II

(Acte fără caracter legislativ)

REGULAMENTE

REGULAMENTUL (UE) NR. 61/2011 AL COMISIEI

din 24 ianuarie 2011

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

COMISIA EUROPEANĂ,

având în vedere Tratatul privind funcționarea Uniunii Europene,

având în vedere Regulamentul (CE) nr. 1234/2007 al Consiliului din 22 octombrie 2007 de instituire a unei organizări comune a piețelor agricole și privind dispoziții specifice referitoare la anumite produse agricole („Regulamentul unic OCP") [1], în special articolul 113 alineatul (1) litera (a) și articolul 121 litera (h), coroborate cu articolul 4,

întrucât:

(1) Regulamentul (CEE) nr. 2568/91 [2] al Comisiei definește caracteristicile fizice și chimice ale uleiurilor de măsline și ale uleiurilor din turte de măsline și metodele de analiză a caracteristicilor respective. Metodele menționate și valorile limită pentru caracteristicile uleiurilor trebuie actualizate în temeiul opiniilor unor experți chimiști și în concordanță cu rezultatele lucrărilor Consiliului Oleicol Internațional.

(2) În speță, deoarece experții chimiști au ajuns la concluzia că conținutul de esteri etilici ai acizilor grași și de esteri metilici ai acizilor grași constituie un parametru al calității uleiurilor de măsline extravirgine, este necesar să se introducă valori limită ale acestor esteri, precum și o metodă pentru determinarea conținutului lor.

(3) Pentru a permite o perioadă de adaptare la noile standarde, pentru introducerea mijloacelor necesare aplicării acestora și pentru a evita perturbarea tranzacțiilor comerciale, modificările aduse regulamentului menționat trebuie să se aplice de la 1 aprilie 2011. Din aceleași motive, este necesar să se dispună ca uleiurile de măsline fabricate și etichetate legal în Uniunea Europeană sau importate legal în Uniunea Europeană și puse în liberă circulație înainte de această dată să fie comercializate până la epuizarea tuturor stocurilor.

(4) Prin urmare, Regulamentul (CEE) nr. 2568/91 trebuie modificat în consecință.

(5) Măsurile prevăzute de prezentul regulament sunt conforme cu avizul Comitetului de gestionare a organizării comune a piețelor agricole,

ADOPTĂ PREZENTUL REGULAMENT:

Articolul 1

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

1) La articolul 2 alineatul (1) se adaugă următoarea liniuță:

„— pentru determinarea conținutului de ceruri, esteri metilici ai acizilor grași și esteri etilici ai acizilor grași prin cromatografie în fază gazoasă cu coloană capilară, metoda descrisă în anexa XX"

2) În sumarul anexelor se adaugă următorul text:

„Anexa XX: Metoda pentru determinarea conținutului de ceruri, esteri metilici ai acizilor grași și esteri etilici ai acizilor grași prin cromatografie în fază gazoasă cu coloană capilară"

3) Anexa I se înlocuiește cu textul anexei I la prezentul regulament.

4) Se adaugă anexa XX în conformitate cu anexa II la prezentul regulament.

Articolul 2

Produsele fabricate și etichetate legal în Uniunea Europeană sau importate legal în Uniunea Europeană și puse în liberă circulație înainte de 1 aprilie 2011 pot fi comercializate până la epuizarea stocurilor.

[1] JO L 299, 16.11.2007, p. 1.
[2] JO L 248, 5.9.1991, p. 1.

Articolul 3

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

Se aplică de la 1 aprilie 2011.

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

Adoptat la Bruxelles, 24 ianuarie 2011.

Pentru Comisie
Președintele
José Manuel BARROSO

ANEXA I

„ANEXA I

CARACTERISTICILE ULEIURILOR DE MĂSLINE

Categorie	Esteri metilici ai acizilor grași [Fatty acid methyl esters (FAME)] și esteri etilici ai acizilor grași [Fatty acid ethyl esters (FAEE)]	Aciditate (%) (*)	Indice de peroxid mEq O_2/kg (*)	Ceară mg/kg (**)	Monopalmitat de 2-gliceril (%)	Stigmastadienol mg/kg (1)	Diferență ECN42 (HPLC) și ECN42 Calcul teoretic	K_{232} (*)	K_{270} (*)	Delta-K (*)	Evaluare organoleptică Valoarea medie a defectului (Md) (*)	Evaluare organoleptică Valoarea medie a atributului fructat (Mf) (*)
1. Ulei de măsline virgin extra	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg/kg sau 75 mg/kg < Σ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg și (FAEE/FAME) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 dacă % acid palmitic total ≤ 14 % ≤ 1,0 dacă % acid palmitic total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Ulei de măsline virgin	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 dacă % acid palmitic total ≤ 14 % ≤ 1,0 dacă % acid palmitic total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
3. Ulei de măsline lampant	—	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 dacă % acid palmitic total ≤ 14 % ≤ 1,1 dacă % acid palmitic total > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (2)	—
4. Ulei de măsline rafinat	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 dacă % acid palmitic total ≤ 14 % ≤ 1,1 dacă % acid palmitic total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Ulei de măsline - compus din uleiuri de măsline rafinate și uleiuri de măsline virgine	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 dacă % acid palmitic total ≤ 14 % ≤ 1,0 dacă % acid palmitic total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Ulei brut din resturi de măsline	—	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Ulei rafinat din resturi de măsline	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Ulei din resturi de măsline	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Suma izomerilor care ar putea să fie (sau să nu fie) separați prin coloana capilară.
(2) Sau atunci când valoarea medie a defectului este mai mică sau egală cu 3,5 și valoarea medie a atributului fructat este egală cu 0.
(3) Uleiurile cu un conținut de ceară cuprins între 300 mg/kg și 350 mg/kg sunt considerate drept ulei de măsline lampant în cazul în care cantitatea de alcooli alifatici totali este mai mică sau egală cu 350 mg/kg sau procentul de eritrodiol și uvaol este mai mic sau egal cu 3,5 %.
(4) Uleiurile cu un conținut de ceară cuprins între 300 mg/kg și 350 mg/kg sunt considerate drept ulei brut din resturi de măsline în cazul în care cantitatea de alcooli alifatici totali depășește 350 mg/kg și procentul de eritrodiol și uvaol este mai mare de 3,5 %.

