

A BIZOTTSÁG (EU) 2019/1604 VÉGREHAJTÁSI RENDELETE**(2019. szeptember 27.)****az olívaolaj és az olívamadaradék-olaj jellemzőiről és az ezekre vonatkozó elemzési módszerekről
szóló 2568/91/EGK rendelet módosításáról**

AZ EURÓPAI BIZOTTSÁG,

tekintettel az Európai Unió működéséről szóló szerződésre,

tekintettel a mezőgazdasági termékpiacok közös szervezésének létrehozásáról és a 922/72/EGK, a 234/79/EGK, az 1037/2001/EK és az 1234/2007/EK tanácsi rendelet hatályon kívül helyezéséről szóló, 2013. december 17-i 1308/2013/EU európai parlamenti és tanácsi rendeletre ⁽¹⁾ és különösen annak 91. cikke első bekezdésének d) pontjára,

mivel:

- (1) A 2568/91/EGK bizottsági rendelet ⁽²⁾ meghatározza az olívaolajok és az olívaolaj-olajok fizikai, kémiai és érzékszervi jellemzőit, valamint az e jellemzők értékelésére szolgáló módszereket.
- (2) E módszerek és az olajok jellemzőire vonatkozó határértékek – a vegyészeti szakértők véleményét figyelembe véve és a Nemzetközi Olívanács (a továbbiakban: IOC) keretében végzett munka eredményeivel összhangban – rendszeresen frissülnek.
- (3) Az IOC által megállapított legújabb nemzetközi szabványok uniós szintű végrehajtásának biztosítása érdekében naprakésszé kell tenni bizonyos, a 2568/91/EGK rendeletben meghatározott elemzési módszereket.
- (4) Az IOC módosította a kereskedelmi szabványt a szabadsavtartalomra vonatkozó határérték kifejezése, a peroxidszám, az érzékszervi értékelés (a hibamedión és a gyümölcsösségi medián), valamint a nagy teljesítményű folyadékromatográfiás (HPLC-) módszerrel kapott ECN42-érték és az elméleti számítás útján kapott ECN42-érték különbsége tekintetében az elemzési módszer pontossági értékeivel való összhang biztosítása érdekében.
- (5) A 2568/91/EGK rendelet 2a. cikkének (5) bekezdésével összhangban annak megvizsgálása céljából, hogy egy adott olívaolaj-minta megfelel-e a bejelentett kategóriának, a tagállamoknak vagy tetszőleges sorrendben, vagy a szóban forgó rendelet Ib. mellékletében szereplő döntési fán előírt sorrendet követve ellenőrizniük kell az ugyanazon rendelet I. mellékletében meghatározott jellemzőket.
- (6) A legújabb fejlemények fényében helyénvaló megfelelően frissíteni a 2568/91/EGK rendelet Ib. mellékletében és annak függelékében szereplő táblázatokat. Az Ib. melléklet tartalmára tekintettel a „folyamatábra” kifejezés megfelelőbbnek tűnik, mint a „döntési fa” kifejezés.
- (7) A 2568/91/EGK rendelet XII. mellékletének 9.4. pontja a hibamediónt a legnagyobb intenzitással érzékelt hiba mediánjaként határozza meg. Az ellenőrző értékelésekkel összefüggésben és tekintettel arra, hogy az olajok megfelelését különböző csoportoknak kell értékelniük, egyértelművé kell tenni, hogy az arra vonatkozó határozatot, hogy valamely olaj jellemzői megfelelnek-e a bejelentett kategóriának, kizárólag a legfontosabb hiba mediánjának értékére kell alapozni, függetlenül annak jellegétől.
- (8) Ezért a 2568/91/EGK rendeletet ennek megfelelően módosítani kell.
- (9) Az e rendeletben előírt intézkedések összhangban vannak a mezőgazdasági piacok közös szervezésével foglalkozó bizottság véleményével,

ELFOGADTA EZT A RENDELETET:

1. cikk

A 2568/91/EGK rendelet a következőképpen módosul:

1. A 2. cikk a következőképpen módosul:

a) az (1) bekezdés l) pontjának helyébe a következő szöveg lép:

„l) a szterinösszetétel és -tartalom meghatározása, valamint az alkoholos vegyületek meghatározása kapilláris oszlopos gázkromatográfiával, a XIX. melléklet szerinti módszerrel”;

⁽¹⁾ HL L 347., 2013.12.20., 671. o.

⁽²⁾ A Bizottság 2568/91/EGK rendelete (1991. július 11.) az olívaolaj és az olívamadaradék-olaj jellemzőiről és az ezekre vonatkozó elemzési módszerekről (HL L 248., 1991.9.5., 1. o.).

b) a (2) bekezdés harmadik albekezdésének helyébe a következő szöveg lép:

„Amennyiben a csoport az érzékszervi jellemzők tekintetében nem erősíti meg a bejelentett kategóriát, az érdekelt fél kérésére a nemzeti hatóságok vagy képviselőik haladéktalanul elvégeztetnek két ellenőrző értékelést más jóváhagyott csoportokkal. A csoportok közül legalább az egyiknek az érintett termelő tagállam által jóváhagyott csoportnak kell lennie. Az érintett jellemzők akkor tekintendők a bejelentett jellemzőkkel megegyezőknak, ha mindkét ellenőrző értékelés megerősíti a bejelentett osztályozást. Ha nem ez a helyzet, az ellenőrző értékelések során megállapított hibák típusától függetlenül az osztályozást a jellemzőkkel össze nem egyeztethetőnek kell nyilvánítani, és az ellenőrző értékelések költségei az érdekelt felet terhelik.”

2. A 2a. cikk (5) bekezdésének b) pontja helyébe a következő szöveg lép:

„b) az Ib. melléklet folyamatábráján előírt sorrendet követve hajtják végre azokat, amíg el nem jutnak a folyamatábrában szereplő valamelyik döntésig.”

3. A mellékletekre vonatkozó összefoglalás helyébe az e rendelet I. mellékletében szereplő táblázat lép.

4. Az I. melléklet helyébe e rendelet II. mellékletének szövege lép.

5. Az Ia. melléklet 2.1. pontja helyébe a következő szöveg lép:

„2.1. Minden egyes elsődleges mintát az EN ISO 5555 szabvány 2.5. pontja szerint laboratóriumi mintákra kell felosztani, és az Ib. melléklet folyamatábrája szerinti vagy bármilyen más véletlenszerű sorrendben kell elemezni.”

6. Az Ib. melléklet helyébe e rendelet III. mellékletének szövege lép.

7. Az V. mellékletet el kell hagyni.

8. A VII. melléklet 4.2. pontja helyébe a következő szöveg lép:

„4.2. n-hexán (kromatográfia céljára alkalmas minőségű). A hexán helyettesíthető izooktánnal (kromatográfia céljára alkalmas minőségű 2,2,4-trimetil-pentán), feltéve, hogy összehasonlítható pontossági értékek érhetők el.”

9. A XII. melléklet e rendelet IV. mellékletének megfelelően módosul.

10. A XVII. melléklet e rendelet V. mellékletének megfelelően módosul.

11. A XVIII. melléklet e rendelet VI. mellékletének megfelelően módosul.

12. A XIX. melléklet helyébe e rendelet VII. mellékletének szövege lép.

13. A XX. melléklet 4.2. pontja helyébe a következő szöveg lép:

„4.2. n-hexán, kromatográfia vagy maradékvizsgálat céljára alkalmas. A hexán helyettesíthető izooktánnal (kromatográfia céljára alkalmas minőségű 2,2,4-trimetil-pentán), feltéve, hogy összehasonlítható pontossági értékek érhetők el. Az n-hexán forráspontjánál magasabb forráspontú oldószerek hosszabb idő alatt párolognak el. A hexán toxicitása miatt azonban előnyben kell részesíteni őket. A tisztaságot ellenőrizni kell, például a 100 ml oldószer elpárologtatása után visszamaradó anyag vizsgálata útján.

FIGYELEM! Gőzei a levegővel keveredve gyúlékonyak! A vizsgálathoz távolítsa el minden gyújtóforrást (hőforrás, szikra, nyílt láng)! Gondoskodjon róla, hogy az üvegek mindig jól le legyenek zárva! Használat során gondoskodjon megfelelő szellőzéstől! Előzze meg a gőzfelhalmozódást, és távolítsa el minden tűzveszélyes tárgyat, például a nem éghetetlen anyagokból készült fűtőberendezéseket és elektromos készülékeket! Az anyag veszélyes, belélegezve idegsejt-károsodást okozhat. Ne lélegezze be a gőzt! Szükség esetén használjon megfelelő lélegeztető berendezést! Szembe és bőrre ne kerüljön!

Az izooktán gyúlékony, tűzveszélyes folyadék. Robbanási határértékei a levegőben 1,1 % és 6,0 % között változnak (térfogatszázalék). Lenyelve és belélegezés útján mérgező. Ezen oldószer alkalmazása során használjon jó üzemiállapotban lévő elszívófülkét!”

2. cikk

Ez a rendelet az *Európai Unió Hivatalos Lapjában* való kihirdetését követő huszadik napon lép hatályba.

Ez a rendelet teljes egészében kötelező és közvetlenül alkalmazandó valamennyi tagállamban.

Kelt Brüsszelben, 2019. szeptember 27-én.

a Bizottság részéről
az elnök
Jean-Claude JUNCKER

I. MELLÉKLET

„MELLÉKLETEK

ÖSSZEFOGLALÁS

I. melléklet	Az olívaolaj jellemzői
Ia. melléklet	Mintavétel közvetlen csomagolásban szállított olívaolajból vagy olívapogácsa-olajból
Ib. melléklet	Folyamatábra annak ellenőrzésére, hogy egy olívaolaj-minta megfelel-e a bejelentett kategóriának
II. melléklet	A szabad zsírsavak meghatározása hideg injektálásos módszerrel
III. melléklet	A peroxidszám meghatározása
IV. melléklet	A viasztartalom meghatározása kapilláris oszlopos gázkromatográfiával
VII. melléklet	A 2-gliceril-monopalmitát százalékos arányának meghatározása
IX. melléklet	Spektrofotometriás vizsgálat ultraibolya fényben
X. melléklet	Zsírsav-metilészterek meghatározása gázkromatográfiával
XI. melléklet	Az olívaolaj illékony halogénezett oldószereinek meghatározása
XII. melléklet	A Nemzetközi Olívanácsnak a szűz olívaolajok érzékszervi értékelésére szolgáló módszere
XV. melléklet	Az olívmaradék olajtartalma
XVI. melléklet	A jódszám meghatározása
XVII. melléklet	A növényi olajok sztigmasztadién-tartalmának meghatározására szolgáló módszer
XVIII. melléklet	Az ECN-42-es triacil-glicerinek tényleges és elméleti mennyisége közötti különbség meghatározása
XIX. melléklet	A szterinösszetétel és -tartalom, valamint az alkoholos vegyületek meghatározása kapilláris gázkromatográfiával
XX. melléklet	A viasz-, valamint a zsírsav-metilészter- és a zsírsav-etilészter-tartalom meghatározása kapilláris gázkromatográfiával
XXI. melléklet	A 8. cikk (2) bekezdésében említett, olívaolajokon végzett megfelelőségi ellenőrzések eredményei”

II. MELLÉKLET

„I. MELLÉKLET

AZ OLÍVAOLAJ JELLEMZŐI

Minőségi jellemzők

Kategória	Savasság (%) (*)	Peroxidszám (milliekvivalens O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₆₈ vagy K ₂₇₀	Delta-K	Érzékszervi értékelés		Zsír-sav-etilésztetek (mg/kg)
						Hibamedién (Hm) (*)	Gyümölcsösségi medián (Gym)	
1. Extra szűz olívaolaj	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Hm = 0,0	Gym > 0,0	≤ 35
2. Szűz olívaolaj	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Hm ≤ 3,5	Gym > 0,0	—
3. Lampante olívaolaj	> 2,0	—	—	—	—	Hm > 3,5 (†)	—	—
4. Finomított olívaolaj	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16	—	—	—
5. Finomított olívaolajból és szűz olívaolajból álló olívaolaj	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15	—	—	—
6. Nyers olívapogácsa-olaj	—	—	—	—	—	—	—	—
7. Finomított olívapogácsa-olaj	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—	—
8. Olívapogácsa-olaj	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—	—

(†) A hibamedién legfeljebb 3,5 lehet, ha a gyümölcsösségi medián 0,0.

Tisztasági jellemzők

Kategória	Zsírsvösszetétel ⁽¹⁾						Transz- izomerek összege (%)	Transzli- nol- + transzli- lén-izome- rek ösz- szege (%)	Sztigma- sztatadiének (mg/kg) ⁽²⁾	A HPLC-mód- szerrel kapott ECN42-érték és az elméleti számítás útján kapott ECN42- érték különb- sége	2-gliceril-monopalmitát (%)
	Mirisztin- sav (%)	Linolénsav (%)	Arachinsav (%)	Eikozénsav (%)	Behénsav (%)	sav (%)					
1. Extra szűz olívaolaj	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9, ha a palmitinsav összaránya ≤ 14,00 %
											≤ 1,0, ha a palmitinsav összaránya > 14,00 %
2. Szűz olívaolaj	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9, ha a palmitinsav összaránya ≤ 14,00 %
											≤ 1,0, ha a palmitinsav összaránya > 14,00 %
3. Lampante olívaolaj	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,9, ha a palmitinsav összaránya ≤ 14,00 %
											≤ 1,1, ha a palmitinsav összaránya > 14,00 %
4. Finomított olívaolaj	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9, ha a palmitinsav összaránya ≤ 14,00 %
											≤ 1,1, ha a palmitinsav összaránya > 14,00 %
5. Finomított olívaolajból és szűz olívaolajból álló olí- vaolaj	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9, ha a palmitinsav összaránya ≤ 14,00 %
											≤ 1,0, ha a palmitinsav összaránya > 14,00 %
6. Nyers olívaolajból készült olaj	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ 0,60	≤ 1,4
7. Finomított olívaolajból készült olaj	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,4
8. Olívaolajból készült olaj	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,2

⁽¹⁾ Egyéb zsírsvartartalom (%): palmitinsav: 7,50–20,00; palmitoleinsav: 0,30–3,50; heptadecánsav: ≤ 0,40; heptadecénsav: ≤ 0,60; sztearinsav: 0,50–5,00; olajsav: 55,00–83,00; linolsav: 2,50–21,00.

⁽²⁾ A kapilláris kolonnával elválasztható (vagy el nem választható) izomerek összesen.

