

II

(Muut kuin lainsäätämisyksessä hyväksyttävät säädökset)

ASETUKSET

KOMISSION ASETUS (EU) N:o 61/2011,**annettu 24 päivänä tammikuuta 2011****oliiviöljyn ja uutetun oliiviöljyn ominaisuuksista sekä niiden määrittämismenetelmistä annetun asetuksen (ETY) N:o 2568/91 muuttamisesta**

EUROOPAN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan unionin toiminnasta tehdyn sopimuksen,

ottaa huomioon maatalouden yhteisestä markkinajärjestelystä ja tiettyjä maataloustuotteita koskevista erityissäännöksistä (yhteisiä markkinajärjestelyjä koskeva asetus) 22 päivänä lokakuuta 2007 annetun neuvoston asetuksen (EY) N:o 1234/2007 ⁽¹⁾ ja erityisesti sen 113 artiklan 1 kohdan a alakohdan ja 121 artiklan h alakohdan yhdessä sen 4 artiklan kanssa,

sekä katsoo seuraavaa:

- (1) Komission asetuksessa (ETY) N:o 2568/91 ⁽²⁾ määritellään oliiviöljyn ja uutetun oliiviöljyn (oliivin puristemassaöljyn) fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet sekä kyseisten ominaisuuksien määrittämismenetelmät. Kyseiset menetelmät ja öljyjen ominaisuuksiin liittyvät raja-arvot olisi saatettava ajan tasalle ottaen huomioon asiantuntijakemistien lausunto ja kansainvälisen oliivineuvoston puitteissa tehty työ.
- (2) Koska asiantuntijakemistit ovat erityisesti todenneet, että rasvahappojen etyyliestereiden (FAEE) ja rasvahappojen metyyliestereiden (FAME) pitoisuus on hyödyllinen parametri ekstra-neitsytoliiviöljyjen laatua määritettäessä, kyseisten estereiden raja-arvot ja pitoisuuden määrittämismenetelmä olisi otettava käyttöön.
- (3) Tällä asetuksella tehtyjä muutoksia olisi sovellettava vasta 1 päivästä huhtikuuta 2011, jotta aikaa jäisi uusiin vaatimuksiin sopeutumiseksi ja niiden soveltamisen vaatimien välineiden käyttöönotolle ja jottei kaupankäynnille aiheutettaisi häiriöitä. Samoista syistä olisi säädettävä, että ennen kyseistä päivämäärää unionissa lainmukaisesti valmistettuja ja merkittyjä tai unioniin lainmukaisesti tuo-

tuja, vapaaseen liikkeeseen laskettuja oliiviöljyjä ja oliivin puristemassaöljyjä voidaan pitää kaupan varastojen loppumiseen asti.

(4) Sen vuoksi asetusta (ETY) N:o 2568/91 olisi muutettava.

(5) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat maatalouden yhteisen markkinajärjestelyn hallintokomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Muutetaan asetus (ETY) N:o 2568/91 seuraavasti:

1) Lisätään 2 artiklan 1 kohtaan luetelmakohta seuraavasti:

— vahojen, rasvahappojen metyyliestereiden ja rasvahappojen etyyliestereiden pitoisuuksien määrittäminen liitteen XX kapillaarikaasukromatografiamenetelmällä.”

2) Lisätään liitteiden yhteenvedoon seuraava:

”Liite XX Vahojen, rasvahappojen metyyliestereiden ja rasvahappojen etyyliestereiden pitoisuuksien määrittäminen kapillaarikaasukromatografiamenetelmällä”

3) Korvataan liite I tämän asetuksen liitteellä I.

4) Lisätään tämän asetuksen liitteessä II esitetty liite XX.

2 artikla

Ennen 1 päivänä huhtikuuta 2011 unionissa lainmukaisesti valmistettuja ja merkittyjä tai unioniin lainmukaisesti tuotuja, vapaaseen liikkeeseen laskettuja tuotteita voidaan pitää kaupan varastojen loppumiseen asti.

⁽¹⁾ EUVL L 299, 16.11.2007, s. 1.⁽²⁾ EYVL L 248, 5.9.1991, s. 1.

3 artikla

Tämä asetus tulee voimaan kolmantena päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä*.

Sitä sovelletaan 1 päivästä huhtikuuta 2011.

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 24 päivänä tammikuuta 2011.

Komission puolesta
José Manuel BARROSO
Puheenjohtaja

OLIIVIÖLJYJEN OMINAISUUDET

Luokka	Rasvahappojen metyyliesterit (FAME) ja rasvahappojen etyyliesterit (FAEE)	Happopitoisuus (%) (*)	Peroksidiluku mEq O ₂ /kg (*)	Vahat mg/kg (**)	2-glyceryylimonopalmiitaatti (%)	Stigmastadieni mg/kg (1)	HPLC:llä määritetyn ja teoreettisesti lasketun ECN42:n välinen ero	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Aistinvarainen arvio Virheen mediaani (Md) (*)	Aistinvarainen arvio Hedelmäisyyden mediaani (Mf) (*)
1. Ekstra-neitsytoliiviöljy	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg/kg tai 75 mg/kg < Σ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg ja (FAEE/FAME) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % ≤ 14 % ≤ 1,0 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Neitsytoliiviöljy	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % ≤ 14 % ≤ 1,0 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Lamppuoliiviöljy	—	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % ≤ 14 % ≤ 1,1 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 2,5 (2)	—
4. Jalostettu oliiviöljy	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % ≤ 14 % ≤ 1,1 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Jalostetusta oliiviöljystä ja neitsytoliiviöljystä valmistettu oliiviöljy	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % ≤ 14 % ≤ 1,0 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Raaka oliivin puristemassaöljy	—	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Jalostettu oliivin puristemassaöljy	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Oliivin puristemassaöljy	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Sellaisten isomeerien yhteismäärä, joka voidaan (tai jota ei voida) erottaa kapillaarikolonnin avulla.