Categorie	Conținutul de acizi (1)						Sumele izomerilor trans ai uleiului oleic (%)	Sumele izomerilor trans ai uleiului linoleic și ai uleiului linolenic (%)	Conținutul de steroli						Steroli totali (mg/kg)	Eritrodiol și uvaol (%) (**)
	Miristic (%)	Linolenic (%)	Arahidic (%)	Eicosanoic (%)	Behenic (%)	Lignoceric (%)			Colesterol (%)	Brassicasterol (%)	Campesterol (%)	Stigmasterol (%)	Betasitosterol (%) (2)	Delta-7-Stigmastenol (%)		
1. Ulei de măsline extravirgin	≤ 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. Ulei de măsline virgin	≤ 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. Ulei de măsline lampant	≤ 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. Ulei de măsline rafinat	≤ 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. Ulei de măsline - compus din uleiuri de măsline rafinate și uleiuri de măsline virgine	≤ 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. Ulei brut din resturi de măsline	≤ 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. Ulei rafinat din resturi de măsline	≤ 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. Ulei din resturi de măsline	≤ 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) Conținutul de alți acizi grași (%): palmitic: 7,5 - 20,0; palmitoleic: 0,3 - 3,5; heptadecanoic: ≤ 0,3; heptadecenoic: ≤ 0,3; stearic: 0,5 - 5,0; oleic: 55,0 - 83,0; linoleic: 3,5 - 21,0.

(2) Suma dintre : Delta-5,23-stigmastadienol+colesterol+betasitosterol+sitostanol+delta-5-avenasterol+delta-5,24-stigmastadienol.

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

(4) Uleiurile cu un conținut de ceară cuprins între 300 mg/kg și 350 mg/kg sunt considerate drept ulei brut din resturi de măsline în cazul în care cantitatea de alcooli alifatici totali depășește 350 mg/kg și procentul de eritrodiol și uvaol este mai mare de 3,5.

Note:

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

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

c) Caracteristicile indicate cu asterisc (*), care fac referire la calitatea uleiului, semnifică următoarele:
— pentru uleiul de măsline lampant, limitele aferente pot să nu fie respectate în mod simultan;
— pentru uleiurile de măsline virgine, nerespectarea cel puțin a uneia dintre aceste limite implică schimbarea categoriei, cu toate că uleiul rămâne clasificat într-una din categoriile de uleiuri de măsline virgine.

d) Caracteristicile indicate cu două asteriscuri (**), care fac referire la calitatea uleiului, semnifică că, pentru toate uleiurile din resturi de măsline, limitele aferente pot să nu fie respectate în mod simultan.”

ANEXA II

„ANEXA XX

Metoda pentru determinarea conținutului de ceruri, esteri metilici ai acizilor grași și esteri etilici ai acizilor grași prin cromatografie în fază gazoasă cu coloană capilară

1. SCOP

Această metodă se utilizează pentru determinarea conținutului de ceruri, esteri metilici ai acizilor grași și esteri etilici ai acizilor grași în uleiurile de măsline. Cerurile și esterii alchilici se separă în funcție de numărul atomilor de carbon. Metoda se recomandă ca instrument pentru a face distincția între uleiul de măsline și uleiul din turte de măsline, precum și ca parametru de calitate pentru uleiurile de măsline extravirgine, permițând detectarea amestecurilor frauduloase de uleiuri de măsline extravirgine cu uleiuri de calitate inferioară, indiferent dacă este vorba despre uleiuri de măsline virgine, lampante sau unele uleiuri deodorizate.

2. PRINCIPIU

Adăugarea unor standarde interne adecvate pentru ulei, apoi fracționarea prin cromatografie pe o coloană cu silicagel hidratat. Recuperarea fracției eluate în condițiile de testare (cu o polaritate mai mică decât cea a triacilglicerolilor), apoi analiza directă prin cromatografie în fază gazoasă cu coloană capilară.