Kategória	Szterinösszetétel						Szterinek összesen (mg/kg)	Eritrodiol és uvaol (%) (**)	Viaszok (mg/kg) (**)
	Koleszterin (%)	Brasszिकासzterin (%)	Kampeszterin ⁽¹⁾ (%)	Sztigmaszterin (%)	Láth. β-szitoszterin ⁽²⁾ (%)	Delta-7-sztigmasztenol ⁽¹⁾ (%)			
1. Extra szűz olívaolaj	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Szűz olívaolaj	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Lampante olívaolaj	≤ 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. Finomított olívaolaj	≤ 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. Finomított olívaolajból és szűz olívaolajból álló olívaolaj	≤ 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. Nyers olívaolaj	≤ 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. Finomított olívaolaj	≤ 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. Olívaolaj	≤ 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⁾ Lásd e melléklet függelékét.

⁽²⁾ Láth. β-szitoszterin: Delta-5,23-sztigmasztadienol+kleroszterin+béta-szitoszterin+szitosztanol+delta-5-avenaszterin+delta-5,24-sztigmasztadienol.

⁽³⁾ A 300 mg/kg és 350 mg/kg közötti viasztartalmú olajok lampante olívaolajnak minősülnek, ha a teljes alifásalkohol-tartalom legfeljebb 350 mg/kg, vagy ha az eritrodiol- és uvaoltartalom legfeljebb 3,5 %.

⁽⁴⁾ A 300 mg/kg és 350 mg/kg közötti viasztartalmú olajok nyers olívaolajnak tekintendők, ha a teljes alifásalkohol-tartalom meghaladja a 350 mg/kg-ot, és ha az eritrodiol- és uvaoltartalom 3,5 %-nál nagyobb.

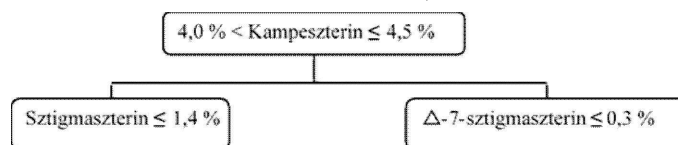
Megjegyzések:

- Az eredményeket ugyanannyi tizedesjeggyel kell megadni, mint amennyi az egyes jellemzőknél meg van adva. Az utolsó értékes számjegyet fel kell kerekíteni a következő számjegyre, ha az ezt követő, nem értékes számjegy 4-nél nagyobb.
- Ha a jellemzői közül bármelyik kívül esik a megállapított határértéken, az olajat vagy egy másik kategóriába kell sorolni, vagy e rendelet alkalmazásában nem megfelelőnek kell minősíteni.
- A lampante olívaolaj esetében a csillaggal (*) jelölt mindkét minőségi jellemző egyidejűleg eltérhet az adott kategóriára megállapított határértékektől.
- Ha valamely jellemző két csillaggal (**) van megjelölve, az a nyers olívapogácsa-olaj esetében azt jelenti, hogy mindkét vonatkozó határérték egyidejűleg eltérhet a megadott értékektől. Az olívapogácsa-olaj és a finomított olívapogácsa-olaj esetében az egyik vonatkozó határérték térhet el a megadott értékektől.

Függelék

Döntési fák

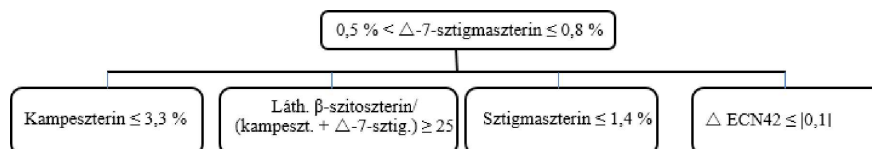
A **kampeszterinre** vonatkozó döntési fa szűz és extra szűz olívaolajok esetében:



A többi paraméternek meg kell felelnie a rendeletben meghatározott határértékeknek.

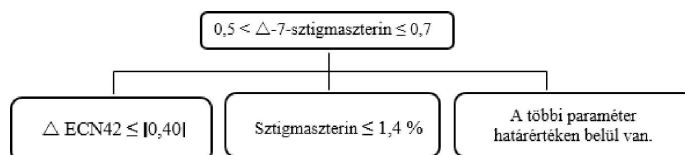
A **delta-7-sztigmaszterinre** vonatkozó döntési fa a következők esetében:

— extra szűz és szűz olívaolajok



A többi paraméternek meg kell felelnie a rendeletben meghatározott határértékeknek.

— olívapogácsa-olajok (nyers és finomított)



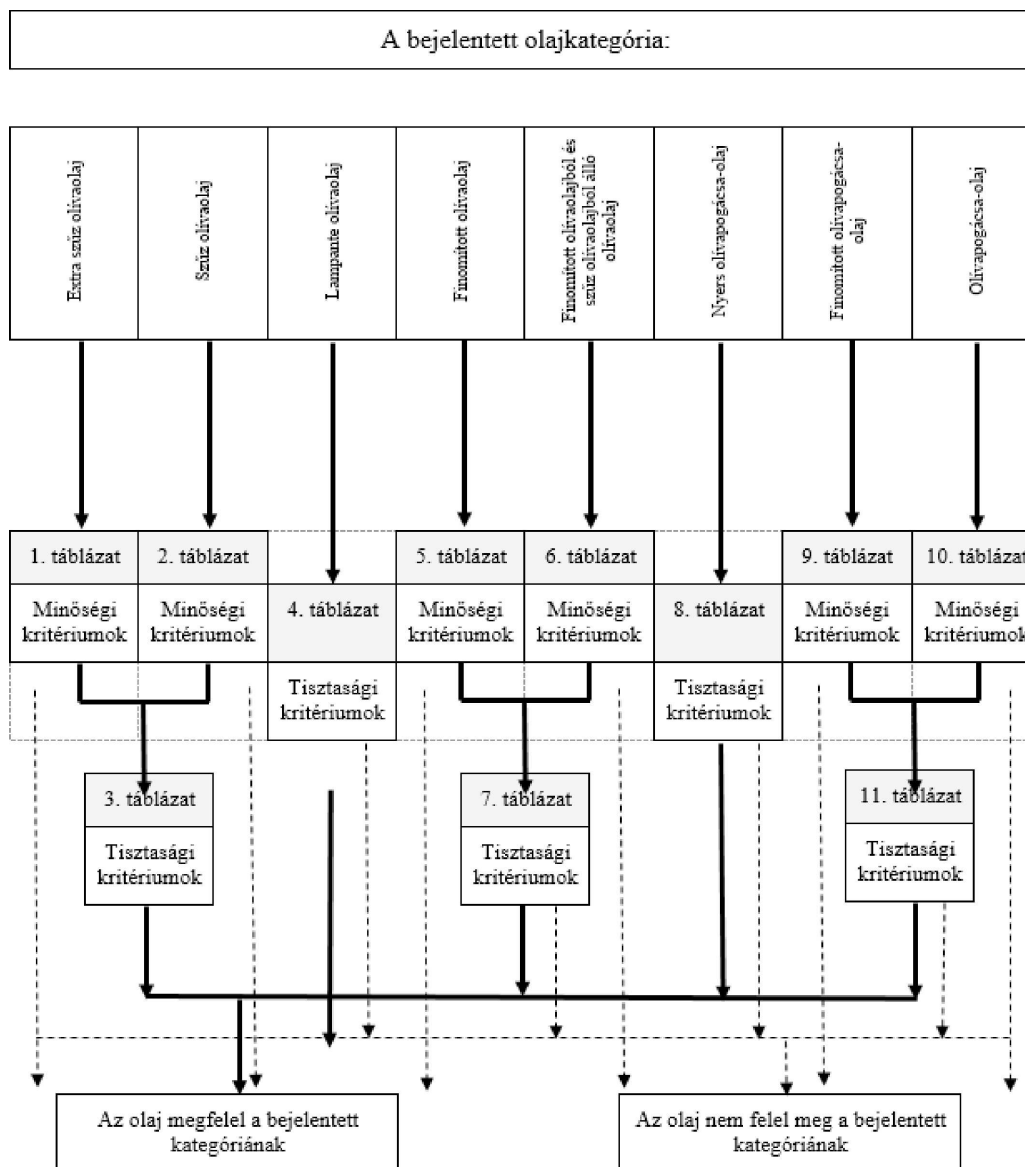
A többi paraméternek meg kell felelnie a rendeletben meghatározott határértékeknek.”

