

**ROZPORZĄDZENIE WYKONAWCZE KOMISJI (UE) NR 1348/2013****z dnia 16 grudnia 2013 r.****zmieniające rozporządzenie (EWG) nr 2568/91 w sprawie właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wyłoczyn oliwek oraz w sprawie odpowiednich metod analizy**

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie Komisji (WE) nr 1234/2007 z dnia 22 października 2007 r. ustanawiające wspólną organizację rynków rolnych oraz przepisy szczegółowe dotyczące niektórych produktów rolnych (rozporządzenie o jednolitej wspólnej organizacji rynku)<sup>(1)</sup>, w szczególności jego art. 113 ust. 1 lit. a) i art. 121 akapit pierwszy lit. a) i h), w związku z jego art. 4,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) W rozporządzeniu Komisji (EWG) nr 2568/91<sup>(2)</sup> określono chemiczne i organoleptyczne właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wyłoczyn z oliwek oraz ustalono metody oceny tych właściwości. Metody i wartości dopuszczalne stosowane w odniesieniu do oliwy należy uaktualnić na podstawie opinii ekspertów w dziedzinie chemii oraz zgodnie z wynikami prac prowadzonych w ramach Międzynarodowej Rady ds. Oliwy („IOC”).
- (2) Aby zapewnić na poziomie Unii Europejskiej wdrażanie najnowszych norm międzynarodowych ustalonych przez IOC należy uaktualnić niektóre metody analizy, a także niektóre wartości dopuszczalne stosowane w odniesieniu do oliwy, określone w rozporządzeniu (EWG) nr 2568/91.
- (3) W związku z tym należy dostosować wartości dopuszczalne stigmastadienów, wosków, kwasu mirystynowego i estrów alkilowych kwasów tłuszczowych i odpowiednio zmienić schematy podejmowania decyzji, w ramach których weryfikuje się, czy próbka oliwy z oliwek jest zgodna ze zgłoszoną kategorią. W celu ochrony konsumentów należy wprowadzić schematy podejmowania decyzji dotyczące kampesterolu i delta-7-stigmastenolu, którym towarzyszyć będą bardziej restrykcyjne parametry, w celu ułatwienia handlu i zagwarantowania autentyczności oliwy z oliwek. Należy zastąpić metodę analizy składu i zawartości steroli oraz oznaczania erytrodolu i uwaolu metodą bardziej wiarygodną, która będzie obejmować także dialkohole triterpenowe. Należy również dokonać przeglądu oceny organoleptycznej oliwy z oliwek i wprowadzić metodę umożliwiającą wykrywanie obcych olejów roślinnych w oliwie z oliwek.
- (4) W świetle rozwoju sytuacji w zakresie procedur dotyczących kontroli zgodności olejów należy odpowiednio dostosować metodę pobierania próbek oliwy z oliwek i oliwy z wyłoczyn z oliwek.
- (5) Należy zatem odpowiednio zmienić rozporządzenie (EWG) nr 2568/91.
- (6) Aby zapewnić czas na dostosowanie się do nowych przepisów i na wprowadzenie środków niezbędnych do ich stosowania oraz w celu uniknięcia zakłóceń podczas transakcji handlowych zmiany wprowadzone niniejszym rozporządzeniem należy stosować od dnia 1 marca 2014 r. Z tych samych powodów należy wprowadzić przepisy dotyczące oliwy z oliwek i oliwy z wyłoczyn z oliwek legalnie wyprodukowanej i oznakowanej w Unii Europejskiej lub legalnie przywiezionej do Unii Europejskiej oraz dopuszczonej do swobodnego obrotu przed tą datą w celu wprowadzenia jej do obrotu do momentu wyczerpania wszystkich zapasów.
- (7) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Komitetu Zarządzającego ds. Wspólnej Organizacji Rynków Rolnych,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

**Artykuł 1**

W rozporządzeniu (EWG) nr 2568/91 wprowadza się następujące zmiany:

1) art. 2 otrzymuje brzmienie:

**„Artykuł 2**

1. Właściwości olejów wymienione w załączniku I określa się zgodnie z następującymi metodami analizy:

- a) metoda oznaczania wolnych kwasów tłuszczowych wyrażonych jako procentowa część kwasu oleinowego, przedstawiona w załączniku II;
- b) metoda oznaczania liczby nadtlenkowej, przedstawiona w załączniku III;
- c) metoda oznaczania zawartości wosków, przedstawiona w załączniku IV;
- d) metoda oznaczania składu i zawartości steroli i dialkoholi triterpenowych metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych, przedstawiona w załączniku V;
- e) metoda oznaczania zawartości procentowej 2-monopalmitynianu glicerolu, przedstawiona w załączniku VII;
- f) metoda analizy spektrofotometrycznej, przedstawiona w załączniku IX;
- g) metoda oznaczania składu kwasu tłuszczowego, przedstawiona w załączniku X A i X B;
- h) metoda oznaczania lotnych rozpuszczalników chlorowcowanych, przedstawiona w załączniku XI;

<sup>(1)</sup> Dz.U. L 299 z 16.11.2007, s. 1.

<sup>(2)</sup> Rozporządzenie Komisji (EWG) nr 2568/91 w sprawie właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wyłoczyn oliwek oraz w sprawie odpowiednich metod analizy (Dz.U. L 248 z 5.9.1991, s. 1).

- i) metoda oceny właściwości organoleptycznych oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia, przedstawiona w załączniku XII;
- j) metoda oznaczania stigmastadienów, przedstawiona w załączniku XVII;
- k) metoda oznaczania zawartości triglicerydów z ECN42, przedstawiona w załączniku XVIII;
- l) metoda oznaczania zawartości alkoholi alifatycznych, przedstawiona w załączniku XIX;
- m) metoda oznaczania zawartości wosków, estrów metylo- wanych kwasów tłuszczowych i estrów etylowych kwasów tłuszczowych, przedstawiona w załączniku XX.

W celu wykrycia obecności obcych olejów roślinnych w oliwie z oliwek stosuje się metodę analizy przedstawioną w załączniku XXa.

2. Weryfikacja właściwości organoleptycznych oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia prowadzona przez organy krajowe i ich przedstawicieli wykonywana jest przez zespoły degustatorów zatwierdzone przez państwa członkowskie.

Właściwości organoleptyczne oliwy, o których mowa w akapicie pierwszym, określa się jako zgodne ze zgłoszoną kategorią, jeżeli zespół degustatorów zatwierdzony przez państwo członkowskie potwierdzi taką klasyfikację.

W przypadku gdy zespół nie potwierdzi kategorii zgłoszonej w odniesieniu do właściwości organoleptycznych, na wniosek zainteresowanej strony organy krajowe lub ich przedstawiciele zapewniają niezwłoczne przeprowadzenie przez inne zatwierdzone zespoły dwóch ocen porównawczych, z których przynajmniej jedna wykonana jest przez zainteresowane państwo członkowskie będące producentem. Przedmiotowe właściwości określa się jako zgodne ze zgłoszonymi właściwościami, jeżeli co najmniej dwie z ocen porównawczych potwierdzą zgłoszoną klasyfikację. Jeżeli tak się nie stanie, zainteresowana strona ponosi koszty ocen porównawczych.

3. W przypadku gdy organy krajowe lub ich przedstawiciele sprawdzają właściwości oliwy, jak przewidziano w ust. 1, próbki pobiera się zgodnie z normami międzynarodowymi: normą EN ISO 661 dotyczącą przygotowania próbek do badań oraz normą EN ISO 5555 dotyczącą pobierania próbek. Jednak niezależnie od przepisów pkt 6.8 normy EN ISO 5555, w przypadku partii takiej oliwy w opakowaniu bezpośrednim próbkę pobiera się zgodnie z załącznikiem Ia do niniejszego rozporządzenia. W przypadku oliwy luzem, której próbek nie można pobrać zgodnie z normą EN ISO 5555, pobieranie próbek wykonuje się zgodnie z instrukcjami opracowanymi przez właściwy organ państwa członkowskiego.

Bez uszczerbku dla normy EN ISO 5555 oraz rozdziału 6 normy EN ISO 661 pobrane próbki jak najszybciej

umieszcza się w ciemnym miejscu, z dala od źródeł wysokiej temperatury i wysyła się do laboratorium w celu poddania analizie nie później niż piątego dnia roboczego po ich pobraniu, w przeciwnym razie próbki przechowuje się w taki sposób, aby nie uległy rozpadowi ani uszkodzeniu w czasie transportu lub przechowywania, zanim zostaną wysłane do laboratorium.

4. Do celów weryfikacji przewidzianej w ust. 3, analizy, o których mowa w załącznikach II, III, IX i XX, oraz w stosownych przypadkach wszystkie analizy porównawcze wymagane na mocy prawa krajowego, wykonuje się przed upływem daty minimalnej trwałości w przypadku produktów pakowanych. W przypadku pobierania próbek oliwy luzem analizy te wykonuje się nie później niż po upływie sześciu miesięcy od miesiąca, w którym pobrano próbkę.

Nie stosuje się żadnych terminów w przypadku innych analiz przewidzianych w niniejszym rozporządzeniu.

Jeżeli wyniki analiz nie odpowiadają właściwościom zgłoszonej kategorii oliwy z oliwek lub oliwy z wyciśniętej z oliwek, zainteresowana strona powiadamiana jest nie później niż miesiąc przed końcem okresu określonego w akapicie pierwszym, chyba że próbkę pobrano później niż dwa miesiące przed upływem daty minimalnej trwałości.

5. W celu oznaczenia właściwości różnych rodzajów oliwy z oliwek za pomocą metod przewidzianych w ust. 1 akapit pierwszy wyniki analiz porównuje się bezpośrednio z limitami określonymi w niniejszym rozporządzeniu.”;

- 2) załącznik I zastępuje się tekstem określonym w załączniku I do niniejszego rozporządzenia;
- 3) załącznik Ia zastępuje się tekstem określonym w załączniku II do niniejszego rozporządzenia;
- 4) załącznik Ib zastępuje się tekstem określonym w załączniku III do niniejszego rozporządzenia;
- 5) załącznik V zastępuje się tekstem określonym w załączniku IV do niniejszego rozporządzenia;
- 6) skreśla się załącznik VI;
- 7) załącznik XII zastępuje się tekstem określonym w załączniku V do niniejszego rozporządzenia;
- 8) załącznik XXa, którego tekst określony jest w załączniku VI do niniejszego rozporządzenia, dodaje się po załączniku XX.

#### Artykuł 2

Produkty legalnie wyprodukowane i oznaczone w Unii Europejskiej lub legalnie przywiezione do Unii Europejskiej i dopuszczone do swobodnego obrotu przed dniem 1 marca 2014 r. mogą być wprowadzane do obrotu do momentu wyczerpania wszystkich zapasów.

*Artykuł 3*

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie siódmego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie stosuje się od dnia 1 marca 2014 r.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 16 grudnia 2013 r.

W imieniu Komisji  
José Manuel BARROSO  
Przewodniczący

---

## ZAŁĄCZNIK I

## „ZAŁĄCZNIK I

## WŁAŚCIWOŚCI OLIWY Z OLIVEK

Kategoria	Estry etylowe kwasu tłuszczowego (FAEE) mg/kg (*)	Kwasowość (%) (*)	Liczba nadtlenkowa mEq O <sub>2</sub> /kg (*)	Woski mg/kg (**)	2-monopalmitynian glicerolu (%)	Stigmastadieny mg/kg (1)	Różnica między HPLC ECN42 a teoretycznym ECN42 (2)	K <sub>232</sub> (*)	K <sub>268</sub> lub K <sub>270</sub> (*)	Delta-K (*)	Ocena organoleptyczna Mediana wad (Md) (*)	Ocena organoleptyczna Mediana aromatu owoców (Mf) (*)
1. Oliwa z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia	FAEE ≤ 40 (rok posadzenia 2013–2014) (3) FAEE ≤ 35 (rok posadzenia 2014–2015) FAEE ≤ 30 (lata posadzenia po 2015 r.)	≤ 0,8	≤ 20	C <sub>42</sub> + C <sub>44</sub> + C <sub>46</sub> ≤ 150	≤ 0,9 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %	≤ 0,05	≤  0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
					≤ 1,0 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %							
2. Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia	—	≤ 2,0	≤ 20	C <sub>42</sub> + C <sub>44</sub> + C <sub>46</sub> ≤ 150	≤ 0,9 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %	≤ 0,05	≤  0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
					≤ 1,0 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %							
3. Oliwa z oliwek typu lampante	—	> 2,0	—	C <sub>40</sub> + C <sub>42</sub> + C <sub>44</sub> + C <sub>46</sub> ≤ 300 (4)	≤ 0,9 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %	≤ 0,50	≤  0,3	—	—	—	Md > 3,5 (5)	—
					≤ 1,1 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %							
4. Rafinowana oliwa z oliwek	—	≤ 0,3	≤ 5	C <sub>40</sub> + C <sub>42</sub> + C <sub>44</sub> + C <sub>46</sub> ≤ 350	≤ 0,9 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %	—	≤  0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %							

Kategoria	Estry etylowe kwasu tłuszczowego (FAEE) mg/kg (*)	Kwasowość (%) (*)	Liczba nadtlenkowa mEq O <sub>2</sub> /kg (*)	Woski mg/kg (**)	2-monopalmitynian glicerolu (%)	Stigmastadieny mg/kg (1)	Różnica między HPLC ECN42 a teoretycznym ECN42 (2)	K <sub>232</sub> (*)	K <sub>268</sub> lub K <sub>270</sub> (*)	Delta-K (*)	Ocena organoleptyczna Mediana wad (Md) (*)	Ocena organoleptyczna Mediana aromatu owoców (Mf) (*)
5. Oliwa z oliwek złożona z rafinowanej oliwy z oliwek oraz oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia	—	≤ 1,0	≤ 15	C <sub>40</sub> + C <sub>42</sub> + C <sub>44</sub> + C <sub>46</sub> ≤ 350	≤ 0,9 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %	—	≤  0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %							
6. Surowa oliwa z wyciąg z oliwek	—	—	—	C <sub>40</sub> + C <sub>42</sub> + C <sub>44</sub> + C <sub>46</sub> > 350 (6)	≤ 1,4	—	≤  0,6	—	—	—	—	—
7. Rafinowana oliwa z wyciąg z oliwek	—	≤ 0,3	≤ 5	C <sub>40</sub> + C <sub>42</sub> + C <sub>44</sub> + C <sub>46</sub> > 350	≤ 1,4	—	≤  0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Oliwa z wyciąg z oliwek	—	≤ 1,0	≤ 15	C <sub>40</sub> + C <sub>42</sub> + C <sub>44</sub> + C <sub>46</sub> > 350	≤ 1,2	—	≤  0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Suma izomerów, które mogłyby (lub nie mogłyby) być oddzielone kolumną kapilarną.

(2) Produkcja oliwy z oliwek musi być zgodna z metodą zamieszczoną w załączniku XXa.

(3) Ta wartość dopuszczalna ma zastosowanie do oliwy z oliwek produkowanej od dnia 1 marca 2014 r.

(4) Oliwa z zawartością wosków wynoszącą 300–350 mg/kg uznawana jest za oliwę z oliwek typu lampante, jeżeli całkowita zawartość alkoholi alifatycznych jest mniejsza lub równa 350 mg/kg lub jeżeli zawartość erytrodiolu i uwaolu jest mniejsza lub równa 3,5 %.

(5) Lub jeżeli mediana wad jest większa niż 3,5 lub jeżeli mediana wad jest równa lub mniejsza niż 3,5, a mediana aromatu owocowego wynosi 0.

(6) Oliwa z zawartością wosków wynoszącą 300–350 mg/kg uznawana jest za surową oliwę z wyciąg z oliwek, jeżeli całkowita zawartość alkoholi alifatycznych jest większa niż 350 mg/kg oraz jeżeli zawartość erytrodiolu i uwaolu jest większa niż 3,5 %.