3. APARATURĂ

3.1. **Pahar Erlenmayer, 25 ml.**

3.2. **Coloană de sticlă** pentru cromatografie în fază lichidă, diametru interior 15 mm, înălțime 30-40 cm, echipată cu un robinet adecvat.

3.3. **Cromatograf în fază gazoasă** adecvat pentru funcționarea cu coloană capilară, echipat cu un sistem de introducere directă în coloană, alcătuit din:

3.3.1. **Cuptor cu control prin termostat cu temperatură programabilă.**

3.3.2. **Injector la rece** pentru introducere directă în coloană

3.3.3. **Detector cu ionizare în flacără și convertor-amplificator.**

3.3.4. **Aparat de înregistrare-integrator** (nota 1) adaptat la funcționarea cu un convertor-amplificator (punctul 3.3.3) cu timp de răspuns de cel mult o secundă și cu viteză a hârtiei variabilă.

Nota 1: Se pot utiliza de asemenea sisteme computerizate dacă datele pentru cromatografia în fază gazoasă se introduc printr-un PC.

3.3.5. **Coloană capilară din silice topită (pentru analiza cerurilor și a esterilor metilici și etilici)**, lungime 8-12 m, diametru interior 0,25-0,32 mm, acoperire în interior cu fază lichidă (nota 2) într-un strat de grosime uniformă cuprinsă între 0,10-0,30 μm.

Nota 2: Există în comerț faze lichide care pot fi folosite în acest scop, de exemplu SE52, SE54 etc.

3.4. **Microseringă**, 10 μl, cu ac călit, pentru injecție directă pe coloană.

3.5. **Agitator electric.**

3.6. **Evaporator rotativ.**

3.7. **Cuptor cu muflă.**

3.8. **Balanță analitică** pentru cântărirea cu o acuratețe de ± 0,1 mg.

3.9. Sticlărie de laborator obișnuită.

4. REACTIVI

4.1. **Silicagel**, 60-200 µm. Silicagelul se păstrează în cuptorul cu muflă la 500 °C timp de cel puțin patru ore. Se lasă să se răcească, apoi se adaugă 2% apă în raport cu cantitatea de silicagel utilizată. Se agită bine pentru omogenizarea suspensiei și se păstrează în desicator timp de cel puțin 12 ore înainte de utilizare.

4.2. **n-hexan**, pentru cromatografie sau analiza reziduurilor (puritatea trebuie verificată).

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

4.3. **Eter etilic, pentru cromatografie.**

AVERTISMENT – Foarte inflamabil și cu toxicitate moderată. Irită pielea. Toxic la inhalare. Poate provoca leziuni ale ochilor. Efectele pot apărea cu întârziere. Poate da naștere unor peroxizi explozivi. Gazele de evacuare se pot aprinde. A se ține la distanță de surse de căldură, scântei sau flăcări deschise. A se verifica întotdeauna etanșeitatea recipientelor. A se asigura ventilarea corespunzătoare în timpul utilizării. A se evita acumularea gazelor de evacuare și a se lua măsuri de eliminarea a oricăror surse de incendiu, precum radiatoarele sau aparatele electrice care nu sunt fabricate din materiale neinflamabile. A nu se evapora până la desicare totală sau cvasitotală. Adăugarea de apă sau alt agent reducător adecvat poate diminua formarea de peroxizi. A nu se ingera. A se evita inspirarea gazelor de evacuare A se evita contactul prelungit sau repetat cu pielea.

4.4. **n-heptan**, pentru cromatografie, sau **izooctan**.

AVERTISMENT – Inflamabil. Toxic la inhalare. A se ține la distanță de surse de căldură, scântei sau flăcări deschise. A se verifica întotdeauna etanșeitatea recipientelor. A se asigura ventilarea corespunzătoare în timpul utilizării. A se evita inspirarea gazelor de evacuare A se evita contactul prelungit sau repetat cu pielea.

4.5. **Soluție standard de lauril arahidat** (*nota 3*), la 0,05 % (m/V) în heptan (standard intern pentru ceruri).

Nota 3: Se poate utiliza, de asemenea, palmitat de palmitil, stearat de miristil sau laureat de arahidil.

4.6. **Soluție standard de metil heptadecanoat, la 0,02 % (m/V) în heptan (standard intern pentru esteri metilici și etilici).**

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

4.8. **Gaz transportor: hidrogen sau heliu, pur, pentru cromatografie în fază gazoasă.**

AVERTISMENT

Hidrogen. Foarte inflamabil, sub presiune. A se ține la distanță de surse de căldură, scântei, flăcări deschise sau aparate electrice care nu sunt fabricate din materiale neinflamabile. A se verifica dacă supapa buteliei este bine închisă atunci când aceasta nu este utilizată. A se utiliza întotdeauna cu reductor de presiune. A se slăbi resortul reductorului înainte de a deschide supapa buteliei. Nu stați în fața punctului de ieșire a gazului din butelie la deschiderea supapei. A se asigura ventilarea corespunzătoare în timpul utilizării. A nu se transfera hidrogen dintr-o butelie în alta. A nu se amesteca gazul din butelie. Asigurați-vă că buteliile nu pot fi răsturnate. A se păstra la adăpost de lumina soarelui și de surse de căldură. A nu se depozita în mediu corosiv. A nu se utiliza butelii deteriorate sau neetichetate.