III. MELLÉKLET

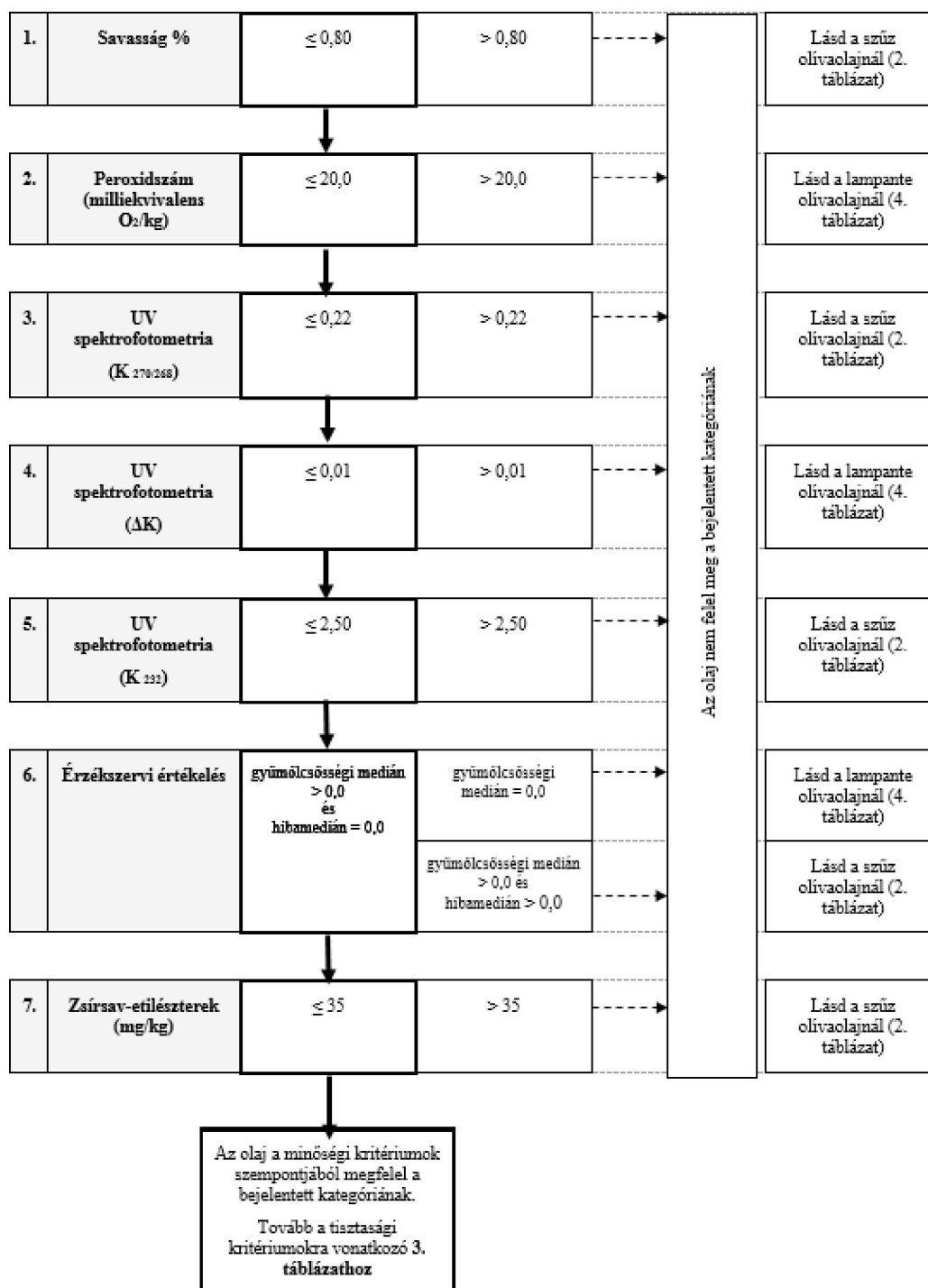
„Ib. MELLÉKLET

FOLYAMATÁBRA ANNAK ELLENŐRZÉSÉRE, HOGY EGY OLÍVAOLAJ-MINTA MEGFELEL-E A BEJELENTETT KATEGÓRIÁNAK

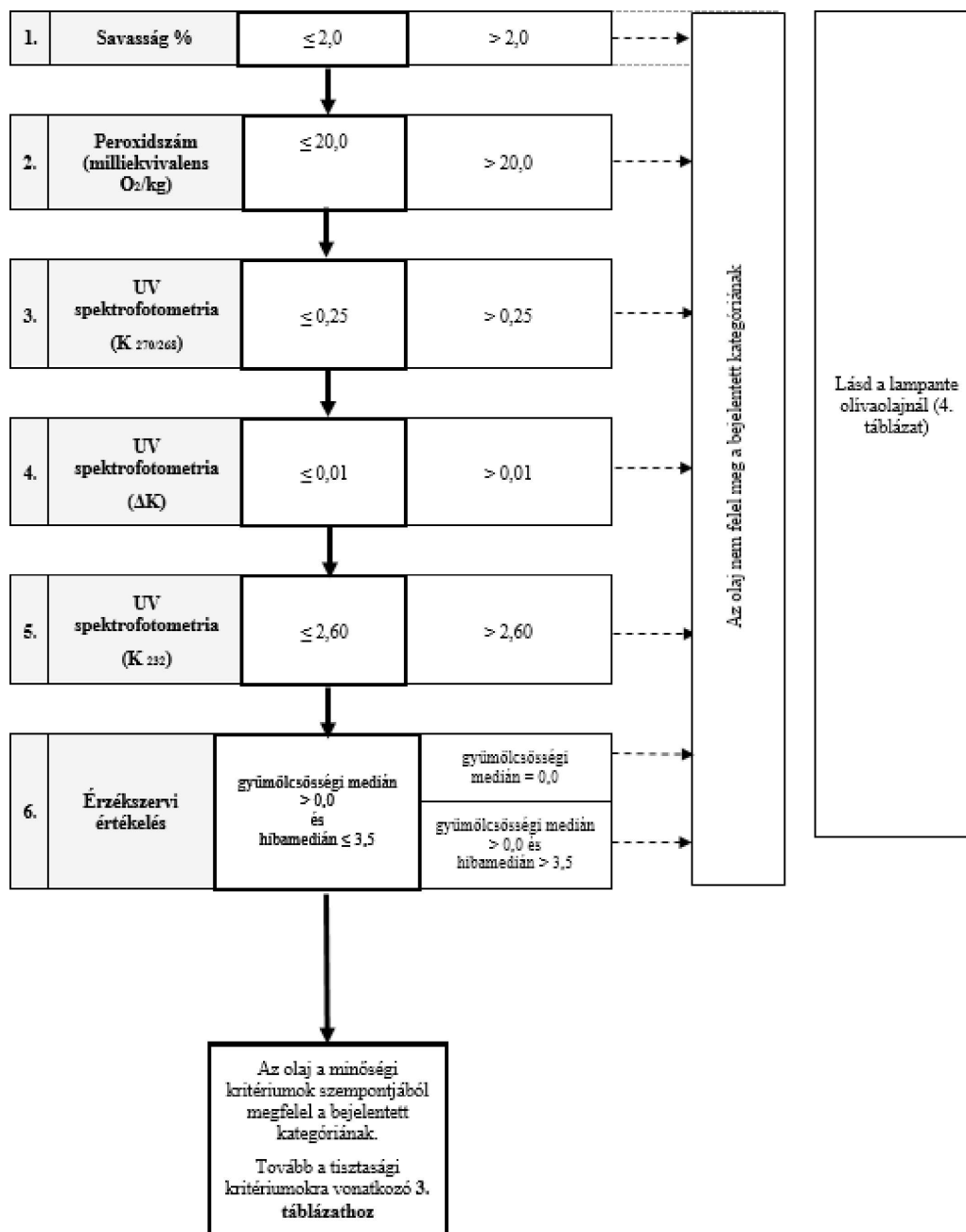
Áttekintő táblázat



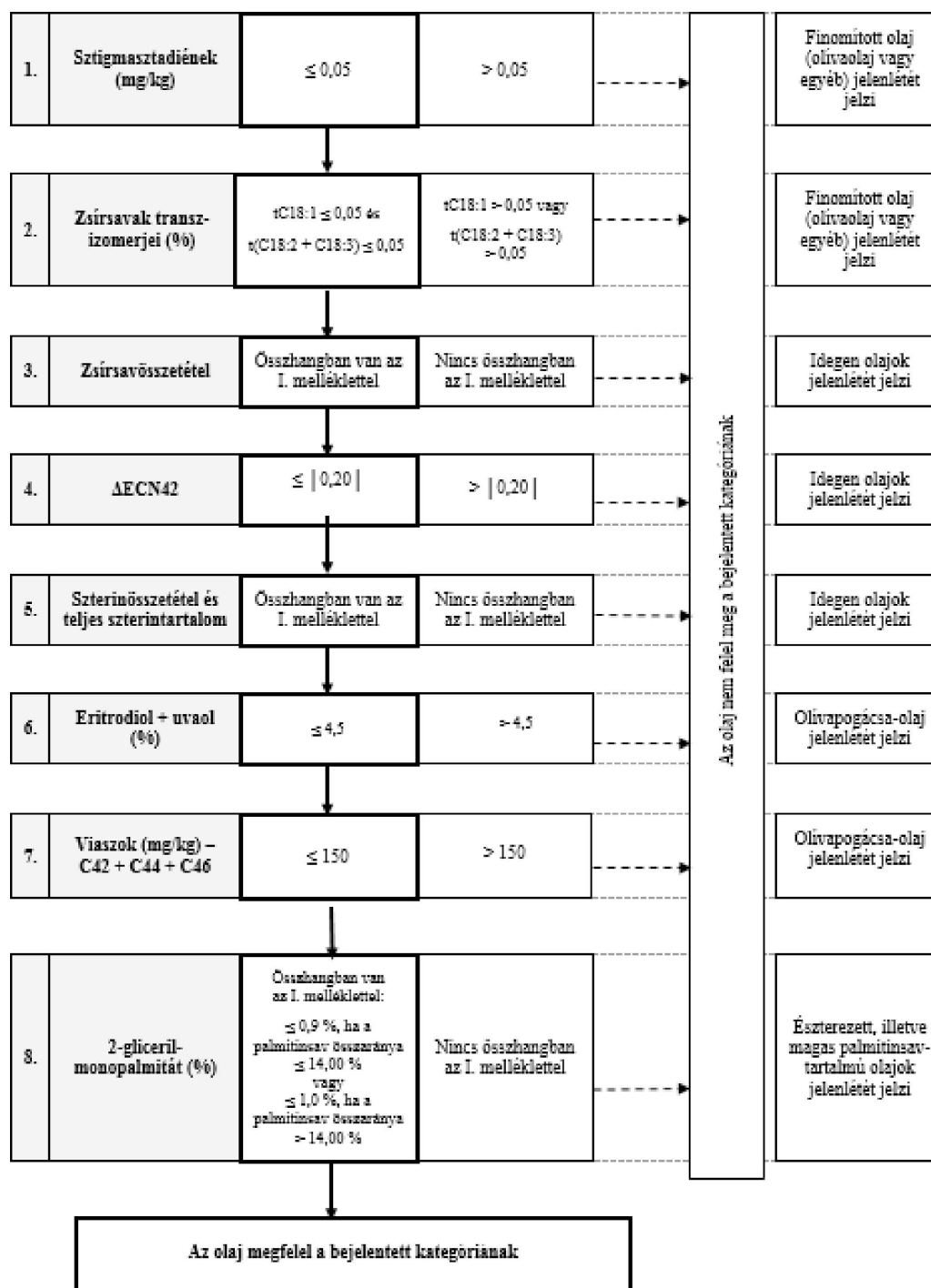
1. táblázat – Extra szűz olívaolaj – Minőségi kritériumok



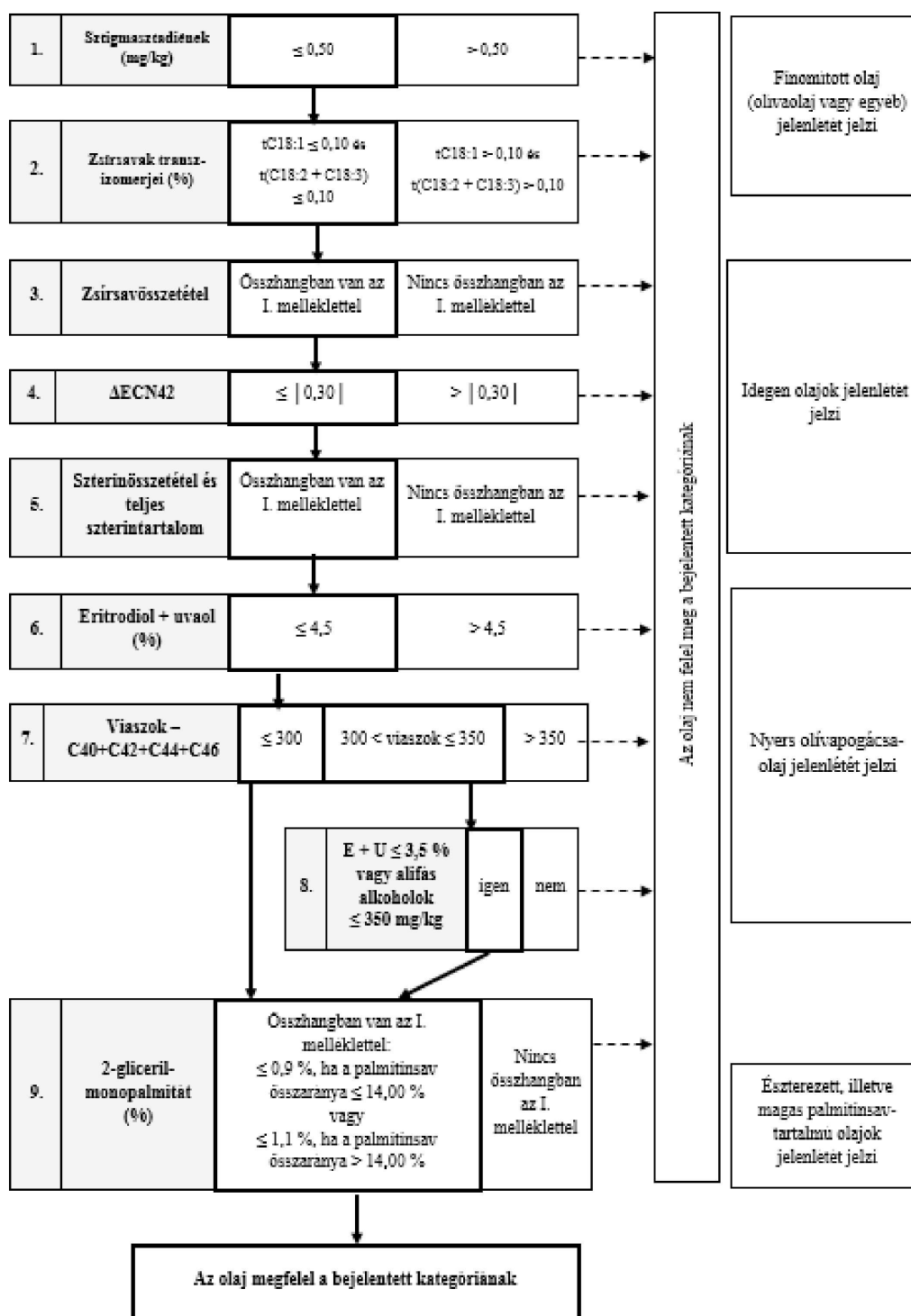
2. táblázat – Szűz olívaolaj – Minőségi kritériumok



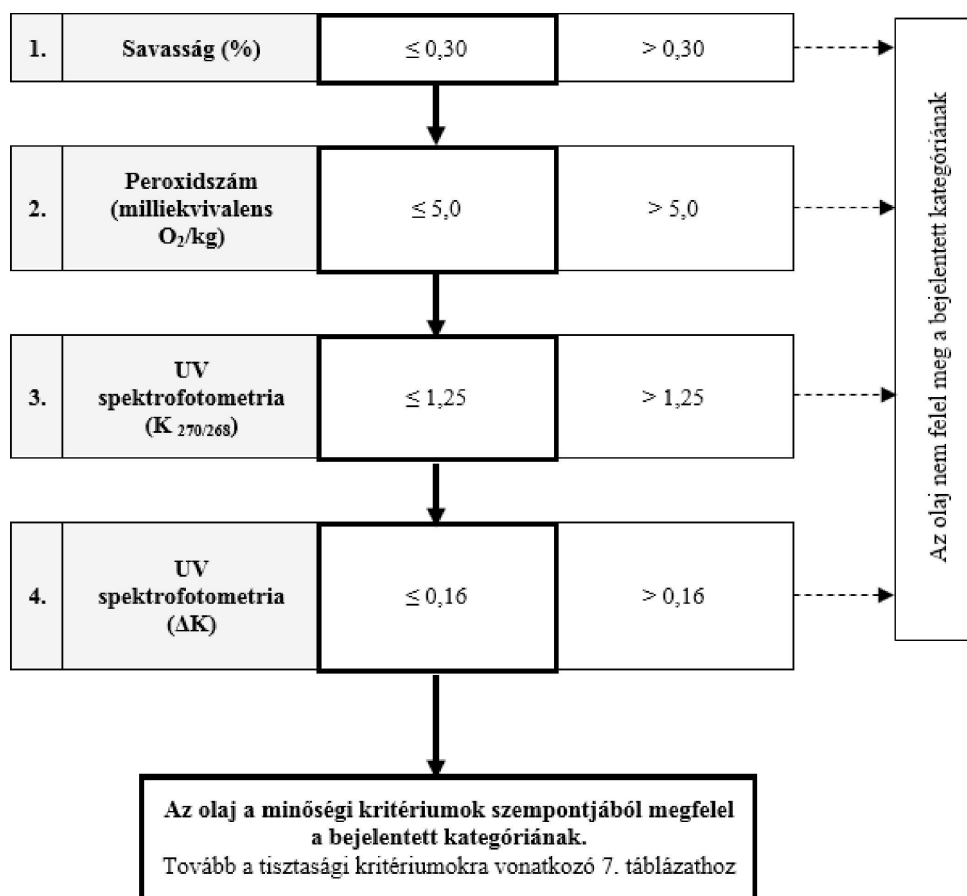
3. táblázat – Extra szűz olívaolaj és szűz olívaolaj – Tisztasági kritériumok



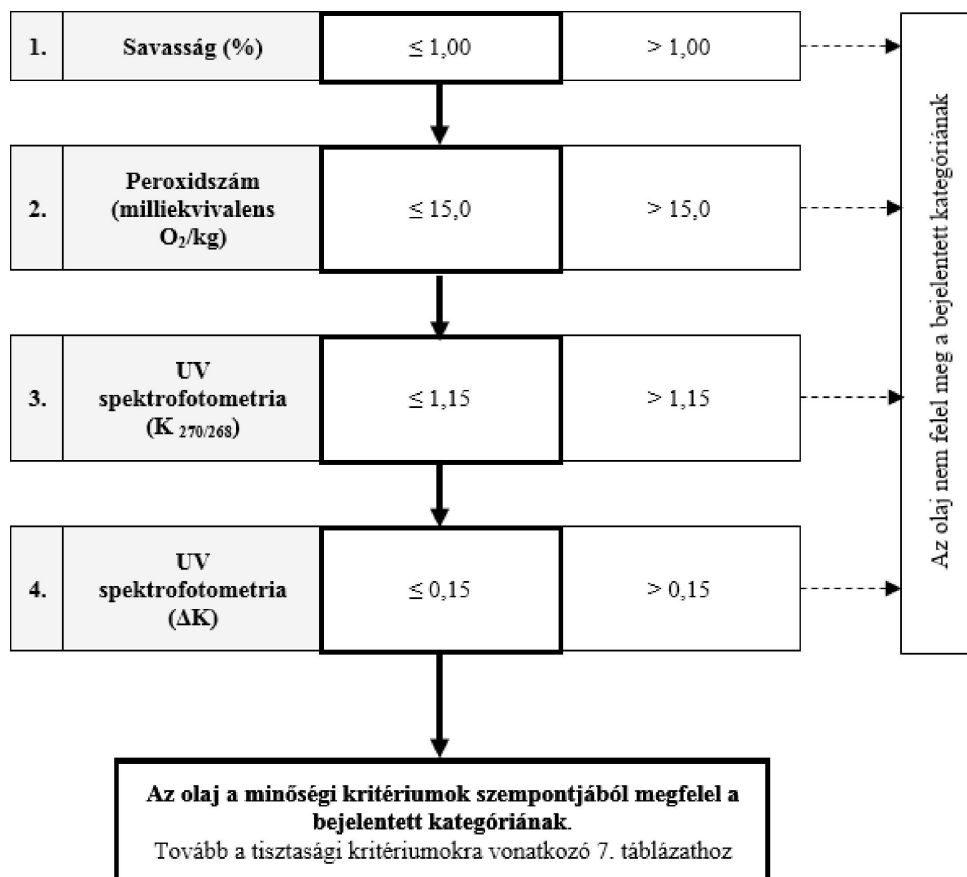
4. táblázat – Lampante olívaolaj – Tisztasági kritériumok