Kategoria	Skład kwasów tłuszczowych (1)							Izomery transolei- nowy ogółem (%)	Izomery translino- lowe + izomery translino- lenowe ogółem (%)	Skład steroli					Sterole ogółem (mg/kg)	Erytrodiol i uwaol (%) (**)
	Mirysty- nowy (%)	Linole- nowy (%)	Arachi- dowy (%)	Eikoze- nowy (%)	Behenowy (%)	Lignocery- nowy (%)	Cholesterol (%)			Brassika- sterol (%)	Kampe- sterol (2) (%)	Stigma- sterol (%)	APP sitosterol (%) (3)	Delta-7- stigmaste- nol (2) (%)		
1. Oliwa z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Oliwa z oliwek typu lampante	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (4)
4. Rafinowana oliwa z oliwek	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5

Kategoria	Skład kwasów tłuszczowych (1)						Izomery transolei- nowe ogółem (%)	Izomery translinolo- we + izomery translinolenowe ogółem (%)	Skład steroli						Sterole ogółem (mg/kg)	Erytrodiol i uwaol (%) (**)
	Mirysty- nowy (%)	Linole- nowy (%)	Arachi- dowy (%)	Eikoze- nowy (%)	Behenowy (%)	Lignocery- nowy (%)			Cholesterol (%)	Brassika- sterol (%)	Kampe- sterol (2) (%)	Stigma- sterol (%)	APP sitosterol (%) (3)	Delta-7- stigmaste- nol (2) (%)		
5. Oliwa z oliwek złożona z rafinowanej oliwy z oliwek oraz oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Surowa oliwa z wytlóczyn z oliwek	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (5)
7. Rafinowana oliwa z wytlóczyn z oliwek	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Oliwa z wytlóczyn z oliwek	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

(1) Zawartość innych kwasów tłuszczowych (%): palmitynowy: 7,50–20,00; palmitolejowy: 0,30–3,50; heptadekanowy: ≤ 0,30; heptadekenowy: ≤ 0,30; stearynowy: 0,50–5,00; olejowy: 55,00–83,00; linolowy: 3,50–21,00.

(2) Zob. dodatek do niniejszego załącznika.

(3) APP β-sitosterol: delta-5,23-stigmastadienol+cholesterol+beta-sitosterol+sitostanol+delta-5-awenasterol+delta-5,24-stigmastadienol.

(4) Oliwa z zawartością wosków wynoszącą 300–350 mg/kg uznawana jest za oliwę z oliwek typu lampante, jeżeli całkowita zawartość alkoholi alifatycznych jest mniejsza lub równa 350 mg/kg lub jeżeli zawartość erytrodiolu i uwaolu jest mniejsza lub równa 3,5 %.

(5) Oliwa z zawartością wosków wynoszącą 300–350 mg/kg uznawana jest za surową oliwę z wytlóczyn z oliwek, jeżeli całkowita zawartość alkoholi alifatycznych jest większa niż 350 mg/kg oraz jeżeli zawartość erytrodiolu i uwaolu jest większa niż 3,5 %.

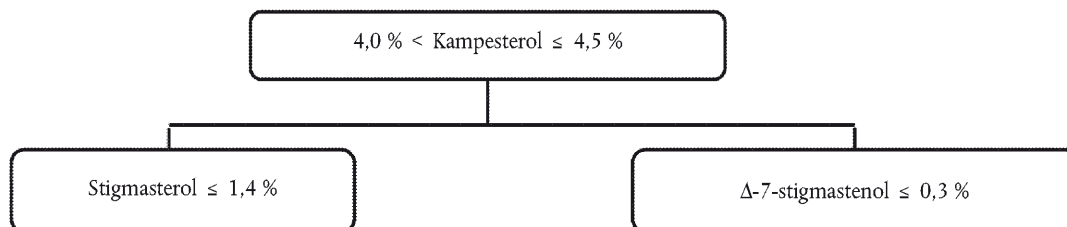
#### Uwagi:

- wyniki analiz muszą być wyrażone z dokładnością do tej samej liczby miejsc po przecinku, jaką zastosowano w odniesieniu do każdej właściwości. Ostatnia cyfra musi być powiększona o jeden, jeżeli następną cyfrą jest większa niż 4;
- jeżeli tylko jedna właściwość nie jest zgodna z wskazanymi wartościami, kategoria oliwy może zostać zmieniona lub zgłoszona jako niezgodna pod względem czystości do celów niniejszego rozporządzenia;
- jeżeli właściwość oznaczona jest gwiazdką (\*), w odniesieniu do jakości oliwy oznacza to, że: - w przypadku oliwy z oliwek typu lampante obie odpowiednie wartości dopuszczalne mogą jednocześnie różnić się od podanych; w przypadku oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia, jeżeli co najmniej jedna z wartości dopuszczalnych różni się od podanych wartości, kategoria oliwy zostanie zmieniona, jedna i druga będzie nadal zaliczana do jednej z kategorii oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia.
- jeżeli właściwość oznaczona jest dwiema gwiazdkami (\*\*), oznacza to, że w przypadku wszystkich rodzajów oliwy z wytlóczyn oliwek obie odpowiednie wartości dopuszczalne mogą różnić się jednocześnie od podanych wartości.

## Dodatek

## Schemat podejmowania decyzji

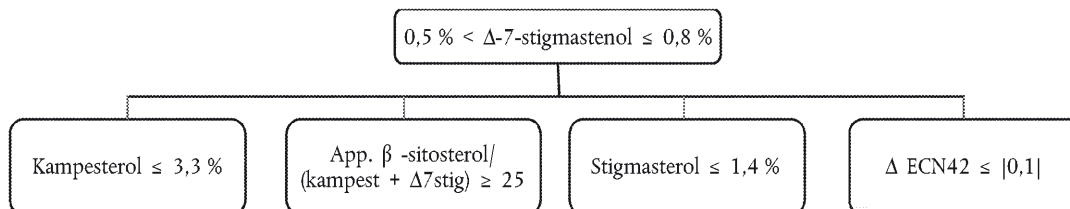
Schemat podejmowania decyzji dotyczących **kampesterolu** w przypadku oliwy z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia i oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia



Pozostałe parametry są zgodne z wartościami dopuszczalnymi określonymi w niniejszym rozporządzeniu.

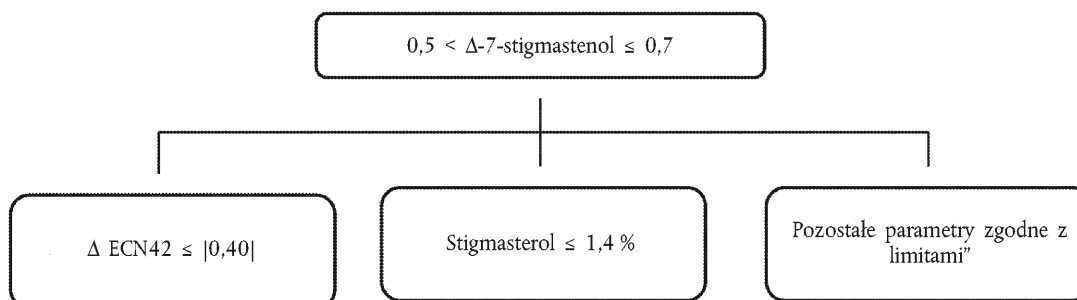
Schemat podejmowania decyzji dotyczących **delta-7-stigmasterolu** w przypadku:

— Oliwa z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia i oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia



Pozostałe parametry są zgodne z wartościami dopuszczalnymi określonymi w niniejszym rozporządzeniu.

— Oliwa z wycłoczyn z oliwek (surowa i rafinowana)



## ZAŁĄCZNIK II

## „ZAŁĄCZNIK Ia

**POBIERANIE PRÓBEK OLIWY Z OLIWEK LUB OLIWY Z WYTŁOCZYN Z OLIWEK DOSTARCZONYCH W OPAKOWANIU BEZPOŚREDNIM**

Ta metoda pobierania próbek ma zastosowanie do partii oliwy z oliwek lub oliwy z wytłoczyn z oliwek umieszczonych w opakowaniu bezpośrednim. W zależności od tego, czy zawartość opakowania bezpośredniego przekracza 5 litrów czy też nie, zastosowanie mają różne metody pobierania próbek.

„Partia” oznacza zbiór opakowań detalicznych, które są produkowane, wytwarzane i pakowane w takich warunkach, w których oliwę zawartą w każdym opakowaniu detalicznym uważa się za jednorodną pod względem wszystkich właściwości analitycznych. Oznakowanie partii musi zostać przeprowadzone zgodnie z dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2011/91/UE <sup>(1)</sup>.

„Próbka jednostkowa” oznacza ilość oliwy zawartej w opakowaniu bezpośrednim, pobraną z dowolnego miejsca partii.

**1. ZAWARTOŚĆ PRÓBKII PIERWOTNEJ****1.1. Opakowanie bezpośrednie nieprzekraczające 5 litrów**

„Próbka pierwotna” w przypadku opakowania bezpośredniego nieprzekraczającego 5 litrów oznacza liczbę próbek jednostkowych pobranych w danej partii zgodnie z tabelą 1.

Tabela 1

**Minimalna próbka pierwotna powinna zawierać**

Jeżeli opakowanie bezpośrednie ma pojemność	Próbka pierwotna musi zawierać oliwę pobraną z
a) 1 litr lub więcej;	a) jednego opakowania bezpośredniego;
b) mniejszą niż 1 litr.	b) minimalnej liczby opakowań o łącznej pojemności wynoszącej co najmniej 1 litr.

Liczba opakowań wymienionych w tabeli 1, które tworzą próbkę pierwotną, może być zwiększona przez każde państwo członkowskie, zgodnie z jego własnymi potrzebami (na przykład ocena organoleptyczna dokonana przez laboratorium inne niż to, które wykonało analizy chemiczne, analizy porównawcze itd.).

**1.2. Opakowanie bezpośrednie przekraczające 5 litrów**

„Próbka pierwotna” w przypadku opakowań bezpośrednich przekraczających 5 litrów oznacza reprezentatywną część łącznych próbek jednostkowych, utrzymaną w procesie redukcyjnym zgodnie z tabelą 2. W skład próbki pierwotnej muszą wchodzić różne przykłady.

„Przykład” próbki pierwotnej oznacza każde opakowanie wchodzące w skład próbki pierwotnej.

Tabela 2

**Minimalna liczba próbek jednostkowych, które należy pobrać**

Liczba opakowań w danej partii towaru	Minimalna liczba próbek jednostkowych, które należy pobrać
do 10 %	1
11–150	2
151–500	3
501–1 500	4
1 501–2 500	5
> 2 500 na 1 000 opakowań	1 dodatkowa próbka jednostkowa

<sup>(1)</sup> Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2011/91/UE w sprawie oznaczeń lub oznakowań identyfikacyjnych partii towaru, do której należy dany środek spożywczy (Dz.U. L 334 z 16.11.2011, s. 1).



W celu ograniczenia objętości próbkowanych opakowań bezpośrednich zawartość pobieranych próbek jednostkowych jest homogenizowana w celu przygotowania próbki pierwotnej. Części różnych próbek jednostkowych wlewane są do wspólnego pojemnika w celu poddania ich homogenizacji przez wymieszanie, aby jak najlepiej zabezpieczyć je przed dostępem powietrza.

Próbkę pierwotną należy wlać do kilku opakowań o minimalnej pojemności wynoszącej 1,0 litr, z których każde stanowi przykład próbki pierwotnej.

Liczba próbek pierwotnych może być zwiększana przez każde państwo członkowskie, zgodnie z jego własnymi potrzebami (na przykład ocena organoleptyczna dokonana przez laboratorium inne niż to, które wykonało analizy chemiczne, analizy kontrolne itd.).

Każde opakowanie należy napełnić w taki sposób, aby warstwa powietrza nad próbką była jak najmniejsza, a następnie odpowiednio zamknąć w celu zabezpieczenia produktu.

Przykłady te należy oznakować w celu zapewnienia prawidłowej identyfikacji.

## 2. ANALIZY I WYNIKI

2.1. Każdą próbkę pierwotną należy podzielić na próbki laboratoryjne, zgodnie z pkt 2.5 normy EN ISO 5555, i analizować w kolejności przedstawionej na schemacie podejmowania decyzji opisanym w załączniku Ib lub w innej dowolnej kolejności.

2.2. Jeżeli wszystkie wyniki analiz są zgodne z właściwościami zgłoszonej kategorii oliwy, cała partia ma być zgłoszona jako zgodna.

Jeżeli jeden wynik analizy nie jest zgodny z właściwościami zgłoszonej kategorii oliwy, cała partia zostaje zgłoszona jako niezgodna.

## 3. WERYFIKACJA KATEGORII DANEJ PARTII

3.1. W celu zweryfikowania kategorii danej partii właściwy organ może zwiększyć liczbę próbek pierwotnych pobranych w różnych punktach partii zgodnie z następującą tabelą:

Tabela 3

**Liczba próbek pierwotnych uwarunkowana wielkością partii**

Wielkość partii (w litrach)	Liczba próbek pierwotnych
mniej niż 7 500	2
od 7 500 do mniej niż 25 000	3
od 25 000 do mniej niż 75 000	4
od 75 000 do mniej niż 125 000	5
równa i większa niż 125 000	6 + 1 na każde 50 000 litrów więcej

Każda próbka jednostkowa stanowiąca próbkę pierwotną musi zostać pobrana z ciągłej części partii; konieczne jest zapisanie miejsca pobrania każdej próbki pierwotnej i jej jednoznaczne zidentyfikowanie.

Tworzenie każdej próbki pierwotnej musi przebiegać zgodnie z procedurami, o których mowa w pkt 1.1 oraz 1.2.

Każdą próbkę pierwotną poddaje się następnie analizom, o których mowa w art. 2 ust. 1.

3.2. Jeżeli jeden z wyników analiz, o których mowa w art. 2 ust. 1, co najmniej jednej próbki pierwotnej jest niezgodny z właściwościami zgłoszonej kategorii oliwy, cała partia pobieranych próbek zostaje zgłoszona jako niezgodna.”.