(2) Tai jos virheen mediaani on enintään 2,5 ja hedelmäisyyden mediaani 0.

(3) Kun öljyn vahapitoisuus on 300–350 mg/kg, sitä pidetään lamppuöljynä, jos alifaattisten alkoholien kokonaispitoisuus on enintään 350 mg/kg tai jos erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on enintään 3,5 prosenttia.

(4) Kun öljyn vahapitoisuus on 300–350 mg/kg, sitä pidetään raakana oliivin puristemassaöljynä, jos alifaattisten alkoholien kokonaispitoisuus on yli 350 mg/kg ja jos erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on yli 3,5 prosenttia.

Luokka	Rasvahappojen pitoisuus ⁽¹⁾						Trans-oleiiniisomeerien summa (%)	Translino-leiisomeerien ja translino-leeniisomeerien summa (%)	Sterolikoostumus						Kokonaissterolit (mg/kg)	Erytrodioli ja uvaoli (%) (**)
	Myristiinihappo (%)	Linoleeni-happo (%)	Arakidoni-happo (%)	Eikoseeni-happo (%)	Beheeni-happo (%)	Lignoseriinihappo (%)			Kolesteroli (%)	Brassika-steroli (%)	Kampesteroli (%)	Stigmaste-rololi (%)	Beetasito-steroli (%) ⁽²⁾	Delta-7-stigmaste-rololi (%)		
1. Ekstra-neitsytoliiviöljy	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Neitsytoliiviöljy	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Lamppuoliiviöljy	≤ 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. Jalostettu oliiviöljy	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Jalostetusta oliiviöljystä ja neitsytoliiviöljystä valmistettu oliiviöljy	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Raaka oliivin puristemassaöljy	≤ 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. Jalostettu oliivin puristemassaöljy	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Oliivin puristemassaöljy	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Muiden rasvahappojen pitoisuus (%): palmitiinihappo: 7,5 - 20,0; palmitoleiinihappo: 0,3 - 3,5; heptadekaanihappo: ≤ 0,3; heptadekeeni-happo: ≤ 0,3 steariinihappo: 0,5 - 5,0; oleiinihappo: 55,0 - 83,0; linolihappo: 3,5 - 21,0

⁽²⁾ Seuraavien summa: delta-5-23-stigmastadienoli + klerosteroli + beetasitosteroli + sitostanoli + delta-5-avenasteroli + delta-5-24-stigmastadienoli

⁽³⁾ Kun öljyn vahapitoisuus on 300 - 350 mg/kg, sitä pidetään lamppuöljynä, jos alifaattisten alkoholien kokonaispitoisuus on enintään 350 mg/kg tai jos erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on enintään 3,5 prosenttia.

⁽⁴⁾ Kun öljyn vahapitoisuus on 300 - 350 mg/kg, sitä pidetään raakana oliivin puristemassaöljynä, jos alifaattisten alkoholien kokonaispitoisuus on yli 350 mg/kg ja jos erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on yli 3,5 prosenttia.

Huom.

a) Analyysitulokset on ilmaistava yhtä monen desimaalin tarkkuudella kuin kunkin ominaisuuden osalta esitetään.

Viimeinen luku on pyöristettävä yhdellä yksiköllä ylöspäin, jos sitä seuraava luku on suurempi kuin 4.

b) Jos öljyn yksikin ominaisuus poikkeaa annetuista arvoista, sen luokka muutetaan tai todetaan, ettei se täytä tässä asetuksessa säädettyjä puhtausvaatimuksia.

c) Öljyn laatuun viittaavat tähdellä (*) merkityt ominaisuudet tarkoittavat, että:

— lamppuoliiviöljyn ei tarvitse täyttää kaikkia raja-arvoja koskevia vaatimuksia samanaikaisesti,

— jos neitsytoliiviöljy ei täytä jotain raja-arvoa koskevaa vaatimusta, öljyn luokka muutetaan, mutta se säilyy edelleen luokiteltuna johonkin neitsytoliiviöljyluokista.

d) Kaksi tähteä (**) oliiviöljyn jonkin laatuominaisuuden kohdalla tarkoittaa, että oliivin puristemassaöljyjen ei tarvitse täyttää kaikkia raja-arvoja koskevia vaatimuksia samanaikaisesti.”

LIITE II

"LIITE XX

Menetelmä vahojen, rasvahappojen etyyliestereiden ja rasvahappojen metyyliestereiden pitoisuuksien määrittämiseksi kapillaarikaasukromatografian avulla

1. TARKOITUS

Tällä menetelmällä määritetään vahojen, rasvahappojen metyyliestereiden ja rasvahappojen etyyliestereiden pitoisuudet oliiviöljyissä. Vahat ja alkyyliesterit eroavat toisistaan hiiliatomien lukumäärän perusteella. Menetelmää suositellaan käytettävän välineenä oliiviöljyn ja oliivin puristemassaöljyn erottamiseksi toisistaan sekä ekstra-neitsytoliiviöljyn laatuparametrina, jonka avulla voidaan havaita, onko ekstra-neitsytoliiviöljyyn vilpillisesti sekoitettu heikompilaatuisia öljyjä (neitsyt- tai lamppuöljyjä tai eräitä hajuttomiksi tehtyjä öljyjä).

