II

(Nezakonodajni akti)

UREDBE

UREDBA KOMISIJE (EU) št. 61/2011

z dne 24. januarja 2011

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 Sveta (ES) št. 1234/2007 z dne 22. oktobra 2007 o vzpostavitvi skupne ureditve kmetijskih trgov in o posebnih določbah za nekatere kmetijske proizvode (Uredba o enotni SUT) [1] ter zlasti členov 113(1)(a) in 121(h) v povezavi s členom 4 Uredbe,

ob upoštevanju naslednjega:

(1) Uredba Komisije (EGS) št. 2568/91 [2] opredeljuje fizikalne ter kemične značilnosti oljčnega olja in olja iz oljčnih tropin, določa pa tudi metode za analizo teh lastnosti. Navedene metode in mejne vrednosti v zvezi z značilnostmi olja je treba posodobiti ob upoštevanju mnenja kemijskih strokovnjakov in v skladu z opravljenim delom v okviru Mednarodnega sveta za oljke.

(2) Strokovnjaki na področju kemije so ugotovili, da je vsebnost etilnih estrov maščobnih kislin (FAEE) in metilnih estrov maščobnih kislin (FAME) uporaben parameter kakovosti za ekstra deviško oljčno olje, zato je zlasti primerno določiti mejne vrednosti za te estre ter metodo za določanje njihove vsebnosti.

(3) Da bi zagotovili dovolj časa za prilagoditev novim standardom in uvedbo sredstev, potrebnih za njihovo uporabo, ter se izognili motnjam pri trgovanju, je treba določiti, da se spremembe iz te uredbe uporabljajo od 1. aprila 2011. Zaradi enakih razlogov je treba določiti, da se lahko oljčno olje in olje iz oljčnih tropin, zakonito proizvedena in označena v Uniji ali zakonito uvožena v Unijo ter dana v prosti promet pred tem datumom, tržita do porabe zalog.

(4) Uredbo (EGS) št. 2568/91 je zato treba ustrezno spremeniti.

(5) Ukrepi iz te uredbe so v skladu z mnenjem Upravljalnega odbora za skupno ureditev kmetijskih trgov –

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

Člen 1

Uredba (EGS) št. 2568/91 se spremeni:

1) Členu 2(1) se doda naslednja alinea:

„— za določanje vsebnosti voskov, metilnih estrov maščobnih kislin in etilnih estrov maščobnih kislin s kapilarno plinsko kromatografijo, metoda, določena v Prilogi XX“

2) Seznamu prilog se doda naslednji vnos:

„Priloga XX: Metoda za določanje vsebnosti voskov, metilnih estrov maščobnih kislin in etilnih estrov maščobnih kislin s kapilarno plinsko kromatografijo“

3) Priloga I se nadomesti z besedilom Priloge I k tej uredbi.

4) Priloga XX se doda, kakor je določeno v Prilogi II k tej uredbi.

Člen 2

Proizvodi, ki so bili zakonito proizvedeni in označeni v Uniji ali zakonito uvoženi v Unijo ter dani v prosti promet pred 1. aprilom 2011, se lahko tržijo do porabe vseh zalog.

[1] UL L 299, 16.11.2007, str. 1.
[2] UL L 248, 5.9.1991, str. 1.

Člen 3

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

Uporablja se od 1. aprila 2011.

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

V Bruslju, 24. januarja 2011

Za Komisijo
Predsednik
José Manuel BARROSO

PRILOGA I

„PRILOGA I

LASTNOSTI OLJČNEGA OLJA

Kategorija	Metilni estri maščobnih kislin (FAME) in etilni estri maščobnih kislin (FAEE)	Vsebnost kislin (%) (*)	Peroksidno število mEq O_2/kg (*)	Voski mg/kg (**)	2 gliceril monopalmitat (%)	Stigmastadien mg/kg (1)	Razlika: ECN42 (HPLC) in ECN42 (teoretičen izračun)	K_{232} (*)	K_{270} (*)	Delta-K (*)	Organoleptično ocenjevanje Mediana napake (Md) (*)	Organoleptično ocenjevanje Mediana sadežnosti (Mf)
1. Ekstra deviško oljčno olje	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg/kg ali 75 mg/kg < Σ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg in (FAEE/FAME) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 če je skupni % palmitinske kisline ≤ 14 % ≤ 1,0 če je skupni % palmitinske kisline > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Deviško oljčno olje	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 če je skupni % palmitinske kisline ≤ 14 % ≤ 1,0 če je skupni % palmitinske kisline > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
3. Lampante oljčno olje	—	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 če je skupni % palmitinske kisline ≤ 14 % ≤ 1,1 če je skupni % palmitinske kisline > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (2)	—
4. Rafinirano oljčno olje	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 če je skupni % palmitinske kisline ≤ 14 % ≤ 1,1 če je skupni % palmitinske kisline > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Oljčno olje - mešanica rafiniranega oljčnega olja in deviškega oljčnega olja	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 če je skupni % palmitinske kisline ≤ 14 % ≤ 1,0 če je skupni % palmitinske kisline > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Surovo olje iz oljčnih tropin	—	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Rafinirano olje iz oljčnih tropin	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Olje iz oljčnih tropin	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Vsota izomer, ki jih lahko (ali ne) ločimo s kapilarno kolono.
(2) Ali če je mediana napake manjša ali enaka 3,5 in je mediana sadežnosti 0.
(3) Olja z vsebnostjo voskov med 300 mg/kg in 350 mg/kg se uvrščajo med lampante oljčna olja, če je skupna vsebnost alifatskih alkoholov manjša ali enaka 350 mg/kg ali če je delež eritrodiola in uvaola manjši ali enak 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 večja od 350 mg/kg in če je delež eritrodiola in uvaola večji od 3,5 %.