## ZAŁĄCZNIK III

## „ZAŁĄCZNIK Ib

## SCHEMAT PODEJMOWANIA DECYZJI, CZY PRÓBKA OLIWY Z OLIWEK JEST ZGODNA ZE ZGŁOSZONĄ KATEGORIĄ

Tabela 1

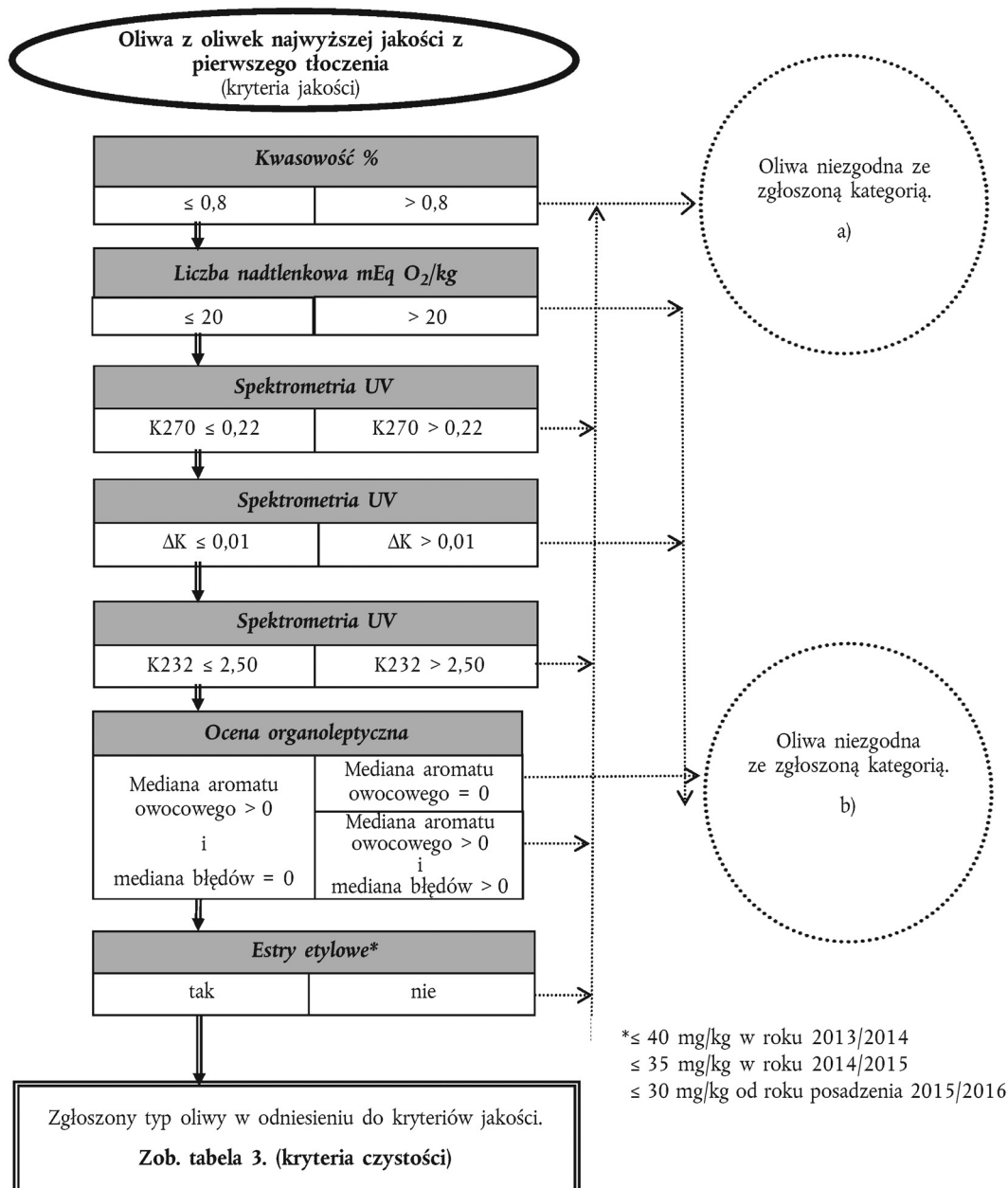


Tabela 2

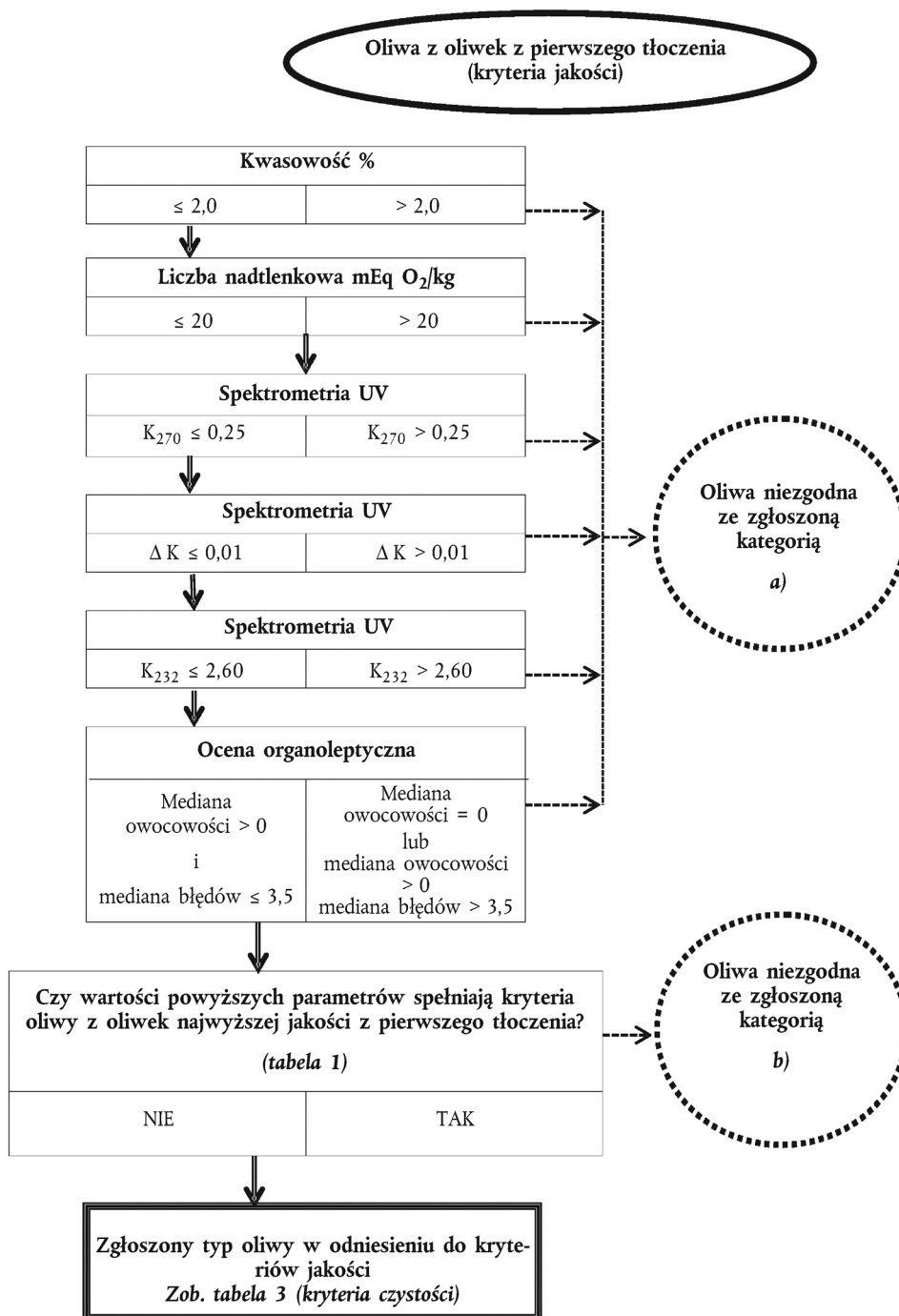
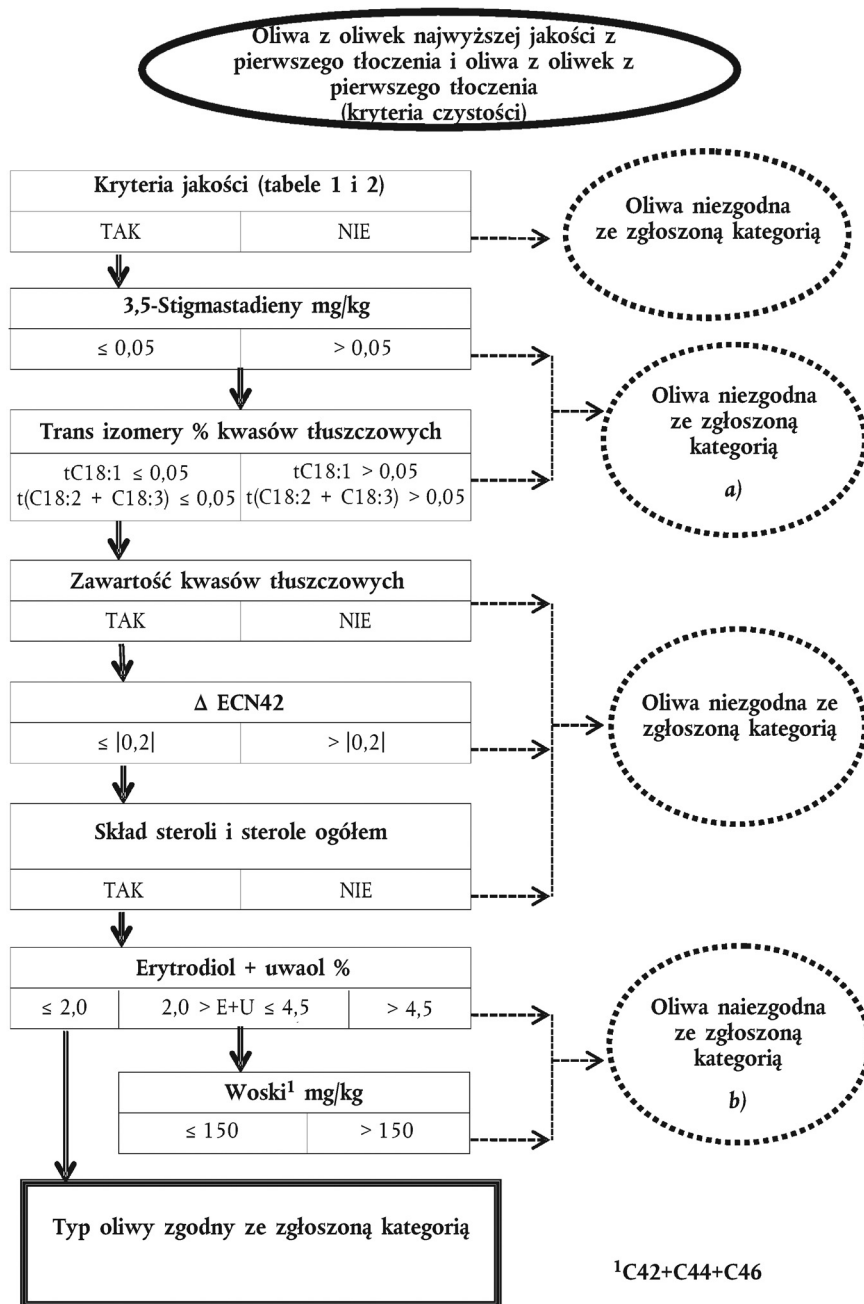


Tabela 3



## Dodatek 1

**Tabela równoważności między załącznikami do niniejszego rozporządzenia a analizami określonymi w schemacie podejmowania decyzji**

— Kwasowość	Załącznik II	Oznaczenie wolnych kwasów tłuszczowych, metoda na zimno
— Liczba nadtlenkowa	Załącznik III	Oznaczanie liczby nadtlenkowej
— Spektrometria UV	Załącznik IX	Analiza spektrofotometryczna
— Ocena organoleptyczna	Załącznik XII	Ocena organoleptyczna oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia
— Estry etylowe	Załącznik XX	Metoda oznaczania zawartości wosków, estrów metylowych kwasów tłuszczowych i estrów etylowych kwasów tłuszczowych za pomocą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych
— 3,5- stigmastadieny	Załącznik XVII	Metoda oznaczania stigmastadienów w olejach roślinnych
— Trans izomery kwasów tłuszczowych	Załącznik X A i	Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej
	Załącznik X B	Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych
— Zawartość kwasów tłuszczowych	Załącznik X A i	Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej
	Załącznik X B	Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych
— ΔECN42	Załącznik XVIII	Oznaczanie składu triglicerydów z ECN42 (różnica między danymi HPLC a zawartością teoretyczną)
— Skład i całkowita zawartość steroli — Erytrodiol i uwaol	Załącznik V	Oznaczanie składu i zawartości steroli i dialkoholi triterpenowych metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych
— Woski	Załącznik IV	Oznaczanie zawartości wosku metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych
— Alkohole alifatyczne	Załącznik XIX	Oznaczanie zawartości alkoholi alifatycznych metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych
— Kwasy tłuszczowe nasycone w pozycji 2	Załącznik VII	Oznaczanie zawartości procentowej 2-monopalmitynianu glicerolu”

## ZAŁĄCZNIK IV

## „ZAŁĄCZNIK V

**OZNACZENIA SKŁADU I ZAWARTOŚCI STEROLI I DIALKOHOli TRITERPENOWYCH METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ NA KOLUMNACH KAPILARNYCH**

## 1. ZAKRES

W ramach metody opisuje się sposoby oznaczania zawartości prostych i łącznych steroli oraz dialkoholi triterpenowych w oliwie z oliwek i oliwie z wyłoczyn z oliwek.

## 2. ZASADA

Oliwa, do której dodano  $\alpha$ -cholestanol, pełniąc rolę wewnętrznego wzorca, jest zmydlana roztworem wodorotlenku potasu w etanolu, a następnie substancja niezmydlająca się jest ekstrahowana eterem dietylowym.

Fracje steroli i frakcja dialkoholi triterpenowych są oddzielane od substancji niezmydlającej się metodą chromatografii cienkowarstwowej na podstawowej płytce z żelu krzemionkowego. Frakcje uzyskane z żelu krzemionkowego przekształcane są w trimetylsilyletery i następnie poddawane analizie metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych.

## 3. APARATURA

Typowe wyposażenie laboratoryjne, a w szczególności następujące urządzenia:

- 3.1. Kolba o pojemności 250 ml wyposażona w chłodnicę zwrotną ze szlifem szklanym.
  - 3.2. Rozdzielacz o pojemności 500 ml.
  - 3.3. Kolby o pojemności 250 ml.
  - 3.4. Kompletny zestaw aparatury do analizy metodą chromatografii cienkowarstwowej łącznie z płytkami szklanymi 20 × 20.
  - 3.5. Źródło światła ultrafioletowego o długości fal 254 lub 366 nm.
  - 3.6. Mikrostrzykawkki o pojemności 100 i 500  $\mu$ l.
  - 3.7. Cylindryczny lejek do sączenia z porowatą przegrodą G3 (porowatość 15–40  $\mu$ m) o średnicy około 2 cm i głębokości 5 cm, przystosowany do filtracji w próżni i ze szlifem szklanym zewnętrznym.
  - 3.8. Kolba stożkowa próżniowa o pojemności 50 ml ze szlifem szklanym wewnętrznym, którą można połączyć z lejkiem do sączenia (pkt 3.7).
  - 3.9. Probówka o pojemności 10 ml z lejkowatym dnem i szczelnym korkiem szklanym.
  - 3.10. Chromatograf gazowy współpracujący z kolumną kapilarną z systemem rozdziału strumienia, składający się z:
    - 3.10.1. komory termostatycznej do kolumn w celu utrzymania wymaganej temperatury z dokładnością do  $\pm 1$  °C;
    - 3.10.2. regulowanego termostatem zespołu dozowania z otworem wytryskowym ze szkła krzemowanego i z systemem rozdziału strumienia;
    - 3.10.3. detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID);
    - 3.10.4. systemu gromadzenia danych współpracującego z detektorem FID (pkt 3.10.3.), z możliwością całkowania ręcznego.
  - 3.11. Kolumna kapilarna wypełniona żelem krzemionkowym o długości 20–30 m, o wewnętrznej średnicy 0,25–0,32 mm, pokryta w 5 % difenylem i w 95 % dimetylopolisiloksanem (faza stacjonarna SE-52 lub SE-54 lub podobna), o jednakowej grubości wynoszącej 0,10–0,30  $\mu$ m.
  - 3.12. Mikrostrzykawkka o pojemności 10  $\mu$ l przeznaczona do chromatografii gazowej z umocowaną na stałe igłą do rozdzielania strumienia.
  - 3.13. Eksykator z chlorkiem wapnia.
4. ODCZYNNIKI
- 4.1. Minimalne miano roztworu wodorotlenku potasu 85 %.

- 4.2. Roztwór wodorotlenku potasu w etanolu, w przybliżeniu roztwór 2 mol/l.  
Rozpuścić 130 g wodorotlenku potasu (pkt 4.1), jednocześnie schładzając, w 200 ml wody destylowanej, następnie uzupełnić etanolem do objętości jednego litra (pkt 4.10). Roztwór przechowywać w dobrze zakorkowanej butelce z ciemnego szkła przez maksymalnie dwa dni.
- 4.3. Eter dietylowy do analiz.
- 4.4. Roztwór wodorotlenku potasu w etanolu, w przybliżeniu roztwór 0,2 mol/l.  
Rozpuścić 13 g wodorotlenku potasu (pkt 4.1) w 20 ml wody destylowanej, następnie uzupełnić etanolem do objętości jednego litra (pkt 4.10).
- 4.5. Bezwodny siarczan sodu do analiz.
- 4.6. Płytki szklane (20 × 20 cm) pokryte żelazem krzemionkowym nie zawierającym wskaźnika fluorescencyjnego o grubości 0,25 mm (dostępne w handlu w postaci gotowej do użytku).
- 4.7. Toluilen do chromatografii.
- 4.8. Aceton do chromatografii.
- 4.9. n-heksan do chromatografii.
- 4.10. Eter dietylowy do chromatografii.
- 4.11. Etanol do analiz.
- 4.12. Octan etylu do analiz.
- 4.13. Roztwór porównawczy stosowany w chromatografii cienkowarstwowej: roztwór cholesterolu lub fitosterolu i erytrodiolu w octanie etylu o stężeniu 5 % (pkt 4.11).
- 4.14. 0,2 % roztwór 2,7-dichlorofluorosceiny w etanolu. Roztwór ten uzyskuje nieco zasadowy charakter w wyniku dodania kilku kropli 2 mol/l roztworu wodorotlenku potasu w alkoholu (pkt 4.2).
- 4.15. Bezwodnik pirydyny do chromatografii (zob. uwaga 5).
- 4.16. Heksametyldizylazyna do analiz.
- 4.17. Trimetylochlorosilan do analiz.
- 4.18. Roztwory próbek eterów trimetylosilanowych steroli.  
Należy je przygotować tuż przed użyciem ze steroli i erytrodiolu uzyskanych z zawierających je olejów.
- 4.19.  $\alpha$ -cholestanol o czystości większej niż 99 % (czystość należy sprawdzać metodą analizy GC).
- 4.20. 0,2 % wewnętrzny roztwór wzorcowy (m/V)  $\alpha$ -cholestanolu w octanie etylu (pkt 4.11).
- 4.21. Roztwór fenoloftaleiny, 10 g/l w etanolu (pkt 4.10).
- 4.22. Gaz nośny: czysty wodór lub hel do celów chromatografii gazowej.
- 4.23. Gazy pomocnicze: Czysty wodór, hel, azot i powietrze do celów chromatografii gazowej.
- 4.24. Mieszanina n-heksanu (pkt 4.9)/eteru dietylowego (pkt 4.10) w proporcji 65:35 (V/V).
- 4.25. Odczynnik wywołujący reakcję silylowania składający się z mieszaniny pirydyny/heksametylodisilazanu/trimetylochlorosilanu w proporcji 9:3:1 (V/V/V).
5. PROCEDURA
- 5.1. Przygotowanie substancji niezmydlającej się.
- 5.1.1. Do kolby o pojemności 250 ml (pkt 3.1) wprowadzić przy użyciu mikrostrzykawki o pojemności 500  $\mu$ l (pkt 3.6) pewną ilość wewnętrznego roztworu wzorcowego  $\alpha$ -cholestanolu (pkt 4.20) zawierającą ilość cholestanolu odpowiadającą w przybliżeniu 10 % steroli w próbce. Na przykład w przypadku próbki zawierającej 5 g oliwy z oliwek dodać 500  $\mu$ l roztworu  $\alpha$ -cholestanolu (pkt 4.20), a w przypadku oliwy z wyłoczyn z oliwek 1 500  $\mu$ l. Odparować do wysuszenia pod słabym strumieniem azotu w łaźni wypełnionej ciepłą wodą, następnie po schłodzeniu kolby odważyć  $5 \pm 0,01$  g suchej przefiltrowanej próbki w tej samej kolbie.
- Uwaga 1:* w przypadku zwierzęcych lub roślinnych olejów i tłuszczów zawierających znaczne ilości cholesterolu może wystąpić pik o czasie retencji zbliżonym do cholestanolu. W takich sytuacjach należy dokonać analizy frakcji steroli z dodaniem wewnętrznego wzorca i bez dodawania go.