2. PERIAATE

Öljy, johon on lisätty soveltuva sisäinen standardi, fraktioidaan kromatografisesti hydratoitua silikageeliä sisältävässä kolonnissa. Koeolosuhteissa eluoinutun jae (jonka polaarisuus on triasyyliglyserolien polaarisuutta heikempi) otetaan talteen ja määritetään suoraan kapillaarikaasukromatografian avulla.

3. LAITTEISTO

3.1. **Erlenmeyer-pullo, 25 ml.**

3.2. **Lasikolonne** nestekromatografiaa varten, sisähalkaisija 15 mm ja pituus 30–40 cm, varustettu hanalla.

3.3. **Kaasukromatografi**, jota voidaan käyttää kapillaarikolonnin kanssa ja johon kuuluu kolonniin suoraan injektointia varten sellainen järjestelmä, jonka osat ovat:

3.3.1. **Termostaattisäätöinen lämpötilaohjelmoitu uuni**

3.3.2. Kolonniin liitetty **kylmäinjektor**, jonka avulla näyte voidaan syöttää suoraan kolonniin

3.3.3. **Liekki-ionisaatiodetektor** ja **muuntaja-vahvistin**

3.3.4. **Integroiva piirturi** (Huomautus 1), joka sopii käytettäväksi muuntaja-vahvistimen (kohta 3.3.3) kanssa.

Huomautus 1: Voidaan käyttää myös tietokonepohjaisia järjestelmiä, joissa kaasukromatografian tiedot syötetään tietokoneen avulla.

3.3.5. **Kvartsilasinen kapillaarikolonne (vahojen sekä metyyli- ja etyyliesterien määrittämiseksi)**, jonka pituus on 8–12 m ja sisähalkaisija 0,25–0,32 mm ja jonka sisäpinta on päällystetty nestefaasilla (Huomautus 2) siten, että nestekerroksen paksuus on tasaisesti 0,10–0,30 µm (Huomautus 2).

Huomautus 2: Soveltuvia kaupallisia nestefaaseja ovat muun muassa SE52, SE54, jne.

3.4. **Mikroruisku**, 10 µl, jossa on karkaistu neula, jonka avulla näyte voidaan injektoida suoraan kolonniin.

3.5. **Sähkökäyttöinen ravistelija.**3.6. **Pyöröhaihdutin**3.7. **Muhveliuuni**

3.8. **Analyysivaaka**, jonka tarkkuus ± 0,1 mg

3.9. Tavanomaiset laboratorion lasivälineet.

4. REAGENSsit

4.1. **Silikageeli**, 60–200 µm mesh. Silikageeli pannaan muhveliuuniin 500 °C:n lämpötilaan vähintään 4 tunniksi. Jäähdytetään ja lisätään vettä 2 % silikageelin määrästä. Sekoitetaan massan homogenisoimiseksi ja säilytetään eksikkaattorissa vähintään 12 tunnin ajan ennen käyttöä.

4.2. **n-heksaani**, kromatografialaattua tai jäämien määrittämiseen soveltuvaa laatua (puhtausaste on tarkistettava).

VAROITUS: Höyryt ovat herkästi syttyviä. Eristettävä lämmönlähteistä, kipinöistä ja avoliekeistä. Pullot on pidettävä aina asianmukaisesti suljettuina. Riittävästä ilmanvaihdosta käytön aikana on huolehdittava. Varottava höyryjen syntymistä. Poistettava tulipaloriskin mahdollisesti aiheuttavat laitteet, kuten lämmittimet tai sähkölaitteet, joita ei ole valmistettu syttymättömästä materiaalista. Haitallista hengitettynä: voi vahingoittaa hermosoluja. Vältettävä höyryjen hengittämistä. Tarvittaessa on käytettävä asianmukaisia hengityssuojaimia. Varottava aineen joutumista silmiin tai iholle.

4.3. **Etyylieetteri, kromatografialaattua.**

VAROITUS: Erittäin helposti syttyvä ja kohtalaisen myrkyllinen. Ärsyttää ihoa. Haitallista hengitettynä. Saattaa aiheuttaa silmävaurioita. Vaikutukset voivat ilmaantua viipeellä. Saattaa muodostua räjähtäviä peroksiedeja. Höyryt voivat syttyä. Eristettävä lämmönlähteistä, kipinöistä ja avoliekeistä. Pullot on pidettävä aina asianmukaisesti suljettuina. Riittävästä ilmanvaihdosta käytön aikana on huolehdittava. Varottava höyryjen syntymistä. Poistettava tulipaloriskin mahdollisesti aiheuttavat laitteet, kuten lämmittimet tai sähkölaitteet, joita ei ole valmistettu syttymättömästä materiaalista. Ei saa haihduttaa kuivaksi tai lähes kuivaksi. Veden tai muun sopivan aineen lisäksi vähentää peroksidien muodostumista. Ei saa niellä. Vältettävä höyryjen hengittämistä. Varottava pitkäaikaista tai toistuvaa ihokosketusta.

4.4. **n-heptaani**, kromatografialaattua, tai **iso-oktaani**.

VAROITUS: Syttyvää. Haitallista hengitettynä. Eristettävä lämmönlähteistä, kipinöistä ja avoliekeistä. Pullot on pidettävä aina asianmukaisesti suljettuina. Riittävästä ilmanvaihdosta käytön aikana on huolehdittava. Vältettävä höyryjen hengittämistä. Varottava pitkäaikaista tai toistuvaa ihokosketusta.

4.5. **Lauryliarakidaatin standardiliuos** (Huomautus 3), 0,05 % (m/V) liuos heksaanissa (sisäinen standardi vahoille).

Huomautus 3: Voidaan käyttää myös palmityylipalmitaattia, myristyylistearaattia tai lauryliarakidaattia.