Kategorija	Vsebnost kislin ([1])						Transoleinski izomerji skupaj (%)	Translinolni + translinolenski izomerji skupaj (%)	Sestava sterolov						Steroli skupaj (mg/kg)	Eritrodiol in uvaol (%) (**)
	Miristinska (%)	Linolenska (%)	Arašidova (%)	Eikozanojska (%)	Behenska (%)	Lignocerinska (%)			Holesterol (%)	Brassikasterol (%)	Campesterol (%)	Stigmasterol (%)	Betasitosterol (%) ([2])	Delta-7-stigmastenol (%)		
1. Ekstra deviško oljčno olje	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Deviško oljčno olje	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3 Lampante oljčno olje	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ([3])
4 Rafinirano oljčno olje	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5 Oljčno olje - mešanica rafin. oljč. olja in deviškega oljčnega olja	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6 Surovo olje iz oljčnih tropin	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ([4])
7 Rafinirano olje iz oljčnih tropin	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8 Olje iz oljčnih tropin	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

([1]) Vsebnost drugih maščobnih kislin (%): palmitinske: 7.5 - 20.0; palmitoleinske: 0.3 - 3.5; heptadekanojske: ≤ 0,3; heptadecenojske: ≤ 0,3; stearinske: 0,5-5,0; oleinske: 55,0-83,0; linoleinske: 3,5-21,0.
([2]) Skupaj: Delta-5,23-stigmastadienol+holesterol+beta-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 lampante oljčna olja, če je skupna vsebnost alifatskih alkoholov večja od 350 mg/kg ali če je delež eritrodiola in uvaola manjši od 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 večja od 350 mg/kg in če je delež eritrodiola in uvaola večji od 3,5 %.

Opombe:

a) Rezultate analiz je treba navesti na enako število decimalk natančno, kot je določeno za posamezno lastnost.
Zadnjo številko v številki je treba povečati za eno enoto, če naslednja številka prekorači 4.
b) Če samo ena lastnost značilnost ni v skladu z navedenimi vrednostmi, se olje razvrsti v drugo kategorijo ali se šteje za neustrezno glede čistosti na deklarirano kategorijo.
c) Značilnosti, označene z zvezdico (*), nanašajoč se na kakovost olja pomenijo:
— za oljčno olje lampante so lahko ustrezne mejne vrednosti hkrati različne od navedenih vrednosti;
— za deviška oljčna olja je nespoštovanje samo ene od mejnih vrednosti vzrok za spremembo kategorije, vendar olje ostane razvrščeno v eno od kategorij deviških oljčnih olj.
d) Če je lastnost označena z dvema zvezdicama (**), nanašajoč se na kakovost olja, to pomeni, da so lahko za vsa olja iz oljčnih tropin mejne vrednosti hkrati različne od navedenih vrednosti.“

PRILOGA II

„PRILOGA XX

Metoda za določanje vsebnosti voskov, metilnih estrov maščobnih kislin in etilnih estrov maščobnih kislin s kapilarno plinsko kromatografijo

1. NAMEN

Metoda je namenjena določanju vsebnosti voskov, metilnih estrov maščobnih kislin in etilnih estrov maščobnih kislin v oljčnih oljih. Posamezni voski in alkilni estri se ločijo glede na število atomov ogljika. Metoda se priporoča kot orodje za ločevanje med oljčnim oljem in oljem iz oljčnih tropin ter kot parameter kakovosti za ekstra deviška oljčna olja, s katerim je mogoče ugotavljati neprave mešanice ekstra deviških oljčnih olj z olji slabše kakovosti, torej z deviškimi, lampante ali nekaterimi razdišavljenimi olji.

2. PRINCIP

Olje, ki smo mu dodali ustrezne interne standarde, na z vodo omočenem silikagelu frakcioniramo s kolonsko kromatografijo. Ujamemo eluirano frakcijo najprej pri pogojih preskušanja (katere polarnost je manjša kot pri trigliceridih) in neposredno analiziramo s pomočjo kapilarne plinske kromatografije.

3. APARAT

3.1. **Erlenmajerica prostornine 25 ml.**

3.2. **Steklena kolona** za tekočinsko kromatografijo z notranjim premerom 15 mm, dolžine 30 do 40 cm in opremljena z ustreznim ventilom.