- 5.1.2. Dodać 50 ml 2 mol/l roztworu wodorotlenku potasu w etanolu (pkt 4.2) i niewielką ilość kamienia pumekowego, uruchomić chłodnicę zwrotną i podgrzać do momentu lekkiego wrzenia aż nastąpi zmydlenie (roztwór stanie się przejrzysty). Kontynuować podgrzewanie przez dalsze 20 minut, następnie wprowadzić 50 ml wody destylowanej od strony wylotu chłodnicy, odłączyć chłodnicę i schłodzić kolbę do temperatury około 30 °C.
- 5.1.3. Przenieść zawartość kolby ilościowo do rozdzielacza o pojemności 500 ml (pkt 3.2), używając kilku porcji wody destylowanej (50 ml). Dodać około 80 ml eteru dietylowego (pkt 4.10), mieszać energicznie przez około 60 sekund, obniżając okresowo ciśnienie przez przełączenie rozdzielacza i otwarcie zaworu odcinającego. Odstawić do całkowitego rozdzielenia się dwóch faz (uwaga 2).

Następnie do drugiego rozdzielacza zebrać jak najdokładniej roztwór mydła. Przeprowadzić jeszcze dwie ekstrakcje na fazie wodno-alkoholowej w ten sam sposób przy użyciu 60–70 ml eteru dietylowego (pkt 4.10).

*Uwaga 2:* emulsję można wyeliminować, dodając niewielkie ilości etanolu (pkt 4.11).

- 5.1.4. Połączyć wszystkie trzy eterowe ekstrakty w jednym rozdzielaczu zawierającym 50 ml wody. Przemycać nadal wodą (50 ml), aż woda przestanie barwić się na różowy kolor po dodaniu kropli roztworu fenoloftaleiny (pkt 4.21).

Po usunięciu wody popłucznej przefiltrować przez bezwodny siarczan sodu (pkt 4.5) do wcześniej zważonej kolby o pojemności 250 ml, płuczac rozdzielacz i filtr niewielkimi ilościami eteru dietylowego (pkt 4.10).

- 5.1.5. Odparować rozpuszczalnik przez destylację przy użyciu wyparki obrotowej w temperaturze 30 °C w próżni. Dodać 5 ml acetonu i usunąć całkowicie lotny rozpuszczalnik pod delikatnym strumieniem powietrza. Suszyć pozostałość w piecu w temperaturze  $103 \pm 2$  °C przez 15 minut. Schłodzić w eksykatorze i zważyć z dokładnością do 0,1 mg.

- 5.2. Oddzielenie frakcji steroli i dialkoholi triterpenowych (erytrodiol + uwaol)

- 5.2.1. Przygotowanie podstawowych płytek do chromatografii cienkowarstwowej Zanurzyć płytki z żelu krzemionkowego (pkt 4.6) na głębokość około 4 cm w 0,2 mol/l roztworze wodorotlenku potasu w etanolu (pkt 4.5) na 10 sekund, następnie suszyć je w dygestorium przez dwie godziny i na koniec umieścić w piecu nagrzanym do temperatury 100 °C na godzinę.

Wyjąć z pieca i umieścić w eksykatorze z chlorkiem wapnia (pkt 3.13) aż do czasu ich użycia (płytki poddane takiej obróbce powinny być wykorzystane w ciągu 15 dni).

*Uwaga 3:* w przypadku stosowania podstawowych płytek z żelu krzemionkowego do oddzielania frakcji steroli nie ma potrzeby poddawania frakcji niezmydlającej się działaniu tlenku glinu. W ten sposób wszystkie związki o charakterze kwasowym (kwasy tłuszczowe i inne) zatrzymują się na linii początkowej, a pasmo steroli jest wyraźnie oddzielone od pasma alkoholi alifatycznych i triterpenowych.

- 5.2.2. Napełnić komorę chromatograficzną mieszaniną heksanu i eteru dietylowego (pkt 4.24) (uwaga 4) do poziomu około 1 cm. Zamknąć komorę odpowiednią pokrywą i pozostawić na co najmniej godzinę w chłodnym miejscu w celu uzyskania równowagi układu ciecz-para; na wewnętrznych powierzchniach komory można umieścić paski bibuły filtracyjnej zanurzone w eluencie. Pozwala to skrócić o około jedną trzecią czas przemieszczenia linii cieczy i uzyskać bardziej jednorodną i regularną elucję składników.

*Uwaga 4:* przy każdej analizie należy wymienić mieszaninę rozwijającą w celu uzyskania idealnie odtwarzalnych warunków elucji, zamiennie można stosować rozpuszczalnik w postaci mieszaniny n-heksanu i eteru dietylowego w proporcji 50:50 (V/V).

- 5.2.3. Przygotować roztwór substancji niezmydlającej się (pkt 5.1.5) w octanie etylu (pkt 4.12) o stężeniu około 5 % i za pomocą mikrostrzykawki o pojemności 100  $\mu$ l nanieść 0,3 ml roztworu w postaci wąskiego i jednolitego pasma na dolnej części płytki chromatograficznej (pkt 5.2.1) w odległości 2 cm od dolnej krawędzi. Na linii pasma nanieść 2–3  $\mu$ l roztworu porównawczego (pkt 4.13) w celu identyfikacji pasma steroli i dialkoholi triterpenowych po rozwinięciu.

- 5.2.4. Umieścić płytkę w komorze chromatograficznej przygotowanej w sposób opisany w pkt 5.2.2. Temperaturę otoczenia należy utrzymywać w granicach 15–20 °C (uwaga 5). Bezwzględnie zakryć komorę pokrywą i pozostawić w celu elucji składników aż do momentu, gdy czoło rozpuszczalnika dotrze na odległość około 1 cm od górnej krawędzi płytki. Wyjąć płytkę z komory chromatograficznej i odparować rozpuszczalnik w strumieniu gorącego powietrza lub umieścić w tym celu płytkę na chwilę w dygestorium.

*Uwaga 5:* wyższa temperatura mogłaby utrudniać oddzielenie.



5.2.5. Spryskać płytkę lekko i równomiernie roztworem 2,7-dichlorofluorosceiny (pkt 4.14) i pozostawić do wyschnięcia. Obserwując płytkę w świetle ultrafioletowym, pasma steroli i dialkoholi triterpenowych można zidentyfikować, przyrównując je do plamek uzyskanych za pomocą roztworu porównawczego (pkt 4.13). Zaznaczyć czarnym ołówkiem granice pasm wzdłuż krawędzi fluoryzujących (zob. wykres 3 dotyczący płytki TLC).

5.2.6. Za pomocą metalowej szpatułki zeszkrobać żel krzemionkowy z zaznaczonego obszaru. Usunięty i dokładnie rozdrobiony materiał przenieść do lejka do sączenia (pkt 3.7). Dodać 10 ml gorącego octanu etylu (pkt 4.12), ostrożnie wymieszać za pomocą metalowej szpatułki i przefiltrować w próżni, zbierając filtrat do kolby stożkowej (pkt 3.8) połączonej z lejkiem do sączenia.

Pozostałość na filtrze przepłukać trzykrotnie eterem dietylowym (pkt 4.3) (około 10 ml przy każdym płukaniu), zbierając filtrat do tej samej kolby połączonej z lejkiem, odparować filtrat do objętości 4–5 ml, przelać pozostały roztwór do zważonej wcześniej probówki o pojemności 10 ml (pkt 3.9), wysuszyć poprzez lekkie podgrzewanie w delikatnym strumieniu azotu, rozpuścić jeszcze raz kilkoma kroplami acetonu (pkt 4.8), ponownie wysuszyć.

Pozostałość znajdująca się w probówce to frakcje steroli i dialkoholi triterpenowych.

5.3. Przygotowanie trimetylsilyloeterów

5.3.1. Do probówki zawierającej frakcje steroli i dialkoholi triterpenowych dodać odczynnik wywołujący reakcję silylowania (pkt 4.25) (uwaga 6) w ilości 50 µl na każdy miligram steroli i dialkoholi triterpenowych, w sposób pozwalający uniknąć wchłaniania wilgoci (uwaga 7).

*Uwaga 6:* w handlu dostępne są gotowe roztwory. Inne odczynniki silylujące, takie jak na przykład bis-trimetylsilyltryfluoroacetamid + 1 % trimetylochlorosilanu, który musi zostać wymieszany z taką samą ilością bezwodnika pirydyny, również są dostępne.

Pirydynę można zastąpić taką samą ilością acetonitrylu.

5.3.2. Zamknąć probówkę korkiem i ostrożnie wstrząsać (bez odwracania) aż do całkowitego rozpuszczenia się związków. Pozostawić na co najmniej 15 minut w temperaturze otoczenia, a następnie wirować przez kilka minut. Przezroczysty roztwór można poddać analizie metodą chromatografii gazowej.

*Uwaga 7:* pojawienie się lekkiej opalizacji jest zjawiskiem normalnym i nie stanowi żadnej nieprawidłowości. Pojawienie się białej zawiesiny lub różowego koloru wskazuje na obecność wilgoci w odczynniku lub pogorszenie jego jakości. W takich przypadkach badanie należy powtórzyć (tylko w przypadku zastosowania heksametylosilazanu/trimetylochlorosilanu).

5.4. Analiza metodą chromatografii gazowej

5.4.1. Czynności wstępne, przygotowanie kolumn kapilarnych

5.4.1.1. Osadzić kolumnę (pkt 3.11) w chromatografii gazowej, podłączając końcówkę wlotową do dozownika z rozdziałem strumienia, a końcówkę wylotową do detektora.

Dokonać ogólnych kontroli zespołu chromatografu gazowego (szczelność układu zasilania gazem, wydajność detektora, wydajność systemu dzielenia strumienia i systemu zapisu itd.)

5.4.1.2. Jeżeli kolumna zostaje użyta po raz pierwszy, zaleca się jej przygotowanie: przepuścić powoli przez kolumnę strumień gazu, następnie włączyć zespół chromatografu gazowego i rozpocząć stopniowe podgrzewanie do temperatury co najmniej 20 °C powyżej temperatury roboczej (uwaga 8). Utrzymywać taką temperaturę przez co najmniej dwie godziny, następnie ustawić zespół w trybie pracy (regulacja strumienia gazu i układu rozdzielania, zapalenie płomienia, połączenie z systemem obliczeniowymi, regulacja temperatury kolumny, detektora i dozownika itd.), a następnie rejestrować sygnał z czułością co najmniej dwa razy większą niż przewidziana czułość analizy. Przebieg linii podstawowej musi mieć charakter liniowy, bez jakichkolwiek pików i bez przesunięcia.

Ujemne przesunięcie prostej linii wskazuje na nieszczelność połączeń kolumn; przesunięcie dodatnie wskazuje na niedostateczne przygotowanie kolumny.

*Uwaga 8:* temperatura przygotowania kolumn musi zawsze być co najmniej o 20 °C niższa niż maksymalna temperatura określona dla fazy stacjonarnej.

5.4.2. Dobór warunków roboczych

5.4.2.1. Warunki robocze są następujące:

- temperatura kolumny: 260 ± 5 °C;
- temperatura dozownika: 280–300 °C;
- temperatura detektora: 280–300 °C;
- prędkość liniowa gazu nośnego: hel 20–35 cm/s; wodór 30–50 cm/s;

- stosunek rozdziału strumienia: 1:50–1:100;
- czułość przyrządów: 4–16 razy minimalne tłumienie;
- czułość rejestratora: 1–2 mV w pełnej skali;
- ilość wprowadzonej substancji: 0,5–1 µl roztworu TMSE.

Warunki te mogą być zmieniane zgodnie z charakterystyką kolumny i chromatografu gazowego w celu uzyskania chromatogramów spełniających następujące wymogi:

- czas retencji w przypadku piku β-sitosterolu powinien wynosić  $20 \pm 5$  min;
- pik kampesterolu powinien wynosić: w przypadku oliwy z oliwek (średnia zawartość 3 %)  $20 \pm 5$  % w pełnej skali; w przypadku oleju sojowego (średnia zawartość 20 %)  $80 \pm 10$  % w pełnej skali;
- Należy oddzielić wszystkie występujące sterole. Oprócz całkowitego oddzielenia od siebie piki muszą także całkowicie rozdzielone, co oznacza, że wykres piku musi łączyć się z linią podstawową, zanim przejdzie w następny pik. Niepełna rozdzielczość jest jednak tolerowana, pod warunkiem że pik w punkcie RRT 1,02 (sitostanol) może zostać oznaczony ilościowo na podstawie linii prostopadłej.

#### 5.4.3. Procedura analityczna

- 5.4.3.1. Za pomocą mikrostrzykawki o pojemności 10 µl pobrać 1 µl heksanu, zassać 0,5 µl powietrza i następnie 0,5–1 µl roztworu próbki. Pociągnąć dalej tłoczek w celu opróżnienia igły. Wprowadzić igłę przez membranę dozownika i po jednej, dwóch sekundach szybko wstrzyknąć, a następnie powoli wyjąć igłę po około pięciu sekundach.

Można zastosować także dozownik automatyczny.

- 5.4.3.2. Prowadzić rejestrację do całkowitego wyeluwania TMSE obecnych w próbce dialkoholi triterpenowych. Linia podstawowa powinna nadal spełniać wymogi (pkt 5.4.1.2).

#### 5.4.4. Identyfikacja pików

Zidentyfikować poszczególne piki na podstawie czasów retencji oraz przez porównanie z mieszaniną steroli i TMSE dialkoholi triterpenowych poddanych analizie w takich samych warunkach (zob. dodatek).

Sterole i dialkohole triterpenowe podlegają elucji w następującej kolejności: cholesterol, brassikasterol, ergosterol, 24-metylen-cholesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ7-kampesterol, Δ5,23-stigmastadienol, klostero-sterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ5-awenasterol, Δ5,24-stigmastadienol, Δ7-stigmastenol, Δ7-awenasterol, erytrodiol i uwaol.

Czasy retencji β-sitosterolu na kolumnach SE-52 i SE-54 przedstawione są w tabeli 1.

Na rysunkach 1 i 2 przedstawione są typowe chromatogramy niektórych rodzajów oliwy.

#### 5.4.5. Ocena ilościowa

- 5.4.5.1. Obliczyć powierzchnie pików α-cholestanolu i steroli oraz dialkoholi triterpenowych za pomocą systemu obliczeniowego. Pominąć związki, które nie są ujęte w tabeli 1 (nie należy uwzględniać w obliczeniach ergosterolu). Współczynnik odpowiedzi w przypadku α-cholestanolu przyjmuje się jako równy 1.

- 5.4.5.2. Obliczyć stężenie każdego poszczególnego sterolu w mg/kg substancji tłuszczowej w następujący sposób:

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

gdzie:

$A_x$  = powierzchnia piku w przypadku sterola x, zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym

$A_s$  = powierzchnia piku α-cholestanolu, zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym

$m_s$  = masa dodanego α-cholestanolu, w miligramach

$m$  = masa próbki użytej do oznaczenia, w gramach

## 6. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

- 6.1. Podać stężenie poszczególnego sterolu w mg/kg substancji tłuszczowej i ich sumę jako „sterole całkowite”. Skład każdego z poszczególnych steroli oraz skład erytrodiolu i uwaolu należy podać z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.  
Zawartość całkowitych steroli musi być podana jako liczba całkowita bez przecinka dziesiętnego.
- 6.2. Procentową zawartość każdego poszczególnego sterolu obliczyć na podstawie stosunku powierzchni odpowiedniego pików do sumy powierzchni pików steroli, erytrodiolu i uwaolu:

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

gdzie:

$A_x$  = powierzchnia pików dla x;

$\Sigma A$  = suma powierzchni pików dla steroli;

- 6.3. APP  $\beta$ -sitosterol:  $\Delta^5$ -23-stigmastadienol + klerosterol +  $\beta$ -sitosterol + sitostanol +  $\Delta^5$ -awenasterol +  $\Delta^5$ -24-stigmastadienol.
- 6.4. Obliczyć procentową zawartość erytrodiolu i uwaolu:

$$\text{Erytrodiol} + \text{Uwaol} = \frac{E_r + U_v}{E_r + U_v + \Sigma A} \times 100$$

gdzie:

$\Sigma A$  = suma powierzchni pików dla steroli, zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym;

$E_r$  = powierzchnia erytrodiolu zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym;

$U_v$  = powierzchnia uwaolu zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym.