4.6. **Metyyliheptadekanoaatin standardiliuos, 0,02 % (m/V) heksaanissa (sisäinen standardi metyyli- ja etyyliesterille).**4.7. **Sudan 1 (1-fenyylitso)-2-naftoli).**4.8. **Kantajakaasut: vety tai helium, puhdasta kaasukromatografista laatua.**

VAROITUS

Vety. Erittäin helposti syttyvä puristettuna. Eristettävä lämmönlähteistä, kipinöistä ja avoliekeistä tai sähkölaitteista, joita ei ole valmistettu syttymättömistä materiaaleista. On varmistettava, että pullon venttiili on kiinni aina, kun se ei ole käytössä. Paineenlenninta on aina käytettävä. Jousen paine päästetään pois ennen pullon venttiilin avaamista. Älä seiso pullon edessä venttiiliä avatessasi. Riittävästä ilmanvaihdosta käytön aikana on huolehdittava. Vetyä ei saa siirtää pullosta toiseen. Kaasua ei saa sekoittaa pullossa. Pullot on kiinnitettävä kaatumisen estämiseksi. Säilytettävä auringonvalolta ja lämmönlähteiltä suojattuna. Varastointipaikan on oltava sellainen, ettei siellä voi tapahtua syöpymistä. Vaurioituneita tai merkitsemättömiä pulloja ei saa käyttää.

Helium. Korkeassa paineessa puristettu kaasu. Se pienentää hengitettävän hapen määrää. Pullo on pidettävä suljettuna. Riittävästä ilmanvaihdosta käytön aikana on huolehdittava. Varastointitiloihin, jotka eivät ole asianmukaisesti tuuletettuja, ei pidä mennä. Paineenlenninta on aina käytettävä. Jousen paine päästetään pois ennen pullon venttiilin avaamista. Kaasua ei saa siirtää pullosta toiseen. Pullot on kiinnitettävä kaatumisen estämiseksi. Älä seiso pullon edessä venttiiliä avatessasi. Säilytettävä auringonvalolta ja lämmönlähteiltä suojattuna. Varastointipaikan on oltava sellainen, ettei siellä voi tapahtua syöpymistä. Vaurioituneita tai merkitsemättömiä pulloja ei saa käyttää. Ei saa hengittää. Käytetään yksinomaan teknisiin tarkoituksiin.

4.9. Apukaasut:

- Vety, puhdasta kaasukromatografista laatua.
- Paineilma, puhdasta kaasukromatografista laatua.

VAROITUS

Paineilma. Korkeassa paineessa puristettu kaasu. Käytettävä varoen syttyvien aineiden lähistöllä, sillä useimpien paineilman sisältämien orgaanisten yhdisteiden itsesyttymislämpötila on suuressa paineessa huomattavasti alhaisempi. On varmistettava, että pullon venttiili on kiinni, kun se ei ole käytössä. Paineenalenninta on aina käytettävä. Jousen paine päästetään pois ennen pullon venttiilin avaamista. Älä seiso pullon edessä venttiiliä avatessasi. Kaasua ei saa siirtää pullosta toiseen. Älä sekoita kaasua pullossa. Pullot on kiinnitettävä kaatumisen estämiseksi. Säilytettävä auringonvalolta ja lämmönlähteiltä suojattuna. Varastointipaikan on oltava sellainen, ettei siellä voi tapahtua syöpyymistä. Vaurioituneita tai merkitsemättömiä pulloja ei saa käyttää. Teknisiin tarkoituksiin tarkoitettua paineilmaa ei saa käyttää hengittämiseen tai hengityslaitteissa.

5. MENETTELY

5.1. Kromatografiakolonnin esikäsittely

Suspendoidaan 15 g silikageeliä (kohta 4.1) n-heksaaniin (kohta 4.2) ja lisätään kolonniin (kohta 3.2). Annetaan laskeutua itsestään. Autetaan laskeutumista sähkökäyttöisellä sekoittajalla, jotta saadaan homogeenisempi kromatografiakerros. Valutetaan läpi 30 ml n-heksaania mahdollisten epäpuhtauksien poistamiseksi. Punnitaan analyysiväällä (kohta 3.8) tarkasti noin 500 mg näytettä 25 ml:n erlenmeyer-pulloon (kohta 3.1) ja lisätään sopiva määrä sisäistä standardia (kohta 4.5) oletetun vahapitoisuuden mukaan. Esimerkki: oliiviöljyyn lisätään lauryyliarakidaattia 0,1 mg ja oliivin puristemassaöljyyn 0,25–0,50 mg, tai oliiviöljyihin (kohta 4.6) 0,05 mg metyyliheptadekanoaattia.

Siirretään näin valmistettu näyte kahden 2 ml:n n-heksaaniannoksen avulla kromatografiakolonneihin.

Liuottimen annetaan valua, kunnes se on 1 mm absorbentin pinnan yläpuolella. Valutetaan vielä n-heksaani/etyyलिएetteriseosta (suhde 99:1) ja kerätään 220 ml valumisnopeuden ollessa noin 15 pisaraa 10 sekunnissa. **(Tämä jae sisältää metyyli- ja etyyलिएettereitä ja vahoja).** (Huomautus 4) (Huomautus 5).

Huomautus 4: N-heksaani/etyyलिएetteriseos, suhde 99:1, on valmistettava uudelleen joka päivä.

Huomautus 5: Vahojen eluotumisen tarkkailemiseksi silmämääräisesti voidaan näyteliukseen lisätä 100 µl 1-prosenttista Sudan 1 -väriainetta eluutioliuksessa.