3.3. **Plinski kromatograf**, primeren za uporabo s kapilarno kolono, opremljen z injicirnim sistemom za injiciranje vzorca neposredno v kolono, ki zajema:

3.3.1. **Termostatsko kontrolirano peč s programirano temperaturo.**

3.3.2. **Injicirni sistem za hladno injiciranje** neposredno v kolono.

3.3.3. **Plamensko ionizacijski detektor in konverter-ojačevalec.**

3.3.4. **Registrator z integratorjem** (opomba 1) za delovanje s pretvornikom z ojačevalnikom (točka 3.3.3), z odzivnim časom, ki ne presega ene sekunde in s spremenljivo hitrostjo papirja.

Opomba 1: Računalniški sistemi se lahko uporabijo tudi, kadar se podatki o plinski kromatografiji vnesejo prek osebnega računalnika.

3.3.5. **Kvarčno kapilarno kolono (za analizo voskov ter metilnih in etilnih estrov)**, dolžine 8–12 m, notranjega premera 0,25–0,32 mm, znotraj prevlečena s tekočo fazo (opomba 2) do enotne debeline 0,10–0,30 μm.

Opomba 2: Za ta namen so na voljo ustrezne tekoče faze za komercialne namene, kakršne so SE52, SE54 in druge.

3.4. **Mikrobrizgalka**, 10 μl, z utrjeno iglo, za neposredno vbrizganje na začetek kolone.

3.5. **Električni vibrator.**

3.6. **Rotacijski izparilnik.**

3.7. **Žarilna peč.**

3.8. **Analitska** tehtnica, ki zagotavlja ± 0,1 mg natančnost.

3.9. Običajna laboratorijska steklovina.

4. REAGENTI

4.1. **Silikagel**, 60–200 μm mesh. Silikagel vsaj 4 ure žarimo v žarilni peči pri 500 °C. Pustimo, da se ohladi, in potem dodamo 2 % vode glede na količino uporabljenega silikagela. Dobro premešamo, da se suspenzija homogenizira, in pred uporabo hranimo vsaj 12 ur v eksikatorju.

4.2. **N-heksan**, kromatografske stopnje ali stopnje ostanka (čistost se lahko preveri).

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.

4.3. **Etil eter, kromatografske stopnje.**

OPOZORILO – Zelo vnetljiv in zmerno toksičen. Draži kožo. Škodljiv pri vdihavanju. Lahko poškoduje oči. Lahko učinkuje s časovnim zamikom. Formira lahko eksplozivne perokside. 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. Ne izparevajte do suhega ali skoraj suhega. Dodajanje vode ali ustreznega reducenta lahko reducira oblikovanje peroksida. Ne pijte. Ne vdihavajte hlapov. Izogibajte se daljšemu ali večkratnemu stiku s kožo.

4.4. **N-heptan** kromatografske stopnje ali **izo-oktan**.

OPOZORILO – Vnetljiv. Škodljiv pri vdihavanju. Ne približujte virom toplote, iskram ali neposrednemu ognju. Prepričajte se, da so steklenice vedno dobro zaprte. Med uporabo zagotovite ustrezno prezračevanje. Ne vdihavajte hlapov. Izogibajte se daljšemu ali večkratnemu stiku s kožo.

4.5. **Standardna raztopina lauril arahidata** (*opomba 3*) koncentracije 0,05 % (m/V) v heptanu (interni standard za voske).

Opomba 3: Uporabijo se lahko tudi palmitil palmitat, miristil stearat ali arahidil laureat.

4.6. **Standardna raztopina metilnega heptadekanoata koncentracije 0,02 % (m/V) v heptanu (interni standard za metilne in etilne estre).**

4.7. **Sudan 1 (1-fenilazo-2-naftol).**

4.8. **Nosilni plin: vodik ali helij, čist, plinske kromatografske stopnje.**

OPOZORILO

Vodik. Pod pritiskom zelo vnetljiv. Ne približujte virom toplote, iskram, neposrednemu ognju ali električnim aparatom, ki niso proizvedeni iz nevnetljivih materialov. Prepričajte se, da je ventil steklenice zaprt, kadar se vodik ne uporablja. Vedno uporabljajte z reducentom pritiska. Preden odprete ventil steklenice, sprostite napetost vzmeti reducenta. Pri odpiranju ventila ne stojte pred odprtino steklenice. Med uporabo zagotovite ustrezno prezračevanje. Ne pretakajte vodika iz ene steklenice v drugo. V steklenici ne mešajte plina. Prepričajte se, da steklenic ni mogoče prevrniti. Ne hranite jih na svetlobi in ob virih toplote. Hranite jih v okolju, ki je odporno na korozijo. Ne uporabljajte poškodovanih steklenic ali steklenic brez nalepke.

