

Dokument ten służy wyłącznie do celów informacyjnych i nie ma mocy prawnej. Unijne instytucje nie ponoszą żadnej odpowiedzialności za jego treść. Autentyczne wersje odpowiednich aktów prawnych, włącznie z ich preambułami, zostały opublikowane w Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej i są dostępne na stronie EUR-Lex. Bezpośredni dostęp do tekstów urzędowych można uzyskać za pośrednictwem linków zawartych w dokumencie

► **B** **ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (EWG) NR 2568/91**

z dnia 11 lipca 1991 r.

w sprawie właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wytłoczn oliwek oraz w sprawie odpowiednich metod analizy

(Dz.U. L 248 z 5.9.1991, s. 1)

zmienione przez:

		Dziennik Urzędowy		
		nr	strona	data
► <u>M1</u>	Rozporządzenie Komisji (EWG) nr 3682/91 z dnia 17 grudnia 1991 r.	L 349	36	18.12.1991
► <u>M2</u>	Rozporządzenie Komisji (EWG) nr 1429/92 z dnia 26 maja 1992 r.	L 150	17	2.6.1992
► <u>M3</u>	Commission Regulation (EEC) No 1683/92 of 29 June 1992 (*)	L 176	27	30.6.1992
► <u>M4</u>	Commission Regulation (EEC) No 1996/92 of 15 July 1992 (*)	L 199	18	18.7.1992
► <u>M5</u>	Rozporządzenie Komisji (EWG) nr 3288/92 z dnia 12 listopada 1992 r.	L 327	28	13.11.1992
► <u>M6</u>	Rozporządzenie Komisji (EWG) nr 183/93 z dnia 29 stycznia 1993 r.	L 22	58	30.1.1993
► <u>M7</u>	zmienione rozporządzeniem Komisji (EWG) nr 826/93 z dnia 6 kwietnia 1993 r.	L 87	6	7.4.1993
► <u>M8</u>	Commission Regulation (EEC) No 620/93 of 17 March 1993 (*)	L 66	29	18.3.1993
► <u>M9</u>	Rozporządzenie Komisji (WE) nr 177/94 z dnia 28 stycznia 1994 r.	L 24	33	29.1.1994
► <u>M10</u>	Commission Regulation (EC) No 2632/94 of 28 October 1994 (*)	L 280	43	29.10.1994
► <u>M11</u>	Rozporządzenie Komisji (WE) nr 656/95 z dnia 28 marca 1995 r.	L 69	1	29.3.1995
► <u>M12</u>	Commission Regulation (EC) No 2527/95 of 27 October 1995 (*)	L 258	49	28.10.1995
► <u>M13</u>	Commission Regulation (EC) No 2472/97 of 11 December 1997 (*)	L 341	25	12.12.1997
► <u>M14</u>	Rozporządzenie Komisji (WE) nr 282/98 z dnia 3 lutego 1998 r.	L 28	5	4.2.1998
► <u>M15</u>	Commission Regulation (EC) No 2248/98 of 19 October 1998 (*)	L 282	55	20.10.1998
► <u>M16</u>	Rozporządzenie Komisji (WE) nr 379/1999 z dnia 19 lutego 1999 r.	L 46	15	20.2.1999
► <u>M17</u>	Commission Regulation (EC) No 455/2001 of 6 March 2001 (*)	L 65	9	7.3.2001
► <u>M18</u>	Commission Regulation (EC) No 2042/2001 of 18 October 2001 (*)	L 276	8	19.10.2001
► <u>M19</u>	Commission Regulation (EC) No 796/2002 of 6 May 2002 (*)	L 128	8	15.5.2002
► <u>M20</u>	Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1989/2003 z dnia 6 listopada 2003 r.	L 295	57	13.11.2003
► <u>M21</u>	Rozporządzenie Komisji (WE) nr 702/2007 z dnia 21 czerwca 2007 r.	L 161	11	22.6.2007
► <u>M22</u>	Rozporządzenie Komisji (WE) nr 640/2008 z dnia 4 lipca 2008 r.	L 178	11	5.7.2008
► <u>M23</u>	Rozporządzenie Komisji (UE) nr 61/2011 z dnia 24 stycznia 2011 r.	L 23	1	27.1.2011
► <u>M24</u>	Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) nr 661/2012 z dnia 19 lipca 2012 r.	L 192	3	20.7.2012

(*) Akt ten nie został nigdy opublikowany w języku polskim.

► <u>M25</u>	Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) nr 299/2013 z dnia 26 marca 2013 r.	L 90	52	28.3.2013
► <u>M26</u>	Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) nr 1348/2013 z dnia 16 grudnia 2013 r.	L 338	31	17.12.2013
► <u>M27</u>	Rozporządzenie delegowane Komisji (UE) 2015/1830 z dnia 8 lipca 2015 r.	L 266	9	13.10.2015
► <u>M28</u>	Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2015/1833 z dnia 12 października 2015 r.	L 266	29	13.10.2015
► <u>M29</u>	Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2016/1227 z dnia 27 lipca 2016 r.	L 202	7	28.7.2016

sprostowane przez:

- **C1** Sprostowanie, Dz.U. L 78 z 24.3.2011, s. 69 (61/2011)

▼B**ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (EWG) NR 2568/91****z dnia 11 lipca 1991 r.****w sprawie właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wyciżczyny oliwek
oraz w sprawie odpowiednich metod analizy****▼M20***Artykuł 1*

1. Oleje, których właściwości pokrywają się z właściwościami określonymi w pkt 1 i 2 załącznika I do niniejszego rozporządzenia, w rozumieniu pkt 1 lit. a) i b) Załącznika do rozporządzenia nr 136/66/-EWG, uznawane są za oliwę z oliwek pierwszego tłoczenia.

2. Olej, którego właściwości pokrywają się z właściwościami określonymi w pkt 3 załącznika I do niniejszego rozporządzenia, w rozumieniu pkt 1 lit. c) Załącznika do rozporządzenia nr 136/66/EWG, uznawany jest za oliwę z oliwek typu lampante.

3. Olej, którego właściwości pokrywają się z właściwościami określonymi w pkt 4 załącznika I do niniejszego rozporządzenia, w rozumieniu pkt 2 Załącznika do rozporządzenia nr 136/66/EWG, uznawany jest za rafinowaną oliwę z oliwek.

4. Olej, którego właściwości pokrywają się z właściwościami określonymi w pkt 5 załącznika I do niniejszego rozporządzenia, w rozumieniu pkt 3 Załącznika do rozporządzenia nr 136/66/EWG, uznawany jest za oliwę z oliwek złożoną z rafinowanej oliwy z oliwek.

5. Olej, którego właściwości pokrywają się z właściwościami określonymi w pkt 6 załącznika I do niniejszego rozporządzenia, w rozumieniu pkt 4 Załącznika do rozporządzenia nr 136/66/EWG, uznawany jest za surową oliwę z wyciżczyny oliwek.

6. Olej, którego właściwości pokrywają się z właściwościami określonymi w pkt 7 załącznika I do niniejszego rozporządzenia, w rozumieniu pkt 5 rozporządzenia nr 136/66/EWG, uznawany jest za rafinowaną oliwę z wyciżczyny oliwek.

7. Olej, którego właściwości pokrywają się z właściwościami określonymi w pkt 8 załącznika I do niniejszego rozporządzenia, w rozumieniu pkt 6 Załącznika do rozporządzenia nr 136/66/EWG, uznawany jest za oliwę z wyciżczyny oliwek.

▼ M26*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 dialkolei 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;

▼ M28

- g) metoda oznaczania składu kwasu tłuszczowego, przedstawiona w załączniku X;

▼ M26

- h) metoda oznaczania lotnych rozpuszczalników chlorowcowanych, przedstawiona w załączniku XI;
- 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;

▼ M28

- l) metoda oznaczania zawartości alkoholi alifatycznych i triterpenowych, przedstawiona w załączniku XIX;

▼ M26

- m) metoda oznaczania zawartości wosków, estrów metylowych kwasów tłuszczowych i estrów etylowych kwasów tłuszczowych, przedstawiona w załączniku XX.

▼ M28**▼ M26**

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.

▼ M26

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 wytlóczyn 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.

▼ M26

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.

▼ M25*Artykuł 2a*

1. Do celów niniejszego artykułu „oliwa z oliwek wprowadzona do obrotu” oznacza całkowitą ilość oliwy z oliwek i oliwy z wyciśniętym z oliwek odpowiedniego państwa członkowskiego konsumowanej w tym państwie członkowskim lub wywożonej z tego państwa członkowskiego.

2. Państwa członkowskie zapewniają selektywne przeprowadzanie opartych o analizę ryzyka i odpowiednio częstych kontroli zgodności, tak aby zagwarantować, że oliwa z oliwek wprowadzona do obrotu jest zgodna ze zgłoszoną kategorią.

3. Kryteria oceny ryzyka mogą obejmować:

- a) kategorię oliwy, okres produkcji, cenę oliwy w stosunku do innych olejów roślinnych, czynności związane z mieszaniem i pakowaniem, obiekty i warunki przechowywania, państwo pochodzenia, państwo przeznaczenia, środki transportu lub objętość partii;
- b) pozycję podmiotów gospodarczych w łańcuchu wprowadzania do obrotu, objętość lub wartość produktów wprowadzanych przez nie do obrotu, zakres kategorii oliwy, które wprowadzają do obrotu, rodzaj prowadzonej działalności, na przykład tłoczenie, przechowywanie, rafinowanie, mieszanie, pakowanie lub sprzedaż detaliczna;
- c) ustalenia poczynione podczas poprzednich kontroli, w tym liczbę i rodzaj stwierdzonych wad, typową jakość oliwy wprowadzanej do obrotu, efektywność wykorzystywanego wyposażenia technicznego;
- d) wiarygodność systemów zapewnienia jakości lub systemów samokontroli podmiotów gospodarczych w odniesieniu do zgodności z normami handlowymi;
- e) miejsce przeprowadzania kontroli, zwłaszcza jeśli jest to pierwszy punkt wprowadzenia produktów na teren Unii, ostatni punkt wyprodukowania produktów z Unii lub miejsce, w którym oleje są produkowane, pakowane, ładowane lub sprzedawane konsumentowi finalnemu;
- f) wszelkie inne informacje, które mogą wskazywać na ryzyko niezgodności.

4. Państwa członkowskie z wyprzedzeniem ustanawiają:

- a) kryteria oceny ryzyka wystąpienia niezgodności poszczególnych partii;
- b) na podstawie analizy ryzyka dla każdej kategorii ryzyka – minimalną liczbę podmiotów gospodarczych, partii lub ilości podlegających kontroli zgodności.