Väriaineen retentioaika on vahojen ja triasyyliglyserolien retentioaikojen välissä. Eluointi on keskeytettävä, kun väri saavuttaa kromatografiakolonnin pohjan, sillä tällöin kaikki vahat ovat eluotuneet.

Tällä tavoin saatu jae kuivataan pyöröhaihduttimessa, kunnes lähes kaikki liuotin on saatu poistettua. Viimeiset 2 ml poistetaan heikon typpivirtauksen avulla. Kerätään metyyli- ja etyyलिएettereitä sisältävä jae 2–4 ml:lla n-heptaanina tai iso-oktaania.

5.2. Kaasukromatografinen analyysi

5.2.1. Esivalmistelut

Kolonne liitetään kaasukromatografiin (kohta 3.3) siten, että injektioportti yhdistetään on-column -järjestelmään ja ulostulo detektoriin. Tarkistetaan kaasukromatografisten laitteiden toimivuus (kaasusilmukoiden kunto, detektorin ja piirturijärjestelmän tehokkuus jne.).

Jos kolonnia ei ole aikaisemmin käytetty, se on ensin esikäsiteltävä. Kolonnin läpi johdetaan kevyt kaasuvirtaus ja kaasukromatografi käynnistetään. Lämmitetään asteittain, kunnes lämpötila on noin neljän tunnin kuluttua kohonnut 350 °C:een.

Tätä lämpötilaa pidetään yllä vähintään 2 tunnin ajan. Sen jälkeen laitteisto säädetään käyttöolosuhteisiin (kaasuvirtojen säätö, liekin sytytys, kytkeminen elektroniseen piirturiin (kohta 3.3.4), uunin lämpötilan säätö kolonnin varten, detektorin säätö jne.). Signaali säädetään niin, että sen herkkyys on vähintään kaksi kertaa niin suuri kuin määrityksessä tarvitaan. Saadun pohjaviivan on oltava suora, siinä ei saa olla minkäänlaisia piikkejä eikä ryömintää mihinkään suuntaan.

Jos ilmenee negatiivista suoraviivaista ryömintää, se on merkki kolonnin liitännöiden viasta. Positiivinen ryömintä johtuu kolonnin riittämättömästä esikäsitteystä.

5.2.2. Toimintaolosuhteiden valinta vahoille sekä metyyli- ja etyyliestereille (Huomautus 6)

Kromatografia tehdään yleensä seuraavissa käyttöolosuhteissa:

— Kolonnin lämpötila:

20 °C minuutissa 5 °C minuutissa

aluksi 80 °C (1') — 140 °C — 335 °C (20)

— Detektorin lämpötila: 350 °C

— Injektoidun aineen määrä: 1 µl n-heptaaniliuosta (2–4 ml)

— Kantajakaasu: helium tai vety valitun kaasun optimaalisella lineaarisella nopeudella (ks. lisäys A)

— Laitteen herkkyys: siten, että edellä mainitut edellytykset täyttyvät.

Huomautus 6: Koska loppulämpötila on korkea, positiivinen ryömintä sallitaan, mutta se saa olla enintään 10 % huippuarvosta.

Kyseisiä käyttöolosuhteita voidaan muuttaa kolonnin ja kaasukromatografian ominaisuuksien perusteella, jotta kaikki vahat ja rasvahappojen metyyli- ja etyyliesterit saadaan erotettua ja piikkien erotus on riittävä (ks. kuvat 2, 3 ja 4) ja jotta sisäisen lauryliarakidaattistandardin retentioaika on 18 ± 3 minuuttia. Vahojen edustavimman piikin on oltava yli 60 % huippuarvosta; metyyli- ja etyyliesterien osalta käytettävän sisäisen metyyliheptadekanoattistandardin on saavutettava huippuarvo.

Piikkien integrointiparametrit asetetaan niin, että haluttujen piikkien pinta-alat voidaan arvioida oikein.

5.3. Määritys

10 µl:n mikroruiskuun vedetään 10 µl liuosta; vedetään männällä neula tyhjäksi. Työnnetään neula injektioalaitteeseen ja 1–2 sekunnin kuluttua injektoidaan nopeasti. Noin 5 sekunnin kuluttua vedetään neula hitaasti pois.

Piirturi pidetään käynnissä, kunnes vahat tai stigmastadieenit (riippuen analysoitavasta jakeesta) ovat eluotuneet täydellisesti.

Pohjaviivan on koko ajan oltava vaatimusten mukainen.

5.4. Piikkien tunnistus

Piikit tunnistetaan retentioaikojen perusteella vertaamalla samoissa olosuhteissa määritettyihin vahojen, joiden retentioajat tunnetaan, seoksiin. Alkyyliesterit tunnistetaan oliiviöljyjen tärkeimpien rasvahappojen (palmitiini- ja oleiinihappo) metyyli- ja etyyliesterien perusteella.

Kuva 1 esittää neitsytoliiviöljyn vahojen kromatogrammia. Kuvissa 2 ja 3 on kahden vähittäismyytävän ekstra-neitsytoliiviöljyn kromatogrammit; ensimmäinen metyyli- ja etyyliesterien kanssa ja toinen ilman niitä. Kuvassa 4 on kromatogrammit huippulaatuisesta ekstra-neitsytoliiviöljystä ja samasta öljystä, johon on sekoitettu 20 % hajuttomaksi tehtyä öljyä.

5.5. Vahojen kvantitatiivinen määrittäminen

Sisäisen lauryylirakidaattistandardin ja C₄₀–C₄₆-alifaattisten esterien piikkien pinta-alat lasketaan integraattorilla.