---

## Dodatek

**Oznaczenie prędkości liniowej gazu**

Do chromatografu gazowego ustawionego na normalne warunki pracy wstrzyknąć 1–3 µl metanu (lub propanu) i zmierzyć czas, w jakim gaz przejdzie przez kolumnę od momentu wstrzyknięcia do momentu, w którym pojawi się pik (tM).

Prędkość liniowa w cm/s jest określona jako L/tM, gdzie L oznacza długość kolumny w centymetrach, a tM oznacza czas zmierzony w sekundach.

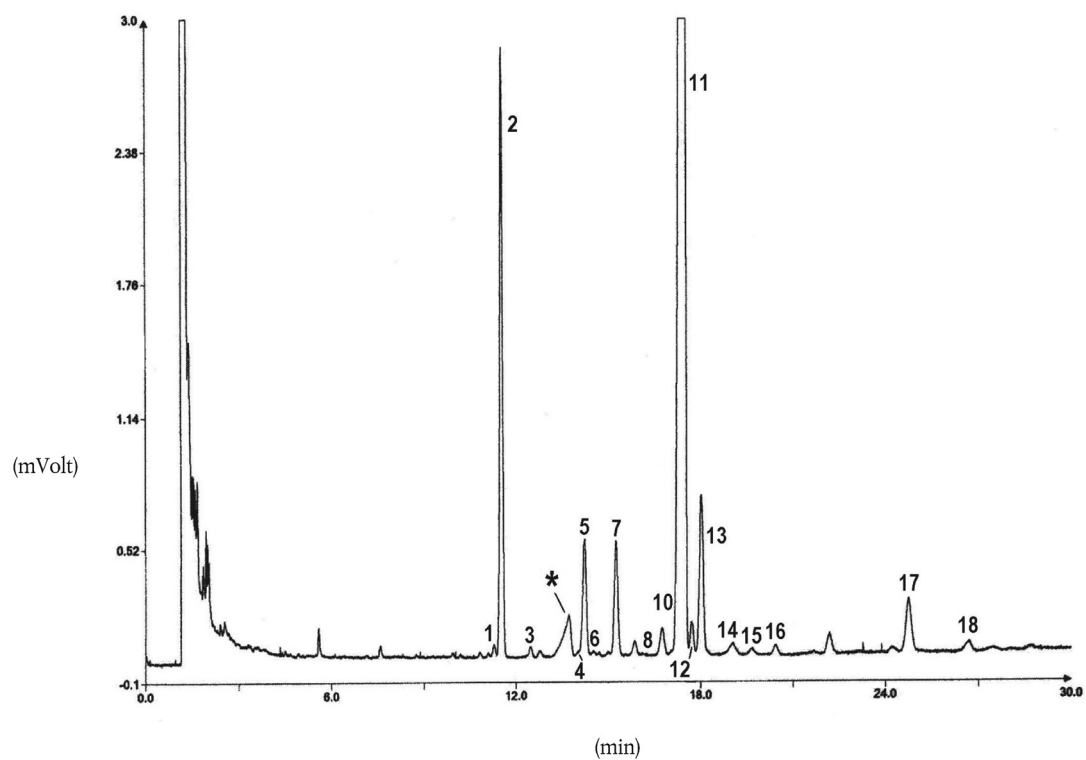
Tabela 1

**Względne czasy retencji dla steroli**

Pik	Identyfikacja		Względny czas retencji	
			Kolumna SE 54	Kolumna SE 52
1	cholesterol	$\Delta$ -5-cholesten-3 $\beta$ -ol	0,67	0,63
2	cholestanol	5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -ol	0,68	0,64
3	brassicasterol	[24S]-24-metyl- $\Delta$ -5,22-cholestadien-3 $\beta$ -ol	0,73	0,71
*	ergosterol	[24S] 24 metyl $\Delta$ 5-7-22 cholestatrien 3 $\beta$ -ol	0,78	0,76
4	24-metylen-cholesterol	24-metylen- $\Delta$ -5,24-cholestadien-3 $\beta$ -ol	0,82	0,80
5	kampesterol	(24R)-24-metyl- $\Delta$ -5-cholesten-3 $\beta$ -ol	0,83	0,81
6	kampestanol	(24R)-24-metyl-cholestan-3 $\beta$ -ol	0,85	0,82
7	stigmasterol	(24S)-24-etyl- $\Delta$ -5,22-cholestadien-3 $\beta$ -ol	0,88	0,87
8	$\Delta$ -7-kampesterol	(24R)-24-metyl- $\Delta$ -7-cholesten-3 $\beta$ -ol	0,93	0,92
9	$\Delta$ -5,23-stigmastadienol	(24R,S)-24-etyl- $\Delta$ -5,23-cholestadien-3 $\beta$ -ol	0,95	0,95
10	klerosterol	(24S)-24-etyl- $\Delta$ -5,25-cholestadien-3 $\beta$ -ol	0,96	0,96
11	$\beta$ -sitosterol	(24R)-24-etyl- $\Delta$ -5-cholesten-3 $\beta$ -ol	1,00	1,00
12	sitostanol	24-etyl-cholestan-3 $\beta$ -ol	1,02	1,02
13	$\Delta$ -5-awenasterol	(24Z)-24-etylid- $\Delta$ -cholesten-3 $\beta$ -ol	1,03	1,03
14	$\Delta$ -5-24-stigmastadienol	(24R,S)-24-etyl- $\Delta$ -5,24-cholestadien-3 $\beta$ -ol	1,08	1,08
15	$\Delta$ -7-stigmastenol	(24R,S)-24-etyl- $\Delta$ -7-cholesten-3 $\beta$ -ol	1,12	1,12
16	$\Delta$ -7-awenasterol	(24Z)-24-etylid- $\Delta$ -7-cholesten-3 $\beta$ -ol	1,16	1,16
17	erytrodiol	5 $\alpha$ olean-12en-3 $\beta$ 28 diol	1,41	1,41
18	uwaol	$\Delta$ 12-ursen-3 $\beta$ 28 diol	1,52	1,52

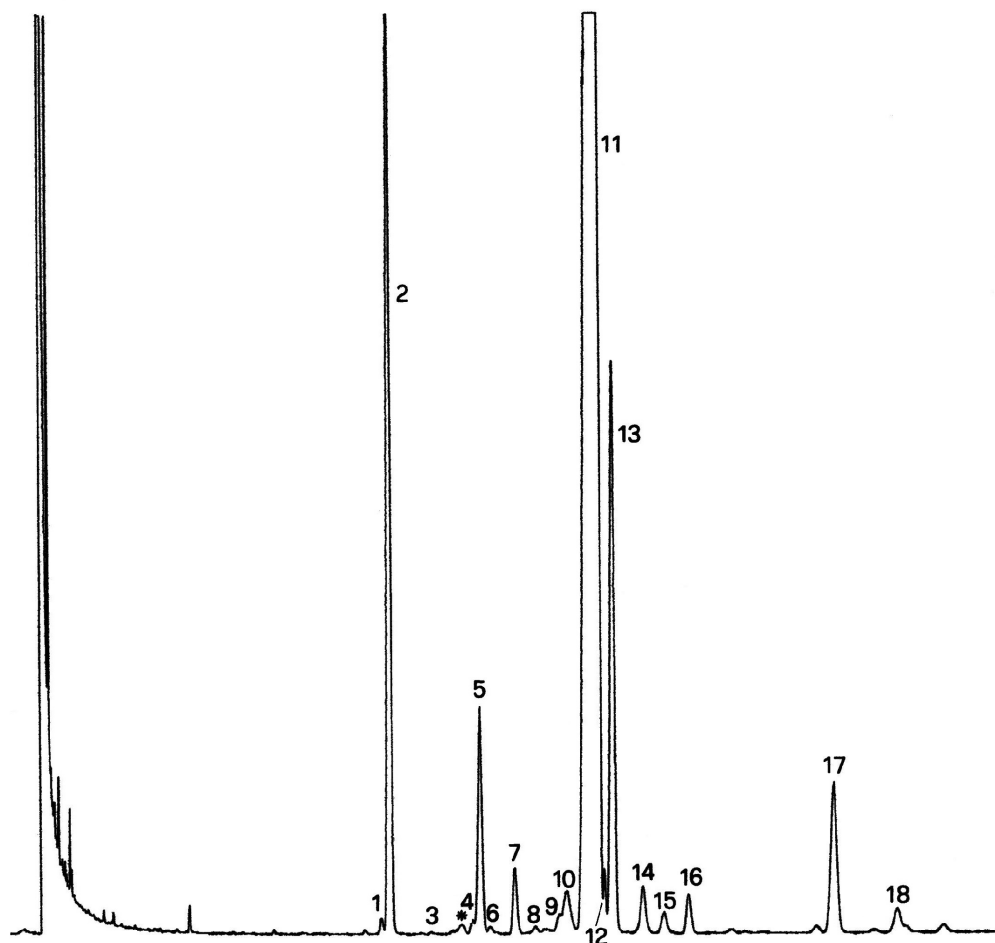
Rysunek 1

Chromatogram gazowy frakcji steroli i dialkoholi triterpenowych oliwy z oliwek typu lampante (wzmocniony wewnętrznym wzorcem)



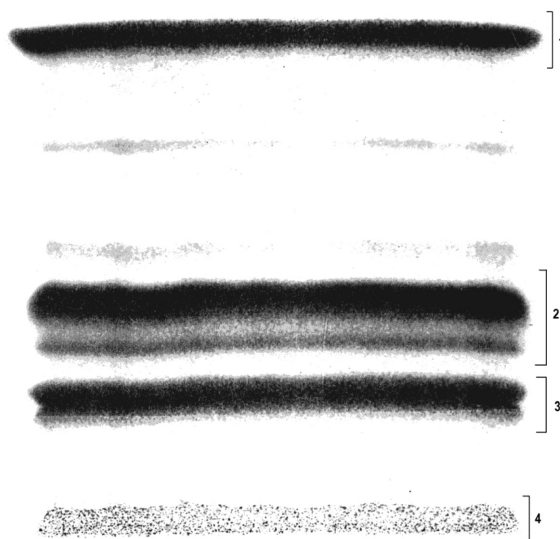
Rysunek 2

Chromatogram gazowy frakcji steroli i dialkoholi triterpenowych rafinowanej oliwy z oliwek (wzmocniony wewnętrznym wzorcem)



Rysunek 3

Płytki TLC oliwy z wytłocznym z oliwek ze strefy, którą musi zostać zeszkrobana w celu oznaczenia steroli i dialkolei triterpenowych



- 1 – skwalen
- 2 – alkohole triterpenowe i alifatyczne
- 3 – sterole i dialkohole triterpenowe
- 4 – początkowe i wolne kwasy tłuszczowe.”

---

## ZAŁĄCZNIK V

## „ZAŁĄCZNIK XII

**METODA MIĘDZYNARODOWEJ RADY DS. OLIWY SŁUŻĄCA DO ORGANOLEPTYCZNEJ OCENY OLIWY Z OLIVEK Z PIERWSZEGO TŁOCZENIA**

## 1. CEL I ZAKRES

Celem tej międzynarodowej metody jest określenie procedury oceny organoleptycznych cech charakterystycznych oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia w rozumieniu pkt 1 załącznika XVI do rozporządzenia (WE) nr 1234/2007 oraz ustanowienie metody jej klasyfikacji w oparciu o wspomniane cechy charakterystyczne. Metoda ta zawiera również wskazania w zakresie nieobowiązkowego etykietowania.

Opisywana metoda ma zastosowanie jedynie do oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia oraz do klasyfikacji lub etykietowania takich rodzajów oliwy, uwzględniając intensywność dostrzeżonych wad oraz owocowości, określaną przez grupę wybranych, przeszkolonych i nadzorowanych degustatorów tworzących zespół.

Metoda ta określa również wskazania w zakresie nieobowiązkowego etykietowania.

Normy IOC wymienione w niniejszym załączniku stosowane są w ich najnowszej dostępnej wersji.

## 2. OGÓLNE SŁOWNICTWO PODSTAWOWE STOSOWANE DO CELÓW ANALIZY SENSORYCZNEJ

W celu uzyskania szczegółów zob. norma IOC/T.20/Doc. No 4 „Sensory Analysis: General Basic Vocabulary”.

## 3. SŁOWNICTWO SPECJALNE

3.1. **Cechy negatywne**

*Zleżały/błotnisty osad* charakterystyczny smak lub zapach oliwy uzyskanej z oliwek ułożonych w stosach lub przechowywanych w takich warunkach, jakie panują w zaawansowanym stadium fermentacji beztlenowej, lub oliwy, która miała bezpośredni kontakt z osadem powstającym w podziemnych zbiornikach i kadziach i która także przeszła proces fermentacji beztlenowej.

*Stęchło-wilgotno-ziemisty* charakterystyczny smak lub zapach oliwy uzyskanej z owoców zaatakowanych przez znaczne ilości grzybów i drożdży na skutek przechowywania ich w wilgoci przez kilka dni lub oliwy uzyskanej z oliwek zabrudzonych ziemią lub błotem i nieumytych.

*Winno-octowo-kwaśno-cierpki* charakterystyczny smak lub zapach niektórych rodzajów oliwy przypominający wino lub ocet. Ten smak i zapach jest głównie efektem procesu fermentacji tlenowej oliwek lub rozniecionych oliwek pozostawionych na niedokładnie oczyszczonych matach służących do ich wyciskania, na skutek czego powstał kwas octowy, octan etylu i etanol.

*Zjęłczały* smak lub zapach oliwy, która uległa intensywnemu utlenianiu.

*Przemrożone oliwki (wilgotne drewno)* charakterystyczny smak lub zapach oliwy pozyskanej z oliwek, które przemarzły na drzewie.

3.2. **Pozostałe cechy negatywne**

*Zapach gotowania lub* charakterystyczny zapach oliwy spowodowany nadmiernym lub długotrwałym

*Spalenienny* podgrzewaniem podczas przetwarzania, w szczególności podczas termougniatania masy, jeżeli proces ten prowadzony jest w niewłaściwych warunkach termicznych.

*Zapach siana i drewna* charakterystyczny zapach niektórych rodzajów oliwy wyprodukowanych z wysuszonych oliwek.

*Szorstkie wrażenie* charakterystyczne wrażenie, jakie dają niektóre rodzaje starszej oliwy, których degustacja pozostawia w ustach uczucie gęstości i maziowatości.

*Zapach smaru* zapach oliwy przypominający zapach oleju napędowego, smaru lub oleju mineralnego.

*Zapach wody pochodzenia roślinnego* zapach, którego oliwa nabrała na skutek długotrwałego kontaktu z wodą pochodzenia roślinnego, która przeszła proces fermentacji.

*Smak solanki* smak oliwy pozyskanej z oliwek zakonserwowanych w solance.

*Metaliczny* smak lub zapach przypominający metal. Jest charakterystyczny dla oliwy, która miała długotrwały kontakt z powierzchniami metalicznymi w trakcie rozdrabniania, ugniatania, wyciskania lub przechowywania.



*Zapach ostnicy* charakterystyczny zapach oliwy uzyskanej z oliwek wyciskanych przy pomocy nowych mat wykonanych z ostnicy. Zapach ten może różnić się w zależności od tego, czy maty te wykonane są ze świeżej, czy z suchej ostnicy.

*Zapach robaczywych owoców* zapach oliwy uzyskanej z oliwek silnie zaatakowanych przez larwy muszki oliwnej (*Bactrocera Oleae*).

*Smak ogórka* smak oliwy powstający w wyniku zbyt długiego przechowywania w zamkniętym hermetycznie opakowaniu, w szczególności w pojemnikach z blachy cynowanej, przypisywany powstawaniu 2,6 nonadienu.

### 3.3. Cechy pozytywne

*Owocowy* charakterystyczny dla oliwy ogół doznań węchowych, zależnych od odmiany oliwek, właściwych dla oliwy z oliwek uzyskanej ze zdrowych i świeżych oliwek, dojrzałych lub niedojrzałych. Doznania te odbierane są bezpośrednio lub poprzez jamę nosowo-gardłową.

*Gorzki* charakterystyczny, podstawowy smak oliwy uzyskanej z oliwek zielonych lub będących na etapie dojrzewania. Wyczuwalny jest za pomocą brodawek okolonych układających się w tylnej części języka w kształt litery V.

*Ostry* wrażenie szczypania charakterystyczne dla rodzajów oliwy produkowanych na początku roku posadzenia, w szczególności z oliwek jeszcze niedojrzałych. Wrażenie to daje się odczuć w całej jamie ustnej, a w szczególności w gardle.