▼ M25

Rocznie przeprowadza się co najmniej jedną kontrolę zgodności na tysiąc ton oliwy z oliwek wprowadzonej do obrotu w państwie członkowskim.

5. Państwa członkowskie sprawdzają zgodność:
- a) przez przeprowadzenie, w dowolnej kolejności, analiz określonych w załączniku I; lub
 - b) przez przeprowadzenie analiz w kolejności określonej w załączniku Ib w sprawie schematu decyzyjnego aż do osiągnięcia jednej z decyzji wymienionych w tym schemacie decyzyjnym.

▼ M19**▼ M25***Artykuł 3*

W przypadku gdy stwierdzono, że oliwa nie odpowiada opisowi jej kategorii, zainteresowane państwo członkowskie stosuje, bez uszczerbku dla wszelkich innych kar, skuteczne, proporcjonalne i odstrasżające kary, które są ustalane w świetle tego, jak poważna jest stwierdzona nieprawidłowość.

W przypadku gdy w ramach kontroli ujawnione zostają istotne nieprawidłowości, państwa członkowskie zwiększają częstotliwość kontroli w odniesieniu do etapu wprowadzania do obrotu, kategorii oliwy, pochodzenia lub innych kryteriów.

▼ M5*Artykuł 4***▼ M19**

1. The Member States may approve assessment panels so that national authorities or their representatives can assess and verify organoleptic characteristics.

The terms of approval shall be set by Member States and ensure that:

- the requirements of Annex XII.4 are met,
- the panel head is given training recognised for this purpose by the Member State,
- continued approval depends on performance in annual checks arranged by the Member State.

Member States shall notify to the Commission a list of approved panels and the action taken under this paragraph.

▼ M5

2. Jeżeli Państwa Członkowskie napotykają trudności w utworzeniu na swoim terytorium zespołów degustatorów, mogą wezwać zespół degustatorów zatwierdzony w innym Państwie Członkowskim.

3. Każde Państwo Członkowskie sporządza wykaz zespołów degustatorów utworzonych przez organizacje zawodowe lub międzybranżowe zgodnie z warunkami ustanowionymi w ust. 1 i zapewnia przestrzeganie tych warunków.

▼ M19**▼ B***Artykuł 6*

1. Zawartość oleju w makuchu i innych wytlókach powstających przy ekstrakcji oliwy z oliwek (kody CN 2306 90 11 i 2306 90 19) oznaczane są metodą przedstawioną w załączniku XV.

▼ B

2. Zawartość oleju, określona w ust. 1, wyrażana jest jako procent masy oleju w stosunku do masy suchej substancji.

▼ M20*Artykuł 7*

Przepisy wspólnotowe dotyczące zawartości zanieczyszczeń stosuje się.

W odniesieniu do rozpuszczalników chlorowcowanych limity dla wszystkich kategorii oliwy z oliwek są następujące:

- maksymalna zawartość wykrytych rozpuszczalników chlorowcowanych: 0,1 mg/kg,
- całkowita maksymalna zawartość wykrytych rozpuszczalników chlorowcowanych: 0,2 mg/kg.

▼ M25*Artykuł 7a*

Osoby fizyczne lub prawne oraz grupy osób, które posiadają oliwę z oliwek lub oliwę z wyciżyn z oliwek od etapu ekstrakcji w tłoczni do etapu butelkowania włącznie, w dowolnych celach zawodowych bądź handlowych, muszą prowadzić rejestry wprowadzania i wycofywania w odniesieniu do każdej kategorii takiej oliwy.

Państwa członkowskie zapewniają należyte przestrzeganie obowiązku określonego w akapicie pierwszym.

Artykuł 8

1. Państwa członkowskie powiadamiają Komisję o środkach służących wprowadzeniu w życie niniejszego rozporządzenia. Państwa członkowskie powiadamiają Komisję o wszelkich późniejszych zmianach.

2. Nie później niż do 31 maja każdego roku państwa członkowskie przekazują Komisji sprawozdanie dotyczące wdrażania niniejszego rozporządzenia w poprzednim roku kalendarzowym. Sprawozdanie zawiera przynajmniej wyniki kontroli zgodności przeprowadzonych w odniesieniu do oliwy z oliwek przedstawione zgodnie z szablonami określonymi w załączniku XXI.

3. Powiadomienia, o których mowa w niniejszym rozporządzeniu, są dokonywane zgodnie z rozporządzeniem Komisji (WE) nr 792/2009 ⁽¹⁾.

▼ B*Artykuł 9*

Niniejszym rozporządzenie (EWG) nr 1058/77 traci moc.

Artykuł 10

1. Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie trzeciego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

Jednakże metodę określoną w załączniku XII stosuje się od ►**M1** dnia 1 listopada 1992 r. ◀, z wyjątkiem działań odnoszących się do systemu interwencyjnego.

⁽¹⁾ Dz.U. L 228 z 1.9.2009, s. 3.

▼ **M5**

Metody tej nie stosuje się do oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia przygotowanej na rynek przed dniem 1 listopada 1992 r.

▼ **B**

2. Niniejsze rozporządzenie nie stosuje się do oliwy z oliwek i oleju z wytloczyn z oliwek pakowanych przed wejściem w życie niniejszego rozporządzenia oraz wprowadzonych do obrotu do dnia 31 października 1992 r.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich Państwach Członkowskich.

▼ B*ZALĄCZNIK I***Streszczenie**

ZALĄCZNIK I:	Właściwości oliwy z oliwek
ZALĄCZNIK Ia:	Pobieranie próbek oliwy z oliwek lub oliwy z wyciżczyn z oliwek dostarczonych w opakowaniu bezpośrednim
ZALĄCZNIK Ib:	Schemat podejmowania decyzji, czy próbka oliwy z oliwek jest zgodna ze zgłoszoną kategorią
ZALĄCZNIK II:	Oznaczanie wolnych kwasów tłuszczowych, metoda na zimno
ZALĄCZNIK III:	Oznaczanie liczby nadtlenkowej
ZALĄCZNIK IV:	Oznaczanie zawartości wosków metodą chromatografii gazowej z użyciem kolumny kapilarnej
ZALĄCZNIK V:	Oznaczenia składu i zawartości steroli i dialkoholi triterpenowych metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych
ZALĄCZNIK VII:	► M21 Oznaczanie zawartości procentowej 2-monopalmitynianu glicerolu ◀

▼ M20**▼ B**

ZALĄCZNIK IX:	Badanie spektrofotometryczne w ultrafiolecie
---------------	----------------------------------------------

▼ M28

ZALĄCZNIK X:	Oznaczanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej
--------------	--------------------------------------------------------------------------------

▼ B

ZALĄCZNIK XI:	Oznaczanie lotnych fluorowcowanych rozpuszczalników oliwy z oliwek
ZALĄCZNIK XII:	Metoda międzynarodowej rady ds. oliwy służąca do organoleptycznej oceny oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia

▼ M20**▼ M19****▼ B**

ZALĄCZNIK XV:	Zawartość oleju w pozostałości z oliwek
ZALĄCZNIK XVI:	Oznaczenie liczby jodowej
ZALĄCZNIK XVII:	Metoda oznaczania stigmastadienów w olejach roślinnych
ZALĄCZNIK XVIII:	Oznaczenie różnicy między rzeczywistą a teoretyczną zawartością triglicerydów z ECN 42
ANNEX XIX:	► M28 Oznaczanie zawartości alkoholi alifatycznych i triterpenowych metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych ◀

▼ M23

ZALĄCZNIK XX:	Metoda dla oznaczenia zawartości wosków, estrów metylowych kwasów tłuszczowych i estrów etylowych kwasów tłuszczowych metodą kapilarnej chromatografii gazowej
---------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

▼ M28**▼ M25**

ZALĄCZNIK XXI:	Wyniki kontroli zgodności przeprowadzonych w odniesieniu do oliwy z oliwek, o których mowa w art. 8 ust. 2
----------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ZAŁĄCZNIK 1

WŁAŚCIWOŚCI OLIWY Z OLIWEK

Kategoria	Estry etylowe kwasu tłuszczowego (FAEE) (*)	Kwasowość (%) (*)	Liczba nadtlenkowa mEq O ₂ /kg (*)	Woski mg/kg (**)	2-monopalmitynian glicerolu (%)	Stigmastadieny mg/kg (1)	Różnica między HPLC ECN42 a teoretycznym ECN42	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ lub K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Ocena organoleptyczna Mediana wad (Md) (*)	Ocena organoleptyczna Mediana aromatu owoców (Mf) (*)
1. Oliwa z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia	FAEE ≤ 40 mg/kg (rok posadzenia 2013–2014) (2)	≤ 0,8	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
	FAEE ≤ 35 mg/kg (rok posadzenia 2014–2016)				≤ 1,0 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %							
2. Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia	—	≤ 2,0	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 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 %							

▼ M27

Kategoria	Estry etylowe kwasu tłuszczowego (FAEE) (*)	Kwasowość (%) (*)	Liczba nadtlenkowa mEq O ₂ /kg (*)	Woski mg/kg (**)	2-monopalmitynian glicerolu (%)	Stigmastadieny mg/kg (1)	Różnica między HPLC ECN42 a teoretycznym ECN42	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ lub K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Ocena organoleptyczna Mediana wad (Md) (*)	Ocena organoleptyczna Mediana aromatu owoców (Mf) (*)
3. Oliwa z oliwek typu lampante	—	> 2,0	—	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 300 (3)	≤ 0,9 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (4)	—
					≤ 1,1 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %							
4. Rafinowana oliwa z oliwek	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %							
5. Oliwa z oliwek złożona z rafinowanej oliwy z oliwek oraz oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0 jeżeli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 %							

▼ M27

Kategoria	Estry etylowe kwasu tłuszczowego (FAEE) (*)	Kwasowość (%) (*)	Liczba nadtlennikowa mEq O ₂ /kg (*)	Woski mg/kg (**)	2-monopalmitynian glicerolu (%)	Stigmastadieny mg/kg ⁽¹⁾	Różnica między HPLC ECN42 a teoretycznym ECN42	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ lub K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Ocena organoleptyczna Mediana wad (Md) (*)	Ocena organoleptyczna Mediana aromatu owoców (Mf) (*)
6. Surowa oliwa z wyciżczyn z oliwek	—	—	—	C40 + C42 + C44 + C46 > 350 ⁽⁵⁾	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Rafinowana oliwa z wyciżczyn z oliwek	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Oliwa z wyciżczyn z oliwek	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

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

⁽²⁾ Ta wartość dopuszczalna ma zastosowanie do oliwy z oliwek produkowanej od dnia 1 marca 2014 r.

⁽³⁾ 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 %.

⁽⁴⁾ Mediana wad może być mniejsza lub równa 3,5, a mediana aromatu owocowego wynosi 0.