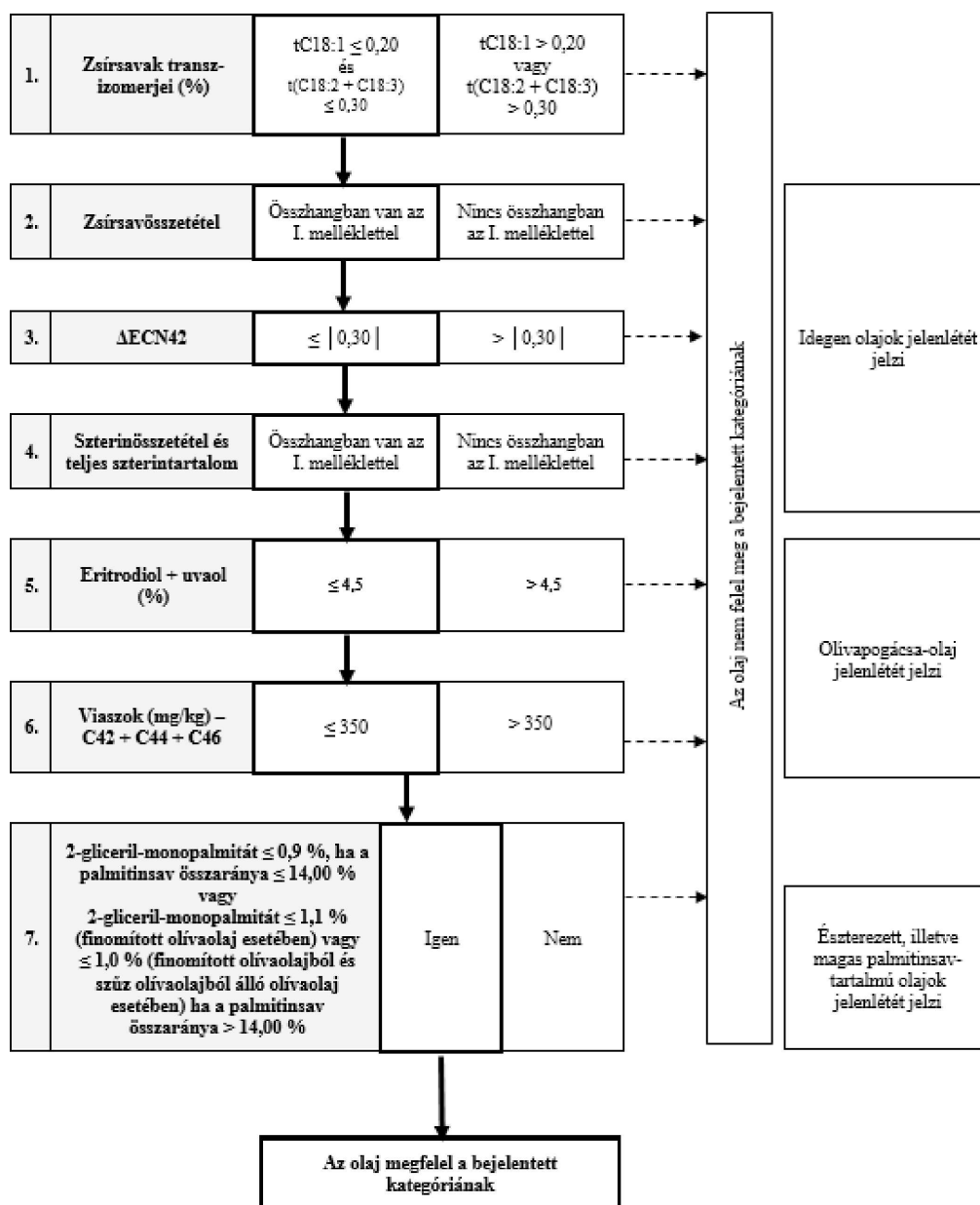
5. táblázat – Finomított olívaolaj – Minőségi kritériumok



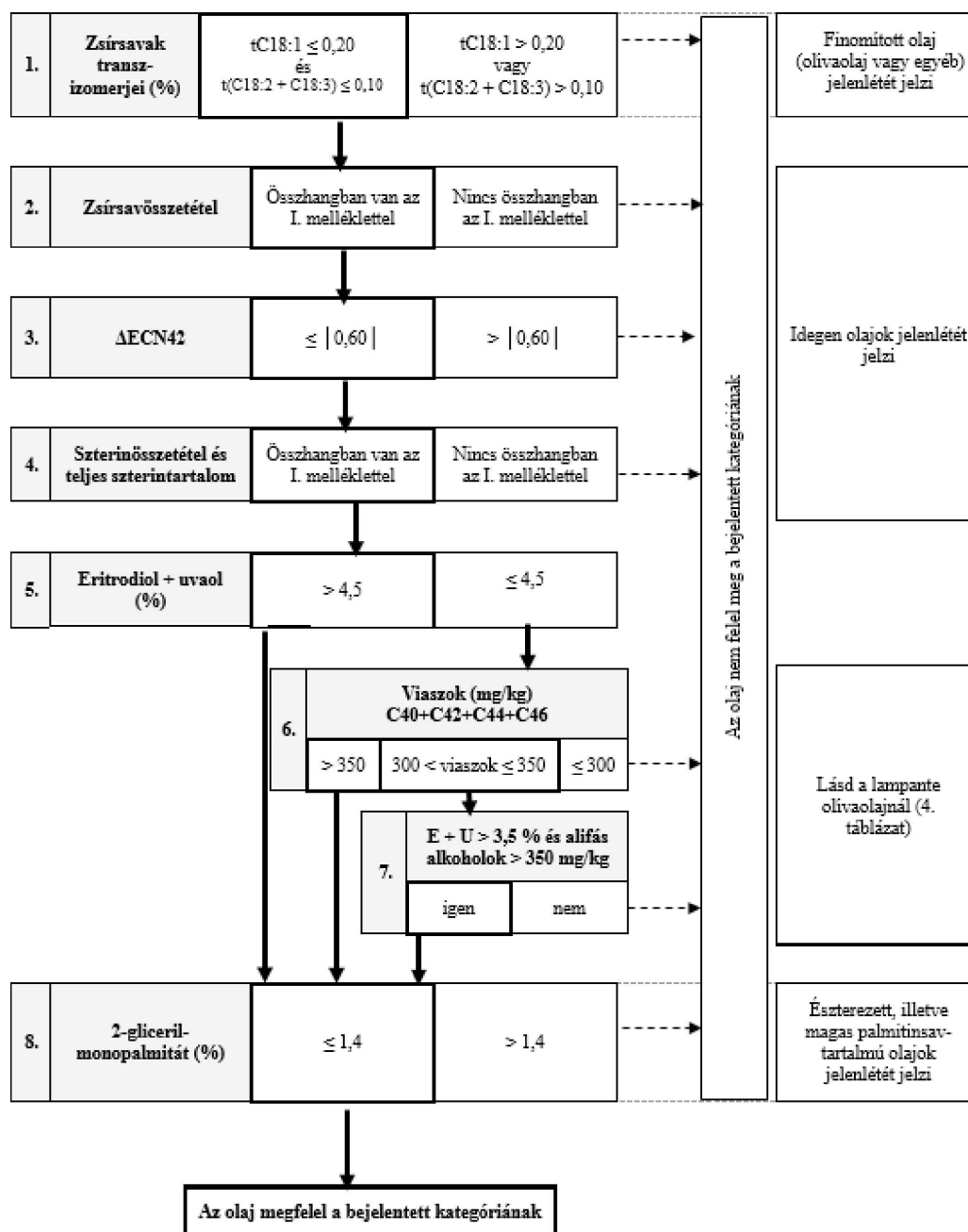
6. táblázat – Olívaolaj (finomított olívaolajból és szűz olívaolajból) – Minőségi kritériumok



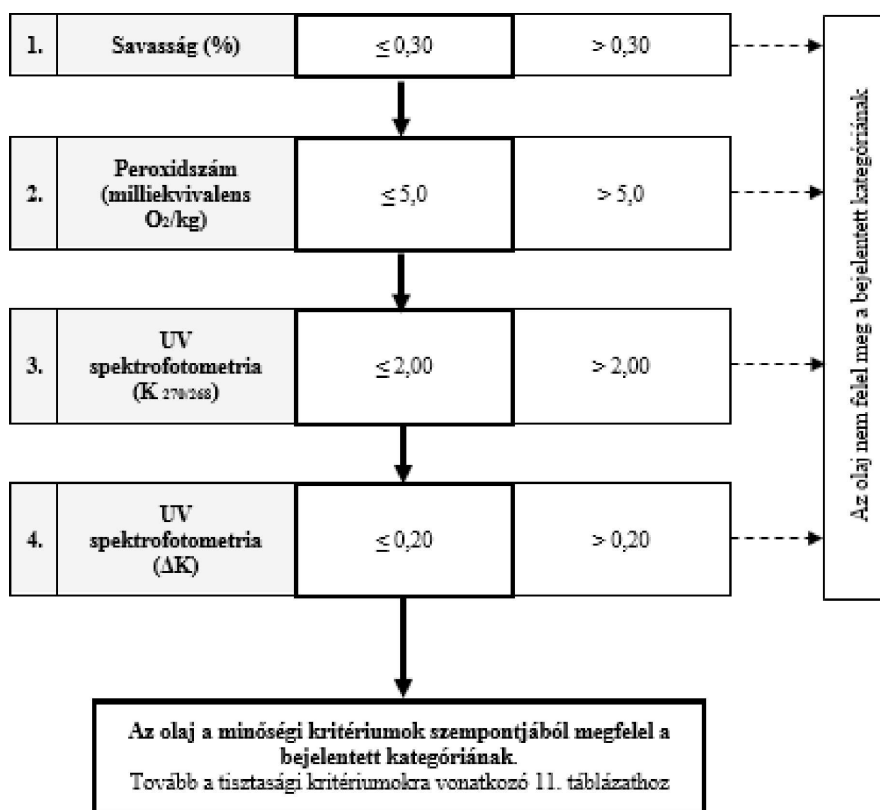
7. táblázat – Finomított olívaolaj, valamint finomított olívaolajból és szűz olívaolajból álló olívaolaj – Tisztasági kritériumok



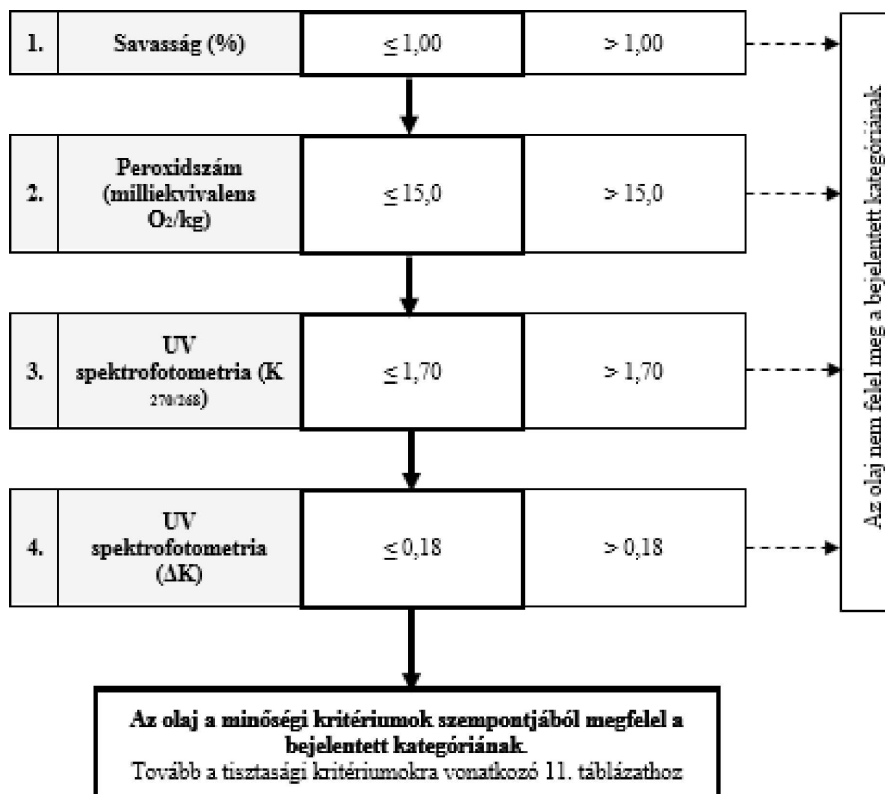
8. táblázat – Nyers olívaogácsa-olaj – Tisztasági kritériumok



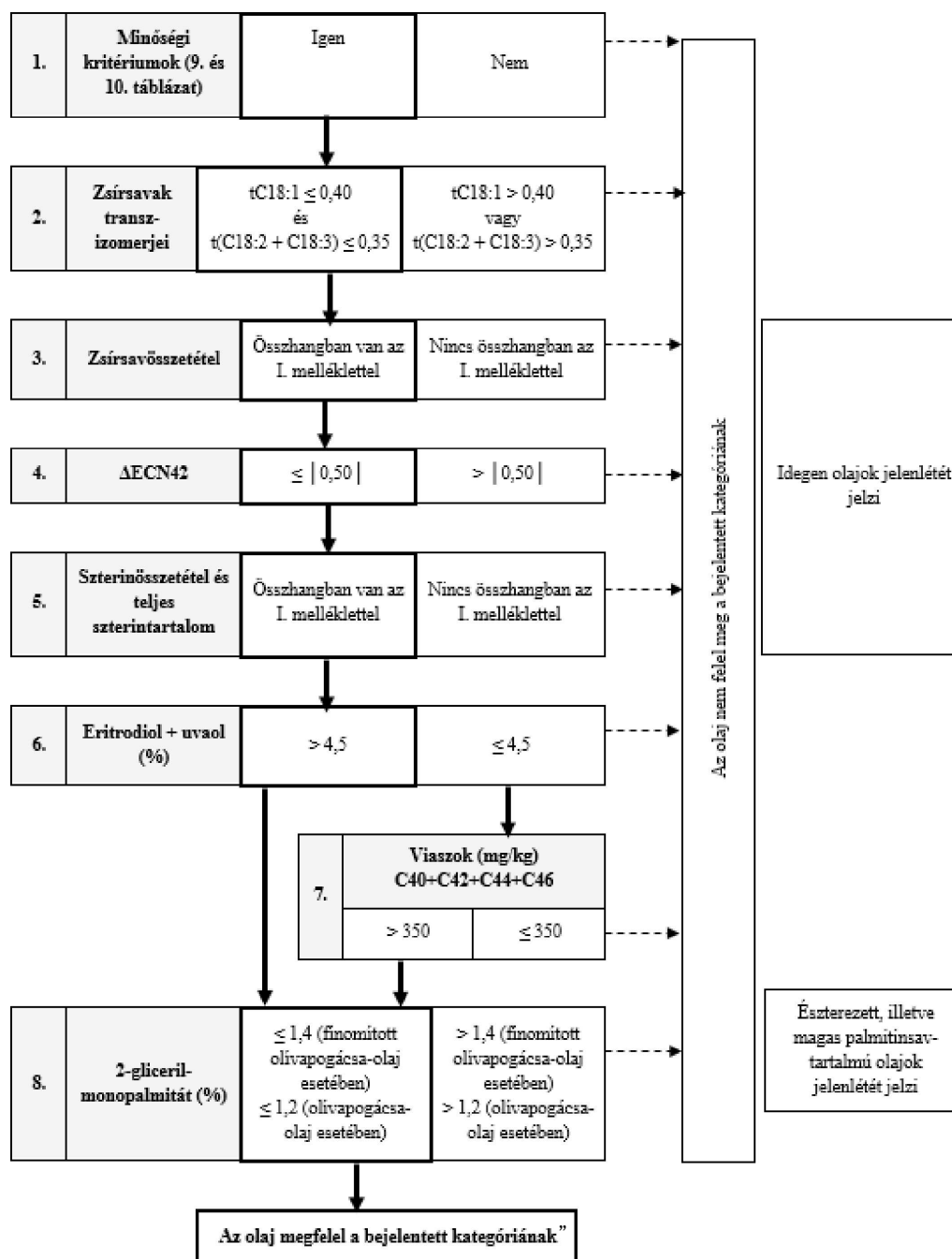
9. táblázat – Finomított olívpogácsa-olaj – Minőségi kritériumok



10. táblázat – Olívpogácsa-olaj – Minőségi kritériumok



11. táblázat – Finomított olívpogácsa-olaj és olívpogácsa-olaj – Tisztasági kritériumok



IV. MELLÉKLET

A XII. melléklet a következőképpen módosul:

1. A 3.3. pont helyébe a következő szöveg lép:

„3.3. A címkézésnél alkalmazható fakultatív kifejezések

Az értékelő csoport elnöke kérelemre tanúsíthatja, hogy az értékelt olajok a tulajdonságok érzékelésének intenzitása tekintetében kizárólag a következő kifejezések és jelzők szerinti meghatározásoknak és fokozatoknak felelnek meg.