Helij. Stisnjen plin pod visokim pritiskom. Zmanjša količino kisika na voljo za dihanje. Steklenica naj bo zaprta. Med uporabo zagotovite ustrezno prezračevanje. Ne vstopajte v prostore za hranjenje, razen če so ustrezno prezračeni. Vedno uporabljajte z reducentom pritiska. Preden odprete ventil steklenice, sprostite napetost vzmeti reducenta. Ne pretakajte plina iz ene steklenice v drugo. Prepričajte se, da steklenic ni mogoče prevrniti. Pri odpiranju ventila ne stojte pred odprtino steklenice. Ne hranite jih na svetlobi in ob virih toplote. Hranite jih v okolju, ki je odporno na korozijo. Ne uporabljajte poškodovanih steklenic ali steklenic brez nalepke. Ne vdihavajte. Uporabljajte samo za tehnične namene.

4.9. **Pomožna plina**:

— Vodik, čist, plinske kromatografske stopnje.

— Zrak, čist, plinske kromatografske stopnje.

OPOZORILO

Zrak. Stisnjen plin pod visokim pritiskom. Uporabljajte previdno v prisotnosti vnetljivih snovi, saj je temperatura, potrebna za samovžig večine organskih sestavin zraka pod visokim pritiskom znatno nižja. Prepričajte se, da je ventil steklenice zaprt, kadar se vodik ne uporablja. Vedno uporabljajte reducent pritiska. Preden odprete ventil steklenice, sprostite napetost vzmeti reducenta. Pri odpiranju ventila ne stojte pred odprtino steklenice. Ne pretakajte plina iz ene steklenice v drugo. V steklenici ne mešajte plina. Prepričajte se, da steklenic ni mogoče prevrniti. Ne hranite jih na svetlobi in ob virih toplote. Hranite jih v okolju, ki je odporno na korozijo. Ne uporabljajte poškodovanih steklenic ali steklenic brez nalepke. Zraka za tehnične namene se ne sme uporabljati za vdihavanje ali dihalne naprave.

5. POSTOPEK

5.1. **Priprava kromatografske kolone**

V n-heksanu (točka 4.2) suspendiramo 15 g silikagela (točka 4.1) in napolnimo kolono (točka 3.2). Počakamo, da se posede. Homogenost posedanja, ki omogoči homogene kromatografske pasove, lahko dosežemo z uporabo električnega vibratorja. Spiramo s 30 ml n-heksana, da odstranimo vse morebitne nečistoče. V 25-ml bučko (točka 3.1) z analitsko tehtnico (točka 3.8) natehtamo natanko 500 mg vzorca in dodamo ustrezno količino internega standarda (točka 4.5), ki je odvisna od pričakovane vsebnosti voskov, npr. pri oljčnem olju dodamo 0,1 mg lauril arahidata, pri olju iz oljčnih tropin 0,25 do 0,50 mg in 0,05 mg metil heptadekanoata pri oljčnih oljih (točka 4.6).

Tako pripravljen vzorec prenesemo v kromatografsko kolono s pomočjo dveh 2-ml odmerkov n-heksana (točka 4.2).

Topilo izpuščamo iz kolone tako dolgo, da doseže 1 mm nad zgornjim robom absorbenta. Nadalje spiramo z n-heksanom/etilnim etrom (99:1) in zberemo 220 ml pri pretoku približno 15 kapljic vsakih 10 sekund. (**Ta frakcija vsebuje metilne in etilne estre ter voske**). (*opomba 4*) (*opomba 5*).

Opomba 4: Vsak dan je treba pripraviti svežo mešanico n-heksana/etilnega etra (99:1).

Opomba 5: Za opazovanje pravilnega eluiranja voskov lahko vzorcu v raztopini dodamo 100 µl 1-odstotnega sudana I v elucijski mešanici.

Barvilo ima vmesno retencijo med voski in trigliceridi. Zato je treba elucijo suspendirati, ko obarvanje doseže dno kromatografske kolone, ker so se eluirali vsi voski.

Iz tako dobljene frakcije na rotavaporju odparimo skoraj vse topilo. Preostala 2 ml odstranimo s pomočjo blagega toka dušika. Zbrano frakcijo, ki vsebuje metilne in etilne estre, razredčimo z 2 do 4 ml n-heptana ali izo-oktana.

5.2. **Plinsko kromatografska analiza**

5.2.1. *Postopek*

Kolono pritrdimo na plinski kromatograf (točka 3.3), in sicer vstopni del na injektor, izhodnega pa na detektor. Preverimo plinski kromatograf (plinske povezave, pravilno delovanje detektorja in rekorderja itd.).

Če kolono uporabljamo prvič, jo je priporočljivo kondicionirati. Pri majhnem pretoku plina skozi kolono vključimo plinski kromatograf. Postopoma segrevamo, tako da po približno 4 urah dosežemo temperaturo 350 °C.