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

▼ M27

Kategoria	Skład kwasów tłuszczowych (1)						Izomery trans-oleinowe ogółem (%)	Izomery translinoleowe + izomery translinoleowe ogółem (%)	Skład steroli					Sterole ogółem (mg/kg)	Erytrodiol i uwaol (%) (**)	
	Mirystynowy (%)	Linoleowy (%)	Arachidowy (%)	Eikozenowy (%)	Behenowy (%)	Lignocerynowy (%)			Cholesterol (%)	Brassikasterol (%)	Kampesterol (2) (%)	Stigmasterol (%)	App β – sitosterol (3) (%) (**)			Delta-7-stigmasterol (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
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 wycłoczyn 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 wycłoczyn 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

▼ M27

Kategoria	Skład kwasów tłuszczowych ⁽¹⁾						Izomery trans-oleinowe ogółem (%)	Izomery translinolowe + izomery translinolenowe ogółem (%)	Skład steroli						Sterole ogółem (mg/kg)	Erytrodiol i uwaol (%) (**)
	Mirystynowy (%)	Linolenowy (%)	Arachidowy (%)	Eikozenowy (%)	Behenowy (%)	Lignocerynowy (%)			Cholesterol (%)	Brassikasterol (%)	Kampesterol ⁽²⁾ (%)	Stigmasterol (%)	App β – sitosterol ⁽³⁾ (%) (**)	Delta-7-stigmasterol ⁽²⁾ (%)		
8. Oliwa z wycłoczyn 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: 2,50–21,00.

⁽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 wycłoczyn z oliwek, jeżeli całkowita zawartość alkoholi alifatycznych jest większa niż 350 mg/kg lub jeżeli zawartość erytrodiolu i uwaolu jest większa niż 3,5 %.

Uwagi:

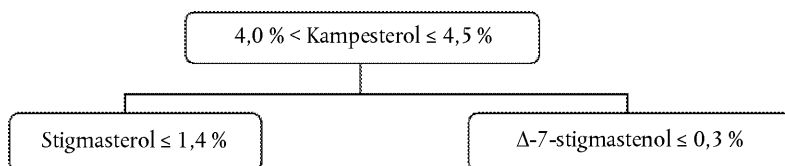
- wyniki analiz muszą być wyrażone z dokładnością do tej samej liczby miejsc po przecinku, jaką zastosowano w odniesieniu do każdej właściwości. Ostatnia cyfra musi być powiększona o jeden, jeżeli następna cyfra jest większa niż 4;
- jeżeli tylko jedna właściwość nie jest zgodna ze wskazanymi wartościami, 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 wycłoczyn oliwek obie odpowiednie wartości dopuszczalne mogą różnić się jednocześnie od podanych wartości.

▼ M27

Dodatek

SCHEMAT PODEJMOWANIA DECYZJI

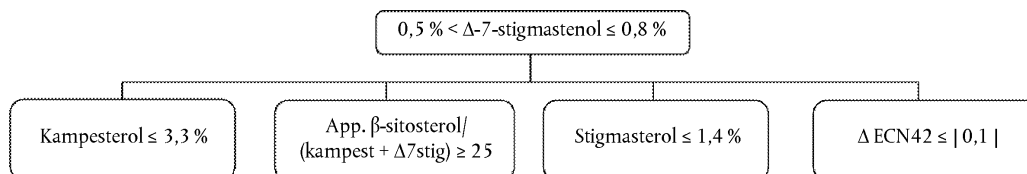
Schemat podejmowania decyzji dotyczących **kampesterolu** w przypadku oliwy z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia i oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia:



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

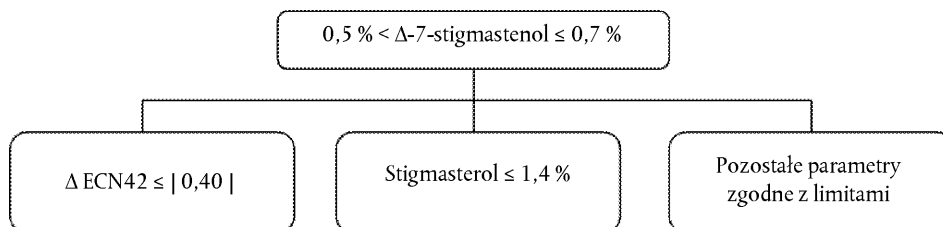
Schemat podejmowania decyzji dotyczących **delta-7-stigmasterenu** w przypadku:

— 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 wyciżczyn z oliwek (surowa i rafinowana)



▼ **M26***ZALĄCZNIK 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 wytłocznin 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 ⁽¹⁾.

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

1. ZAWARTOŚĆ PRÓBKI PIERWOTNEJ**1.1. Opakowanie bezpośrednio 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 bezpośrednio przekraczające 5 litrów

„Próbka pierwotna” w przypadku opakowań bezpośrednich przekraczających 5 litrów oznacza reprezentatywną część łącznych próbek jednostkowych, otrzymaną 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

⁽¹⁾ 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).

▼ **M26**

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

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 napęlić 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

▼ M26

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.

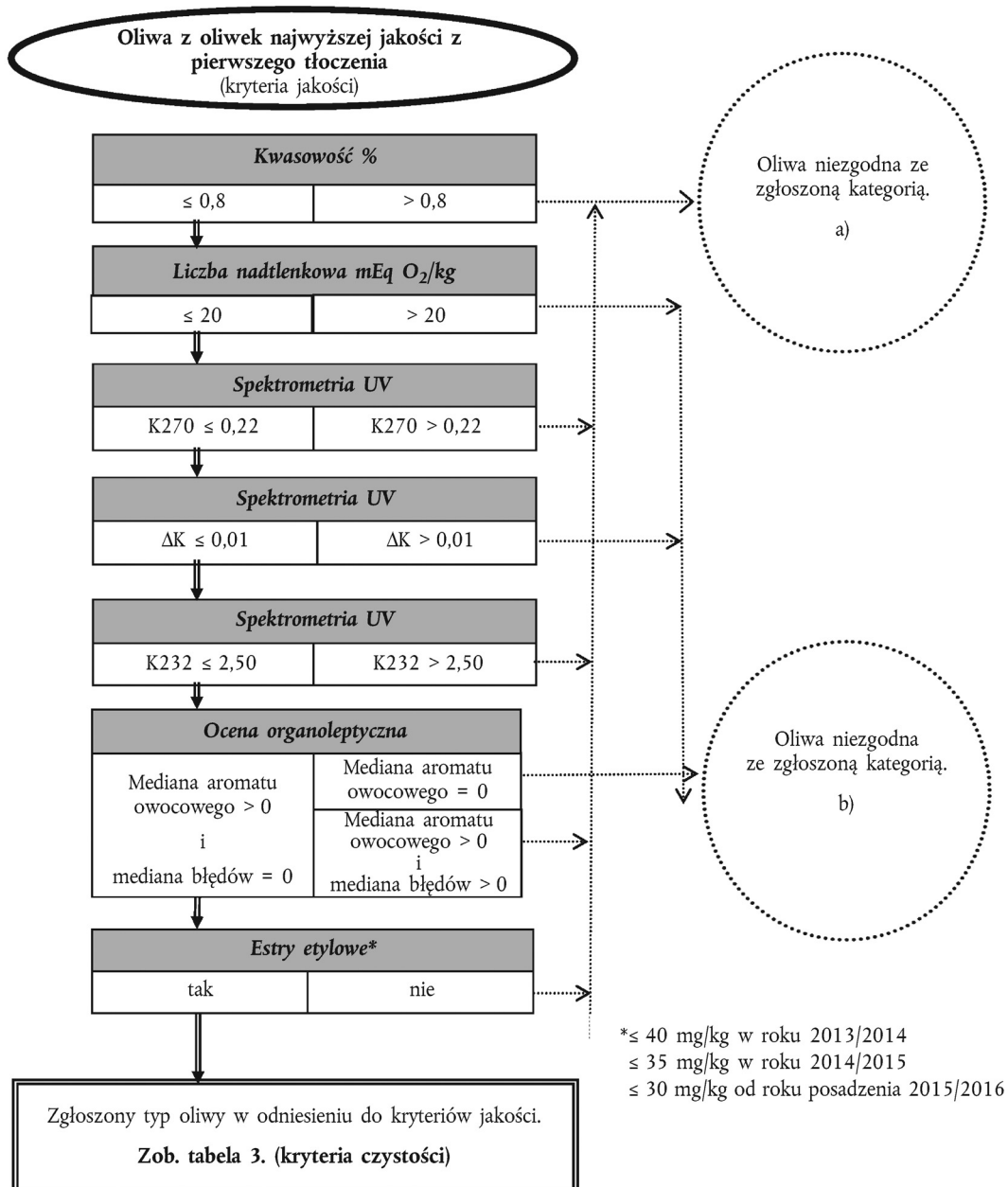
- 3.2. Jeżeli jeden z wyników analiz, o których mowa w art. 2 ust. 1, co najmniej jednej próbki pierwotnej jest niezgodny z właściwościami zgłoszonej kategorii oliwy, cała partia pobieranych próbek zostaje zgłoszona jako niezgodna.