Pozitív tulajdonságok (gyümölcsös, kesernyés és csípős): Az érzékelés intenzitásának függvényében:

- erős, ha az érintett tulajdonság mediánja 6,0-nál nagyobb;
- közepes, ha az érintett tulajdonság mediánja 3,0 és 6,0 között van;
- enyhe, ha az érintett tulajdonság mediánja 3,0-nál kisebb.

Gyümölcsösség	Az olajra jellemző mindazon – olajbogyófajta szerint változó – szagérzetek, amelyek olyan egészséges és friss olajbogyókból erednek, amelyekben sem a zöld, sem az érett gyümölcsösség nem domináns. E tulajdonság érzékelése közvetlen és/vagy retronazális úton történik.
Zöld gyümölcsösség	Az olajra jellemző mindazon – olajbogyófajta szerint változó – szagérzetek, amelyek a zöld gyümölcsre emlékeztetnek, és zöld, egészséges és friss olajbogyókból erednek. E tulajdonság érzékelése közvetlen és/vagy retronazális úton történik.
Érett gyümölcsösség	Az olajra jellemző mindazon – olajbogyófajta szerint változó – szagérzetek, amelyek az érett gyümölcsre emlékeztetnek, és egészséges és friss olajbogyókból erednek. E tulajdonság érzékelése közvetlen és/vagy retronazális úton történik.
Kiegyensúlyozott olaj	Olyan olaj, amely nem mutat kiegyensúlyozatlanságot; ezen azt a szaglási-ízlelési és érintési érzetet kell érteni, amikor a kesernyesség mediánja és a csípősség mediánja legfeljebb 2,0 ponttal van a gyümölcsösség mediánja fölött.
Lágy olaj	Olyan olaj, amelynél a kesernyesség és a csípősség mediánja 2,0 vagy annál kisebb.

Kifejezések az érzékelés intenzitásának függvényében:

Az érzékszervi vizsgálati jegyzőkönyvben szereplő kifejezések	Az érintett tulajdonság mediánja
Gyümölcsösség	—
Érett gyümölcsösség	—
Zöld gyümölcsösség	—
Enyhe gyümölcsösség	$\leq 3,0$
Közepes gyümölcsösség	$3,0 < Me \leq 6,0$
Erős gyümölcsösség	$> 6,0$
Enyhe érett gyümölcsösség	$\leq 3,0$
Közepes érett gyümölcsösség	$3,0 < Me \leq 6,0$
Erős érett gyümölcsösség	$> 6,0$
Enyhe zöld gyümölcsösség	$\leq 3,0$
Közepes zöld gyümölcsösség	$3,0 < Me \leq 6,0$
Erős zöld gyümölcsösség	$> 6,0$

Az érzékszervi vizsgálati jegyzőkönyvben szereplő kifejezések	Az érintett tulajdonság mediánja
Enyhe kesernyesség	$\leq 3,0$
Közepes kesernyesség	$3,0 < Me \leq 6,0$
Erős kesernyesség	$> 6,0$
Enyhe csípősség	$\leq 3,0$
Közepes csípősség	$3,0 < Me \leq 6,0$
Erős csípősség	$> 6,0$
Kiegyensúlyozott olaj	A kesernyesség mediánja és a csípősség mediánja legfeljebb 2,0 ponttal van a gyümölcsösség mediánja fölött.
Lágy olaj	A kesernyesség mediánja és a csípősség mediánja legfeljebb 2,0.”

2. A 9.4. pont helyébe a következő szöveg lép:

„9.4. Az olaj osztályozása

Az olaj a hibamedián és a gyümölcsösségi medián függvényében az alábbi osztályok valamelyikébe sorolandó. A hibamedián a legnagyobb intenzitással érzékelt hiba mediánja. A hibamediant és a gyümölcsösségi mediánt egy tizedesjegy pontossággal kell megadni.

Az olaj osztályozása a hibamedián és a gyümölcsösségi medián értékeinek az alább bemutatott referenciatartományokkal való összehasonlítása alapján történik. E tartományok határai a módszerhiba figyelembevételével kerültek megállapításra, ezért abszolút értékeknek tekintendők. A számítógépes programok táblázatba foglalt statisztikai adatok, illetve grafikus ábrázolás útján lehetővé teszik az osztályozás vizuális megjelenítését.

- Extra szűz olívaolaj: a hibamedián 0,0 és a gyümölcsösségi medián 0,0-nél nagyobb.
- Szűz olívaolaj: a hibamedián 0,0-nél nagyobb, de legfeljebb 3,5, és a gyümölcsösségi medián 0,0-nél nagyobb.
- Lampante szűz olívaolaj: a hibamedián 3,5-nél nagyobb, vagy a hibamedián legfeljebb 3,5 és a gyümölcsösségi medián 0,0.

1. megjegyzés: Ha a kesernyesség és/vagy a csípősség mediánja meghaladja az 5,0 értéket, a csoport elnöke ezt bejegyezi a vizsgálati jegyzőkönyvbe.

A megfeleléségi ellenőrzések keretében végzett elemzések esetében egy próbát végeznek. Egymásnak ellentmondó elemzések esetén külön kóstolások során két vizsgálatot kell elvégezni. A párhuzamos vizsgálatnak statisztikailag homogén eredményeket kell adnia (lásd a 9.5. pontot). Ellenkező esetben a minta vizsgálatát még kétszer el kell végezni. Az osztályozási tulajdonságok mediánjának végső értékét a két medián átlagaként kell kiszámolni.”

V. MELLÉKLET

A XVII. melléklet a következőképpen módosul:

1. Az 5.1. pont helyébe a következő szöveg lép:

„5.1. Hexán vagy alkánok keveréke 65 és 70 °C közötti forrásponttal, rektifikáló oszlopon lepárolva. A hexán helyettesíthető izooktánnal (kromatográfia céljára alkalmas minőségű 2,2,4-trimetil-pentán), feltéve, hogy összehasonlítható pontossági értékek érhetők el. Az ellenőrzés történhet a 100 ml oldószer elpárologtatása után visszamaradó anyag vizsgálata útján. Az n-hexán forráspontjánál magasabb forráspontú oldószeres hosszabb idő alatt párolognak el. A hexán toxicitása miatt azonban előnyben kell részesíteni őket.”

2. A 6.3.3. pont a következő szöveggel egészül ki:

„10. megjegyzés Amennyiben a sztigmasztadiének koncentrációja meghaladja a 4 mg/kg értéket, akkor szükség esetén a mennyiségi meghatározáshoz a Nemzetközi Olívanács által a finomított olajok szterinjeinek meghatározása céljára elfogadott módszert kell alkalmazni.”

—

VI. MELLÉKLET

A XVIII. melléklet a következőképpen módosul:

1. A 4.2.1. pont helyébe a következő szöveg lép:

„4.2.1. Kromatográfia céljára alkalmas minőségű petróleum-éter (40–60 °C) vagy hexán. A hexán helyettesíthető izooktánnal (kromatográfia céljára alkalmas minőségű 2,2,4-trimetil-pentán), feltéve, hogy összehasonlítható pontossági értékek érhetők el. Az n-hexán forráspontjánál magasabb forráspontú oldószerek hosszabb idő alatt párolognak el. A hexán toxicitása miatt azonban előnyben kell részesíteni őket.”

2. A szöveg a következő 4.2.12. ponttal egészül ki:

„4.2.12. Kromatográfia céljára alkalmas minőségű heptán. A heptán helyettesíthető izooktánnal (kromatográfia céljára alkalmas minőségű 2,2,4-trimetil-pentán).”

—

VII. MELLÉKLET

„XIX. MELLÉKLET

**A SZTERINÖSSZETÉTEL ÉS -TARTALOM, VALAMINT AZ ALKOHOLOS VEGYÜLETEK MEGHATÁROZÁSA
KAPILLÁRIS GÁZKROMATOGRÁFIÁVAL**

1. ALKALMAZÁSI KÖR

A módszer az olívaolajokban és az olívaogácsa-olajokban, valamint ezek keverékeiben található egyes alkoholos vegyületek mennyiségének és az ilyen vegyületek össz mennyiségének meghatározására szolgáló eljárást ismerteti.

Az olívaolajok és az olívaogácsa-olajok alkoholos vegyületei lehetnek alifás alkoholok, szterinek és triterpén-dialkoholok.

2. ALAPELV

Az olajakat, amelyekhez belső standardként α -kolesztanol és 1-eikozanol adnak, etanolos kálium-hidroxid-oldattal elszappanosítják, majd az el nem szappanosítható anyagot etiléterrel kivonják.

A különböző alkoholos vegyületek frakcióit vagy vékonyréteg-kromatográfiával, bázisos szilikagél lemezen (referencia-módszer), vagy nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC), szilikagél oszlop alkalmazásával elválasztják az el nem szappanosítható anyagtól. A szilikagél felhasználásával elvégzett elválasztás útján visszanyert frakciókat trimetilszilil-éterre alakítják és kapilláris oszlopos gázkromatográfia alkalmazásával elemzik.

1. RÉSZ**AZ EL NEM SZAPPANOSÍTHATÓ ANYAG ELŐÁLLÍTÁSA**

1. ALKALMAZÁSI KÖR

Ez a rész az el nem szappanosítható anyag előállításának és kivonásának módját ismerteti. Az olíva- és olívaogácsa-olajokból származó, el nem szappanosítható anyag előállítását és kivonását foglalja magában.

2. ALAPELV

A vizsgált mennyiséget az etanolos kálium-hidroxid-oldattal, visszafolytatás mellett történő forralással elszappanosítják. Az el nem szappanosítható anyagot dietil-éterrel kivonják.

3. BERENDEZÉS

Hagyományos laboratóriumi felszerelés különös tekintettel a következőkre:

- 3.1. 250 ml-es, gömbölyű fenekű lombik visszafolyós hűtővel és csiszolt üvegcsatlakozókkal.
- 3.2. 500 ml-es elválasztó tölcser.
- 3.3. 250 ml-es lombikok.
- 3.4. 100 μ l-es és 500 μ l-es mikrofecskendők.
- 3.5. Megközelítőleg 2 cm átmérőjű és megközelítőleg 5 cm magas, vákuum alatti szűrésre alkalmas hengeres szűrőtölcser G3 porózus válaszfalal (15–40 μ m-es porozitás), csiszolt üveg apacsatlakozóval.
- 3.6. A szűrőtölcserhez (3.5.) csatlakoztatható, 50 ml-es Erlenmeyer-lombik csiszolt üveg anyacsatlakozóval.
- 3.7. 10 ml-es, kúpos fenekű kémcső csiszolt üveg dugóval.
- 3.8. Kalcium-kloriddal működő szárítóberendezés.

4. REAGENSEK

- 4.1. Kálium-hidroxid (minimális titer: 85 %).

- 4.2. Kálium-hidroxid megközelítőleg 2 M etanolos oldata.
130 g kálium-hidroxid (4.1.) hűtés közben feloldva 200 ml desztillált vízben, majd etanollal (4.7.) feltöltve egy liter mennyiségűre. Az oldatot jól lezárt, sötét színű üvegben kell tárolni, legfeljebb 2 napig.
- 4.3. Analízis céljára alkalmas minőségű etiléter.
- 4.4. Analízis céljára alkalmas minőségű, vízmentes nátrium-szulfát.
- 4.5. Kromatográfia céljára alkalmas minőségű acetone.
- 4.6. Kromatográfia céljára alkalmas minőségű etiléter.
- 4.7. Analízis céljára alkalmas minőségű etanol.
- 4.8. Analízis céljára alkalmas minőségű etil-acetát.
- 4.9. Belső standard, α -kolesztanol, 99 % feletti tisztaságú (a tisztaságot gázkromatográfiás elemzéssel kell ellenőrizni).
- 4.10. α -kolesztanol belső standard oldat, 0,2 % (m/V) oldat etil-acetátban (4.8.).
- 4.11. Fenoltaleinoldat, 10 g/l etanolban (4.7.).
- 4.12. 0,1 %-os (m/V) 1-eikozanol-oldat etil-acetátban (belső standard).

5. ELJÁRÁS

Egy 500 μ l-es mikrofecskendő (3.4.) segítségével tegyen a 250 ml-es lombikba (3.1.) olyan mennyiségű α -kolesztanol belső standard oldatot (4.10.) és olyan mennyiségű 1-eikozanol (4.12.), amelyben a kolesztanol, illetve az eikozanol mennyisége a minta szterin- és alkoholtartalmának megközelítőleg 10 %-a. Például 5 g olívaolaj-mintához adjon 500 μ l α -kolesztanol-oldatot (4.10.) és 250 μ l 1-eikozanol-oldatot (4.12.). Az olívapogácsa-olajok esetében az α -kolesztanol-oldatból (4.10.) és az 1-eikozanol-oldatból (4.12.) egyaránt 1 500 μ l-t adjon a mintához. Enyhe nitrogénáramban való párologtatással, meleg vízfürdőben szárítsa ki. A lombik lehűtése után mérjen $5,00 \pm 0,01$ g-ot a száraz, szűrt mintából ugyanabba a lombikba.

1. megjegyzés: Az észlelhető mennyiségű koleszterint tartalmazó állati vagy növényi olajok és zsírok esetében olyan csúcsok jelenhetnek meg, amelyek retenciósideje megegyezik a kolesztanoléval. Ennek előfordulása esetén a szterinfrakció esetében két elemzést kell végezni, az egyiket belső standard nélkül, a másikat pedig belső standarddal.