### 3.4. Nieobowiązkowa terminologia stosowana do celów etykietowania

Na żądanie kierownik zespołu degustatorów może potwierdzić, że oceniane oliwy są zgodne z definicjami i przedziałami odpowiadającymi następującym określeniom i przymiotnikom, w zależności od stopnia intensywności i percepcji cech oliwy.

*Cechy pozytywne (owocowy, gorzki i ostry)* w odniesieniu do intensywności percepcji:

- *określenie intensywny stosuje się*, jeżeli mediana danej cechy jest wyższa niż 6;
- *określenie średni stosuje się*, jeżeli mediana danej cechy wynosi 3–6;
- *określenie lekki stosuje się*, jeżeli mediana danej cechy jest niższa niż 3.

*Owocowy* charakterystyczny dla oliwy ogół doznań węchowych, zależnych od odmiany oliwek, właściwych dla oliwy z oliwek uzyskanej ze zdrowych i świeżych oliwek, niezdominowanej zapachem ani zielonych, ani dojrzałych oliwek. Doznania te odbierane są bezpośrednio lub poprzez jamę nosowo-gardłową.

*Owoc niedojrzały* charakterystyczny dla oliwy ogół doznań węchowych przypominających zapach niedojrzałych owoców, zależnych od odmiany oliwek i właściwych dla oliwy z oliwek uzyskanej z zielonych, zdrowych i świeżych oliwek. Doznania te odbierane są bezpośrednio lub poprzez jamę nosowo-gardłową.

*Owoc dojrzały* charakterystyczny dla oliwy ogół doznań węchowych przypominających zapach dojrzałych owoców, zależnych od odmiany oliwek, właściwych dla oliwy z oliwek uzyskanej ze zdrowych i świeżych oliwek. Doznania te odbierane są bezpośrednio lub poprzez jamę nosowo-gardłową.

*Oliwa zrównowazona* oliwa, która nie wykazuje braku równowagi, co oznacza wrażenie węchowo-smakowe i dotykowe, w którym mediana goryczy lub ostrego smaku jest o dwa punkty wyższa od mediany owocowego smaku/zapachu.

*Oliwa łagodna* oliwa, w odniesieniu do której mediana goryczy i ostrego smaku jest niższa lub równa 2.

### 4. POJEMNIK SZKLANY PRZEZNACZONY DO DEGUSTACJI OLIIWY

W celu uzyskania szczegółów zob. norma IOC/T.20/Doc. No 5 „Glass for Oil Tasting”.

### 5. POMIESZCZENIE DO BADANIA

W celu uzyskania szczegółów zob. norma IOC/T.20/Doc. No 6 „Guide for the Installation of a Test Room”.

### 6. WYPOSAŻENIE

W każdej kabinie należy zapewnić następujące wyposażenie, niezbędne dla degustatorów, aby mogli poprawnie wykonywać swoje zadanie, oraz łatwy dostęp do tego wyposażenia:

- szklanki (standardowe) oznaczone kodem liczbowym, zawierające próbki, przykryte szkłem zegarkowym i przechowywane w temperaturze  $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ;
- formularz oceny (zob. rysunek 1) w wersji drukowanej lub elektronicznej, pod warunkiem że spełnia ona wymogi dotyczące formularza oceny, w razie potrzeby wraz z instrukcją wypełniania tego formularza;
- długopis lub nieścieralny tusz;
- tace z pokrojonym jabłkiem lub z wodą, wodą gazowaną lub sucharkami;
- szklanka wody o temperaturze otoczenia;
- formularz zawierający ogólne zasady wymienione w sekcjach 8.4 i 9.1.1;
- spluwaczki.

## 7. KIEROWNIK ZESPOŁU I DEGUSTATORZY

### 7.1. Kierownik zespołu

Kierownik zespołu musi być osobą starannie wyszkoloną, posiadającą szczegółową wiedzę na temat różnych rodzajów oliwy, jakie będą poddawane ocenie w trakcie pracy zespołu. Kierownik jest najważniejszą osobą w zespole i jest on odpowiedzialny za jego organizację i funkcjonowanie.

Praca kierownika zespołu wymaga podstawowego szkolenia w zakresie narzędzi analizy sensorycznej, umiejętności sensorycznych, skrupulatności w przygotowywaniu, organizacji i przeprowadzaniu badań oraz umiejętności i cierpliwości niezbędnych do planowania i wykonywania badań w sposób naukowy.

Kierownik zespołu jest jedyną osobą odpowiedzialną za wybór, szkolenie i nadzorowanie degustatorów celem ustalenia poziomu ich zdolności. Jest on zatem odpowiedzialny za ocenę degustatorów, która zawsze musi być obiektywna i w odniesieniu do której musi on opracować szczegółowe procedury oparte na badaniach oraz rzetelne kryteria przyjmowania i odrzucania. Zob. norma IOC/T.20/Doc. No 14 „Guide for the selection, training and monitoring of skilled virgin olive oil tasters”.

Kierownicy zespołu są odpowiedzialni za efektywność pracy zespołu, a co za tym idzie za jej ocenę, której rzetelny i obiektywny dowód muszą przedstawić. W każdym przypadku muszą zawsze wykazać, że metoda i degustatorzy znajdują się pod kontrolą. Zaleca się okresowe dobieranie zespołu (IOC/T.20/Doc. No 14, § 5).

Ponoszą oni ostateczną odpowiedzialność za prowadzenie rejestrów zespołu. Rejestry te muszą zawsze być identyfikowalne. Kierownicy muszą przestrzegać wymogów w zakresie zapewnienia jakości, określonych w międzynarodowych normach dotyczących analizy sensorycznej oraz w każdym przypadku gwarantować anonimowość próbek.

Są oni odpowiedzialni za inwentaryzację i zapewnienie dokładnego czyszczenia i konserwacji aparatury i sprzętu niezbędnych do przestrzegania specyfikacji tej metody oraz przechowują pisemne dowody potwierdzające to oraz dowody zgodności z wymogami dotyczącymi analizy.

Są odpowiedzialni za odbiór i przechowywanie próbek po ich dostarczeniu do laboratorium oraz za ich przechowywanie po przeprowadzeniu badania. W ten sposób kierownicy zapewniają każdorazowo anonimowość i odpowiednie przechowywanie próbek, przy czym do tego celu muszą opracować pisemne procedury, aby zapewnić identyfikowalność procesu i gwarancje jego prawidłowości.

Ponadto są odpowiedzialni za przygotowywanie, kodowanie i podawanie próbek degustatorom, zgodnie z odpowiednim doświadczalnie ustalonym schematem dostosowanym do wcześniej ustanowionych protokołów oraz za gromadzenie danych uzyskanych przez degustatorów i ich statystyczne przetwarzanie.

Kierownicy odpowiadają za opracowywanie i sporządzanie projektów pozostałych procedur, które mogą być konieczne dla uzupełnienia tej normy oraz zapewnienia poprawnego funkcjonowania zespołu.

Muszą poszukiwać sposobów porównywania wyników zespołu z wynikami otrzymywanymi przez inne zespoły zajmujące się analizą oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia w celu ustalenia, czy zespół funkcjonuje poprawnie.

Obowiązkiem kierownika zespołu jest motywowanie jego członków poprzez stymulowanie ich zainteresowania, ciekawości i atmosfery konkurencyjności między nimi. W związku z tym zdecydowanie zaleca się kierownikom, aby zapewniali sprawny przepływ informacji między sobą a członkami zespołu, informując ich o wszystkich wykonywanych przez nich zadaniach i otrzymywanych wynikach. Ponadto kierownicy dbają, aby ich opinia nie była znana i nie dopuszczają, aby ewentualni kierownicy narzucali swoje kryteria pozostałym degustatorom.

Kierownicy wzywają degustatorów z odpowiednim wyprzedzeniem i udzielają im odpowiedzi na wszelkie pytania dotyczące przeprowadzania oceny, ale powstrzymują się od sugerowania swoich opinii na temat próbek.

### 7.2. Degustatorzy

Osoby pełniące funkcje degustatorów w ocenie organoleptycznych właściwości oliwy z oliwek wykonują swoje zadania dobrowolnie, wraz z wszystkimi wynikającymi z takiego dobrowolnego działania konsekwencjami dotyczącymi wypełniania obowiązków i braku wynagrodzenia finansowego. Zaleca się zatem kandydatom składanie wniosków w formie pisemnej. Kandydaci są wybierani, szkoleni i nadzorowani przez kierownika zespołu, z uwzględnieniem ich umiejętności w zakresie rozróżniania podobnych próbek; należy pamiętać, że ich dokładność ulegnie poprawie dzięki szkoleniom.

Degustatorzy muszą zachowywać się jak prawdziwi obserwatorzy sensoryczni, odkładając na bok swoje osobiste gusty i przedstawiając jedynie wrażenia, jakie odbierają. W związku z tym muszą zawsze pracować w ciszy, w sposób nierestrykcyjny i bez pośpiechu, w pełni skupiając swoją sensoryczną uwagę na poddawanej degustacji próbek.

Każde badanie wymaga obecności 8–12 degustatorów, warto jest jednak mieć kilku dodatkowych degustatorów w rezerwie, w razie potrzeby zastąpienia nieobecnych degustatorów.

## 8. WARUNKI BADANIA

### 8.1. Prezentacja próbki

Próbki oliwy poddawanej analizie podaje się w standardowych szklankach do degustacji spełniających wymagania normy IOC/T.20/Doc. No 5 „Glass for oil tasting”.

Szklanka zawiera 14–16 ml oliwy lub, jeżeli szklanki mają być ważone, 12,8–14,6 g oliwy i jest zakryta szkłem zegarkowym.

Każda szklanka oznaczona jest kodem składającym się z cyfr lub kombinacji losowo wybranych liter i cyfr. Oznaczenia kodem dokonuje się za pomocą bezwonnego systemu.

### 8.2. Badanie i temperatura próbek

Podczas badania próbki oliwy przeznaczone do degustacji przechowywane są w szklankach w temperaturze  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Temperaturę taką wybrano, ponieważ obserwowanie różnic organoleptycznych w tej temperaturze jest łatwiejsze niż w temperaturze otoczenia i ponieważ w niższych temperaturach związki aromatyczne charakterystyczne dla tych rodzajów oliwy są słabo uwalniane, natomiast wyższe temperatury prowadzą do powstawania substancji lotnych, charakterystycznych dla ogrzewanych olejów. W celu uzyskania informacji na temat metody, którą należy stosować do ogrzewania próbek w szklankach, zob. norma IOC/T.20/Doc. No 5 „Glass for Oil Tasting”.

Temperatura w pomieszczeniu, w którym odbywa się badanie, musi wynosić  $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (zob. norma IOC/T.20/Doc. No 6).

### 8.3. Czas badania

Najlepszą porą na przeprowadzanie degustacji oliwy są godziny ranne. Udowodniono, że w ciągu dnia występują optymalne okresy percepcji zmysłu smaku i zapachu. Posiłki są poprzedzone okresem, w którym wrażliwość zapachowo-smakowa wzrasta, natomiast po posiłku percepcja ta maleje.

Kryterium to nie powinno jednak być traktowane w sposób absolutny, ponieważ uczucie głodu może rozpraszać degustatorów, wpływając niekorzystnie na ich zdolność dyskryminacyjną; zaleca się zatem, aby degustacje odbywały się między godziną 10:00 rano a 12:00 w południe.

### 8.4. Degustatorzy: ogólne zasady postępowania

Poniższe zalecenia mają zastosowanie do postępowania degustatorów podczas ich pracy.

W przypadku wezwania przez kierownika zespołu do uczestniczenia w ocenie organoleptycznej, degustatorzy powinni być w stanie stawić się w uprzednio ustalonym terminie oraz powinni uwzględnić następujące zalecenia:

- nie palić papierosów ani nie pić kawy co najmniej na 30 minut przed ustalonym terminem oceny;
- nie używać żadnych substancji zapachowych, kosmetyków lub mydła, których zapach mógłby utrzymać się do czasu badania; używać bezzapachowego mydła do mycia rąk, które należy następnie opłukiwać i suszyć tak często, jak wymaga tego wyeliminowanie wszystkich zapachów;
- nie jeść niczego co najmniej na godzinę przed przeprowadzeniem oceny;
- w przypadku złego samopoczucia, w szczególności jeżeli ma ono wpływ na ich zmysł węchu lub smaku lub na skutek efektu psychologicznego uniemożliwiającego skupienie się na pracy, degustatorzy muszą powstrzymać się od przeprowadzenia degustacji i poinformować o tym kierownika zespołu;
- jeżeli degustatorzy spełniają powyższe wymagania, zajmują przydzielone im miejsca w kabinach w sposób zdyscyplinowany, zachowując ciszę.
- muszą ostrożnie przeczytać instrukcje znajdujące się w formularzu oceny i nie przystępować do badania próbki, dopóki nie będą w pełni przygotowani do wykonania tego zadania (zrelaksowani i spokojni). W przypadku pojawienia się jakichkolwiek wątpliwości degustatorzy powinni na osobności zasięgnąć rady kierownika zespołu;
- podczas wykonywania swoich zadań muszą zachować milczenie;
- aby nie zakłócać koncentracji i pracy swoich koleżanek i kolegów, degustatorzy zawsze wyłączają swoje telefony komórkowe.

## 9. PROCEDURA OCENY ORGANOLEPTYCZNEJ I KLASYFIKACJA OLIWY Z OLIVEK Z PIERWSZEGO TŁOCZENIA

### 9.1. Metoda degustacji

- 9.1.1. Degustatorzy podnoszą szklankę, nie zdejmując z niej szkła zegarkowego, i lekko ją przechylają; następnie w tej pozycji wykonują pełny obrót szklanki, tak aby wewnątrz szklanki było w jak największym stopniu zwilżone. Po zakończeniu tego etapu degustatorzy zdejmują szkło zegarkowe i wachają próbkę, wykonując powolne, głębokie oddechy w celu dokonania oceny oliwy. Wachanie oliwy nie powinno trwać dłużej niż 30 sekund. Jeżeli w tym czasie degustator nie wyciągnie żadnego wniosku, musi zrobić krótką przerwę zanim podejmie kolejną próbę.

Po zakończeniu badania zapachu degustatorzy oceniają wrażenie podpoliczkowe (ogólne retronosowe wrażenie zapachu, smaku i dotyku). Aby dokonać takiej oceny, degustatorzy biorą do ust mały łyk oliwy o objętości około 3 ml. Niezwykle ważne jest rozprowadzenie oliwy na całej powierzchni jamy ustnej, od przedniej części ust i języka, poprzez boczne obszary jamy ustnej, do tylnej części jamy oraz podniebienia i gardła, ponieważ wiadomo jest, że intensywność percepcji smaków i wrażeń dotykowych różni się w zależności od obszaru języka, podniebienia i gardła.

Należy podkreślić, że istotne jest bardzo powolne rozprowadzenie dostatecznej ilości oliwy na tylnej części języka w kierunku podniebienia i jednocześnie koncentrowanie się na kolejności, w jakiej pojawiają się wrażenia goryczy i ostrego smaku. Jeżeli degustator nie postąpi w taki sposób, w przypadku niektórych rodzajów oliwy oba te bodźce smakowe mogą umknąć jego uwadze lub ostry smak może zagłuszyć gorycz.

Krótkie, następujące po sobie oddechy i wciąganie powietrza ustami pozwala degustatorowi nie tylko na rozprowadzenie w pełni próbki w całej jamie ustnej, ale także na wycucie lotnych substancji aromatycznych poprzez jamę gardłowo-nosową poprzez wymuszenie użycia tej części jamy ustnej.

Należy także uwzględnić wrażenie dotykowe związane z pikantnością. W tym celu zaleca się połknięcie oliwy.

- 9.1.2. Dokonując organoleptycznej oceny oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia, zaleca się, aby podczas jednej sesji poddawać ocenie nie więcej niż CZTERY PRÓBKİ oraz aby przeprowadzać maksymalnie trzy sesje w ciągu dnia w celu uniknięcia efektu kontrastu, jaki mógłby wystąpić w przypadku bezpośredniej degustacji pozostałych próbek.

Ponieważ następujące po sobie degustacje powodują zmęczenie lub utratę wrażliwości spowodowaną degustacją wcześniejszych próbek, konieczne jest stosowanie produktu, który usuwa z jamy ustnej pozostałości oliwy z poprzedniej degustacji.

Zaleca się użycie małego plasterka jabłka, który po przeżuciu można wypluć do sopluczki. Następnie zaleca się wypłukanie jamy ustnej niewielką ilością wody o temperaturze otoczenia. Między zakończeniem jednej sesji a rozpoczęciem kolejnej należy odczekać co najmniej 15 minut.

#### 9.2. Korzystanie z formularza oceny przez degustatorów

Na rys. 1 w niniejszym załączniku przedstawiono wzór formularza oceny przeznaczonego do użytku przez degustatorów.