▼ **M26**

ZAŁĄCZNIK Ib

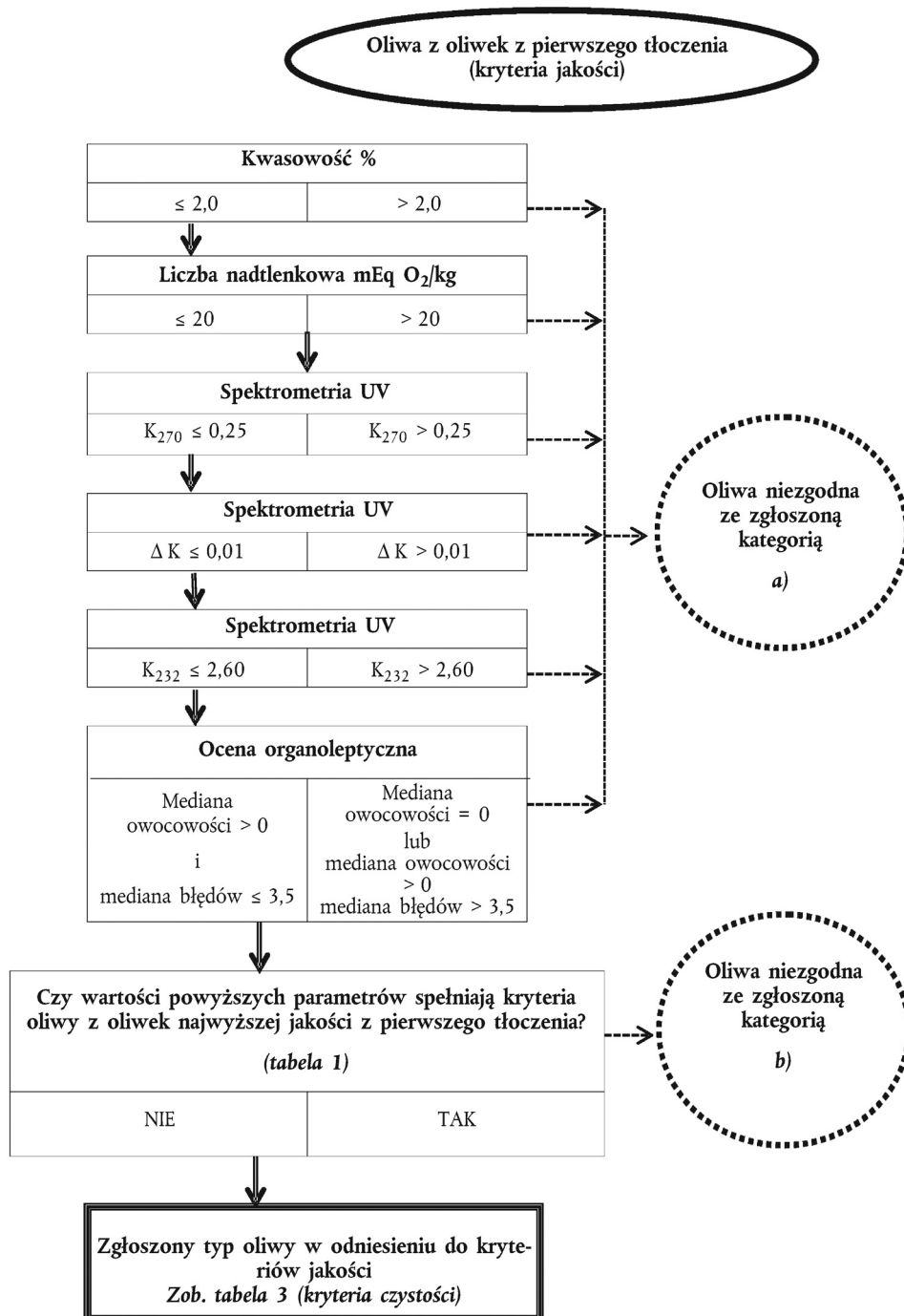
SCHEMAT PODEJMOWANIA DECYZJI, CZY PRÓBKA OLIWY Z OLIVEK JEST ZGODNA ZE ZGŁOSZONĄ KATEGORIĄ

Tabela 1



▼ M26

Tabela 2



▼ **M26**

Dodatek 1

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

— Kwasowość	Załącznik II	Oznaczanie 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
▼ M28		
— Izomery <i>trans</i> kwasów tłuszczowych	Załącznik X	Oznaczanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej
— Zawartość kwasów tłuszczowych	Załącznik X	Oznaczanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej
▼ M26		
— ΔECN42	Załącznik XVIII	Oznaczanie składu triglicerydów z ECN42 (różnica między danymi HPLC a zawartością teoretyczną)
— Skład i całkowita zawartość steroli	Załącznik V	Oznaczanie składu i zawartości steroli i dialkoholi triterpenowych metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych
— Erytrodiole i uwaole		
— Woski	Załącznik IV	Oznaczanie zawartości wosków metodą chromatografii gazowej z użyciem kolumny kapilarnej
▼ M28		
— Alkohole alifatyczne i triterpenowe	Załącznik XIX	Oznaczanie zawartości alkoholi alifatycznych i triterpenowych metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych
▼ M26		
— Kwasy tłuszczowe nasycone w pozycji 2	Załącznik VII	Oznaczanie zawartości procentowej 2-monopalmitynianu glicerolu

▼ **M29****ZAŁĄCZNIK II****OZNACZANIE WOLNYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH, METODA NA ZIMNO****1. ZAKRES I DZIEDZINA STOSOWANIA**

Niniejsza metoda opisuje sposób oznaczania wolnych kwasów tłuszczowych w oliwie z oliwek i w oliwie z wyłocznym z oliwek. Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych wyrażona jest w postaci kwasowości obliczonej jako procentowa część kwasu oleinowego.

2. ZASADA

Próbkę rozpuszcza się w mieszaninie rozpuszczalników, a obecne w niej wolne kwasy tłuszczowe miareczkuje przy użyciu roztworu wodorotlenku potasu lub wodorotlenku sodu.

3. ODCZYNNIKI

Stosować wyłącznie odczynniki o uznanej czystości analitycznej i wodę destylowaną lub o równoważnym stopniu czystości.

3.1. Eter dietylowy; etanol 95 % (v/v), mieszanina jednakowych objętościowo części.

Zobojętnić dokładnie w momencie stosowania za pomocą roztworu wodorotlenku potasu (3.2) z dodatkiem 0,3 ml roztworu fenoloftaleiny (3.3) na 100 ml mieszaniny.

Uwaga 1: Eter dietylowy jest wysoce łatwopalny i może tworzyć wybuchowe nadtlaki. Stosując tę substancję należy zachować szczególną ostrożność.

Uwaga 2: Jeśli zastosowanie eteru dietylowego jest niemożliwe, można zastosować mieszaninę rozpuszczalników zawierających etanol i toluen. Jeśli to konieczne, etanol można zastąpić 2-propanolem.

3.2. Wodorotlenek potasu lub wodorotlenek sodu, mianowany roztwór etanolowy lub wodny, c(KOH) [lub c(NaOH)] o stężeniu 0,1 mol/l lub, jeśli konieczne, c(KOH) [lub c(NaOH)] o stężeniu 0,5 mol/l. Roztwory są dostępne w handlu.

Przed zastosowaniem należy sprawdzić stężenie roztworu wodorotlenku potasu (lub roztworu wodorotlenku sodu). Stosować roztwór przygotowany co najmniej pięć dni przed użyciem i zdekantowany do butelki z brązowego szkła z gumowym korkiem. Roztwór powinien być bezbarwny lub mieć barwę słomkową.

Jeśli doszło do rozdzielania faz przy zastosowaniu wodnego roztworu wodorotlenku potasu (lub wodorotlenku sodu), należy zastąpić roztwór wodny roztworem etanolowym.

Uwaga 3: Stabilny bezbarwny roztwór wodorotlenku potasu (lub wodorotlenku sodu) można przygotować w następujący sposób: doprowadzić do wrzenia 1 000 ml etanolu lub wody z 8 g wodorotlenku potasu (lub wodorotlenku sodu) i 0,5 g opiółków aluminiowych i gotować pod chłodnicą zwrotną przez godzinę. Następnie poddać bezzwłocznie destylacji. Rozpuścić w destylacie wymaganą ilość wodorotlenku potasu (lub wodorotlenku sodu). Odstawić na kilka dni, a następnie zdekantować klarowną warstwę cieczy z nad osadu węglanu potasu (lub węglanu sodu).

Roztwór można także przygotować z pominięciem procesu destylacji w następujący sposób: do 1 000 ml etanolu (lub wody) dodać 4 ml butanolu glinu i odstawić mieszaninę na kilka dni. Zdekantować nad osadu klarowną ciecz i rozpuścić w niej wymaganą ilość wodorotlenku potasu (lub wodorotlenku sodu). Roztwór jest gotowy do użycia.

▼ M29

- 3.3. Fenoloftaleina, roztwór 10 g/l w 95–96 % etanolu (v/v) lub błękit alkaliczny 6B lub tymoloftaleina, roztwór 20 g/l w 95–96 % etanolu (v/v). W przypadku silnie zabarwionych olejów należy stosować błękit alkaliczny lub tymoloftaleinę.

4. APARATURA

Normalnie stosowany sprzęt laboratoryjny, w tym:

- 4.1. waga analityczna;
- 4.2. kolba stożkowa o pojemności 250 ml;
- 4.3. biureta na 10 ml, klasa A, skalowana co 0,05 ml lub równoważna biureta automatyczna.

5. PROCEDURA

5.1. **Przygotowanie próbki do badań**

Jeśli próbka jest mętna, należy ją przefiltrować.

5.2. **Porcja badana**

W zależności od zakładanej kwasowości pobierać próbkę według poniższej tabeli:

Przewidywana kwasowość (w przeliczeniu na kwas oleinowy g/100 g)	Masa próbki (g)	Dokładność ważenia (g)
0 do 2	10	0,02
> 2 do 7,5	2,5	0,01
> 7,5	0,5	0,001

Próbkę należy ważyć w kolbie stożkowej (4.2).

5.3. **Oznaczanie**

Rozpuścić próbkę (5.2) w 50 do 100 ml poprzednio zobojętnionej mieszaniny eteru dietylowego i etanolu (3.1).

Miareczkować mieszając z 0,1 mol/l roztworem wodorotlenku potasu (lub wodorotlenku sodu) (3.2) (zob. Uwaga 4), dopóki nie nastąpi zmiana barwy wskaźnika (zabarwienie wskaźnika utrzymuje się co najmniej przez 10 sekund).

Uwaga 4: Jeżeli wymagana ilość 0,1-molowego wodorotlenku potasu (lub wodorotlenku sodu) przekracza 10 ml, należy zastosować roztwór 0,5 mol/l lub zmienić masę próbki w zależności od przewidywanej wolnej kwasowości i przedstawionej tabeli.

Uwaga 5: Jeżeli w trakcie miareczkowania roztwór zaczyna mętnieć, należy dodać dostateczną ilość rozpuszczalników (3.1), aby uzyskać klarowny roztwór.

Należy wykonać drugie oznaczenie jedynie wówczas, gdy rezultat pierwszego oznaczenia jest wyższy niż limit określony dla danej kategorii oliwy.

▼ M29

6. PREZENTACJA WYNIKÓW

Kwasowość wyrażona jako procent masowy kwasu oleinowego wynosi:

$$V \times c \times \frac{M}{1\,000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

gdzie:

V = objętość użytego do miareczkowania roztworu wodorotlenku potasu (lub wodorotlenku sodu) w mililitrach;

c = dokładne stężenie molowe użytego do miareczkowania roztworu wodorotlenku potasu (lub wodorotlenku sodu);

M = 282 g/mol, molowa masa w gramach na mol kwasu oleinowego;

m = masa próbki w gramach.

Kwasowość oleju podaje się następująco:

- a) do drugiego miejsca po przecinku dla wartości od 0 do 1 włącznie;
- b) do pierwszego miejsca po przecinku dla wartości od 1 do 100 włącznie.

▼B*ZAŁĄCZNIK III***OZNACZENIE LICZBY NADTLENKOWEJ**

1. ZAKRES

Niniejsza norma zawiera opis metody oznaczania liczby nadtlenkowej olejów i tłuszczów.