Kokonaisvahapitoisuus (mg/kg rasvaa) lasketaan muodostamalla yksittäisten vahojen summa seuraavasti:

$$\text{Vahat, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

jossa:

A_x = kunkin esterin piikin pinta-ala tietokoneella laskettuna

A_s = sisäisen lauryylirakidaattistandardin piikin pinta-ala tietokoneella laskettuna

m_s = lisätyn sisäisen lauryylirakidaattistandardin massa milligrammoina

m = määritettävän näytteen massa grammoina.

5.5.1. Metyyli- ja etyyliesterien kvantitatiivinen määrittäminen

Sisäisen metyyliheptadekanoaattistandardin, C₁₆- ja C₁₈-rasvahappojen metyyliesterien ja C₁₆- ja C₁₈-rasvahappojen etyyliesterien piikkien pinta-alat määritetään integraattorin avulla.

Lasketaan kunkin alkyliesterien pitoisuus (mg/kg rasvaa) seuraavasti:

$$\text{Esteri, mg/kg} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

jossa:

A_x = kunkin C₁₆- ja C₁₈-esterin piikin pinta-ala tietokoneella laskettuna

A_s = sisäisen metyyliheptadekanoaattistandardin piikin pinta-ala tietokoneella laskettuna

m_s = lisätyn sisäisen metyyliheptadekanoaattistandardin massa milligrammoina

m = määritettävän näytteen massa grammoina.

6. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

C₄₀–C₄₆:n (Huomautus 7) eri vahojen pitoisuuksien summa ilmoitetaan mg/kg rasvaa.

Ilmoitetaan C₁₆–C₁₈-rasvahappojen metyyli- ja etyyliesterien pitoisuuksien summa ja molempien yhteismäärä.

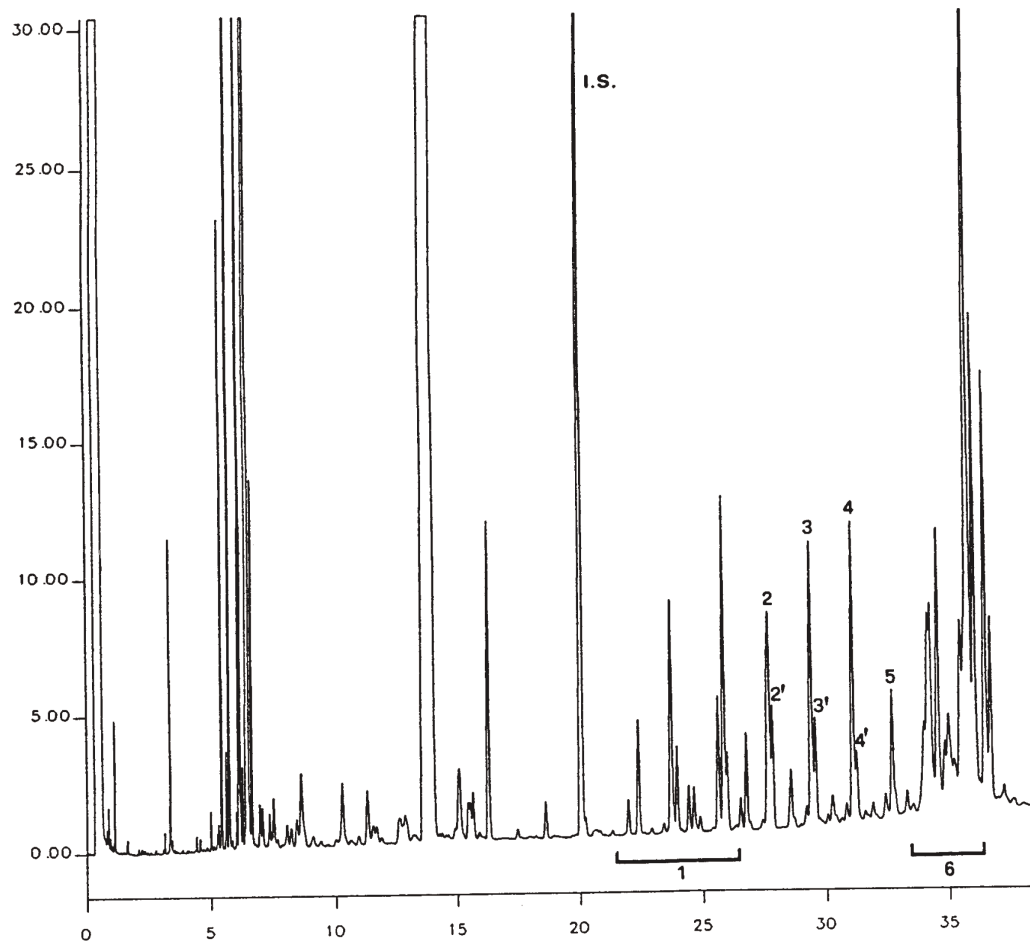
Tulokset ilmoitetaan mg/kg:n tarkkuudella.

Huomautus 7: Piikkien pinta-aloista määritetään niiden komponenttien määrät, joissa on parillinen määrä C-atomeja välillä C₄₀–C₄₆, liitteenä olevassa kuvassa esitetyn oliiviöljyn vahojen kromatogrammin mukaisesti. Jos C₄₆-esteri esiintyy kahtena piikkinä, sen tunnistamiseksi on syytä analysoida oliivin puristemassaöljyn vahojen jae, jossa C₄₆:n piikki on helppo tunnistaa, koska se on selvästi hallitsevin.

Ilmoitetaan etyyli- ja metyyliesterien välinen suhde.