Adjon hozzá 50 ml 2 M etanolos kálium-hidroxid-oldatot (4.2.) és néhány forrkövet, csatlakoztassa a visszafolyós hűtőt, és vízfürdőben fokozatosan hevítse forrásig, amíg a szappanképződés meg nem indul (az oldat tisztává válik). Folytassa a melegítést további 20 percen keresztül, majd adjon hozzá 50 ml desztillált vizet a visszafolyós hűtő tetején keresztül, ezután szerelje le a hűtőt, és hűtse le a lombikot megközelítőleg 30 °C-ra.

A lombik tartalmát töltse át egy 500 ml-es elválasztó tölcserbe (3.2.) több rész desztillált vízzel (50 ml) történő öblítés mellett. Adjon hozzá megközelítőleg 80 ml etilétert (4.6.) és körülbelül 60 másodpercen keresztül rázza erőteljesen; a nyomás kiengedéséhez időnként fordítsa át az elválasztó tölcserét és nyissa meg az elzárócsapot. Hagyja állni, amíg a két fázis teljesen szét nem válik (2. megjegyzés). Ezután válassza le a szappanos oldatot amennyire csak lehetséges, és helyezze át egy másik elválasztó tölcserbe. Végezzen két további kivonást a vizes-alkoholos fázison hasonló módon, esetenként 60–70 ml etiléter (4.6.) felhasználásával.

2. megjegyzés: Az emulziók megszüntethetők kis mennyiségű etanol (4.7.) hozzáadásával.

A három éterkivonatot keverje össze egy közös elválasztó tölcserben 50 ml vízzel. Folytassa az átmosást vízzel (50 ml-enként), amíg a mosóvíz már nem válik rózsaszínűvé egy csepp fenoltaleinoldat (4.11.) hozzáadására. A mosóvíz eltávolítását követően szűrje át vízmentes nátrium-szulfáton (4.4.) egy 250 ml-es lombikba, amelynek súlyát előzőleg lemérte; a tölcserét és a szűrőt mossa ki több adagban, kis mennyiségű etiléterrel (4.6.).

Desztillációval párologtassa el az oldószert rotációs bepárlóban, 30 °C-on, vákuumban. Adjon hozzá 5 ml acetont (4.5.), és az illékony oldószert teljesen távolítsa el enyhe nitrogénáramban. Kemencében 103 ± 2 °C-os hőmérsékleten szárítsa a maradékot 15 percen keresztül. Szárítóberendezésben hagyja kihűlni, és mérje meg a súlyát 0,1 mg pontossággal.

2. RÉSZ**AZ ALKOHOLOS VEGYÜLETEK FRAKCIÓINAK ELVÁLASZTÁSA****1. ALKALMAZÁSI KÖR**

Az 1. részben foglaltak szerint előállított, el nem szappanosítható anyagnak a különböző alkoholos vegyületek – az alifás alkoholok, a szterinek és a triterpén-dialkoholok (eritrodliol és uvaol) – frakcióira bontása.

2. ALAPELV

Az el nem szappanosítható anyag bázisos vékonyréteg-kromatográfiával (referencia-módszer) frakcionálható, kimutatható, a megfelelő sávok pedig lekaphatóak és kivonhatóak. Alternatív elválasztási módszerként HPLC is alkalmazható szilikagél oszlop és UV-detektor használatával, összegyűjtve a különböző frakciókat. Az alifás és a triterpén-alkoholok, valamint a szterin és a triterpén-dialkoholok együtt kerülnek elkülönítésre.

3. BERENDEZÉS

Hagyományos laboratóriumi felszerelés különös tekintettel a következőkre:

- 3.1. Komplet elemzőberendezés vékonyréteg-kromatográfiához, 20 × 20 cm-es nagyságú üveg tárgylemezekkel.
- 3.2. 366 vagy 254 nm hullámhosszúságú ultraibolya lámpa.
- 3.3. 100 µl-es és 500 µl-es mikrofecskendők.
- 3.4. Megközelítőleg 2 cm átmérőjű és megközelítőleg 5 cm magas, vákuum alatti szűrésre alkalmas hengeres szűrőtölcsér G3 porózus válaszfalal (15–40 µm-es porozitás), csiszolt üveg apacsatlakozóval.
- 3.5. A szűrőtölcsérhez (3.4.) csatlakoztatható, 50 ml-es Erlenmeyer-lombik csiszolt üveg anyacsatlakozóval.
- 3.6. 10 ml-es, kúpos fenekű kémcső csiszolt üvegdugóval.
- 3.7. Kalcium-kloriddal működő szárítóberendezés.
- 3.8. HPLC-rendszer, amely a következőkből áll:
 - 3.8.1. Bináris pumpa.
 - 3.8.2. 200 µl-es injektáló hurokkal felszerelt kézi vagy automatikus injektor.
 - 3.8.3. Integrált gáztalanító.
 - 3.8.4. UV-VIS vagy infravörös detektor.
- 3.9. HPLC-oszlop (25 cm × 4 mm belső átmérő), szilikagél 60 használatával (5 µm-es részecskeméret).
- 3.10. 0,45 µm-es fecskendőszűrő.
- 3.11. 25 ml-es Erlenmeyer-lombik.

4. REAGENSEK

- 4.1. Kálium-hidroxid (minimális titer: 85 %).
- 4.2. Kálium-hidroxid megközelítőleg 2 M etanos oldata.

130 g kálium-hidroxid (4.1.) hűtés közben feloldva 200 ml desztillált vízben, majd etanollal (4.9.) feltöltve egy liter mennyiségűre. Az oldatot jól lezárt, sötét színű üvegben kell tárolni, legfeljebb 2 napig.
- 4.3. Analízis céljára alkalmas minőségű etiléter.
- 4.4. Kálium-hidroxid megközelítőleg 0,2 M etanos oldata.

13 g kálium-hidroxid (4.1.) feloldva 20 ml desztillált vízben, majd etanollal (4.9.) feltöltve egy liter mennyiségűre.
- 4.5. Szilikagél bevonatú, 0,25 mm vastagságú, 20 x 20 cm-es üveg tárgylemezek, fluoreszcens indikátor nélkül (kereskedelmi fogalomban használatra készen kapható).
- 4.6. Kromatográfia céljára alkalmas minőségű acetone.

- 4.7. Kromatográfia céljára alkalmas minőségű n-hexán.
 - 4.8. Kromatográfia céljára alkalmas minőségű etiléter.
 - 4.9. Analízis céljára alkalmas minőségű etanol.
 - 4.10. Analízis céljára alkalmas minőségű etil-acetát.
 - 4.11. Referenciaoldat a vékonyréteg-kromatográfiához: koleszterin, fitoszterinek, alkoholok és eritrodol 5 %-os oldata etil-acetátban (4.10.)
 - 4.12. 2,7-diklór-fluoreszcein 0,2 %-os oldata etanolban. Enyhén meglúgosítva néhány csepp 2 M alkoholos kálium-hidroxid-oldat (4.2.) hozzáadásával.
 - 4.13. n-hexán (4.7.) és etiléter (4.8.) 65:35 térfogatarányú (V/V) elegye.
 - 4.14. A HPLC mozgófázisa: n-hexán (4.7.) és etiléter (4.8.) 1:1 (V/V) arányban.
5. REFERENCIA-MÓDSZER: AZ ALKOHOLOS VEGYÜLETEK ELVÁLASZTÁSA BÁZISOS VÉKONYRÉTEG-KROMATOGRÁFIÁS LEMEZ HASZNÁLATÁVAL

A bázisos vékonyréteg-kromatográfias lemezek előkészítése. Merítse vagy mártsa be a szilikagél bevonatú lemezeket (4.5.) 4 cm mélységben 0,2 M etanolos kálium-hidroxid-oldatba (4.4.) 10 másodpercig, majd hagyja őket füstszekrényben száradni két órán át, végül helyezze őket 100 °C hőmérsékletű kemencébe egy órára.

Vegye ki a lemezeket a kemencéből, és felhasználásig tegye őket kalcium-kloriddal működő szárítóberendezésbe (3.7.) (az így kezelt lemezeket 15 napon belül fel kell használni).

A hexán és az etiléter elegyét (4.13.) (3. megjegyzés) vezesse egy futtatókádba megközelítőleg 1 cm mélységben. Zárja le a kádat megfelelő fedéllel, és hagyja hűvös helyen legalább egy fél órán keresztül annak érdekében, hogy beálljon az egyensúly a gőz és a folyadék között. A kád belső felületein az eulensbe merülő szűrőpapírcsíkok helyezhetők el. Ezzel megközelítőleg egyharmadával csökkenthető a futtatási idő, és egyenletesebb lesz az összetevők eluálódása.

3. megjegyzés: A futtatóelegyet a tökéletesen reprodukálható elúciós körülmények megteremtése érdekében minden vizsgálatnál cserélni kell. Alternatív megoldásként használható n-hexán és etiléter 50:50 térfogatarányú (V/V) oldata is.

Az 1. részben foglaltaknak megfelelően előállított, el nem szappanosítható anyagból készítsen megközelítőleg 5 %-os etil-acetátos (4.10.) oldatot, és a 100 µl-es mikrofecskendő (3.3.) segítségével ebből az oldatból 0,3 ml-t vigyen fel egyenletes és vékony csíkban egy kromatográfias lemez (4.5.) alsó részére (2 cm-re a szélétől). A csíkhöz igazodva vigyen fel 2–3 µl-t a megadott anyagok referenciaoldatából (4.11.) annak érdekében, hogy a szterin-, triterpén-dialkohol- és alkoholsávok azonosíthatók legyenek a futtatás után.

Helyezze a lemezt a futtatókádba (3.1.). A környezeti hőmérsékletet 15–20 °C között kell tartani (4. megjegyzés). Azonnal zárja le a kádat a fedéllel, és hagyja a lemezt eluálódni, amíg az oldószerfront el nem éri a lemez felső szélétől számított 1 cm távolságot. Ekkor vegye ki a lemezt a futtatókádból, és meleglevegő-áram segítségével vagy a lemezt rövid időre elszívófülkébe helyezve párologtassa el az oldószert.

4. megjegyzés: Magasabb hőmérséklet hatására romlik az elválasztás hatásfoka.

Kismértékben és egyenletesen permetezze be a lemezt 2,7-diklór-fluoreszcein-oldattal (4.12.), és hagyja megszáradni. A lemez ultraibolya lámpa (3.2.) alatti vizsgálatakor a szterin-, triterpén-dialkohol- és alkoholsávokat a referenciaoldat (4.11.) által hagyott foltok segítségével lehet elkülöníteni. A fluoreszkáló terület mentén fekete ceruzával jelölje be a sávok határait (lásd az 1. ábrán látható vékonyréteg-kromatográfias lemezt).

A kijelölt területen található szilikagél kaparja le egy fémspatulával. Az eltávolított és apróra zúzott anyagot tegye egy szűrőtölcsérbe (3.4.). Adjon hozzá 10 ml forró etil-acetátot (4.10.), és alaposan keverje össze a fémspatula segítségével, majd (szükség esetén vákuumban) szűrje le, a szűrletet gyűjtse össze a szűrőtölcsérhez csatlakoztatott Erlenmeyer-lombikban (3.5.).

A lombikban maradó anyagot mossa ki háromszor etiléterrel (4.3.) (minden alkalommal megközelítőleg 10 ml-rel), a szűrletet gyűjtse ugyanabba a tölcsérhez csatlakoztatott lombikba. Párolja be a szűrletet megközelítőleg 4–5 ml térfogatra, és a maradék oldatot töltsé egy 10 ml-es kémcsőbe (3.6.), amelynek súlyát előzőleg lemérte; enyhe melegítéssel, gyenge nitrogénáramban párologtatva szárítsa ki az oldatot, pótolja ki újra néhány csepp acetonnal (4.6.), majd párologtassa el újra a kiszáradásig. A kémcsőben maradt anyag a szterin- és a triterpén-dialkohol, illetve az alkoholok és a triterpén-alkoholok frakcióiból áll

6. AZ ALKOHOLOS FRAKCIÓ ELVÁLASZTÁSA NAGY TELJESÍTMÉNYŰ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁVAL (HPLC)

Az 1. részben foglaltaknak megfelelően előállított, el nem szappanosítható anyagot oldja fel 3 ml mozgófázisban (4.14.), majd szűrje át az oldatot egy fecskendőszűrővel (3.10.), és tegye félre.

Fecskendezzen be 200 µl-t az el nem szappanosított anyag leszűrt oldatából a HPLC-rendszerbe (3.8.)

Futtassa a HPLC-elválasztást 0,8 ml/perc sebességgel, öntse ki az első 5 percben átáramlott mennyiséget, majd gyűjtse 25 ml-es Erlenmeyer-lombikokba (3.11.) az 5 és 10 perc közötti időszámban átáramló oldatot az alifás és a triterpén-alkoholok, aztán a 11 és 25 perc közötti időszámban átáramló oldatot a szterinek, az eritrodinol és az uvaol elválasztásához (5. megjegyzés).

Az elválasztás 210 nm-es hullámhosszra beállított UV-detektorral vagy törésmutató detektorral követhető nyomon (lásd a 6. ábrát).

A frakciókat párologtatással ki kell szárítani és elő kell készíteni a kromatográfiás elemzéshez.

5. megjegyzés: Gondosan felügyelje a HPLC-pumpa nyomását: az etiléter növelheti a nyomást, ezért az áramlást a nyomás megfelelő szinten tartása érdekében szükség szerint ki kell igazítani.

3. RÉSZ

AZ ALKOHOLOS VEGYÜLETEK FRAKCIÓINAK GÁZKROMATOGRÁFIÁS ELEMZÉSE

1. ALKALMAZÁSI KÖR

Ez a rész általános útmutatást ad az e módszer 2. részében ismertetett eljárás szerint elkülönített alkoholos vegyületek minőségi és mennyiségi összetételének kapilláris oszlopos gázkromatográfia alkalmazásával történő meghatározásához.

2. ALAPELV

Az el nem szappanosítható anyagból vékonyréteg-kromatográfiával vagy nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával kigyűjtött frakciókat származékképzés útján trimetilszilil-éterekké alakítják át, majd megosztó (split) injektor és lángionizációs detektor használatával végzett kapilláris oszlopos gázkromatográfia alkalmazásával elemzik.