2. ZAKRES ZASTOSOWANIA

Niniejsza norma stosuje się w odniesieniu do olejów i tłuszczów pochodzenia zwierzęcego i roślinnego.

3. DEFINICJA

Liczba nadtlenkowa jest to wyrażona w milirównoważnikach aktywnego tlenu na kilogram zawartość w próbce tych substancji, które utleniają jodek potasu w opisanych warunkach technologicznych.

4. ZASADA

Poddanie Badanej części próbki, w roztworze kwasu octowego i chloroformu, działaniu roztworu jodku potasu. Miareczkowanie uwolnionego jodu znormalizowanym roztworem tiosiarczynu sodu.

5. APARATURA

W użytych sprzęcie nie mogą występować substancje redukujące lub utleniające.

Uwaga: Nie pokrywać tłuszczem powierzchni szlifowanych.

5.1. Łyżka szklana o pojemności 3 ml.

5.2. Kolby stożkowe ze szlifowanymi szyjkami i korkami o pojemności około 250 ml, wysuszone i napełnione czystym, obojętnym gazem (azotem lub najlepiej ditlenkiem węgla).

5.3. Biureta o pojemności 25 lub 50 ml wyskalowana co 0,1 ml.

6. ODCZYNNIKI

6.1 Chloroform, którego jakość spełnia wymogi stawiane odczynnikiem laboratoryjnym, pozbawiony tlenu poprzez przepuszczanie przezeń silnego strumienia czystego suchego gazu obojętnego.

6.2. Kwas octowy lodowaty, którego jakość spełnia wymogi stawiane odczynnikiem laboratoryjnym, pozbawiony tlenu poprzez przepuszczanie przezeń silnego strumienia czystego suchego gazu obojętnego.

6.3. Jodek potasu w postaci nasyconego roztworu wodnego, świeżo przygotowany, niezawierający jodu i jodanów.

6.4. Tiosiarczan sodu, 0,01 lub 0,002 mol/l z dokładnie nastawionym mianem tuż przed użyciem.

6.5. Roztwór skrobi, rozproszenie wodne o stężeniu 10 g/l, świeżo przygotowany z naturalnej rozpuszczalnej skrobi.

7. PRÓBKA

Należy zadbać, aby próbka była pobrana i składowana w ciemnym i chłodnym miejscu w całkowicie napełnionych szklanych pojemnikach, zamkniętych hermetycznie zatyczkami szlifowanymi szklanymi lub z korka.

▼ B

8. PROCEDURA

Badanie wykonuje się w rozproszonym świetle dziennym lub w świetle sztucznym. Odważyć szklaną łyżką (5.1) lub, w przypadku jej braku, w kolbie (5.2) z dokładnością do 0,001 g masę próbki według poniższej tabeli stosownie do oczekiwanej liczby nadtlenkowej:

Przewidywana liczba nadtlenkowa	Ciężar próbki częściowej
0 do 12	5,0 do 2,0
12 do 20	2,0 do 1,2
20 do 30	1,2 do 0,8
30 do 50	0,8 do 0,5
50 do 90	0,5 do 0,3

Wyjąć korek z kolby (5.2) i wprowadzić do niej szklaną łyżkę z badaną częścią próbki. Dodać 10 ml chloroformu (6.1). Rozpuścić szybko badaną próbkę mieszając. Dodać 15 ml kwasu octowego (6.2), a następnie 1 ml roztworu jodku potasu (6.3). Szybko zakorkować kolbę, wstrząsać przez jedną minutę i pozostawić dokładnie na pięć minut w nieoświetlonym miejscu o temperaturze od 15 do 25 °C.

Dodać około 75 ml wody destylowanej. Miareczkować uwolniony jod roztworem tiosiarczanu sodu (6.4) (roztworem 0,002 mol/l dla przewidywanych wartości poniżej 12 i roztworem 0,01 mol/l dla przewidywanych wartości powyżej 12) intensywnie wstrząsając, stosując roztwór skrobi jako wskaźnik (6.5).

Przeprowadzić dwa oznaczenia tej samej próbki.

Jednocześnie przeprowadzić ślepe próby. Jeżeli wynik ślepej próby przekracza 0,05 ml 0,01 mol/l roztworu tiosiarczanu sodu (6.4) należy wymienić zanieczyszczone odczynniki.

9. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

LICZBA NADTLenkowa (LN) wyrażona w milirównoważnikach aktywnego tlenu na kilogram określana jest wzorem:

$$PV = \frac{V \times T \times 1000}{m}$$

gdzie:

V = ilość ml nastawionego roztworu tiosiarczanu (6.4) użytego w badaniu, skorygowana w celu uwzględnienia ślepej próby

T = dokładna molarność użytego roztworu tiosiarczanu sodu (6.4)

m = masa badanej części próbki w gramach

Jako wynik przyjąć średnią arytmetyczną dwóch oznaczeń.

▼ **M21***ZALĄCZNIK IV***OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WOSKÓW METODĄ CHROMATO-
GRAFII GAZOWEJ Z UŻYCIEM KOLUMNY KAPILARNEJ**

1. CEL

Niniejsza metoda stanowi opis procedury analitycznej oznaczania zawartości wosków w oliwie z oliwek. Woski rozdziela się w zależności od liczby atomów węgla. Metodę można w szczególności stosować do rozróżniania oliwy z oliwek uzyskanej z tłoczenia od oliwy z oliwek uzyskanej z ekstrakcji (oliwy z wytłoczn).

2. ZASADA

Dodanie odpowiedniego wzorca wewnętrznego do tłuszczu, następnie frakcjonowanie metodą chromatografii w kolumnie z uwodnionym żelom krzemionkowym, odzyskanie frakcji wymytej uprzednio w warunkach testowych (której biegunowość jest mniejsza niż w przypadku triglicerydów), następnie przeprowadzenie bezpośredniej analizy metodą chromatografii gazowej z użyciem kolumny kapilarnej.

3. MATERIAŁY

3.1. Kolba Erlenmeyera o pojemności 25 ml.

3.2. Szklana kolumna do chromatografii gazowej, średnica wewnętrzna 15,0 mm, wysokość 30–40 cm, wyposażona w kranik.

3.3. Odpowiedni chromatograf gazowy z kolumną kapilarną, wyposażony w system do bezpośredniego wprowadzania do kolumny, składający się z:

3.3.1. komory z termostatem do kolumn, wyposażonej w programator temperatury;

3.3.2. zimnego dozownika do bezpośredniego wprowadzania do kolumny;

3.3.3. detektora płomieniowo-jonizacyjnego i konwertera-wzmacniacza;

3.3.4. rejestrującego integratora współpracującego z konwerterem-wzmacniaczem (3.3.3), o szybkości odpowiedzi poniżej 1 sekundy, ze zmienną szybkością przesuwu papieru. (Można również zastosować systemy informatyczne przewidujące uzyskiwanie danych z chromatografii gazowej przy użyciu komputera osobistego);

3.3.5. Kolumny kapilarnej, ze szkła lub z topionej krzemionki, o długości 8–12 m, średnicy wewnętrznej 0,25–0,32 mm, pokrytej od środka płynem rozdzielającym, o jednolitej grubości 0,10–0,30 µm. (Płyny rozdzielające nadające się do użycia typu SE52 lub SE 54, dostępne w handlu).

3.4. Mikrostrzykawka umożliwiająca bezpośrednie wstrzyknięcie do kolumny porcji 10 µl, wyposażona w igłę o utwardzonej powierzchni.

3.5. Wibrator elektryczny.

3.6. Wyparka rotacyjna.

3.7. Piec muflowy.

3.8. Waga analityczna zapewniająca precyzję pomiaru ± 0,1 mg.

3.9. Zwykłe szkło laboratoryjne.

4. ODCZYNNIKI

4.1. Żel krzemionkowy o granulometrii w zakresie od 60 do 200 µm.

Żel krzemionkowy należy umieścić w piecu w temperaturze 500 °C na co najmniej 4 godziny. Schłodzić, następnie dodać 2 % wody względem ilości pobranego żelu krzemionkowego. Dobrze wstrząsnąć do otrzymania jednolitej zawiesiny. Trzymać w zaciemnionym miejscu przez co najmniej 12 godzin przed użyciem.

▼ M21

- 4.2. n-heksan, do chromatografii.
- 4.3. Eter etylowy, do chromatografii.
- 4.4. n-heptan, do chromatografii.
- 4.5. Roztwór wzorca arachidynianu laurylowego o stężeniu 0,1 % (m/V) w heksanie (wzorzec wewnętrzny). (Można również zastosować palmitynian palmitylu lub stearynian mirystylu).
 - 4.5.1. *Sudan 1 (1-fenylo-azo-2-naftol)*.
- 4.6. Gaz nośny: czysty wodór lub hel, do chromatografii gazowej.
- 4.7. Gazy pomocnicze:
 - czysty wodór, do chromatografii gazowej,
 - czyste powietrze, do chromatografii gazowej.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA**5.1. Przygotowanie kolumny chromatograficznej**

Sporządzić zawiesinę 15 g żelu krzemionkowego (4.1) w n-heksanie (4.2) i wprowadzić do kolumny (3.2). Po spontanicznym wytrącaniu osadu zakończyć ten proces przy użyciu wytrząsarki elektrycznej (3.5), tak aby warstwa chromatograficzna była bardziej jednolita. Przesączyć 30 ml n-heksanu, aby usunąć wszelkie zanieczyszczenia. Odważyć dokładnie, przy użyciu wagi (3.8), 500 mg próbki do kolby Erlenmeyera o pojemności 25 ml (3.1) i dodać właściwą ilość wzorca wewnętrznego (4.5), zależnie od przypuszczalnej zawartości wosków. Dodać na przykład 0,1 mg arachidynianu laurylowego w przypadku oliwy z oliwek i 0,25–0,5 mg w przypadku oliwy z wyciżczyny oliwek. Do tak przygotowanej próbki dodać dwie porcje po 2 ml n-heksanu (4.2) i przenieść do kolumny chromatograficznej.

Wprowadzić próbkę, tak aby rozpuszczalnik napłynął do wysokości 1 mm powyżej górnego poziomu absorbentu, następnie przesączyć dodatkowych 70 ml n-heksanu, tak aby usunąć naturalnie obecne n-alkany. Rozpocząć wymywanie chromatograficzne, pobierając 180 ml mieszaniny n-heksanu/eteru etylowego w proporcji 99/1, przy przepływie około 15 kropli w ciągu 10 sekund. Wymywanie próbki należy prowadzić w temperaturze pokojowej $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4$.

Uwagi: — Mieszaninę n-heksanu/eteru etylowego (99/1) należy przygotowywać codziennie.