Pri tej temperaturi kolono kondicioniramo vsaj 2 uri, nato uravnamo instrument v skladu s pogoji delovanja (uravnamo pretok plina, prižgemo plamen, povežemo z elektronskim rekorderjem (točka 3.3.4), naravnamo delovno temperaturo peči, naravnamo detektor itd.). Pri občutljivosti, ki je vsaj dvakrat večja od delovne, posnamemo bazno linijo. Le-ta mora biti linearna, brez vrhov in brez kakršnih koli odstopanj.

Negativno premočrtni odklon kaže na slabo tesnjenje med kolono in instrumentom, pozitiven odklon pa na slabo kondicionirano kolono.

5.2.2. *Izbira delovnih pogojev za voske ter metilne in etilne estre (opomba 6).*

Splošni delovni pogoji, ki jih je treba upoštevati, so naslednji:

— Temperatura kolone:

20 °C/min 5 °C/min

80 °C najprej (1′) ——— 140 °C ——— 335 °C (20)

— Temperatura detektorja: 350 °C.

— Brizg: 1 µl raztopine (2–4 ml) n-heptana.

— Nosilni plin: helij ali vodik z optimalno linearno hitrostjo izbranega plina (glej Dodatek A).

— Občutljivost instrumenta: primerna za izpolnjevanje zgoraj navedenih pogojev.

Opomba 6: Zaradi visoke končne temperature je pozitivni odklon dovoljen, a ne sme preseči 10 % polne vrednosti skale.

Te pogoje lahko spremenimo, da bi zadostili značilnostim kolone in plinskega kromatografa, ločili vse voske ter metilne in etilne estre maščobnih kislin ter dosegli zadovoljivo najvišjo separacijo (glej slike 2, 3 in 4) in retencijski čas, ki za interni standard lauril arahidata znaša 18 ± 3 minute. Najznačilnejši vrh voskov mora biti najmanj 60 % od spodnjega dela skale, interni standard metilnega heptadekanoata za metilne in etilne estre pa mora doseči polno vrednost skale.

Vrhove integracijskih parametrov moramo določiti na tak način, da bomo dobili pravilno vrednotenje zadevnih površin vrhov.

5.3. **Izvedba analize**

Z 10-µl mikrobrizgalko vzamemo 10 µl raztopine; bat potegnemo nazaj, da se igla izprazni. Iglo vbodemo v injektor in po eni ali dveh sekundah hitro vbrizgnemo. Iglo po približno petih sekundah nežno izvlečemo.

Kromatogram snemamo, dokler ne eluirajo vsi voski oziroma stigmastadieni, odvisno od frakcije, ki jo analiziramo.

Bazna linija mora ves čas izpolnjevati zahtevane pogoje.

5.4. **Identifikacija vrhov**

Vrhove identificiramo s pomočjo retencijskih časov s primerjavo med mešanicami voskov z znanimi retencijskimi časi, ki so bili analizirani pri istih pogojih. Alkilni estri se določijo iz mešanic metilnih in etilnih estrov glavnih maščobnih kislin v oljčnih oljih (palmitinskih in oleinskih).

Slika 1 prikazuje kromatogram voskov deviškega oljčnega olja. Sliki 2 in 3 prikazujeta kromatograma dveh ekstra deviških oljčnih olj v prodaji, od katerih eno vsebuje metilne in etilne estre, drugo pa ne. Slika 4 prikazuje kromatogram za ekstra deviško oljčno olje najvišje kakovosti in isto olje, mešano z 20 % razdišavljenega olja.

5.5. **Kvantitativna analiza voskov**

S pomočjo integratorja določimo površine vrhov alifatskih estrov od C_{40} do C_{46} in površino vrhov internega standarda lauril arahidata.

Skupno vsebnost voskov določimo z dodajanjem vsakega voska posebej v mg/kg maščobe, kot sledi:

$$\text{Voski, mg/kg} = \frac{(\Sigma A_x) \cdot m_{s.} \cdot 1\,000}{A_{s.} \cdot m}$$

kjer je:

A_x = površina vrha za posamezni ester z računalniškim preštevanjem;

A_s = površina vrha za interni standard lauril arahidata ester z računalniškim preštevanjem;

m_s = masa dodanega internega standarda lauril arahidata, v miligramih;

m = masa vzorca za določanje, v gramih.

5.5.1. *Kvantitativna analiza metilnih in etilnih estrov*

S pomočjo integratorja določimo površine vrhov internega standarda metil heptadekanoata, maščobnih kislin metilnih estrov C_{16} in C_{18} ter maščobnih kislin etilnih estrov C_{16} in C_{18}.

Določimo vsebnost vsakega alkilnega estra v mg/kg maščobe, kot sledi

$$\text{Ester, mg/kg} = \frac{A_x \cdot m_{s.} \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

kjer je:

A_x = površina vrha za posamezni ester C_{16} in C_{18} z računalniškim preštevanjem;

A_s = površina vrha za interni standard metil heptadekanoata z računalniškim preštevanjem;

m_s = masa dodanega internega standarda metil heptadekanoata, v miligramih;

m = masa vzorca za določanje, v gramih.