Każdy degustator wchodzący w skład zespołu musi powąchać oliwę będącą przedmiotem badania, a następnie dokonać jej degustacji<sup>(1)</sup>. Następnie musi zaznaczyć na dziesięciocentymetrowej skali udostępnionego formularza intensywność wrażeń doznanych w odniesieniu do cech negatywnych i pozytywnych.

Jeżeli doznane przez degustatorów wrażenie odnosi się do cechy negatywnej niewymienionej w sekcji 4, podają to w rubryce „inne” przy użyciu terminu lub terminów opisujących te cechy z jak największą precyzją.

#### 9.3. Wykorzystanie danych przez kierowników zespołu degustatorów

Kierownik zespołu zbiera formularze wypełnione przez każdego z degustatorów i dokonuje przeglądu stopni intensywności przypisanych do różnych cech. W przypadku stwierdzenia jakiegokolwiek nieprawidłowości kierownicy zwracają się do degustatora z prośbą o wprowadzanie poprawek w jego formularzu oceny oraz, w razie potrzeby, o powtórzenie badania.

Kierownik zespołu wprowadza dane z oceny dostarczone przez każdego z degustatorów do programu komputerowego, takiego jak program przewidziany w normie (IOC/T.20/Doc. No 15) w celu statystycznego obliczenia wyników analizy w oparciu o obliczenie median tych wyników. Zobacz sekcja 9.4 i dodatek do niniejszego załącznika. Wprowadzenie danych dotyczących jednej próbki odbywa się przy pomocy matrycy składającej się z 9 kolumn odpowiadających 9 cechom sensorycznym i liczbie linijek „n” odpowiadającej liczbie „n” członków zespołu.

Jeżeli co najmniej 50 % członków zespołu odbierze daną cechę negatywną i odnotuje ją w rubryce „inne”, kierownik zespołu oblicza medianę takiej wady i otrzymuje odpowiednią klasyfikację.

Wartość odpornego współczynnika zmienności określającego klasyfikację (wada, której cechą jest największa intensywność i owocowy charakter) musi być niższa lub równa 20 %.

W przeciwnym wypadku kierownik zespołu musi powtórzyć ocenę danej próbki, przeprowadzając drugą degustację.

W przypadku częstego występowania takiej sytuacji zaleca się, aby kierownik zespołu przeprowadził wśród degustatorów dodatkowe szczegółowe szkolenie (IOC/T.20/Doc. No 14, § 5) oraz aby skorzystał ze wskaźnika powtarzalności i wskaźnika odchyżeń w celu sprawdzenia efektywności zespołu (IOC/T.20/Doc. No 14, § 6).

#### 9.4. Klasyfikacja oliwy

Oliwa klasyfikowana jest zgodnie z wymienionymi poniżej kategoriami, w zależności od mediany wad i mediany charakteru owocowego. Medianę wad określa się jako medianę wady odebranej z największą intensywnością. Mediana wad i mediana charakteru owocowego przedstawiane są z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

<sup>(1)</sup> Degustator może powstrzymać się od degustacji oliwy, jeżeli na podstawie samego zapachu stwierdzi występowanie niezwykle intensywnej cechy negatywnej; w takim przypadku odnotowuje w formularzu oceny zaistnienie tej okoliczności nadzwyczajnej.

Klasyfikacji oliwy dokonuje się poprzez porównanie wartości mediany wad i mediany charakteru owocowego z przedstawionymi poniżej przedziałami odniesienia. Ponieważ przy ustalaniu poziomów przedziałów uwzględniono błąd metody, uznaje się, iż poziomy te są ostateczne. Pakiety oprogramowania umożliwiają przedstawienie klasyfikacji w formie tabeli danych statystycznych lub w formie wykresu.

- a) oliwa z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia: mediana wad jest równa 0, a mediana charakteru owocowego jest wyższa niż 0;
- b) oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia: mediana wad jest wyższa niż 0, ale nie przekracza 3,5, a mediana charakteru owocowego jest wyższa niż 0;
- c) oliwa z oliwek typu lampante: mediana wad jest wyższa niż 3,5 lub mediana wad jest niższa lub równa 3,5, a mediana charakteru owocowego jest równa 0.

*Uwaga 1:*

jeżeli mediana cech dotyczących goryczy lub ostrego smaku jest wyższa niż 5,0, kierownik zespołu zaznacza to na świadectwie badania oliwy z oliwek.

Rysunek 1

**FORMULARZ OCENY OLIWY Z OLIVEK Z PIERWSZEGO TŁOCZENIA**

<b>Intensywność percepcji wad</b>	
Zleżały/błotnisty osad (*)	
Stęchły/wilgotny/ziemisty (*)	
Winy/octowy kwaśny/cierpki (*)	
Przemrożone oliwki (wilgotne drewno)	
Zjełczały	
Pozostałe cechy negatywne:	
Cecha:	Metaliczny <input type="checkbox"/> Zapach siana <input type="checkbox"/> Zapach robaczywych owoców <input type="checkbox"/> Szorstkie wrażenie <input type="checkbox"/> Smak solanki <input type="checkbox"/> Zapach gotowania lub spalenizny <input type="checkbox"/> Zapach wody pocho- dzenia roślinnego <input type="checkbox"/> Zapach ostnicy <input type="checkbox"/> Smak ogórka <input type="checkbox"/> Zapach smaru <input type="checkbox"/>
(*) niepotrzebne skreślić	
<b>Intensywność percepcji cech pozytywnych</b>	
Owocowy	
	Niedojrzały <input type="checkbox"/> Dojrzały <input type="checkbox"/>
Gorzki	
Ostry	
Nazwisko degustatora:	Kod degustatora:
Kod próbki:	Podpis:

## Dodatek

**Metoda obliczania mediany i przedziałów ufności****Mediana**

$$Me = [p (X < x_m) \leq 1/2 \wedge p (X \leq x_m) \geq 1/2]$$

Medianę określa się jako liczbę rzeczywistą  $X_m$ , scharakteryzowaną w ten sposób, że prawdopodobieństwo ( $p$ ) przyjęcia przez zmienną losową o rozkładzie ( $X$ ) wartości poniżej tej liczby ( $X_m$ ) jest mniejsze lub równe 0,5 i jednocześnie prawdopodobieństwo ( $p$ ) przyjęcia przez zmienną losową o rozkładzie ( $X$ ) wartości mniejszej lub równej  $X_m$  jest równe lub większe niż 0,5. Bardziej praktyczna definicja określa medianę jako 50. percentyl rozkładu zestawu liczb uszeregowanych w porządku rosnącym. Ujmując prościej, mediana określa wartość środkową w uporządkowanym zbiorze liczb o nieparzystej ilości elementów lub wartość średnią dwóch wartości środkowych w uporządkowanym zbiorze liczb o parzystej ilości elementów.

**Odporne odchylenie standardowe**

Aby uzyskać wiarygodne oszacowanie zmienności wokół mediany, należy zastosować metodę szacowania odpornego odchylenia standardowego Stuarta i Kendalla (4). Przedstawiony poniżej wzór wskazuje asymptotyczne odchylenie standardowe, tj. odporną wartość szacunkową zmienności rozważanych danych, gdzie  $N$  jest liczbą obserwacji, a IQR przedziałem międzykwartylowym, który pokrywa dokładnie 50 % przypadków losowania z danego rozkładu prawdopodobieństwa:

$$s^* = \frac{1,25 \times \text{IQR}}{1,35 \times \sqrt{N}}$$

Przedział międzykwartylowy oblicza się jako wielkość różnicy pomiędzy 75. a 25. percentylem.

$$\text{IQR} = 75. \text{ percentyl} - 25. \text{ percentyl}$$

gdzie percentyl to wartość  $X_{pc}$  określona w taki sposób, że prawdopodobieństwo ( $p$ ) przyjęcia przez zmienną losową wartości poniżej  $X_{pc}$  jest nie większe niż określona setna część i jednocześnie prawdopodobieństwo ( $p$ ) przyjęcia przez zmienną losową wartości niższej lub równej  $X_{pc}$  jest większe lub równe danej setnej części. Setna określa przyjęty stopień rozkładu. W przypadku mediany jest to 50/100.

$$\text{percentyl} = [p (X < x_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge p (X \leq x_{pc}) \geq \frac{n}{100}]$$

Ze względów praktycznych percentyl jest wartością rozkładu odpowiadającą określonej powierzchni pod wykresem rozkładu lub jego funkcji gęstości. Na przykład 25. percentyl reprezentuje wartość rozkładu odpowiadającą polu równemu 0,25 lub 25/100.

W tej metodzie percentyle obliczane są na podstawie wartości rzeczywistych, które znajdują się w macierzy danych (procedura obliczania percentyli).

**Odporny współczynnik zmienności (%)**

Odporny współczynnik zmienności  $CV_r\%$  odpowiada wielkości niemianowanej, która wskazuje procentową zmienność zbioru analizowanych liczb. Z tego powodu jest wielkością bardzo użyteczną przy sprawdzaniu wiarygodności ocenianych będących członkami zespołu.

$$CV_r = \frac{s^*}{Me} \times 100$$

**Przedziały ufności mediany na poziomie 95 %**

Przedziały ufności na poziomie 95 % (wartość błędu pierwszego rodzaju równa jest 0,05 lub 5 %) odpowiadają zakresowi, w którym wartość mediany mogłaby się zmieniać, gdyby było możliwe powtarzanie doświadczenia nieskończoną liczbą razy. W praktyce oznacza to zakres zmienności testu w przyjętych warunkach operacyjnych, wychodząc z założenia, że możliwe jest wielokrotne powtarzanie oceny. Przedział ufności pomaga ocenić wiarygodność oceny, tak jak w przypadku odpornego współczynnika zmienności.

$$C.I._{górný} = Me + (c \times s^*)$$

$$C.I._{dolny} = Me - (c \times s^*)$$

gdzie  $C = 1,96$ , w przypadku przedziału ufności na poziomie 95 %.

Przykład zestawienia obliczeń przedstawiono w załączniku I do normy IOC/T 20/Doc. No 15.

## Źródła

- 1) Wilkinson, L., *Systat: The system for statistics*, SYSTAT Inc., Evanston, IL., 1990.
  - 2) Cicchitelli, G., *Probabilità e Statistica*, Maggioli Editore, Rimini, 1984.
  - 3) Massart, D. L., Vandeginste, B.G.M., Deming, Y., Michotte, L., *Chemometrics. A textbook*, Elsevier, Amsterdam, 1988.
  - 4) Kendall, M. G., Stuart, A., *The advanced theory of statistics. Vol. 1*, Hafner Publishing Co., 1967.
  - 5) McGill, R., Tukey, J. W., Larsen, W. A., *Variation of Box Plots. The American Statistician*, tom 32, (2), 1978, s. 12–16.
  - 6) IOC/T.28/Doc. No 1, *Guidelines for the accreditation of sensory testing laboratories with particular reference to virgin olive oil according to standard ISO/IEC 17025:2005*, wrzesień 2007.
  - 7) IOC/T.20/Doc. No 14.
  - 8) IOC/T.20/Doc. No 15.
  - 9) ISO/IEC 17025:05.”.
-

## ZAŁĄCZNIK VI

## „ZAŁĄCZNIK XXa

**METODA WYKRYWANIA OLEJÓW OBCYCH W OLIWIE Z OLIWEK**

## 1. ZAKRES

Metoda ta znajduje zastosowanie w wykrywaniu obecności obcych olejów roślinnych w oliwie z oliwek. W oliwie z oliwek mogą być wykryte oleje roślinne z wysoką zawartością kwasu linolowego (sojowe, rzepakowe, słonecznikowe itp.) i niektóre rodzaje oleju roślinnego z wysoką zawartością kwasu oleinowego, takie jak olej z orzechów laskowych, olej słonecznikowy z wysoką zawartością kwasu oleinowego i oliwa z wyłocznin z oliwek. Poziom wykrywalności zależy od rodzaju obcego oleju i odmiany oliwek. W odniesieniu do oleju z orzechów laskowych poziom wykrywalności często wynosi 5–15 %. Metoda ta nie pozwala na identyfikację rodzaju wykrytego obcego oleju a jedynie umożliwia wskazanie, czy dana oliwa z oliwek posiada czystość odmianową, czy nie.

## 2. ZASADA

Oliwę oczyszcza się metodą ekstrakcji do fazy stałej na wkładach z żelazem krzemionkowym. Skład triglicerydów oznacza się za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami, stosując detektor wskaźnika refraktometrycznego i propionitryl jako fazy ruchomej. Estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME) przygotowuje się z oczyszczonej oliwy w procesie metylowania przy użyciu zimnego roztworu wodorotlenku potasu w metanolu (załącznik X B), a następnie estry te poddaje się analizie metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych przy użyciu wysokopolarnych kolumn (załącznik X A). Teoretyczny skład triglicerydów obliczany jest na podstawie składu kwasów tłuszczowych za pomocą programu komputerowego, przy założeniu losowego rozmieszczenia kwasów tłuszczowych w triglicerydach na pozycjach 1,3 oraz na pozycji 2, z pewnymi ograniczeniami dla nasyconych kwasów tłuszczowych na pozycji 2. Metoda obliczania jest zmodyfikowaną procedurą opisaną w załączniku XVIII. Szereg matematycznych algorytmów oblicza się na podstawie teoretycznych i eksperymentalnych (HPLC) składów triglicerydów, a uzyskane wartości są porównywane z wartościami zawartymi w bazie danych, uzyskanymi na podstawie badań oliwy z oliwek posiadającej czystość odmianową.

## 3. MATERIAŁ I ODCZYNNIKI

3.1. **Oczyszczanie oliwy**

- 3.1.1. Kolby stożkowe o pojemności 25 ml.
- 3.1.2. Szklane probówki o pojemności 5 ml z zakrętkami z uszczelką z PTFE.
- 3.1.3. Wkłady z żelazem krzemionkowym, 1 g (6 ml), do ekstrakcji do fazy stałej (np. Waters, Massachusetts, Stany Zjednoczone Ameryki).
- 3.1.4. *n*-heksan, do analiz.
- 3.1.5. Rozpuszczalnik stanowiący mieszaninę *n*-heksanu / eteru dietylowego (87:13 ułamek objętościowy).
- 3.1.6. *N*-heptan, do analiz.
- 3.1.7. Aceton, do analiz.

3.2. **Analiza triglicerydów metodą HPLC**

- 3.2.1. Mikrostrzykawkki (50 µL) i igły wprowadzające do HPLC.
- 3.2.2. Propionitryl o najwyższym stopniu czystości lub do HPLC (np. ROMIL, Cambridge, Zjednoczone Królestwo), używany jako faza ruchoma.
- 3.2.3. Kolumna HPLC (25 cm x 4 mm średnicy wewnętrznej) wypełniona fazą RP-18 (rozmiar cząsteczek 4 µm).

3.3. **Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych**

(zob. załącznik X B)

- 3.3.1. Metanol o zawartości wody nieprzekraczającej 0,5 %.
- 3.3.2. Heptan, do analiz.
- 3.3.3. Roztwór 2N wodorotlenku potasu w metanolu. Należy rozpuścić 1,1 g wodorotlenku potasu w 10 ml metanolu.
- 3.3.4. Zakręcane szklane probówki o pojemności 5 ml i nakrętki z połączeniem politetrafluoroetylenowym.

3.4. **Analiza GC estrów metylowych kwasów tłuszczowych**

(Zob. metoda oznaczania nienasyconych kwasów tłuszczowych *trans* metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych określona w załączniku X A).

- 3.4.1. Mikrostrzykawkki (5 µL) i igły wprowadzające do GC.
- 3.4.2. Wodór lub hel jako gaz nośny.