- W celu wzrokowego skontrolowania prawidłowości wymywania wosków można dodać do próbki 100 μl roztworu 1 % Sudanu w mieszaninie wymywającej. Ponieważ wartość retencji tego barwnika jest pośrednia pomiędzy wartościami retencji wosków i triglicerydów, należy zatrzymać wymywanie, gdy barwnik dotrze do dna kolumny chromatograficznej, ponieważ wszystkie woski zostały już wymyte.

Otrzymaną w ten sposób frakcję suszy się w wyparce rotacyjnej (3.6) aż do niemal całkowitego wyeliminowania rozpuszczalnika. Usuwa się ostatnie 2 ml rozpuszczalnika przy użyciu słabego strumienia azotu; a następnie dodaje 2–4 ml n-heptanu.

5.2. Analiza metodą chromatografii gazowej**5.2.1. Procedura wstępna**

Umieścić kolumnę w chromatografii gazowej (3.3), łącząc szczelinę wlotową z systemem kolumnowym, a wylotową z detektorem. Wykonać ogólne kontrole aparatury do chromatografii gazowej (działanie pętli gazowych, sprawność detektora i systemu rejestracyjnego itp.).

▼ **M21**

Jeżeli kolumna używana jest po raz pierwszy, zaleca się jej kondycjonowanie. Przepuścić przez kolumnę gaz o małym natężeniu przepływu, następnie uruchomić aparaturę do chromatografii gazowej. Stopniowo podgrzewać do uzyskania, po około 4 godzinach, temperatury 350 °C. Utrzymać tę temperaturę przez co najmniej 2 godziny, a następnie ustawić aparaturę według zadanych warunków pracy (zadać natężenie przepływu gazu, zapalić płomień, podłączyć do elektronicznego przyrządu rejestrującego (3.3.4), ustawić temperaturę komory kolumny, detektora itd.) oraz rejestrować sygnał z czułością co najmniej dwukrotnie wyższą niż czułość przewidziana do przeprowadzenia analizy. Przebieg linii podstawowej powinien mieć charakter liniowy, bez jakichkolwiek pików, i linia ta nie powinna wykazywać nachyleń.

Prostoliniowe, ujemne nachylenie linii wskazuje na to, że połączenia kolumn są nieprawidłowe; nachylenie dodatnie oznacza, że kolumna nie została poddana wystarczającemu kondycjonowaniu.

5.2.2. *Dobór warunków roboczych*

Ogólnie należy przestrzegać następujących warunków roboczych:

— temperatura kolumny:

	20 °C/ minutę		5 °C/ minutę		20 °C/ minutę	
początkowa 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10')

— temperatura detektora: 350 °C,

— porcja wstrzykiwana: 1 µl roztworu (2–4 ml) n-heptanu,

— gaz nośny: hel lub wodór z szybkością liniową optymalną dla wybranego gazu (patrz: dodatek),

— czułość urządzenia: taka, aby były spełnione warunki określone poniżej:

Warunki te mogą być modyfikowane w sposób dostosowany do charakterystyk kolumn i aparatów do chromatografii gazowej, tak aby uzyskano oddzielenie wszystkich wosków i zadowalającą rozdzielczość pików (patrz: rysunek), przy czym czas retencji wzorca wewnętrznego C₃₂ powinien wynosić 18 ± 3 minut. Pik najbardziej reprezentatywny dla wosków musi mierzyć co najmniej 60 % od dołu skali.

Ustalić parametry całkowania pików w taki sposób, by uzyskać dokładną wartość pól powierzchni rozpatrywanych pików.

Uwaga: Ze względu na wysoką temperaturę końcową przyjmuje się dodatnie nachylenie, które nie może przekraczać 10 % od dołu skali.

5.3. **Przeprowadzenie analizy**

Pobrać 1 µl roztworu za pomocą mikrostrzykawki o pojemności 10 µl; odciągnąć tłoczek, aż igła zostanie całkowicie opróżniona. Wprowadzić igłę do układu nastrojowego i szybko wstrzyknąć po upływie jednej do dwóch sekund. Po upływie około 5 sekund powoli wyciągnąć igłę.

Przeprowadzić rejestrację danych aż do momentu całkowitego wymycia wosków.

▼ M21

Linia podstawowa musi przez cały czas spełniać ustalone wymagania.

5.4. Identyfikacja pików

Zidentyfikować piki po czasach retencji, porównując je z mieszaninami wosków o znanych czasach retencji, analizowanymi w takich samych warunkach.

Rysunek przedstawia chromatogram wosków oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia.

5.5. Analiza ilościowa

Ustalić za pomocą integratora pola powierzchni pików odpowiadające wzorcowi wewnętrznemu i estrom alifatycznym od C₄₀ do C₄₆.

Obliczyć zawartość wosków każdego z estrów, w mg/kg tłuszczu, zgodnie ze wzorem:

$$\text{ester, mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

gdzie:

A_x = pole pod pikiem każdego estru, w milimetrach kwadratowych;

A_s = pole pod pikiem wzorca wewnętrznego, w milimetrach kwadratowych;

m_s = masa dodanego wzorca wewnętrznego, w miligramach;

m = masa próbki pobranej do oznaczenia, w gramach.

6. PREZENTACJA WYNIKÓW

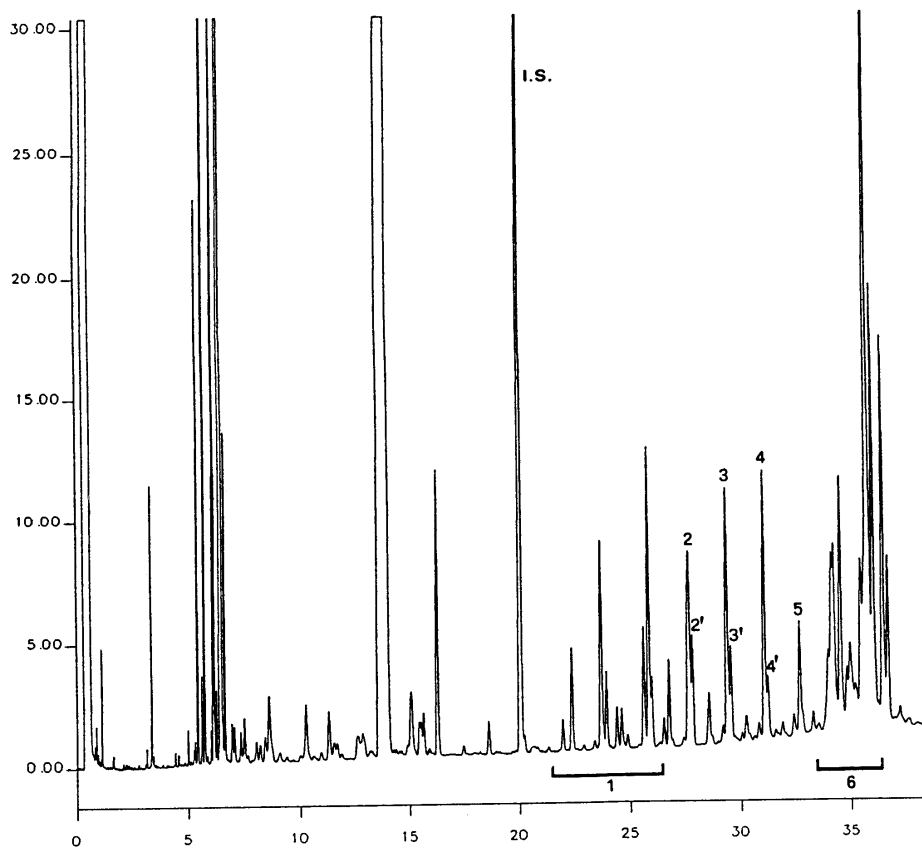
Podać zawartość poszczególnych wosków od C₄₀ do C₄₆, w mg/kg tłuszczu (ppm).

Uwaga: Oznaczane składniki odpowiadają pikom o liczbie par węglowych zawartych pomiędzy estrami C₄₀ a C₄₆, zgodnie z przykładowym chromatogramem wosków oliwy z oliwek przedstawionym na rysunku poniżej. Jeżeli ester C₄₆ pojawi się podwójnie, w celu jego identyfikacji zaleca się analizę frakcji wosków oliwy z wycłoczyn oliwek, gdzie C₄₆ łatwo jest zidentyfikować, ponieważ wykazuje wyraźną przewagę ilościową.

Wynik należy podać z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

▼M21

Rysunek

Chromatogram wosków oliwy z oliwek ⁽¹⁾

Objaśnienie:

I.S. = Arachidynian laurylowy

1 = Estry diterpenowe

2 + 2' = Estry C₄₀

3 + 3' = Estry C₄₂

4 + 4' = Estry C₄₄

5. = Estry C₄₆

6 = Estry steroli i alkohole triterpenowe.

⁽¹⁾ Po wymyciu estrów steroli w zapisie chromatograficznym nie powinny być widoczne istotne piki (triglicerydy).

▼ M21*Dodatek***Oznaczenie prędkości liniowej gazu**

Do chromatografu gazowego ustawionego na normalne warunki robocze wprowadzić 1–3 μl metanu (lub propanu). Mierzyć chronometrem czas potrzebny na przejście gazu przez kolumnę, począwszy od momentu wstrzyknięcia do spadku wartości szczytowej (t_M).

Prędkość liniowa, w cm/s , jest określona na podstawie wzoru L/t_M , gdzie L jest długością kolumny w centymetrach, a t_M – czasem zmierzonym w sekundach.

▼ **M26***ZALĄCZNIK 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 dialkholi triterpenowych w oliwie z oliwek i oliwie z wyciżczyny z oliwek.
2. ZASADA

Oliwa, do której dodano α -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 dialkholi 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. Mikrostrzykawki o pojemności 100 i 500 μ l.
 - 3.7. Cylindryczny lejek do sączenia z porowatą przegrodą G3 (porowatość 15–40 μ 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 ± 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 μ m.

▼ M26

- 3.12. Mikrostrzykawką o pojemności 10 μ l przeznaczoną 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 żelem 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-dichlorofluoresceiny 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. α -cholestanol o czystości większej niż 99 % (czystość należy sprawdzić metodą analizy GC).
- 4.20. 0,2 % wewnętrzny roztwór wzorcowy (m/V) α -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.

▼ M26

4.24. Mieszanina n-heksanu (pkt 4.9)/eteru dietylowego (pkt 4.10) w proporcji 65:35 (V/V).

4.25. Odczynnik wywołujący reakcję siliłowania 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 µl (pkt 3.6) pewną ilość wewnętrznego roztworu wzorcowego α -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 µl roztworu α -cholestanolu (pkt 4.20), a w przypadku oliwy z wytlóczyn z oliwek 1 500 µl. 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 pumekсового, 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. Przemycić 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, płuczając 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 ± 2 °C przez 15 minut. Schłodzić w ekscyatorze i zważyć z dokładnością do 0,1 mg.