Heliu. Gaz comprimat sub presiune ridicată. Reduce cantitatea de oxigen disponibilă pentru respirație. A se păstra recipientul închis. A se asigura ventilarea corespunzătoare în timpul utilizării. A nu se intra în spațiile de depozitare dacă nu sunt ventilate adecvat. A se utiliza întotdeauna cu reductor de presiune. A se slăbi resortul reductorului înainte de a deschide supapa buteliei. A nu se transfera gaz dintr-o butelie în alta. Asigurați-vă că buteliile nu pot fi răsturnate. Nu stați în fața punctului de ieșire a gazului din butelie la deschiderea supapei. A se păstra la adăpost de lumina soarelui și de surse de căldură. A nu se depozita în mediu corosiv. A nu se utiliza butelii deteriorate sau neetichetate. A nu se inhala. A se utiliza exclusiv pentru aplicații tehnice.

4.9. **Gaze auxiliare**:

— hidrogen, pur, pentru cromatografie în fază gazoasă.

— aer, pur, pentru cromatografie în fază gazoasă.

AVERTISMENT

Aer. Gaz comprimat sub presiune ridicată. A se utiliza cu atenție în prezența substanțelor combustibile, deoarece temperatura de autoaprindere pentru majoritatea compușilor organici în aer se reduce substanțial la presiune mare. A se verifica dacă supapa buteliei este bine închisă atunci când aceasta nu este utilizată. A se utiliza întotdeauna un reductor de presiune. A se slăbi resortul reductorului înainte de a deschide supapa buteliei. Nu stați în fața punctului de ieșire a gazului din butelie la deschiderea supapei. A nu se transfera gaz dintr-o butelie în alta. A nu se amesteca gazul din butelie. Asigurați-vă că buteliile nu pot fi răsturnate. A se păstra la adăpost de lumina soarelui și de surse de căldură. A nu se depozita în mediu corosiv. A nu se utiliza butelii deteriorate sau neetichetate. Aerul destinat utilizării în aplicații tehnice nu trebuie inhalat sau utilizat pentru aparatele de respirat.

5. PROCEDURA

5.1. **Pregătirea coloanei cromatografice**

Se prepară o suspensie de 15 g de silicagel (punctul 4.1) în n-hexan (punctul 4.2) și se introduce pe coloană (punctul 3.2). Se lasă să se clarifice spontan. Se definitivează clarificarea cu ajutorul unui agitator electric pentru a face banda de cromatografie mai omogenă. Se percolează 30 ml de n-hexan pentru a înlătura orice impurități. Cu ajutorul balanței analitice (punctul 3.8), se cântăresc exact 500 mg de probă într-o fiolă de 25 ml (punctul 3.1) și se adaugă o cantitate adecvată de soluție standard intern (punctul 4.5), în funcție de conținutul de ceară estimat, de exemplu se adaugă 0,1 mg de lauril arahidat în cazul uleiului de măsline, 0,25-0,50 mg în cazul uleiului din turte de măsline și 0,05 mg de metil heptadecanoat în cazul uleiurilor de măsline (punctul 4.6).

Se transferă proba preparată în coloana cromatografică cu ajutorul dozelor de 2 ml de n-hexan (punctul 4.2).

Se lasă solventul să curgă până la 1 mm deasupra nivelului superior al absorbantului. Se percolează un amestec de n-hexan/eter etilic (99:1) și se colectează 220 ml la un debit de aproximativ 15 picături la fiecare 10 secunde. **(Această fracțiune conține esterii metilici, esterii etilici și cerurile).** (*Nota 4*) (*Nota 5*).

Nota 4: Amestecul de n-hexan/eter etilic (99:1) trebuie să fie proaspăt pregătit în fiecare zi.

Nota 5: Pentru a verifica vizual eluția corectă a cerurilor, se poate adăuga la soluția probei 100 µl de colorant Sudan I diluat la 1 % în amestecul de eluție.

Colorantul are un timp de retenție cuprins între cel al cerurilor și cel al triacilglicerolilor. Prin urmare, atunci când colorantul atinge fundul coloanei cromatografice, eluția trebuie suspendată deoarece toate cerurile au fost eluate.

Se evaporă fracțiunile rezultate într-un evaporator rotativ până când aproape tot solventul este eliminat. Se elimină ultimii 2 ml de solvent cu ajutorul unui curent slab de azot. Se colectează fracțiunea care conține esterii metilici și etilici, diluată cu 2-4 ml de n-heptan sau izooctan.

5.2. **Analiza prin cromatografie în fază gazoasă**

5.2.1. *Procedura preliminară*

Se instalează coloana în cromatograful în fază gazoasă (punctul 3.3), conectând extremitatea de intrare la sistemul coloanei și extremitatea de ieșire la detector. Se verifică aparatura pentru cromatografia în fază gazoasă (funcționarea buclelor cu gaz, eficiența detectorului și a aparatului înregistrator etc.).

În cazul în care coloana este folosită pentru prima dată, se recomandă condiționarea sa. Se trece un debit slab de gaz prin coloană, apoi se deschide aparatul de cromatografie în fază gazoasă. Se încălzește treptat până la atingerea unei temperaturi de 350 °C, după aproximativ patru ore.

