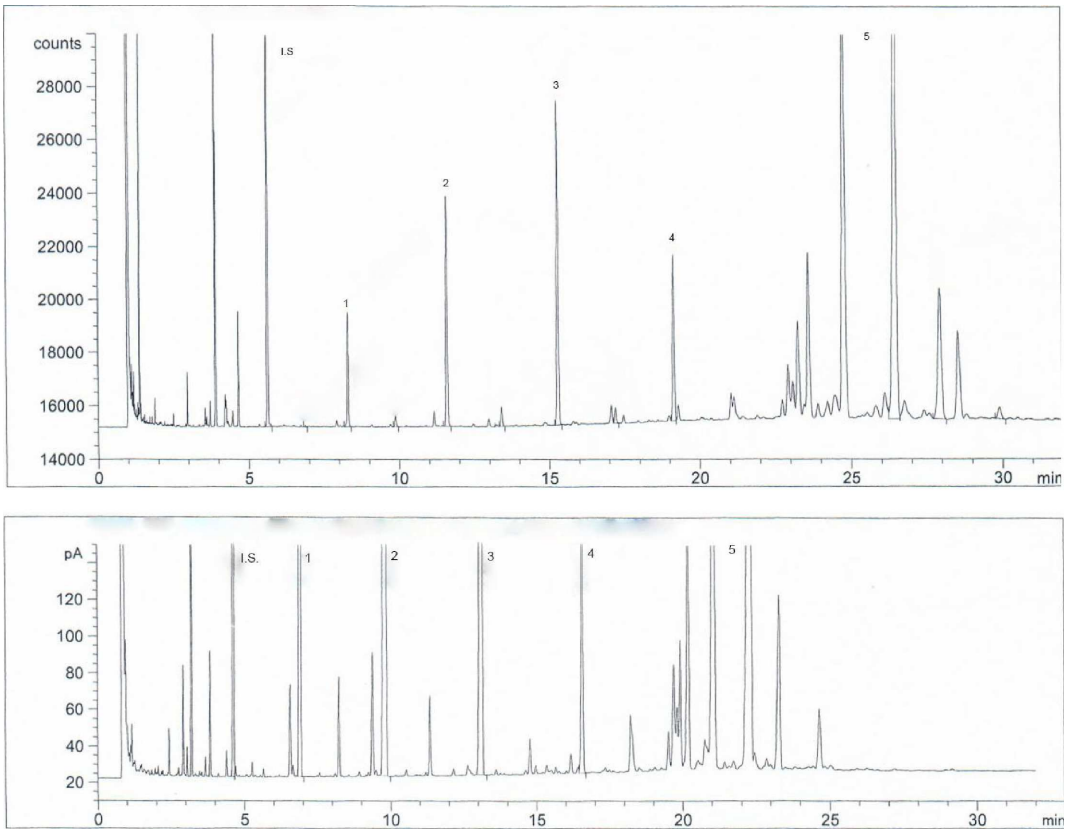
Slika 2 - Kromatografski profil GC-FID sterola in triterpenskih dialkoholov iz rafiniranega oljčnega olja. (1) holesterol, (2) α-holestanol (I.S.), (3) 24-metilenholesterol, (4) kampesterol, (5) kampestanol, (6) stigmasterol, (7) Δ5,23-stigmastadienol, (8) klerosterol, (9) β-sitosterol, (10) sitostanol, (11) Δ5-avenasterol, (12) Δ5,24-stigmastadienol, (13) Δ7-stigmastenol, (14) Δ7-avenasterol, (15) eritrodiol, (16) uvaol.



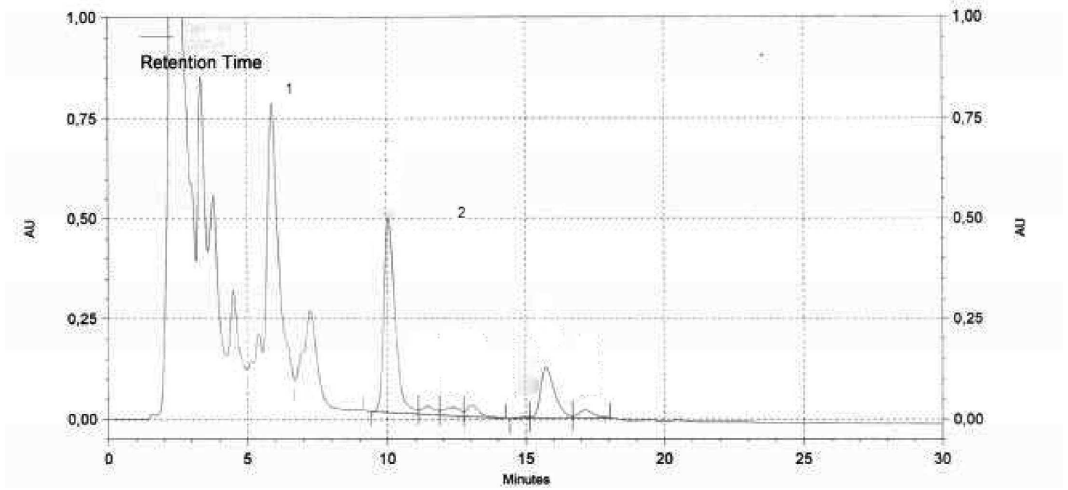
Slika 3 - Kromatografski profil GC-FID sterola in triterpenskih dialkoholov iz lampantnega oljčnega olja. (1) holesterol, (2) α-holestanol (I.S.), (3) brasikasterol, (4) 24-metilenholesterol, (5) kampesterol, (6) kampestanol, (7) stigmasterol, (8) Δ7-kampesterol, (9) Δ5,23-stigmastadienol, (10) klerosterol, (11) β-sitosterol, (12) sitostanol, (13) Δ5-avenasterol, (14) Δ5,24-stigmastadienol, (15) Δ7-stigmastenol, (16) Δ7-avenasterol, (17) eritrodiol, (18) uvaol.



Slika 4 - Kromatografski profil GC-FID alifatskih alkoholov in triterpenskih alkoholov iz oljčnega olja. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) triterpenski alkoholi.



Slika 5 - Kromatografski profil GC-FID alifatskih alkoholov in triterpenskih alkoholov iz rafiniranega oljčnega olja in oljčnega olja, dobljenega po drugem centrifugiranju. (I.S.) C20-ol, (1) C22-ol, (2) C24-ol, (3) C26-ol, (4) C28-ol, (5) triterpenski alkoholi.



Slika 6 - Kromatogram HPLC neumiljive frakcije oljčnega olja, ločene s HPLC z uporabo UV-detektorja. (1) Alifatski in triterpenski alkoholi; (2) steroli in triterpenski dialkoholi.“