▼ **M26**

- 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. Napelnić 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 µl 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 µl 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-dichlorofluoresceiny (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 zeszkobać żel krzemionkowy z oznaczonego obszaru. Usunięty i dokładnie rozdrobniony materiał przemieścić 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.

▼ M26

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 próbówki 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 próbówce to frakcje steroli i dialkoholi triterpenowych.

5.3. Przygotowanie trimetylsilyloeterów

- 5.3.1. Do próbówki 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-trimetylsilyltrifluoroacetamid + 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 próbówkę 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 heksametylodisilazanu/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 chromatografie gazowym, 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.

▼ **M26**

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 uzyskiwania chromatogramów spełniających następujące wymogi:

- czas retencji w przypadku pików β -sitosterolu powinien wynosić 20 ± 5 min;
- pik kampesterolu powinien wynosić: w przypadku oliwy z oliwek (średnia zawartość 3 %) 20 ± 5 % w pełnej skali; w przypadku oleju sojowego (średnia zawartość 20 %) 80 ± 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 wyeluowania 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).

▼ M26

Sterole i dialkohole triterpenowe podlegają elucji w następującej kolejności: cholesterol, brassikasterol, ergosterol, 24-metylen-cholesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, $\Delta 7$ -kampesterol, $\Delta 5,23$ -stigmastadienol, klerosterol, β -sistosterol, sitostanol, $\Delta 5$ -awenasterol, $\Delta 5,24$ -stigmastadienol, $\Delta 7$ -stigmastenol, $\Delta 7$ -awenasterol, erytrodiol i uwaol.

Czasy retencji β -sistosterolu 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 pików w przypadku sterola x , zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym

A_s = powierzchnia pików 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.

▼ M28

6.2. Procentową zawartość każdego sterolu obliczyć na podstawie stosunku powierzchni odpowiedniego pików do sumy powierzchni pików steroli:

$$\text{sterol}_x = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

gdzie:

A_x = powierzchnia pików dla x ;

$\sum A$ = suma powierzchni pików dla steroli.

▼ M26

6.3. APP β -sistosterol: $\Delta 5,23$ -stigmastadienol + klerosterol + β -sistosterol + sitostanol + $\Delta 5$ -awenasterol + $\Delta 5,24$ -stigmastadienol.

▼M26

- 6.4. Obliczyć procentową zawartość erytrodiolu i uwaolu:

$$\text{Erytrodiol} + \text{Uwaol} = \frac{\text{Er} + \text{Uv}}{\text{Er} + \text{Uv} + \Sigma\text{A}} \times 100$$

gdzie:

ΣA = suma powierzchni pików dla steroli, zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym;

Er = powierzchnia erytrodiolu zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym;

Uv = powierzchnia uwaolu zgodnie z obliczeniami w systemie obliczeniowym.

▼ **M26***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.

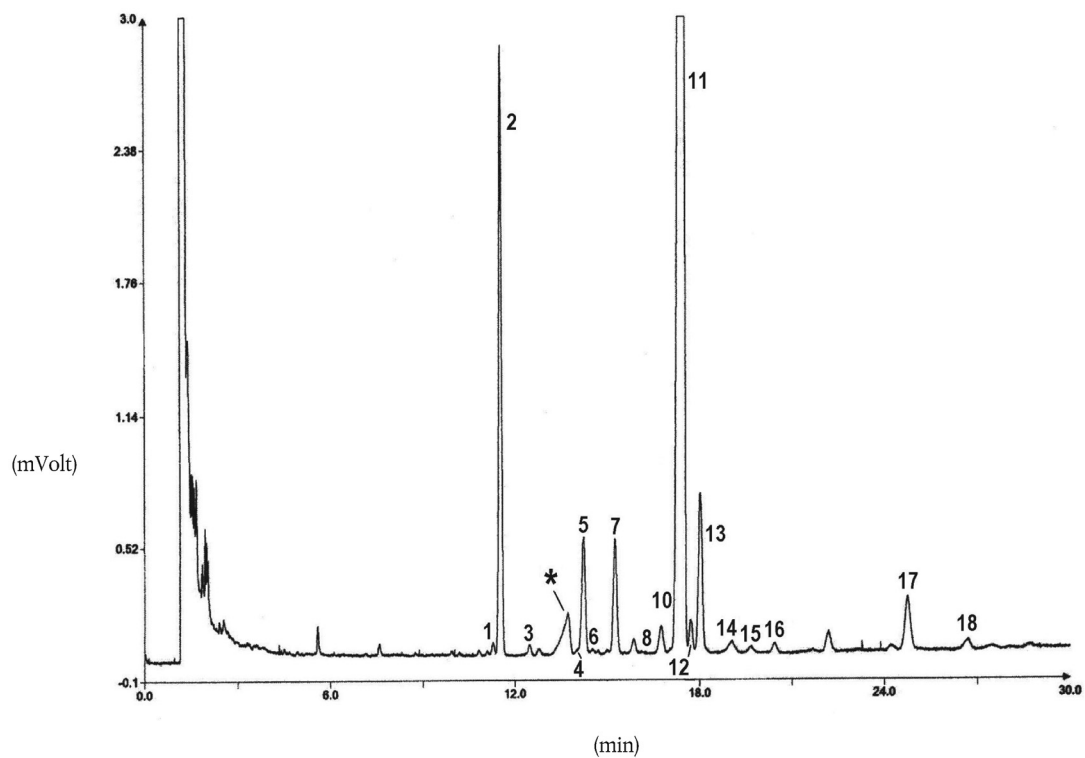
*Tabela 1***Względne czasy retencji dla steroli**

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

▼ M26

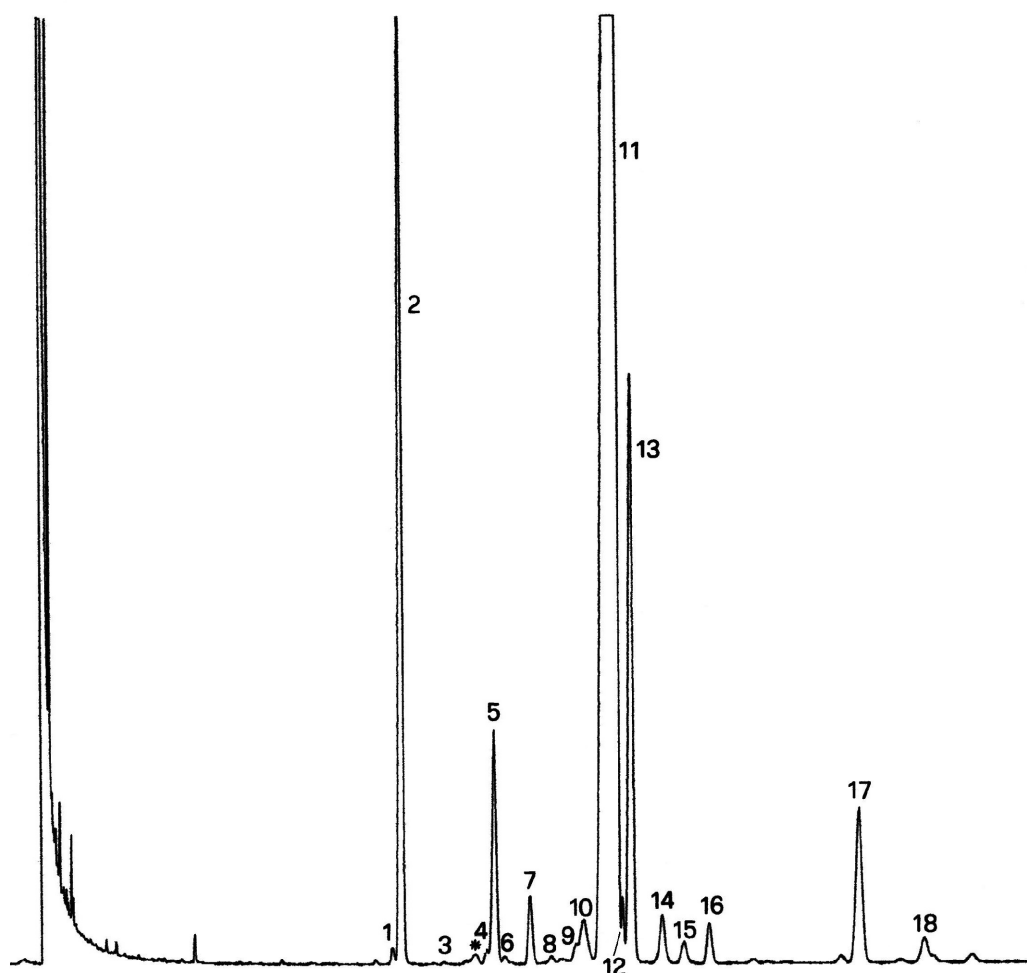
Rysunek 1

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



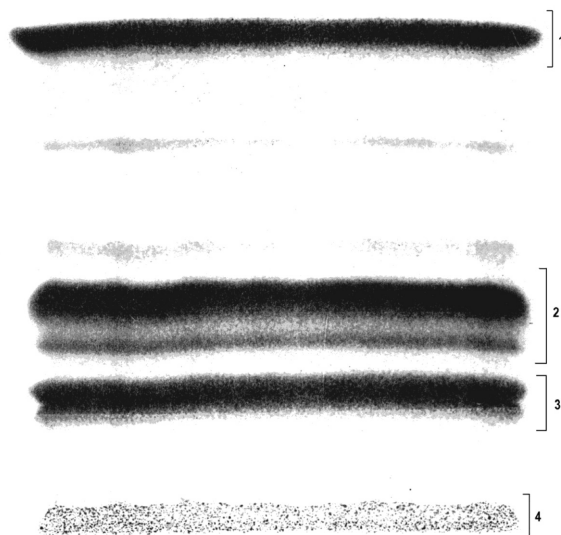
▼ M26*Rysunek 2*

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



▼ **M26***Rysunek 3*

Płytką TLC oliwy z wytłocznym z oliwek ze strefą, którą musi zostać zeskrobana w celu oznaczenia steroli i dialkoholi triterpenowych



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

▼ **M21***ZAŁĄCZNIK VII***OZNACZANIE ZAWARTOŚCI PROCENTOWEJ
2-MONOPALMITYNIANU GLICEROLU****1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA**

Niniejsza metoda stanowi opis procedury analitycznej oznaczania zawartości procentowej kwasu palmitynowego w pozycji 2 triglicerydów metodą oznaczania 2-monopalmitynianu glicerolu.

Niniejsza metoda dotyczy olejów roślinnych płynnych w temperaturze pokojowej (20 °C).