6. PODAJANJE REZULTATOV

Podamo vsoto vsebnosti različnih voskov od C_{40} do C_{46} (*opomba 7*) v miligramih na kilogram maščobe.

Podamo vsoto vsebnosti metilnih estrov in etilnih estrov od C_{16} do C_{18} ter vsoto obeh skupaj.

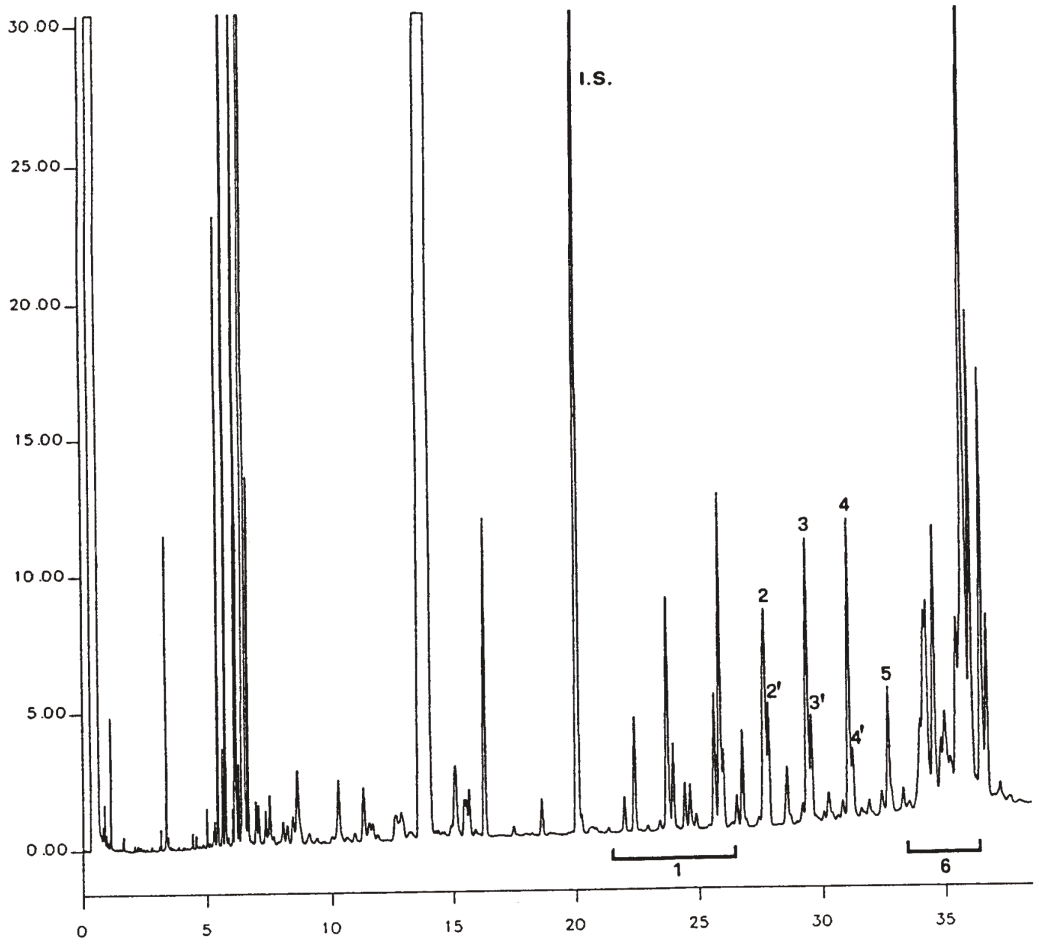
Rezultate izrazimo do najbližjega mg/kg.

Opomba 7: Spojine, ki jih je treba količinsko določiti, se nanašajo na vrhove s sodim številom ogljikovih atomov med estri C_{40} do C_{46}, tako kot je to prikazano na primeru kromatograma voskov oljčnega olja v priloženi sliki. Za namene določanja se v primeru, da je ester C_{46} razdeljen, priporoča, da se analizira voskova frakcija olja iz oljčnih tropin, pri čemer je vrh C_{46} razločen, ker je jasno prevladuje.

Podamo razmerje med etilnimi estri in metilnimi estri.

Slika 1

Primer plinskega kromatograma voskove frakcije oljčnega olja (*)



Vrhovi z retencijo med 5 in 8 min metilnih in etilnih estrov maščobnih kislin

Ključ:

I.S. = lauril arahidat

1 = diterpenski estri

2+2′ = estri C_{40}

3+3′ = estri C_{42}

4+4′ = estri C_{44}

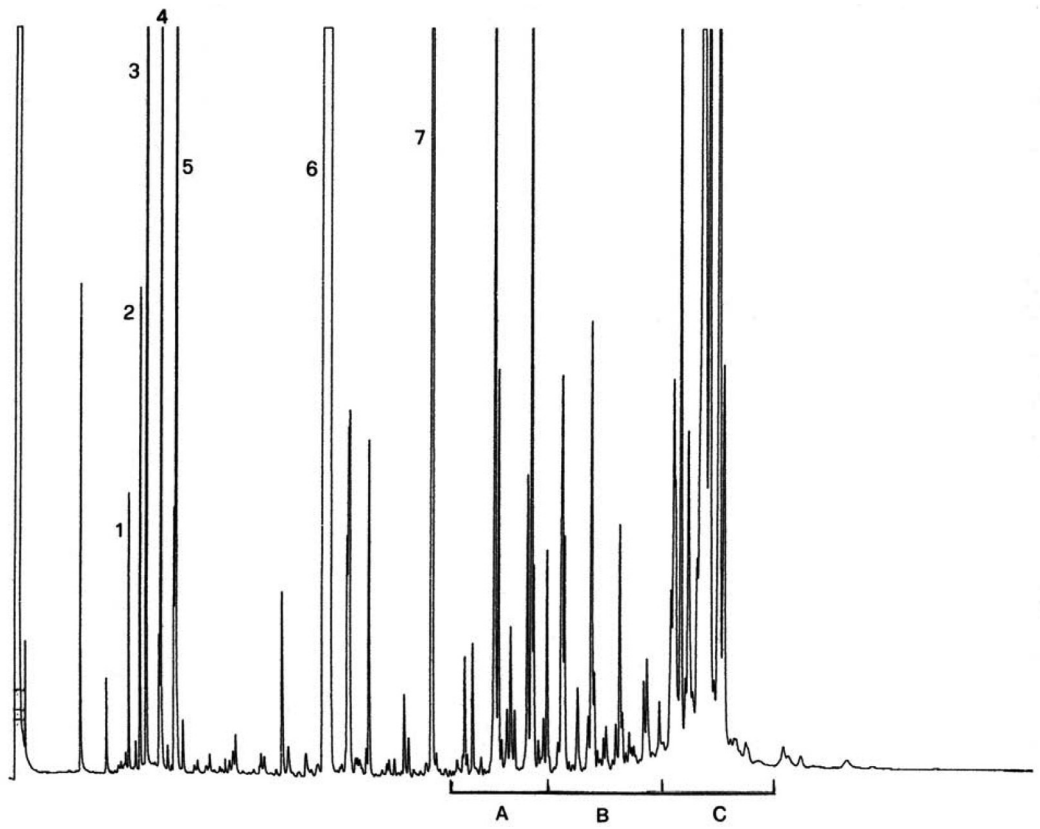
5 = estri C_{46}

6 = sterolni estri in triterpenski alkoholi

(*) Po eluciji sterolnih estrov kromatogram ne sme imeti izpostavljenih vrhov (trigliceroli).

Slika 2

Metilni estri, etilni estri in voski v deviškem oljčnem olju



Ključ:

1 – metil C_{16}

2 – etil C_{16}

3 – I.S. metil heptadekanoata

4 – metil C_{18}

5 – etil C_{18}

6 – skvalen

7 – I.S. lauril arahidata

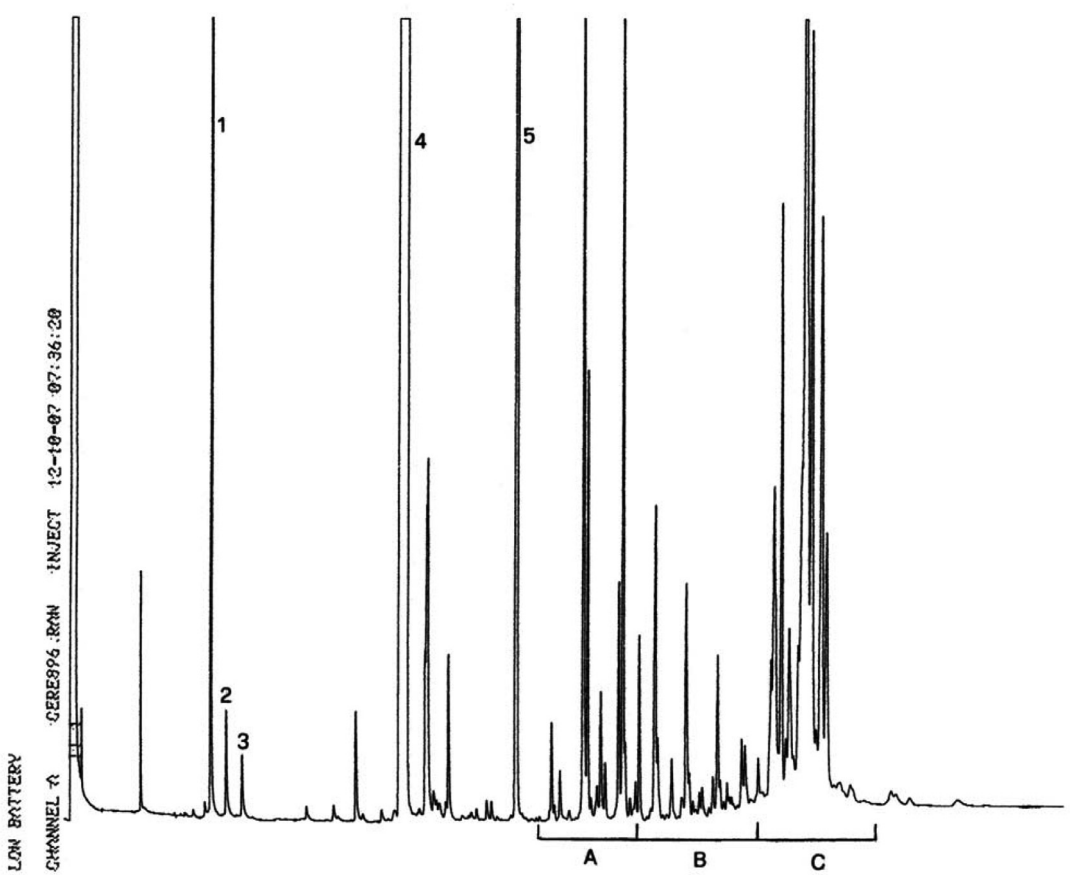
A – diterpenski estri

B – voski

C – sterolni estri in triterpenski estri

Slika 3

Metilni estri, etilni estri in voski v ekstra deviškem oljčnem olju



Ključ:

1 – I.S. metil heptadekanoata

2 – metil C_{18}

3 – etil C_{18}

4 – skvalen

5 – I.S. lauril arahidata

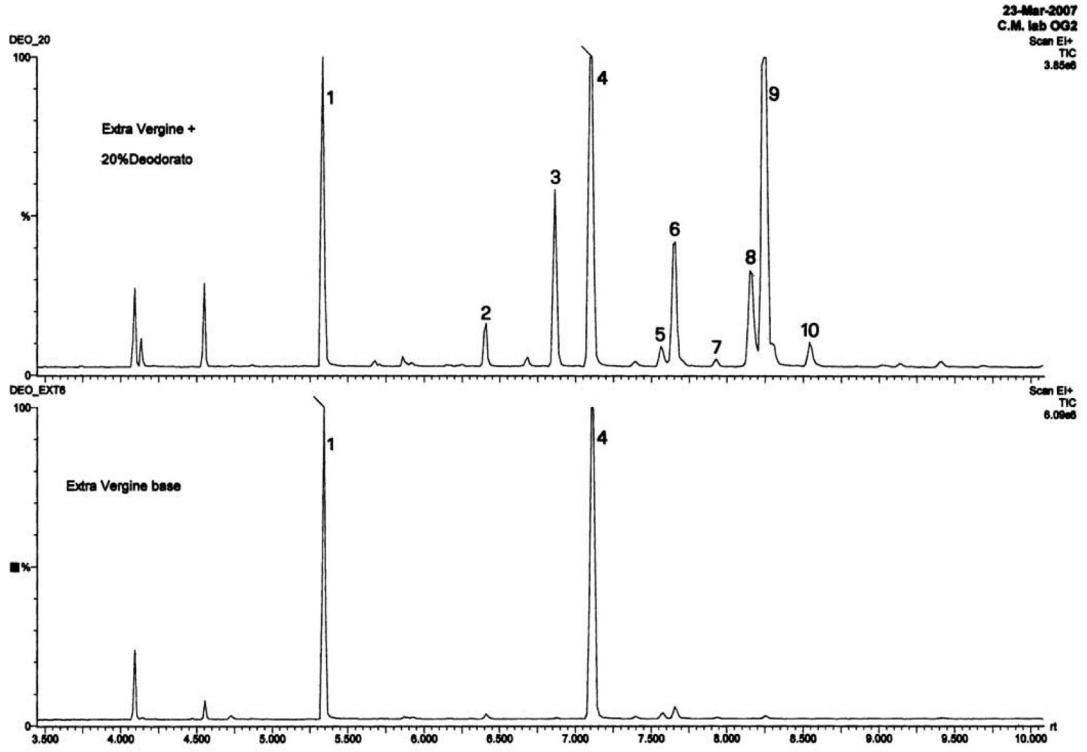
A – diterpenski estri

B – voski

C – sterolni estri in triterpenski estri

Slika 4

Del kromatograma za ekstra deviško oljčno olje in isto olje, mešano z razdišavljenim oljem



Ključ:

1 – I.S. metil miristata

2 – metil palmitat

3 – etil palmitat

4 – I.S. metil heptadekanoata

5 – metil linoleat

6 – metil oleat

7 – metil stearat

8 – etil linoleat

9 – etil oleat

10 – etil stearat

Dodatek A

Določitev linearne hitrosti plina

V plinski kromatograf, ki je naravnan na delovne pogoje, vbrizgnemo 1:3 µl metana (propana). Merimo čas, ki ga plin potrebuje za pot skozi kolono od trenutka vbrizga do trenutka, ko se pojavi vrh (tM).

Linearna hitrost v cm/s je podana z L/tM, pri čemer je L dolžina kolone v centimetrih in tM izmerjeni čas v sekundah.“