3. BERENDEZÉS

Hagyományos laboratóriumi felszerelés különös tekintettel a következőkre:

- 3.1. 10 ml-es, kúpos fenekű kémcső csiszolt üvegdugóval.
- 3.2. Megosztó injektoros kapilláris oszloppal használható gázkromatográf, amely a következőkből áll:
 - 3.2.1. termosztatikus kamra az oszlopok számára (oszlopkemence), amely alkalmas arra, hogy a kívánt hőmérsékletet ± 1 °C pontossággal fenntartsa;
 - 3.2.2. szabályozható hőmérsékletű befecskendező egység perszilanizált üvegből készült gőzölögtető elemmel és megosztásos (split) rendszerrel;
 - 3.2.3. lángionizációs detektor (FID);
 - 3.2.4. a lángionizációs detektorral (3.10.3.) használható, manuális integrációra alkalmas adatgyűjtő rendszer.
- 3.3. Olvasztott szilícium-dioxidból készült, 20–30 m hosszúságú, 0,25–0,32 mm belső átmérőjű, egyenes 0,10–0,30 µm vastagságú, 5 % difenil- és 95 % dimetil-polisziloxán összetételű bevonattal ellátott (SE-52 vagy SE-54 vagy ezekkel egyenértékű állófázist tartalmazó) kapilláris oszlop.
- 3.4. 10 µl térfogatú mikrofecskendő gázkromatográfiahoz, megosztó injektáláshoz alkalmas cementált tűvel.

4. REAGENSEK

- 4.1. Kromatográfia céljára alkalmas minőségű vízmentes piridin.
- 4.2. Analízis céljára alkalmas minőségű hexametil-diszilazán.
- 4.3. Analízis céljára alkalmas minőségű trimetil-klórszilán.

- 4.4. Szterin-trimetilszilil-éterek referenciaoldatai. A felhasználáskor kell előállítani az azokat tartalmazó olajokból származó szterinekből és eritrodiolból.
- 4.5. C20–C28 alifás alkoholok trimetilszilil-étereinek standard oldatai. A felhasználáshoz tiszta alkoholok elegyeiből frissen készíthetők el.
- 4.6. Vivőgáz: gázkromatográfiás tisztaságú hidrogén vagy hélium.
- 4.7. Segédgázok: gázkromatográfiás tisztaságú hidrogén, hélium, nitrogén és levegő.
- 4.8. Szililező reagens piridin, hexametil-diszilazán és trimetil-klórszilán 9:3:1 (V/V/V) térfogatarányú elegyből.
- 4.9. Kromatográfia céljára alkalmas minőségű n-hexán.

5. A TRIMETILSZILIL-ÉTEREK ELŐÁLLÍTÁSA

Töltse az alkoholos vegyület frakcióját tartalmazó kémcsőbe (3.1.) a szililező reagenst (4.8.) (6. megjegyzés), az alkoholos vegyület minden milligrammjához 50 µl-nyi mennyiségben, úgy, hogy az közben ne vegyen fel nedvességet (7. megjegyzés).

6. megjegyzés: A használatra kész oldatok kereskedelmi forgalomban kaphatók. Egyéb szililező reagensek – például a bisz-trimetilszilil-trifluor-acetamid + 1 % trimetil-klórszilán, amelyet azonos térfogatú vízmentes piridinnel kell hígítani – szintén kaphatók. A piridin helyettesíthető azonos mennyiségű acetonitrillel.

7. megjegyzés: Kismértékű opálosság kialakulhat; ez normális jelenség, nem okoz problémát. A fehér pelyhek képződése vagy a rózsaszín elszíneződés megjelenése nedvesség jelenlétét, illetve a reagens elhasználódását jelzi. Ilyen esetben a tesztet meg kell ismételni (kizárólag hexametil-diszilazán és trimetil-klórszilán elegyének használata esetén).

Zárja le a kémcsövet (3.1.), és óvatosan (felfordítás nélkül) rázza addig, amíg az összetevők teljesen fel nem oldódnak. Hagyja az oldatot legalább 15 percig szobahőmérsékleten állni, majd ezt követően centrifugálja néhány percig. A tiszta oldat készen áll a gázkromatográfiás elemzésre.

6. GÁZKROMATOGRÁFIÁS ELEMZÉS

6.1. Előzetes műveletek és az oszlop tömítése

A kapilláris oszlopot (3.3.) illessze be a gázkromatográfba úgy, hogy az oszlop bemenetét csatlakoztassa a megosztó injektorhoz, az oszlop kimenetét pedig a detektorhoz.

Végezze el a gázkromatográfiás berendezés általános ellenőrzését (gázszerelvények szivárgása, a detektor határfoka, a megosztós rendszer és a regisztráló rendszer határfoka stb.).

Amennyiben első alkalommal használja az oszlopot, célszerű azt kondicionálni: vezessen át egy enyhe gázáramot a kapilláris oszlopon, majd kapcsolja be a gázkromatográfiás berendezést, és kezdje el fokozatosan melegíteni addig, amíg a hőmérséklet legalább 20 °C-kal meghaladja az üzemi hőmérsékletet (8. megjegyzés). Ezt a hőmérsékletet tartsa legalább két órán keresztül, majd helyezze az egész berendezést üzemi körülmények közé (a gázáramok és a megosztós folyamat szabályozása, a láng begyújtása, csatlakoztatás az elektronikus íróhoz, az oszlop beszabályozása, a detektor és az injektor hőmérsékletének beállítása stb.), és rögzítse a jelet az analízis során tervezett legmagasabb szintnél legalább kétszer nagyobb érzékenységgel. Az alapvonalnak lineárisnak kell lennie, mindennemű csúcs és ingadozás nélkül. A negatív irányú, egyenes vonalú elmozdulás az oszlop csatlakozásainak tökéletlen tömítettségét jelzi, míg a pozitív irányú elmozdulás azt mutatja, hogy az oszlop kondicionálása nem megfelelő.

8. megjegyzés: A kondicionálás hőmérsékletének mindig legalább 20 °C-kal alacsonyabbnak kell lennie az alkalmazott állófázis esetében várható maximális hőmérsékletnél.

6.2. Üzemi körülmények

Optimalizálja a hőmérséklet programozását és a vivőgáz áramlását annak érdekében, hogy a 3–6. ábrán láthatóhoz hasonló kromatogramokat kapjon.

A következő paraméterek vizsgálat tárgyát képezték és hasznosnak bizonyultak:

6.2.1. Alifás alkoholok

A kemence programozása	180 °C (8 perc) → 260 °C (5 °C/perc) → 260 °C (15 perc)
Az injektor hőmérséklete	280 °C
A detektor hőmérséklete	290 °C
A vivőgáz lineáris sebessége	hélium (20–30 cm/s); hidrogén (30–50 cm/s)
Megosztási arány	1:50 – 1:100
Befecskendezett mennyiség	0,5–1 µl TMSE-oldat

6.2.2. Szerin és triterpén-dialkoholok

A kemence programozása	260 ± 5 °C, izotermikus
Az injektor hőmérséklete	280–300 °C
A detektor hőmérséklete	280–300 °C
A vivőgáz lineáris sebessége	hélium (20–30 cm/s); hidrogén (30–50 cm/s)
Megosztási arány	1:50 – 1:100
Befecskendezett mennyiség	0,5–1 µl TMSE-oldat

A fenti feltételek az oszlop és a gázkromatográf jellemzőinek megfelelően módosíthatók, hogy a kapott kromatogramok megfeleljenek a következő feltételeknek:

- A C26 alkohol retenció idejének 18 ± 5 percnél kell lennie.
- A C22 alkoholcsúcsnak a teljes skálára vonatkozó érték 80 ± 20 %-ának kell lennie az olívaolaj esetében, és a teljes skálára vonatkozó érték 40 ± 20 %-ának kell lennie az olívaogócska-olaj esetében.
- A β -szitoszterin-csúcs retenció idejének 20 ± 5 percnél kell lennie.
- A kampeszterin-csúcsnak olívaolaj esetében (3 %-os átlagos tartalom mellett) a teljes skála 20 ± 5 %-ának kell lennie.
- Minden jelen lévő szerint el kell választani. A szétválasztáson túl a csúcsokat teljesen fel kell bontani, azaz a csúcs vonalának a következő csúcs kezdete előtt vissza kell térnie az alapvonalhoz. Azonban a nem teljes felbontás elfogadható abban az esetben, ha az 1,02 értékű relatív retenció időhöz tartozó csúcs (szitosztanol) a függőleges segítségével kiszámítható.

6.3. Az elemzési eljárás

A 10 µl-es mikrofecskendővel (3.4.) szívjon fel 1 µl hexánt, majd 0,5 µl levegőt, ezt követően pedig 0,5–1 µl mintaoldatot. A mikrofecskendő dugattyúját felfelé mozgatva ürítse ki a tűt. A tűt vezesse be az injektor válaszfalán, majd 1–2 másodperc elmúltával fecskendezze be gyorsan az oldatot, és körülbelül 5 másodperc múlva lassan húzza ki a tűt. Automatikus injektor is alkalmazható.

Folytassa a rögzítést mindaddig, amíg a jelen lévő alkoholos vegyületek TMSE-elegyének elúciója teljesen végbe nem ment. Az alapvonalnak továbbra is meg kell felelnie a vonatkozó üzemi körülmények (6.2.1. vagy 6.2.2.) követelményeinek.

6.4. A csúcsok azonosítása

Az egyes csúcsok azonosítását a retenciók idői alapján, valamint az alifás és a triterpén-alkoholok, illetve a szterin és a triterpén-dialkoholok azonos körülmények között elemzett TMSE-elegyével összehasonlítva végezze. A 3. ábrán az alifás és a triterpén-alkoholok frakciójának kromatogramja látható, míg a szterinekre és a triterpén-dialkoholokra vonatkozó kromatogramokat a 2. ábra illusztrálja.

Az alifás alkoholok a következő sorrendben eluálódnak: C20-ol (belső standard), C22-ol, C23-ol, C24-ol, C25-ol, C26-ol, C27-ol és C28-ol.

A szterinek és a triterpén-dialkoholok a következő sorrendben eluálódnak: koleszterin, brasszिकासzterin, ergoszterin, 24-metilén-koleszterin, kampeszterin, kampesztanol, sztigmaszterin, Δ7-kampeszterin, Δ5,23-sztigmasztadienol, kleroszterin, β-szitoszterin, szitosztanol, Δ5-avenaszterin, Δ5,24-sztigmasztadienol, Δ7-sztigmaszterin, Δ7-avenaszterin, eritrodiol és uvaol.

6.5. Mennyiségi értékelés

Az 1-eikozanol és a C22, C24, C26 és C28 alifás alkoholok csúcsterületeit adatgyűjtő rendszer használatával kell kiszámítani. Az 1-eikozanol választényezőjének értékét vegye 1-nek.

Az α-kolesztanol, valamint a szterin és a triterpén-dialkoholok csúcsainak területét az integrátor segítségével számítsa ki. Hagyja figyelmen kívül az 1. táblázat felsorolásában nem szereplő vegyületekhez tartozó csúcsokat (az ergoszterin esetében nem kell elvégezni a számítást). Az α-kolesztanol választényezőjének értékét vegye 1-nek.

Az egyes alkoholos vegyületek zsírban mért, mg/kg mértékegységben kifejezett koncentrációja a következő módon számítandó ki:

$$x \text{ alkoholos vegyület} = \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

ahol:

A_x = az x alkoholos vegyület csúcsának területe a rendszer által használt mértékegységben.

A_s = az 1-eikozanol/α-kolesztanol csúcsának területe a rendszer által használt mértékegységben.

m_s = a hozzáadott 1-eikozanol/α-kolesztanol tömege milligrammban.

m = a meghatározás céljára használt minta tömege grammban.

7. AZ EREDMÉNYEK KIFEJEZÉSE

Jegyezze fel az egyes alifás és triterpén-alkoholok zsírban mért koncentrációját mg/kg mértékegységben, illetve ezen értékek összegét mint „teljes alifásalkohol-tartalmat”. A teljes tartalom a C22, C24, C26 és C28 alkoholok mennyiségének összege.

Az egyes alkoholos vegyületek összetételét egy tizedes pontosságig kell megadni.

A teljes szterinkoncentrációt tizedes nélkül kell megadni.

Az egyes szterinek koncentrációját a vonatkozó csúcs területének és az összes szterincsúcs területének hányadosából határozza meg:

$$x \text{ szterin} = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

ahol:

A_x = az x szterin csúcsának területe.

ΣA = az összes szterincsúcs területe.

Látható β-szitoszterin: Δ5,23-sztigmasztadienol + kleroszterin + β-szitoszterin + szitosztanol + Δ5-avenaszterin + Δ5,24-sztigmasztadienol.

Számítsa ki az eritrodiol és az uvaol százalékos arányát:

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

ahol:

A_{Er} = az eritrodiol területe a rendszer által használt mértékegységben.

A_{Uv} = az uvaol területe a rendszer által használt mértékegységben.

ΣA_T = a szterin + az eritrodiol + az uvaol összterülete a rendszer által használt mértékegységben.

Az egyes szterinek és triterpén-dialkoholok relatív százalékos arányának és a szterinek összkoncentrációjának a kiszámításán túlmenően az eritrodiol és az uvaol koncentrációját és ezek összegét is ki kell számítani (zsírban mért koncentráció mg/kg mértékegységben), a következőképpen fejezve ki az eredményeket:

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

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

ahol:

A_{Er} = az eritrodiol csúcsának területe a rendszer által használt mértékegységben.

A_{Uv} = az uvaol területe a rendszer által használt mértékegységben.

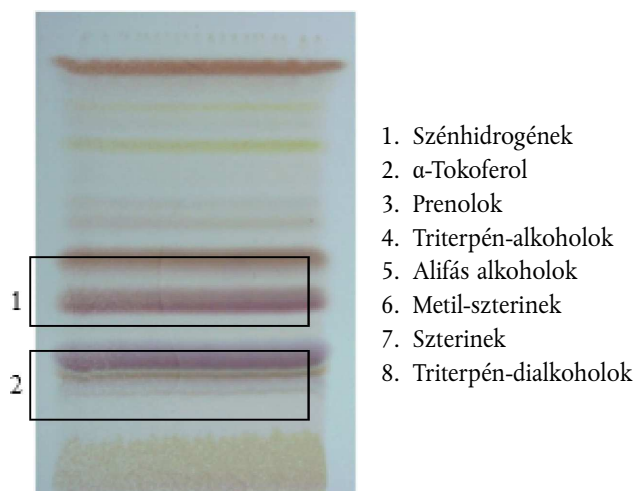
A_s = az α -kolesztanol csúcsának területe a rendszer által használt mértékegységben.

m_s = a hozzáadott α -kolesztanol tömege milligrammban.

m = a meghatározás céljára használt minta tömege grammban.