Se menține această temperatură timp de cel puțin două ore, apoi se reglează aparatul la condițiile de funcționare [se reglează debitul de gaz, se aprinde flacăra, se conectează la aparatul înregistrator electronic (punctul 3.3.4), se reglează temperatura cuptorului pentru coloană, detectorul etc.]. Se înregistrează semnalul la o sensibilitate cel puțin de două ori mai mare decât cea necesară pentru analiză. Traseul liniei de bază obținute trebuie să fie liniar, fără valori de vârf, de orice natură, și să nu prezinte abateri.

O abatere negativă în linie dreaptă indică faptul că nu sunt efectuate corect conexiunile coloanei, iar o abatere pozitivă indică faptul că nu a fost condiționată corect coloana.

5.2.2. *Alegerea condițiilor de funcționare pentru ceruri, esteri metilici și esteri etilici (Nota 6)*

Condițiile de funcționare care trebuie respectate sunt, în general, următoarele:

— Temperatura coloanei:

20 °C/min 5 °C/min

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

— Temperatura detectorului: 350 °C.

— Cantitatea injectată: 1 µl de soluție (2-4 ml) de n-heptan.

— Gaz transportor: heliu sau hidrogen cu viteză lineară optimă pentru gazul ales (a se vedea apendicele A).

— Sensibilitatea instrumentelor: adecvată pentru îndeplinirea condițiilor de mai sus.

Nota 6: Datorită temperaturii finale ridicate, este permisă o abatere pozitivă care să nu depășească însă 10 % din valoarea maximă admisibilă la citire.

Aceste condiții se pot modifica pentru a se adapta caracteristicilor coloanei și ale cromatografului în fază gazoasă, în scopul separării tuturor cerurilor și esterilor metilici și etilici ai acizilor grași, precum și în scopul obținerii unei separări a vârfurilor satisfăcătoare (a se vedea figurile 2, 3 și 4) și a unui timp de retenție de 18 ± 3 minute pentru standardul intern de lauril arahidat. Vârful cel mai reprezentativ al cerurilor trebuie să fie peste 60 % din valoarea maximă admisibilă la citire, în timp ce standardul intern de metil heptadecanoat pentru esterii metilici și etilici trebuie să atingă valoarea maximă admisibilă la citire.

Se determină parametrii de integrare a vârfurilor în așa fel încât să se obțină o evaluare corectă a suprafeței vârfurilor luate în considerare.

5.3. **Realizarea analizei**

Se iau 10 µl de soluție cu ajutorul unei microseringi de 10 µl, retrăgând pistonul până când acul este gol. Se introduce acul în sistemul de injecție și se injectează repede, după una sau două secunde. După aproximativ 5 secunde, acul se scoate ușor.

Se înregistrează până la eluarea completă a cerurilor sau a stigmastadienelor, în funcție de fracțiunea analizată.

Linia de bază trebuie să corespundă întotdeauna condițiilor impuse.

5.4. **Identificarea vârfurilor**

Se identifică vârfurile timpilor de retenție, comparându-le cu amestecuri de ceruri cu timpi de retenție cunoscuți, analizate în aceleași condiții. Esterii alchilici se identifică din amestecuri de esteri metilici și etilici din principalii acizi grași conținuți în uleiurile de măsline (palmitic și oleic).

Figura 1 prezintă cromatograma cerurilor pentru un ulei de măsline virgin. Figurile 2 și 3 prezintă cromatogramele a două uleiuri de măsline extravirgine din comerț, unul cu esteri metilici și etilici, iar celălalt fără. Figura 4 prezintă cromatograma unui ulei de măsline extravirgin de bună calitate și cea a aceluiași ulei conținând în proporție de 20 % un ulei deodorizat.

5.5. **Analiza cantitativă a cerurilor**

Se determină suprafața vârfurilor corespunzătoare standardului intern de lauril arahidat și esterilor alifatici de la C_{40} la C_{46} cu ajutorul integratorului.

Se determină conținutul total de ceruri adunând fiecare tip de ceară, în mg/kg de grăsime, după cum urmează:

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

unde:

A_x = aria corespunzătoare vârfului pentru fiecare ester, calculată sub formă numerică

A_s = aria corespunzătoare vârfului pentru standardul intern de lauril arahidat, calculată sub formă numerică

m_s = masa de standard intern de lauril arahidat adăugat, în miligrame;

m = masa probei prelevate pentru determinare, în grame.

5.5.1. *Analiza cantitativă a esterilor metilici și etilici*

Cu ajutorul integratorului, se determină ariile vârfurilor corespunzătoare standardului intern de metil heptadecanoat, esterilor metilici ai acizilor grași C_{16} și C_{18}, precum și esterilor etilici ai acizilor grași C_{16} și C_{18}.

Se determină conținutul pentru fiecare ester alchilic, în mg/kg de grăsime, după cum urmează:

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

unde:

A_x = aria corespunzătoare vârfului pentru fiecare ester C_{16} și C_{18}, calculată sub formă numerică

A_s = aria corespunzătoare vârfului pentru standardul intern de metil heptadecanoat, calculată sub formă numerică

m_s = masa de standard intern de metil heptadecanoat adăugat, în miligrame;

m = masa probei prelevate pentru determinare, în grame.