- 3.4.3 Wodór i tlen do detektora płomieniowo-jonizacyjnego.
- 3.4.4 Azot lub hel jako pomocniczy gaz nośny.
- 3.4.5. Kolumna kapilarna wypełniona żelam krzemionkowym (50–60 m x 0,25–0,30 mm średnicy wewnętrznej) pokryta fazą cyjanopropylpolisiloksanu lub cyjanopropylfenylosiloksanu (SP-2380 lub podobną) o grubości powłoki wynoszącej 0,20–0,25 µm.
4. APARATURA
- 4.1. Aparatura próżniowa do ekstrakcji do fazy stałej.
- 4.2. Wyparka rotacyjna.
- 4.3. Urządzenia HPLC obejmujące:
- 4.3.1. degazer do fazy ruchomej;
- 4.3.2. zawór do nastrzykiwania Rheodyne z pętlą 10 µL;
- 4.3.3. wysokociśnieniową jednostkę pompującą;
- 4.3.4. piec termostatyczny dla kolumny HPLC zdolny do utrzymywania temperatur niższych niż temperatura otoczenia (15–20°C), (np. typu Peltier);
- 4.3.5. detektor współczynnika refraktometrycznego;
- 4.3.6. skomputeryzowany system gromadzenia danych wraz z programem do całkowania.
- 4.4. Urządzenia do chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych omówione w załączniku X A, wyposażone w:
- 4.4.1. dozownik do nastrzykiwania z podziałem strumienia;
- 4.4.2. detektor płomieniowo-jonizacyjny;
- 4.4.3. piec z możliwością programowania temperatury;
- 4.4.4. skomputeryzowany system gromadzenia danych wraz z programem do całkowania.
- 4.5. Komputer z programem Microsoft EXCEL.
5. PROCEDURA ANALITYCZNA
- 5.1. **Oczyszczanie oliwy**

Wkład SPE z żelam krzemionkowym należy umieścić w elucyjnej aparaturze próżniowej i przemyć 6 ml heksanu w warunkach próżni. Aby zapobiec wysychaniu kolumny, należy przywrócić normalne ciśnienie i umieścić pod wkładem kolbę stożkową. Do kolumny wprowadzić roztwór oliwy (około 0,12 g) w 0,5 ml heksanu, przepuścić przez nią, a następnie eluować 10 ml mieszaniny heksanu i eteru dietylowego (3.1.5) (87:13 ułamek objętościowy) w próżni. Eluowany rozpuszczalnik należy poddać homogenizacji i włąć w przybliżeniu połowę jego objętości do innej kolby stożkowej. Oba roztwory należy oddzielnie odparować do suchości w wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej. Na potrzeby analizy triglicerydów jedną z pozostałości należy rozpuścić w 1 ml acetonu (zob. pkt 5.2 akapit pierwszy) i włąć do zakręcanej szklanej próbówki o pojemności 5 ml. Na potrzeby przygotowania estrów metylowych kwasów tłuszczowych drugą pozostałość należy rozpuścić w 1 ml *n*-heptanu i włąć do drugiej zakręcanej szklanej próbówki o pojemności 5 ml.

*Uwaga:* oczyszczanie oliwy można przeprowadzić na kolumnie z żelam krzemionkowym, jak opisano w metodzie 2.507 IUPAC.

## 5.2. **Analiza triglicerydów metodą HPLC**

Zestawić system HPLC, utrzymując kolumnę w temperaturze 20°C i stosując propionitryl jako fazę ruchomą przy natężeniu przepływu wynoszącym 0,6 ml/min. Po uzyskaniu stabilnej linii podstawowej należy wstrzyknąć rozpuszczalnik; jeżeli występują zakłócenia linii podstawowej w obrębie 12–25 min., należy użyć innego rodzaju acetonu lub mieszaniny propionitrylu/acetonu (25:75) w celu rozpuszczenia próbki.

*Uwaga:* niektóre rodzaje acetonu powodują zakłócenia linii podstawowej we wspomnianym wyżej obrębie.

Wstrzyknąć 10 µl podwielokrotności roztworu oczyszczonej oliwy w acetonie (5 %). Wykonanie analizy trwa około 60 min. Temperatura pieca lub natężenie przepływu muszą być dostosowane w celu otrzymania chromatogramu podobnego do chromatogramu przedstawionego na rys. 1, na którym czas eluowania trioleinianu (pik 1) wynosi 15,5 min, a rozdzielczości między parami LLL/OLLn (pik 1 i 2) a OLL/OOLn (pik 4 i 5) są poprawne.

Wysokość piku 2 (OLLn+PoLL) musi osiągnąć poziom przynajmniej 3 % pełnej skali.

### 5.3. Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Należy dodać 0,1 mL roztworu 2N wodorotlenku potasu w metanolu do roztworu oczyszczonej oliwy w 1 mL *n*-heptanu. Zakręcić mocno probówkę. Wstrząsać probówkę energicznie przez 15 sekund i pozostawić do momentu, w którym nastąpi rozwarstwienie i górna warstwa stanie się przejrzysta (5 minut). Roztwór *n*-heptanu jest gotowy do wstrzyknięcia do chromatografu gazowego. Roztwór może być pozostawiony w temperaturze pokojowej na maksymalnie 12 godzin.

### 5.4. Analiza GC estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Należy zastosować procedurę opisaną w metodzie oznaczania nienasyconych kwasów tłuszczowych *trans* (zob. załącznik X A).

Zestawić system GC w temperaturze pieca 165°C. Zalecana temperatura pieca jest regulowana termostatem na poziomie 165°C przez 10 min, a następnie podnoszona do 200°C na 1,5°C/min. Zaleca się ustawienie temperatury dozownika do nastrzykiwania na 220°C–250°C, aby zminimalizować tworzenie się kwasów tłuszczowych *trans* (zob. załącznik X A). Temperaturę detektora ustawić na 250°C. Użyć wodoru lub helu jako gazu nośnego pod ciśnieniem w głowicy kolumny około 130 kPa. Wstrzykiwana objętość w trybie podziału strumienia wynosi 1 µL.

Należy uzyskać chromatogram podobny do chromatogramu przedstawionego na rys. 2. Szczególną uwagę należy zwrócić na rozdzielczości między C18:3 a C:20:1 (pik C18:3 musi pojawić się przed pikiem C20:1). Aby osiągnąć wymienione warunki, należy zoptymalizować temperaturę początkową lub ciśnienie w głowicy kolumny. Skorygować warunki pracy dozownika (temperatura, stosunek podziału, objętość wprowadzanej próbki), aby zminimalizować odróżnianie kwasu palmitynowego i kwasu oleopalmitynowego.

Aby określić wartości izomerów *trans*, wysokość pików C20:0 musi być na poziomie około 20 % pełnej skali. W przypadku zakłócenia pików C18:0 należy ograniczyć wielkość próbki.

## 6. CAŁKOWANIE PIKÓW CHROMATOGRAFICZNYCH

### 6.1. Chromatogram HPLC

Na rys. 1 przedstawiono typowy chromatogram HPLC triglicerydów oczyszczonej oliwy. Do celów całkowania pików należy wyznaczyć trzy linie podstawowe: pierwszą, między początkiem pików 1 a końcem pików 3; drugą, między początkiem pików 4 a doliną przed pikiem 8; oraz trzecią, między doliną poprzedzającą pik 8 a końcem pików 18.

Powierzchnia całkowita jest sumą powierzchni wszystkich pików (zidentyfikowanych i niezidentyfikowanych) od pików 1 do pików 18. Wartość procentową każdego pików określa się za pomocą następującego wzoru:

$$\text{TAG}_x (\%) = 100 (A_x + A_T)$$

Wartości procentowe należy przedstawić z dokładnością do drugiego miejsca po przecinku.

### 6.2. Chromatogram GC

Na rys. 2 przedstawiono chromatogram GC alkilowych estrów kwasów tłuszczowych oczyszczonej oliwy z oliwek. Należy obliczyć wartości procentowe następujących kwasów tłuszczowych:

kwas palmitynowy;	P (C16:0)	=	ester metylowy + ester etylowy
kwas stearynowy;	S (C18:0)	=	ester metylowy
kwas oleopalmitynowy;	Po (C16:1)	=	suma estrów metylowych dwóch izomerów <i>cis</i>
kwas oleinowy;	O (C18:1)	=	suma estrów metylowych dwóch izomerów <i>cis</i> + ester etylowy + izomery <i>trans</i>
kwas linolowy;	L (C18:2)	=	ester metylowy + ester etylowy + izomery <i>trans</i>
kwas linolenowy	Ln (C18:3)	=	ester etylowy + izomery <i>trans</i>
kwas arachidowy;	A (C20:0)	=	ester metylowy
kwas eikozenowy (gondolowy);	G (C20:1)	=	ester metylowy

Estry etylowe i izomery *trans* mogą być nieobecne na chromatografie GC.

Powierzchnia całkowita ( $A_T$ ) jest sumą wszystkich pików pojawiających się na chromatogramie od pików C14:0 do pików C24:0, z wyjątkiem pików odpowiadających skwalenowi. Wartość procentową każdego pików oblicza się w następujący sposób:

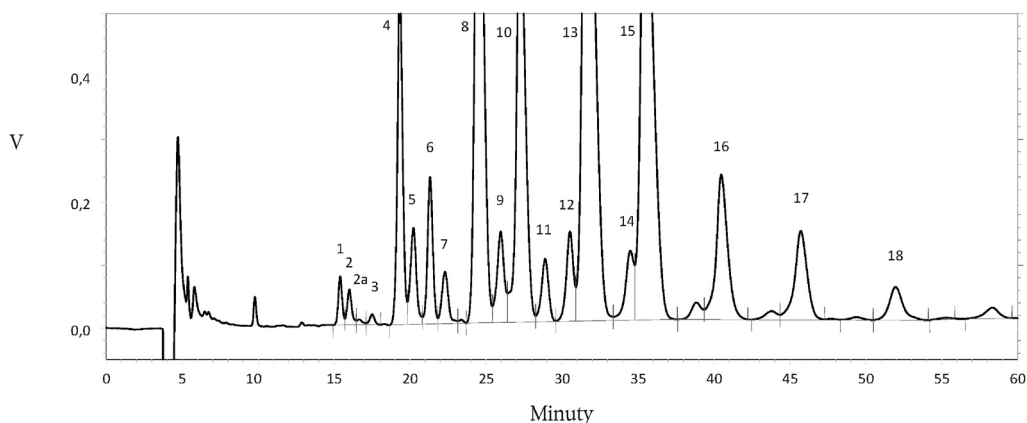
$$\text{FA}_x (\%) = 100 (A_x + A_T)$$

Wyniki należy przedstawić z dokładnością do drugiego miejsca po przecinku.

Do celów obliczeń programów komputerowych nie jest konieczne normalizowanie do 100, ponieważ odbywa się to automatycznie.

Rysunek 1

Chromatogram HPLC triglicerydów oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia „Chamlali”. Główne elementy składowe pików chromatograficznych



- (1) LLL; (2) OLLn+PoLL; (3) PLLn; (4) OLL; (5) OOLn+PoOL;  
 (6) PLL+PoPoO; (7) POLn+PPoPo+PpoL; (8) OOL+LnPP; (9) PoOO;  
 (10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; (12) PLP;  
 (13) OOO+PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; (17) SOO;  
 (18) POS+SLS.

Tabela 1

Powtarzalność danych dotyczących oznaczania triglicerydów oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia metodą HPLC w temperaturze kolumny 20°C, przy zastosowaniu propionitrylu jako fazy ruchomej

ECN	Piki HPLC	triglicerydy	Próbka 1		Próbka 2		Próbka 3		Próbka 4		Próbka 5	
			Mediana (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	Mediana (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	Mediana (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	Mediana (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	Mediana (%)	RSD <sub>r</sub> (%)
42	1	LLL	0,020	7,23	0,066	5,18	0,095	4,10	0,113	0,95	0,34	1,05
	2	OLLn+ PoLL	0,085	7,44	0,24	1,78	0,26	2,25	0,35	2,02	0,50	2,83
	3	PLLn	0,023	15,74	0,039	5,51	0,057	5,62	0,082	4,35	0,12	6,15
44	4	OLL	0,47	1,52	1,53	0,42	2,62	0,98	3,35	1,05	4,37	1,13
	5	OOLn+ PoOL	1,07	2,01	1,54	0,46	1,61	0,71	1,72	1,07	1,77	2,40
	6	PLL+ PoPoO	0,11	12,86	0,24	4,37	0,65	1,32	1,35	0,73	2,28	1,24
	7	POLn+ PpoPo+ PpoL	0,42	5,11	0,49	2,89	0,55	2,01	0,85	1,83	1,09	1,96
46	8	OOL+ LnPP	6,72	0,63	8,79	0,31	11,21	0,42	13,25	0,33	15,24	0,23
	9	PoOO	1,24	2,86	1,49	0,95	1,63	0,85	2,12	0,45	2,52	0,56
	10	SLL+ PLO	2,70	0,65	4,05	0,70	6,02	0,65	9,86	0,53	11,53	0,31
	11	PoOP+ SPoL+ SOLn+ SPoPo	0,64	4,42	0,69	3,02	0,79	1,23	1,53	0,89	1,70	1,66

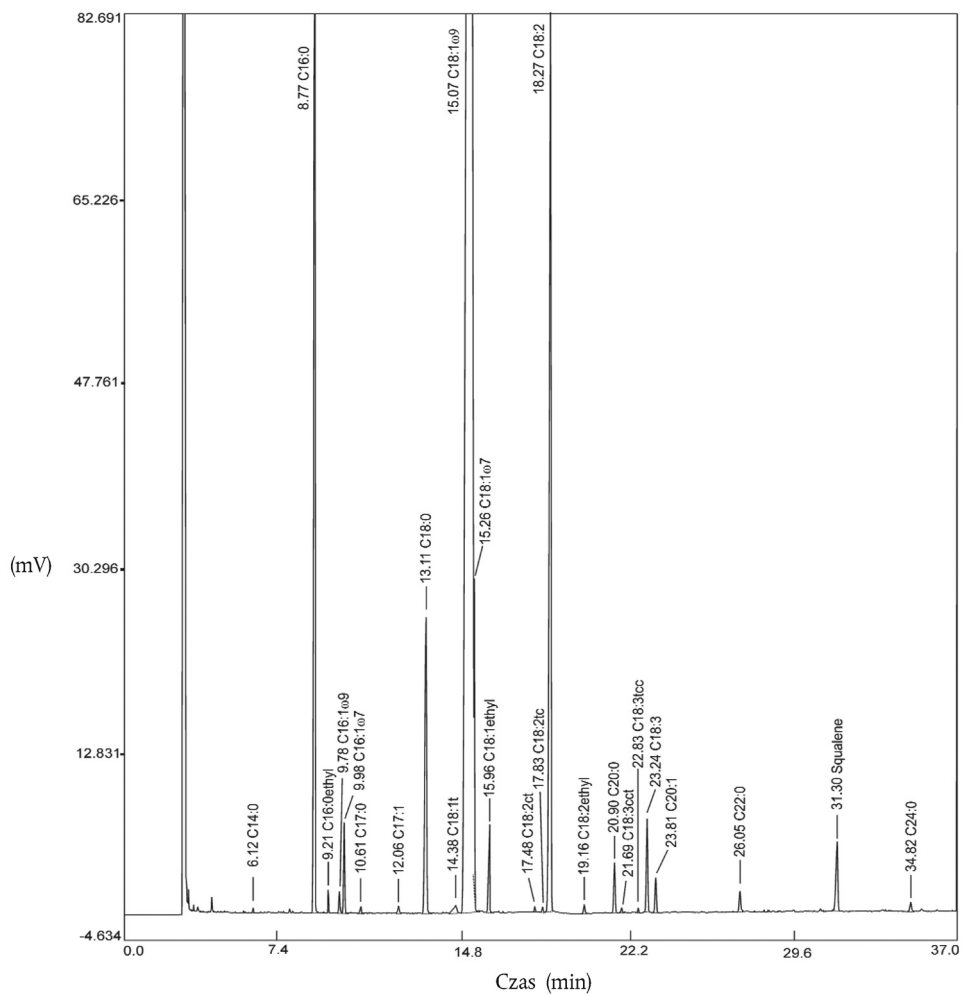
ECN	Piki HPLC	triglicerydy	Próbka 1		Próbka 2		Próbka 3		Próbka 4		Próbka 5	
			Mediana (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	Mediana (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	Mediana (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	Mediana (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	Mediana (%)	RSD <sub>r</sub> (%)
48	12+13	OOO+PLP+PoPP	49,60	0,07	48,15	0,06	42,93	0,06	33,25	0,10	24,16	0,06
	14	SOL	0,82	1,72	0,92	1,56	1,05	1,32	1,25	1,05	1,60	1,77
	15	POO	22,75	0,25	21,80	0,20	21,05	0,30	20,36	0,35	20,17	0,14
50	16	POP	3,05	0,46	4,56	0,42	4,98	0,52	5,26	0,41	5,57	0,38
	17	SOO	6,87	0,21	5,56	0,33	4,86	0,43	4,12	0,72	3,09	0,69
	18	POS+SLS	1,73	1,23	1,65	1,10	1,54	0,99	1,49	1,10	1,41	1,00

n = 3 kontrolne próbki

RSD<sub>r</sub> = względne odchylenie standardowe powtarzalności

Rysunek 2

Chromatogram GC alkilowych estrów kwasów tłuszczowych otrzymanych z oczyszczonej oliwy z wyłoczyn z oliwek w procesie transestryfikacji, przy użyciu zimnego roztworu wodorotlenku potasu w metanolu



7. WYKRYWANIE OLEJÓW OBCYCH W OLIWIE Z OLIWEK

Metoda obliczeniowa służąca do wykrywania olejów obcych w oliwie z oliwek, polegająca na porównywaniu algorytmów matematycznych z bazą danych utworzoną w oparciu o badania oliwy z oliwek posiadającej czystość odmianową, została przedstawiona w załączniku I do normy IOC/T.20/Doc. No 25.”

---