Kuva 1

Esimerkki oliiviöljyn vahajakeen kaasukromatogrammista (*)



Niiden rasvahappojen metyyli- ja etyyliesterien piikit, joiden retentioajat ovat välillä 5–8 minuuttia

Merkkien selitykset:

I.S. = lauryliarakidaatti

1 = diterpeniesterit

2+2' = C₄₀-esterit

3+3' = C₄₂-esterit

4+4' = C₄₄-esterit

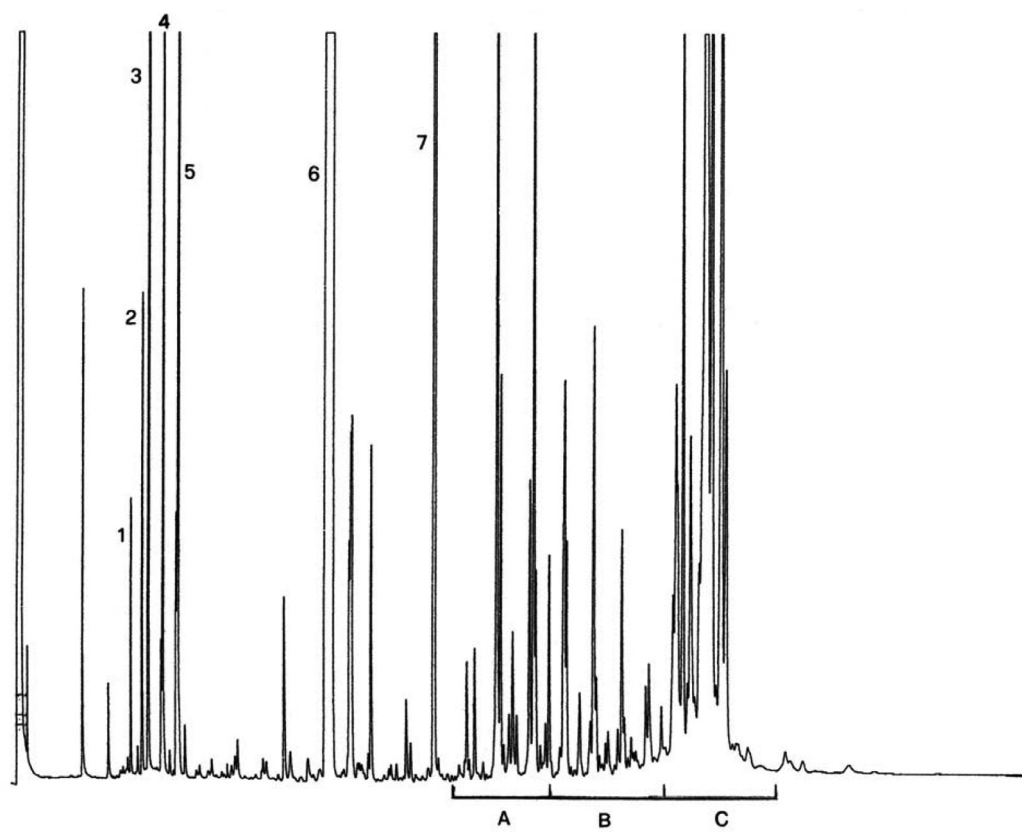
5 = C₄₆-esterit

6 = steroliesterit ja triterpeenialkoholit.

(*) Kun steroliesterit ovat eluotuneet, kromatogrammissa ei pitäisi olla merkittäviä piikkejä (triasyyli glyseroleja).