—

Függelék

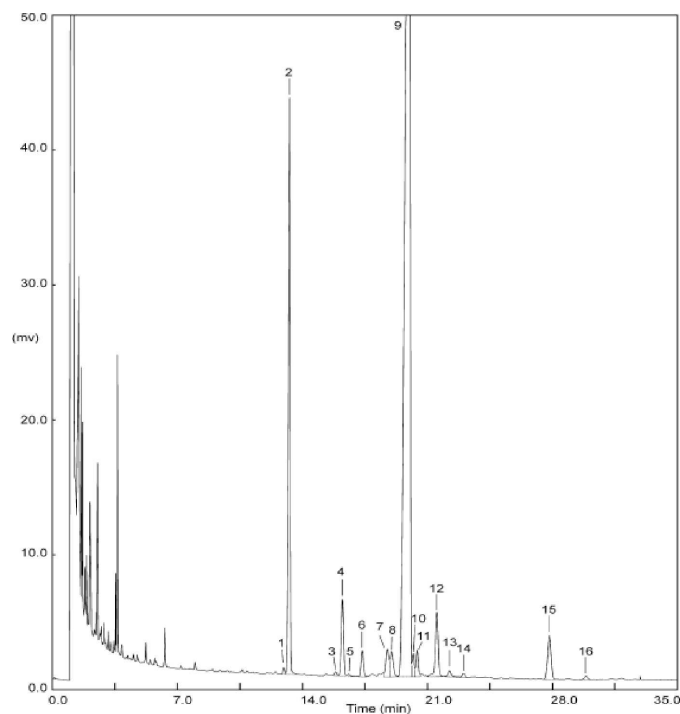


1. ábra – Az olívapogácsa-olaj hexán és dietil-éter (65:35 térfogatarányú) elegyével kétszer eluált, SO₄H₂ (50 %) alkalmazásával futtatott és melegített, el nem szappanosítható frakciójának vékonyréteg-kromatográfiája. A lekaparandó sávok azok, amelyek a téglalapokon belül találhatóak; az 1. téglalap az alifás alkoholokhoz tartozó sávokat, a 2. téglalap a szterinekhez és a triterpén-dialkoholokhoz tartozó sávokat tartalmazza.

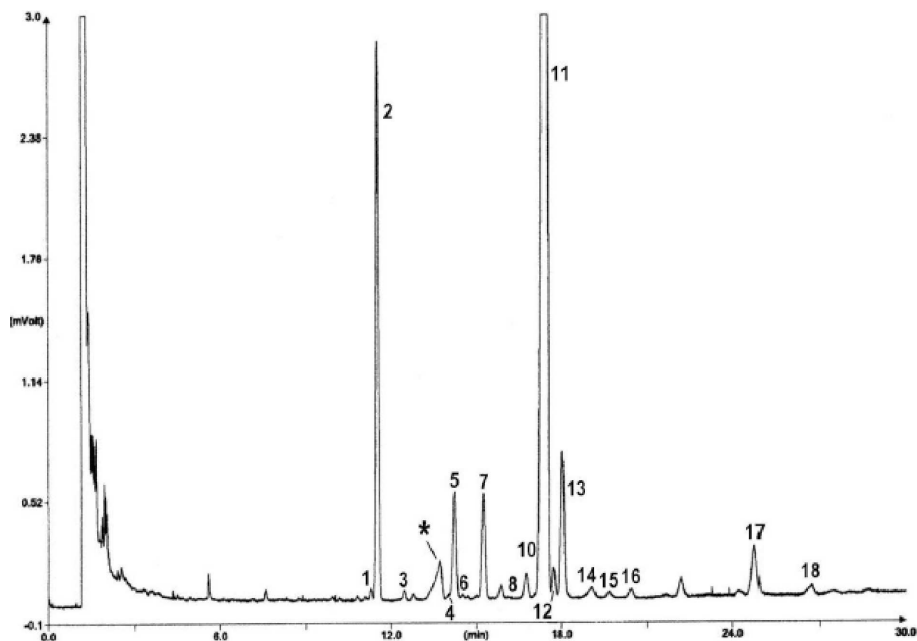
I. táblázat – A szterinek relatív retenciósi ideje

Csúcs	Megnevezés		Relatív retenciósi idő	
			SE 54 oszlop	SE 52 oszlop
1.	Koleszterin	Δ -5-kolesztén-3 β -ol	0,67	0,63
2.	Kolesztanol	5 α -kolesztán-3 β -ol	0,68	0,64
3.	Brasszikaszterin	[24S]-24-metil- Δ -5,22-kolesztadién-3 β -ol	0,73	0,71
*	Ergoszterin	[24S]-24-metil- Δ -5,7,22-kolesztatrién-3 β -ol	0,78	0,76
4.	24-metilén-koleszterin	24-metilén- Δ -5,24-kolesztadién-3 β -ol	0,82	0,80
5.	Kampeszterin	(24R)-24-metil- Δ -5-kolesztén-3 β -ol	0,83	0,81
6.	Kampeszstanol	(24R)-24-metil-kolesztán-3 β -ol	0,85	0,82
7.	Sztigmaszterin	(24S)-24-etil- Δ -5,22-kolesztadién-3 β -ol	0,88	0,87
8.	Δ -7-kampeszterin	(24R)-24-metil- Δ -7-kolesztén-3 β -ol	0,93	0,92
9.	Δ -5,23-sztigmasztadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,23-kolesztadién-3 β -ol	0,95	0,95
10.	Kleroszterin	(24S)-24-etil- Δ -5,25-kolesztadién-3 β -ol	0,96	0,96

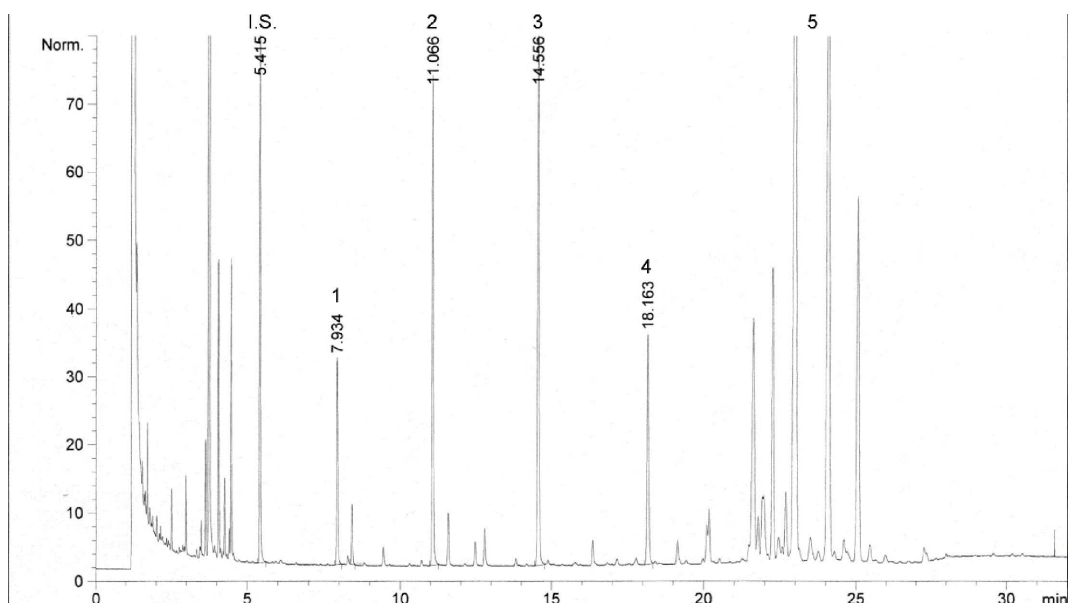
Csúcs	Megnevezés		Relatív retenció idő	
			SE 54 oszlop	SE 52 oszlop
11.	β -szitoszterin	(24R)-24-etil- Δ -5-kolesztén-3 β -ol	1,00	1,00
12.	Szitosztanol	24-etil-kolesztán-3 β -ol	1,02	1,02
13.	Δ -5-avenaszterin	(24Z)-24-etilidén- Δ -kolesztén-3 β -ol	1,03	1,03
14.	Δ -5,24-sztigmasztadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,24-kolesztadién-3 β -ol	1,08	1,08
15.	Δ -7-sztigmasztenol	(24R,S)-24-etil- Δ -7-kolesztén-3 β -ol	1,12	1,12
16.	Δ -7-avenaszterin	(24Z)-24-etilidén- Δ -7-kolesztén-3 β -ol	1,16	1,16
17.	Eritrodiol	5 α -oleán-12-én-3 β ,28-diol	1,41	1,41
18.	Uvaol	Δ 12-urszén-3 β ,28-diol	1,52	1,52



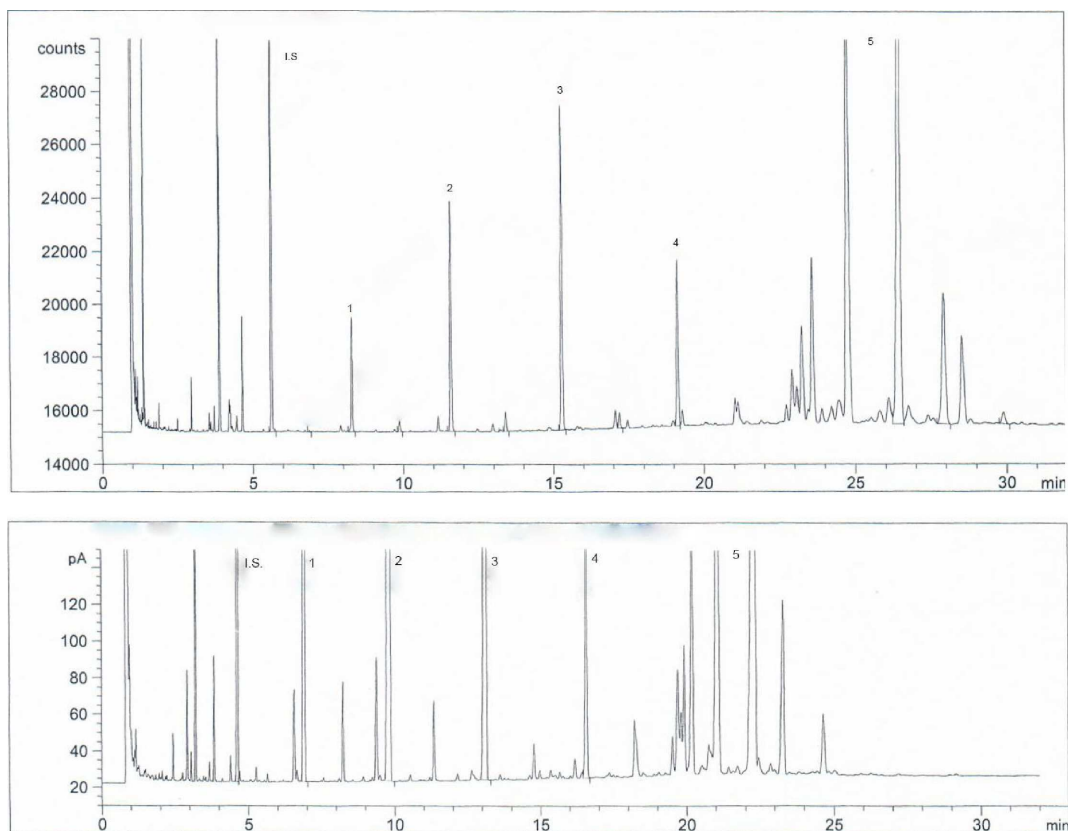
2. ábra – Finomított olívaolajból nyert szterin és triterpén-dialkoholok lángionizációs detektorral végzett gázkromatográfia szerinti profilja (a továbbiakban: GC-FID kromatográfiai profil). 1. koleszterin, 2. α -kolesztanol (belső standard), 3. 24-metilén-koleszterin, 4. kampeszterin, 5. kampesztanol, 6. sztigmaszterin, 7. Δ 5,23-sztigmasztadienol, 8. kloroszterin, 9. β -szitoszterin, 10. szitosztanol, 11. Δ 5-avenaszterin, 12. Δ 5,24-sztigmasztadienol, 13. Δ 7-sztigmasztenol, 14. Δ 7-avenaszterin, 15. eritrodiol, 16. uvaol.



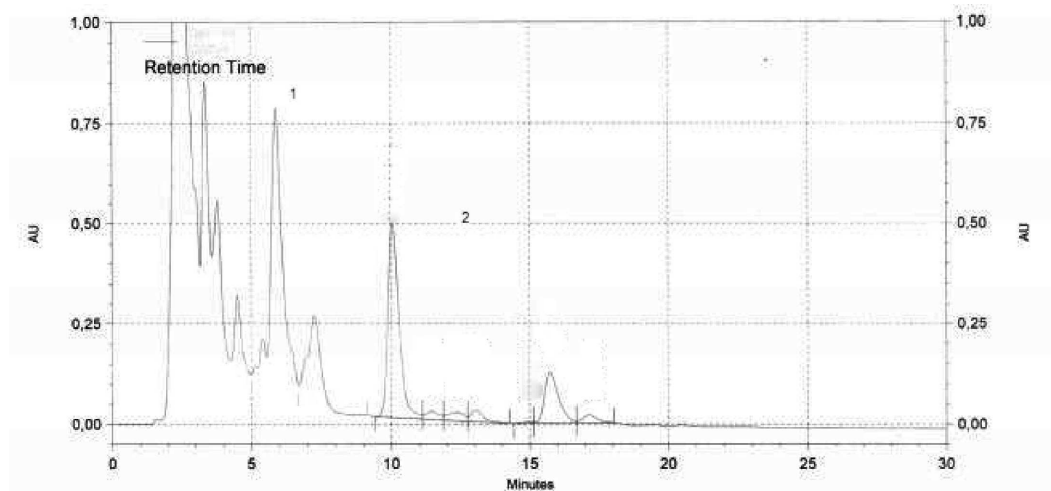
3. ábra – Lampante olívaolajból nyert szterin és triterpén-dialkoholok GC-FID kromatográfiás profilja. 1. koleszterin, 2. α -kolesztanol, 3. brasszिकासzterin, 4. 24-metilén-koleszterin, 5. kampeszterin, 6. kampeszanol, 7. sztigmaszterin, 8. Δ 7-kampeszterin, 9. Δ 5,23-sztigmasztadienol, 10. kleroszterin, 11. β -szitoszterin, 12. szitosztanol, 13. Δ 5-avenaszterin, 14. Δ 5,24-sztigmasztadienol, 15. Δ 7-sztigmaszterin, 16. Δ 7-avenaszterin, 17. eritrodol, 18. uvaol.



4. ábra – Az olívaolaj alifás alkoholjainak és triterpén-alkoholjainak GC-FID kromatográfiás profilja. (Belső standard) C20-ol, 1. C22-ol, 2. C24-ol, 3. C26-ol, 4. C28-ol, 5. triterpén-alkoholok.



5. ábra – Finomított olívaolaj és egy második centrifugáláson átesett olívaolaj alifás alkoholjainak és triterpén-alkoholjainak GC-FID kromatográfiai profilja. (Belső standard) C20-ol, 1. C22-ol, 2. C24-ol, 3. C26-ol, 4. C28-ol, 5. triterpén-alkoholok.



6. ábra – El nem szappanosítható, UV-detektor alkalmazásával végzett HPLC-vel szétválasztott olívaolaj HPLC-kromatogramja. 1. alifás és triterpén-alkoholok; 2. szterinek és triterpén-dialkoholok.”