6. EXPRIMAREA REZULTATELOR

Se indică suma de ceruri conținute de la C_{40} la C_{46} (*Nota 7*) în miligrame per kilogram de grăsime.

Se indică suma esterilor metilici și a esterilor etilici conținuți de la C_{16} la C_{18} și totalul celor două.

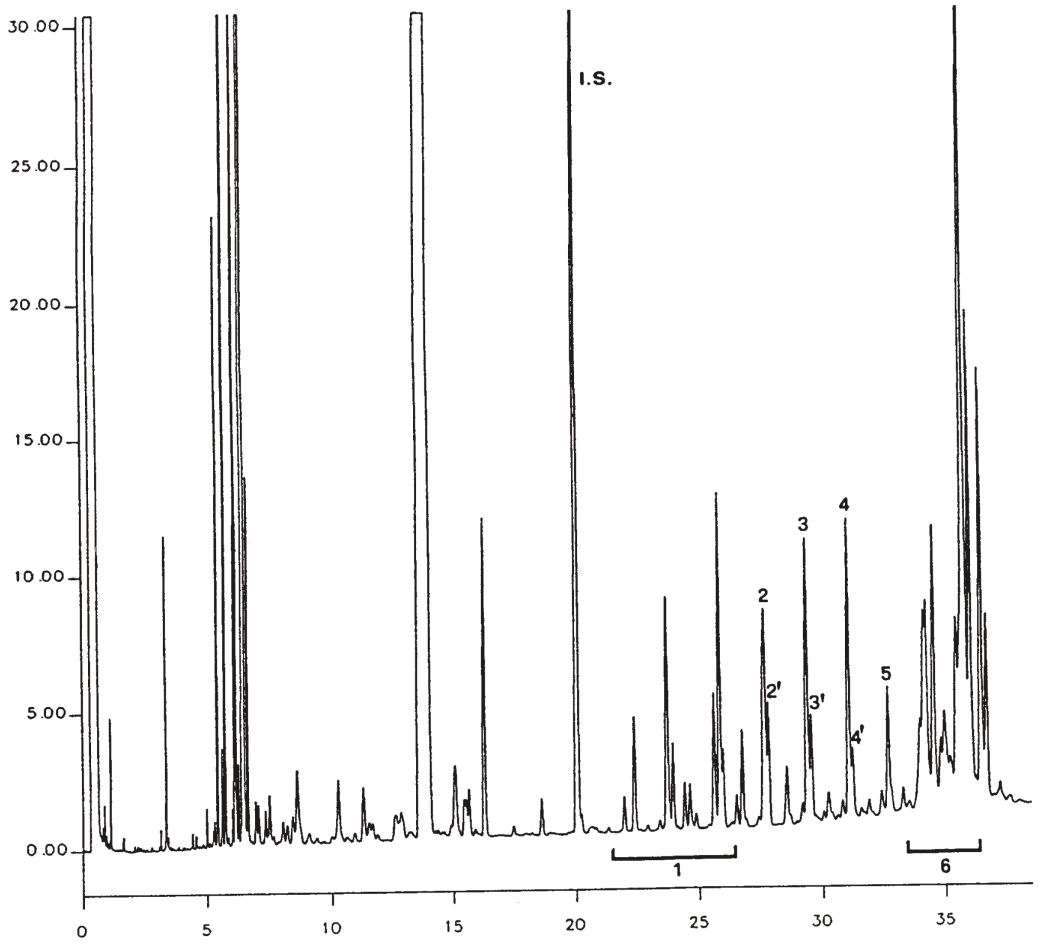
Rezultatele se aproximează la cea mai apropiată valoare în mg/kg.

Nota 7: Componentele de cuantificat se referă la vârfurile esterilor C_{40} - C_{46} cu un număr par de atomi de carbon, conform cromatogramei cerurilor din uleiul de măsline reproduse în figura atașată. În scopul identificării, dacă esterul C_{46} este scindat, se recomandă să se analizeze fracțiunea de ceruri a unui ulei din turte de măsline, unde vârful pentru C_{46} se poate distinge, deoarece acesta este clar predominant.

Se indică raportul dintre esterii etilici și esterii metilici.

Figura 1

Exemplu de cromatogramă în fază gazoasă a fracțiunii cerurilor dintr-un ulei de măsline (*)



Vârfuri cu timp de retenție cuprins între cinci și opt minute a esterilor metilici și etilici ai acizilor grași

Explicații:

S.I. = Lauril arahidat

1 = Esteri diterpenici

2+2′ = Esteri C_{40}

3+3′ = Esteri C_{42}

4+4′ = Esteri C_{44}

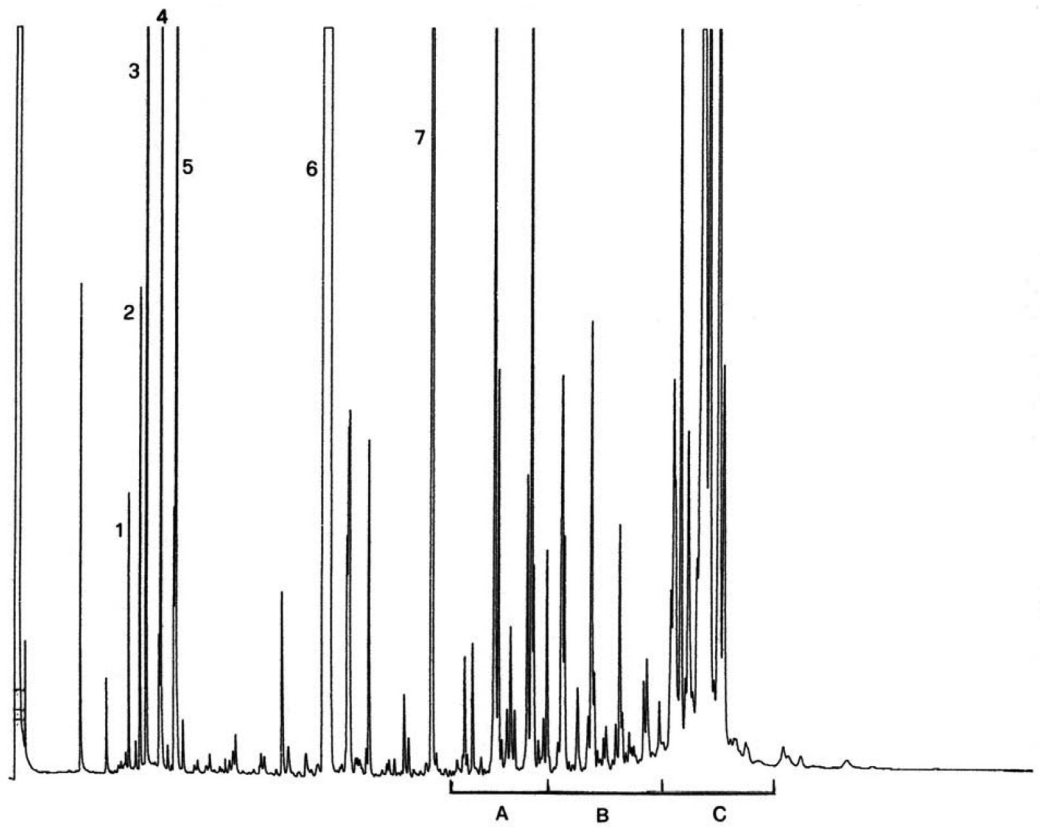
5 = Esteri C_{46}

6 = Esteri steroli și alcooli triterpenici.

(*) După eluarea esterilor steroli, traseul cromatografic nu trebuie să prezinte vârfuri semnificative (triacilgliceroli).

Figura 2

Esteri metilici, esteri etilici și ceruri într-un ulei de măsline virgin



Explicații:

1 – Metil C_{16}

2 – Etil C_{16}

3 – S.I Metil heptadecanoat

4 – Metil C_{18}

5 – Etil C_{18}

6 – Scualen

7 – S.I Lauril arahidat

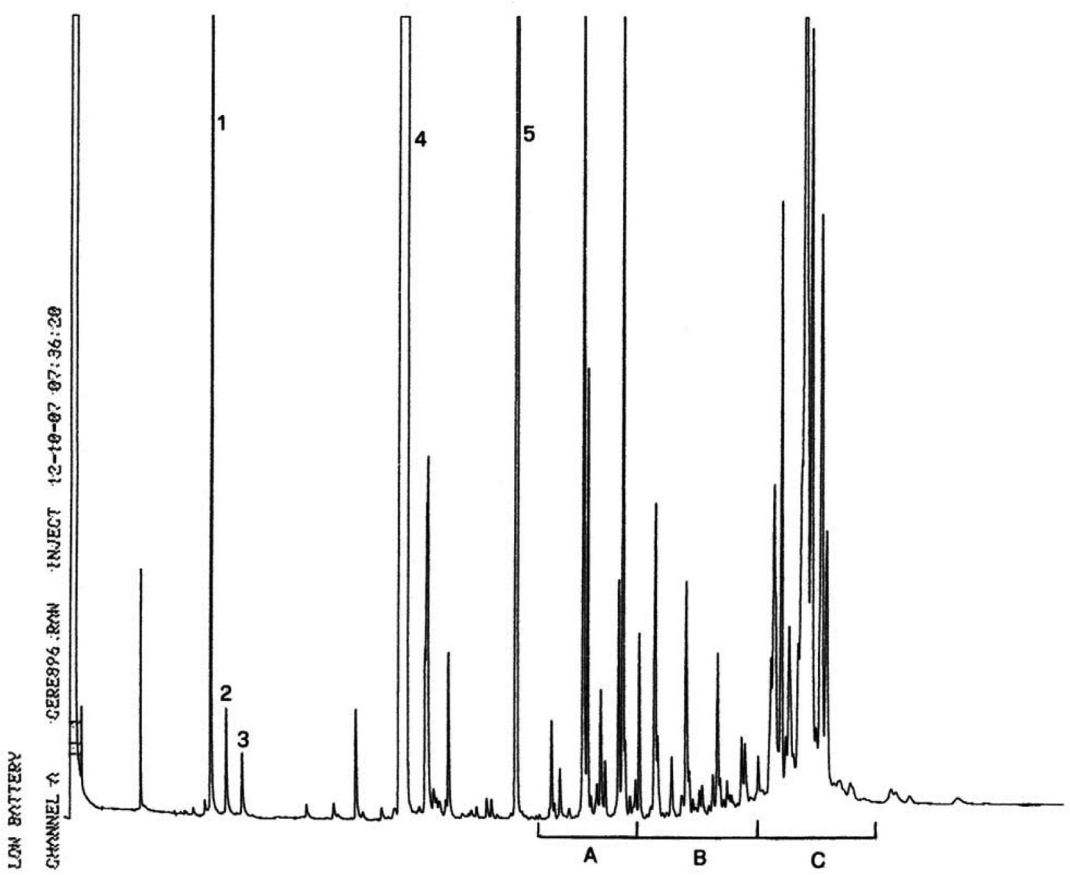
A – Esteri diterpenici

B – Ceruri

C – Esteri steroli și esteri triterpenici

Figura 3

Esteri metilici, esteri etilici și ceruri într-un ulei de măsline extravirgin



Explicații:

1 – S.I Metil heptadecanoat

2 – Metil C_{18}

3 – Etil C_{18}

4 – Scualen

5 – S.I Lauril arahidat

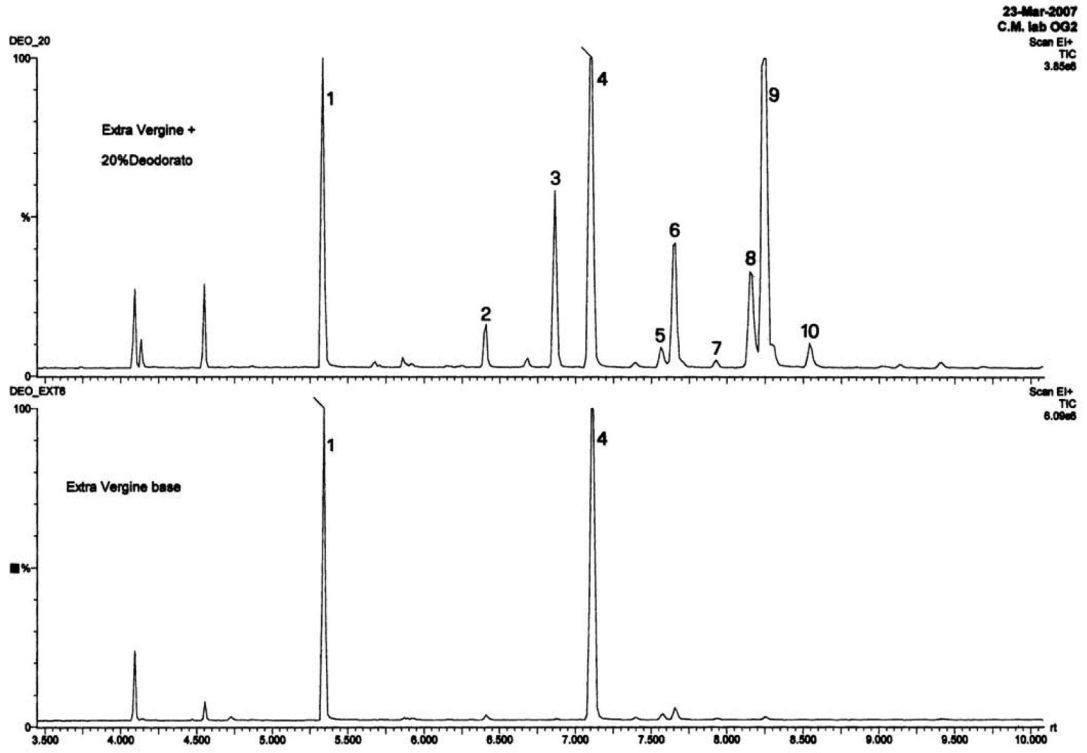
A – Esteri diterpenici

B – Ceruri

C – Esteri steroli și esteri triterpenici

Figura 4

Cromatograma parțială a unui ulei de măsline extravirgin și cea a aceluiași ulei conținând un ulei deodorizat



Explicații:

1 – S.I Miristat de metil

2 – Palmitat de metil

3 – Palmitat de etil

4 – S.I Metil heptadecanoat

5 – Linoleat de metil

6 – Oleat de metil

7 – Stearat de metil

8 – Linoleat de etil

9 – Oleat de etil

10 – Stearat de etil

Apendicele A

Determinarea vitezei liniare a gazului

Se injectează 1:3 µl de metan (sau propan) în cromatograful în fază gazoasă, după ce acesta a fost în prealabil reglat la condițiile normale de funcționare. Se măsoară timpul în care gazul trece prin coloană, din momentul în care a fost injectat până când apare vârful (tM).

Viteza liniară în cm/s se obține prin formula L/tM, unde L este lungimea coloanei în centimetri, iar tM este timpul măsurat în secunde."