Kuva 2

Metyyliesterit, etyyliesterit ja vahat neitsytoliiviöljyssä

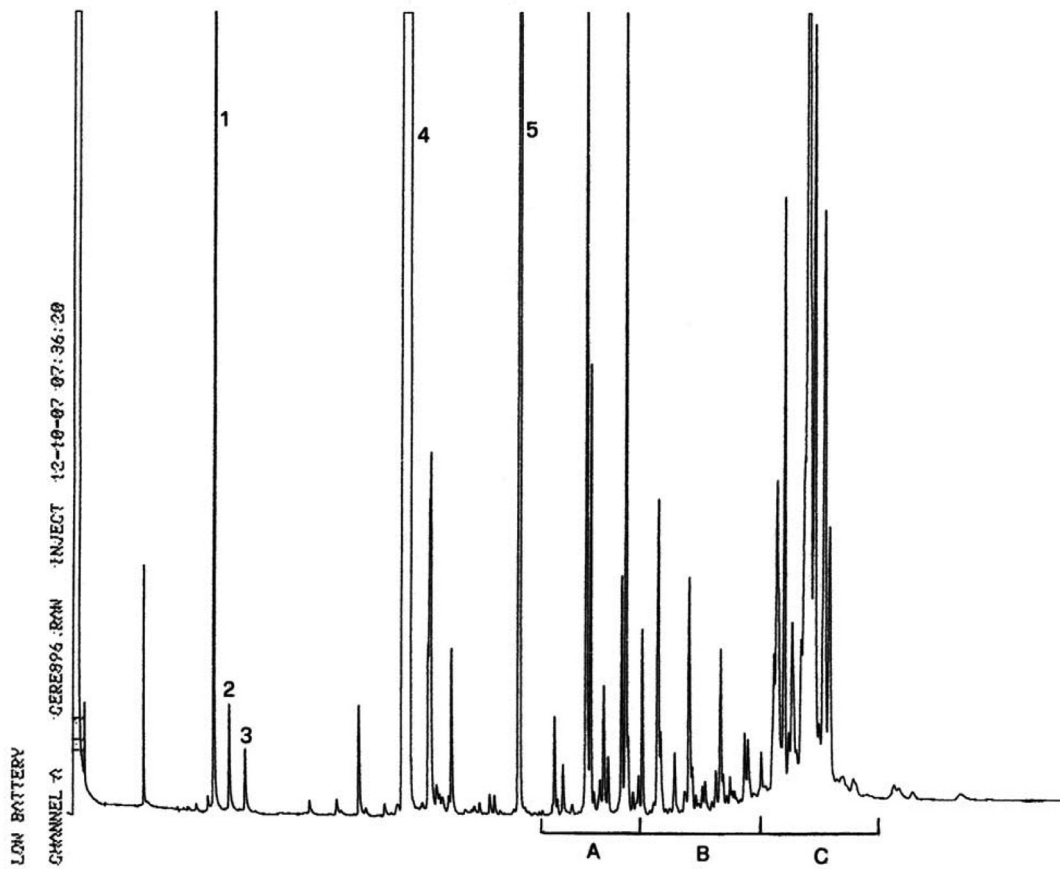


Merkkien selitykset:

- 1 – C₁₆-metyyli
- 2 – C₁₆-etyyli
- 3 – metyyliheptadekanoaatti I.S.
- 4 – C₁₈-metyyli
- 5 – C₁₈-etyyli
- 6 – skvaleeni
- 7 – lauryliarakidaatti I.S.
- A – diterpeniesterit
- B – vahat
- C – steroliesterit ja triterpeniesterit

Kuva 3

Metyyliesterit, etyyliesterit ja vahat ekstra-neitsytoliiviöljyssä

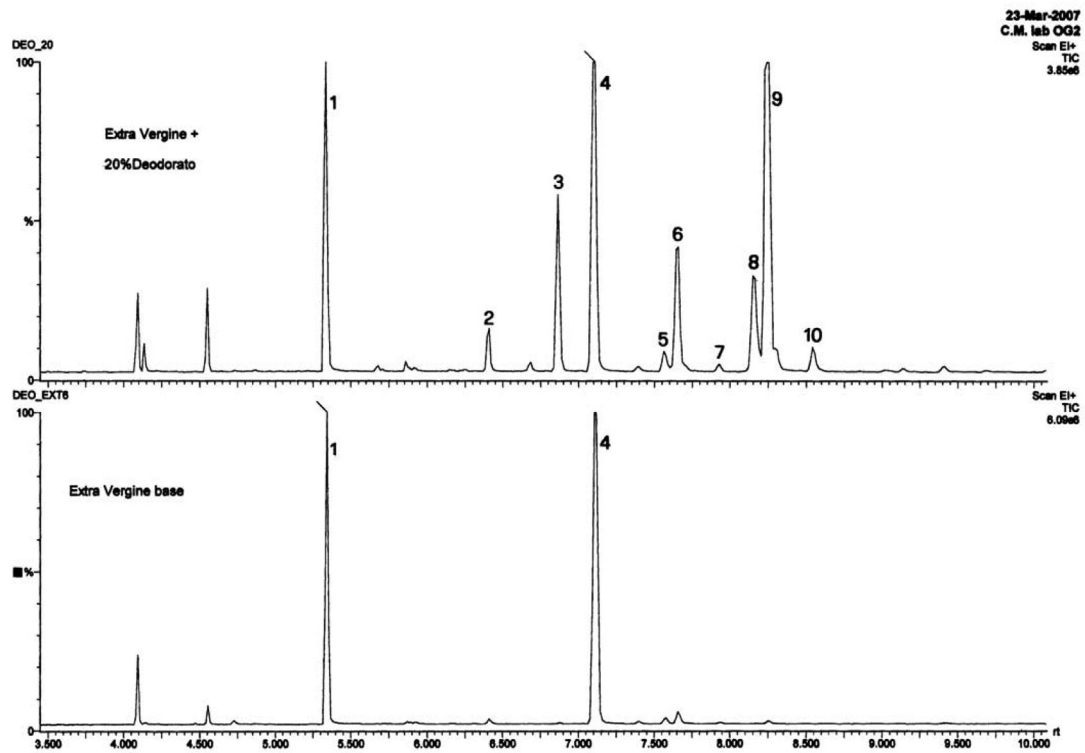


Merkkien selitykset:

- 1 – metyyliheptadekanoaatti I.S
- 2 – C₁₈-metyyli
- 3 – C₁₈-etyyli
- 4 – skvaleeni
- 5 – lauryliarakidaatti I.S.
- A – diterpeniesterit
- B – vahat
- C – steroliesterit ja triterpeniesterit

Kuva 4

Kromatogrammit ekstra-neitsytoliiviöljystä ja samasta öljystä, johon on sekoitettu 20 % hajuttomaksi tehtyä öljyä



Merkkien selitykset:

- 1 – metyylimyristaatti I.S.
- 2 – metyylipalmitaatti
- 3 – etyylipalmitaatti
- 4 – metyyliheptadekanoaatti I.S.
- 5 – metyyliinoleaatti
- 6 – metyylioleaatti
- 7 – metyylistearaatti
- 8 – etyyliinoleaatti
- 9 – etyylioleaatti
- 10 – etyylistearaatti

*Lisäys A***Lineaarisen kaasuvirtausnopeuden määrittäminen**

Injektoidaan 1:3 µl metaania (tai propaania) tavanomaisiin käyttöolosuhteisiin säädettyyn kaasukromatografialaitteistoon. Otetaan tarkka aika siitä, miten kauan kaasu kulkee kolonnin läpi, alkaen injektiohetkestä piikin muodostumiseen (t_M).

Lineaarinen nopeus (cm/s) saadaan kaavasta L/t_M , jossa L on kolonnin pituus senttimetreinä ja t_M on sekunteina mitattu aika.”