2. ZASADA

Po przygotowaniu próbkę oleju poddaje się działaniu lipazy trzustkowej: częściowa i swoista hydroliza w pozycjach 1 i 3 cząsteczki triglicerydu powoduje pojawienie się monoglicerydów w pozycji 2. Zawartość procentowa 2-monopalmitynianu glicerolu we frakcji monoglicerydów jest oznaczana, po sililowaniu, metodą chromatografii gazowej na kolumnie kapilarnej.

3. APARATURA I MATERIAŁY EKSPLOATACYJNE

- 3.1. Kolba Erlenmeyera o pojemności 25 ml.
- 3.2. Zlewki o pojemności 100, 250 i 300 ml.
- 3.3. Szklana kolumna chromatograficzna (wewnętrzna średnica: 21–23 mm, długość: 400 mm), wyposażona w płytkę ze spieku szklanego i kranik.
- 3.4. Cylindry miarowe o pojemności 10, 50, 100 i 200 ml.
- 3.5. Kolby o pojemności 100 i 250 ml.
- 3.6. Wyparka obrotowa.
- 3.7. Probówki do wirowania o pojemności 10 ml, ze szlifowanym korkiem.
- 3.8. Wirówka do probówek o pojemności 10 i 100 ml.
- 3.9. Termostat umożliwiający utrzymanie temperatury na poziomie 40 °C ± 0,5 °C.
- 3.10. Biurety z podziałką co 1 i 2 ml.
- 3.11. Strzykawka podskórna o pojemności 1 ml.
- 3.12. Mikrostrzykawka o pojemności 100 µl.
- 3.13. Lejek, 1 000 ml.
- 3.14. Chromatograf gazowy do kolumn kapilarnych, wyposażony w dozownik do nastrzykiwania „na kolumnę” na zimno w celu bezpośredniego wprowadzania próbki do kolumny oraz w piecyk zapewniający utrzymanie wybranej temperatury z dokładnością do 1 °C.
- 3.15. Układ nastrykowy „na kolumnę” na zimno, w celu bezpośredniego wprowadzenia próbki do kolumny.
- 3.16. Detektor płomieniowo-jonizacyjny i elektrometr.
- 3.17. Rejestrujący integrator współpracujący z elektrometrem, z szybkością odpowiedzi poniżej 1 sekundy, ze zmienną szybkością przesuwu papieru.
- 3.18. Kolumna kapilarna ze szkła lub z topionej krzemionki, o długości 8–12 m i średnicy wewnętrznej 0,25–0,32 mm, pokryta 5 % polimetylosiloksanem lub polifenylometylosiloksanem, o grubości 0,10–0,30 µm, którą można stosować w temperaturze 370 °C.

▼ M21

3.19. Mikrostrzykawką o pojemności 10 µl, wyposażoną w igłę o utwardzonej powierzchni, o długości co najmniej 7,5 cm, przeznaczoną do wykonywania bezpośrednich nastrzyków na kolumnę.

4. ODCZYNNIKI

4.1. Żel krzemionkowy o granulometrii w zakresie od 0,063 do 0,200 mm (70/280 mesh), przygotowany następująco: umieścić żel krzemionkowy w kapsule porcelanowej, suszyć w suszarce w temperaturze 160 °C przez 4 godziny, schłodzić do temperatury pokojowej w eksykatorze. Dodać objętość wody równoważną 5 % masy żelu krzemionkowego, w następujący sposób: do kolby Erlenmeyera o pojemności 500 ml odważyć 152 g żelu krzemionkowego i dodać 8 g wody destylowanej, zatkać kolbę i delikatnie wstrząsać do uzyskania równomiernego rozproszczenia wody. Odstawić na co najmniej 12 godzin przed użyciem.

4.2. n-heksan (do chromatografii).

4.3. Izopropanol.

4.4. Izopropanol, roztwór wodny 1/1 (V/V).

4.5. Lipaza trzustkowa. Użyta lipaza musi wykazywać aktywność w zakresie od 2,0 do 10 jednostek lipazy na mg (*W handlu dostępne są lipazy trzustkowe o aktywności w zakresie od 2 do 10 jednostek na mg enzymu*).

4.6. Roztwór buforowy tris-hydroksymetyloaminometan: roztwór wodny 1 M doprowadzony do pH 8 (kontrola potencjometryczna) stężonym HCl (1/1 V/V).

4.7. Cholan sodu, jakości enzymatycznej, roztwór wodny o stężeniu 0,1 % (roztwór ten należy wykorzystać w ciągu 15 dni od sporządzenia).

4.8. Chlorek wapnia, 22 % roztwór wodny.

4.9. Eter dietylowy do chromatografii.

4.10. Rozpuszczalnik rozwijający: mieszanina n-heksanu/eteru dietylowego (87/13) (V/V).

4.11. Wodorotlenek sodu, roztwór 12 % wagowo.

4.12. Fenoloftaleina, roztwór 1 % w etanolu.

4.13. Gaz nośny: wodór lub hel do chromatografii gazowej.

4.14. Gazy pomocnicze: – wodór w stężeniu minimum 99 %, pozbawiony wilgoci i substancji organicznych – oraz powietrze do chromatografii gazowej o takiej samej czystości.

4.15. Odczynnik wywołujący reakcję siliłowania: mieszanina pirydyna/heksametylodisilazan/trimetylochlorosilan w proporcji 9/3/1 (V/V/V) (*W handlu dostępne są roztwory gotowe do użycia. Można zastosować również inne odczynniki wywołujące reakcję siliłowania, jak np. bis-trimetylosilyltryfluoroacetamid + 1 % trimetylochlorosilan, rozcieńczone taką samą objętością bezwodnika pirydyny*).

4.16. Próbkki wzorcowe: czyste monoglicerydy lub mieszaniny monoglicerydów o znanym składzie procentowym podobnym do występującego w próbce badanej.

5. PROCEDURA**5.1. Przygotowanie próbki**

5.1.1. Oleje o wolnej kwasowości poniżej 3 % nie wymagają zubożenia przed wykonaniem chromatografii na kolumnie z żelem krzemionkowym. Oleje o wolnej kwasowości powyżej 3 % muszą być zubożone zgodnie z pkt 5.1.1.1.

▼ M21

- 5.1.1.1. Do lejka o pojemności 1 000 ml (3.13) wlać 50 g oleju i 200 ml n-heksanu. Dodać 100 ml izopropanolu i ilość roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 12 % (4.11) odpowiadającą wolnej kwasowości oleju powiększonej o 5 %. Wstrząsać energicznie przez jedną minutę. Dodać 100 ml wody destylowanej, ponownie wstrząsnąć i odstawić.

Po dekantacji usunąć dolną warstwę mydła. Usunąć także wszystkie pośrednie warstwy (śluzę, substancje nierozpuszczalne). Płukać roztwór heksanu i zubożonego oleju kolejnymi porcjami 50–60 ml roztworu izopropanol/woda w proporcji 1/1 (V/V) (4.4), aż zniknie różowa barwa fenolofaleiny.

Usunąć większość heksanu za pomocą destylacji w próżni (wykorzystać do tego celu na przykład wyparkę obrotową) i przenieść olej do kolby o pojemności 100 ml (3.5). Suszyć olej w próżni do całkowitego usunięcia rozpuszczalnika.

Pod koniec tej czynności kwasowość oleju musi wynosić poniżej 0,5 %.

- 5.1.2. Wprowadzić 1,0 g oleju przygotowanego w sposób wskazany powyżej do kolby Erlenmeyera o pojemności 25 ml (3.1) i rozpuścić go w 10 ml mieszaniny rozwijającej (4.10). Odstawić roztwór na co najmniej 15 minut przed wykonaniem chromatografii na kolumnie z żelom krzemionkowym.

Jeżeli roztwór jest mętny, odwirować go w celu zapewnienia optymalnych warunków wykonywania chromatografii. *(Można zastosować gotowe do użycia wkłady żelu krzemionkowego SPE o masie 500 mg).*

- 5.1.3. *Przygotowanie kolumny chromatograficznej*

Nanieść na kolumnę (3.3) około 30 ml rozpuszczalnika rozwijającego (4.10), za pomocą szklanej pałeczki wprowadzić wacik do dolnej części kolumny; przycisnąć w celu usunięcia powietrza.

Przygotować w zlewce zawiesinę 25 g żelu krzemionkowego (4.1) w około 80 ml rozpuszczalnika rozwijającego i przelać ją do kolumny przy użyciu lejka.

Sprawdzić, czy cały żel krzemionkowy został wprowadzony do kolumny; przemyć rozpuszczalnikiem rozwijającym (4.10), otworzyć kranik i poczekać, aż poziom płynu osiągnie wysokość około 2 mm poniżej górnego poziomu żelu krzemionkowego.

- 5.1.4. *Chromatografia na kolumnie*

Do kolby Erlenmeyera o pojemności 25 ml (3.1) odważyć dokładnie 1,0 g próbki przygotowanej zgodnie z ppkt 5.1.

Rozpuścić próbkę w 10 ml rozpuszczalnika rozwijającego (4.10). Wlać roztwór do kolumny chromatograficznej przygotowanej zgodnie z ppkt 5.1.3. Starać się nie poruszyć powierzchni kolumny.

Otworzyć kranik i zlać roztwór próbki, aż osiągnie poziom żelu krzemionkowego. Rozwinąć poprzez dodanie 150 ml rozpuszczalnika rozwijającego. Ustawić szybkość przepływu na 2 ml/min (tak aby 150 ml przeszło przez kolumnę w ciągu około 60–70 minut).

Zebrać odciek z kolumny do wcześniej wytarowanej kolby o pojemności 250 ml. Odparować rozpuszczalnik w próżni i usunąć jego resztkowe pozostałości pod strumieniem azotu.

Zważyć kolbę i obliczyć ilość zebranego ekstraktu.

▼ M21

(W przypadku korzystania z gotowych do użytku wkładów krzemionkowych SPE postępować następująco: wprowadzić 1 ml roztworu (5.1.2) do wkładów przygotowanych wcześniej przy użyciu 3 ml n-heksanu.

Po perkolacji roztworu rozwinąć chromatogram poprzez dodanie 4 ml n-heksanu/eteru dietylowego w proporcji 9/1 (V/V).

Zebrać odciek z kolumny do probówki o pojemności 10 ml i poddać go odparowywaniu do sucha pod strumieniem azotu.

Poddać suchą pozostałość działaniu lipazy trzustkowej (5.2). Bezwzględnie konieczne jest sprawdzenie składu kwasów tłuszczowych przed przepuszczeniem i po przepuszczeniu przez wkład SPE).

5.2. Hydroliza przez lipazę trzustkową

5.2.1. Do probówki do wirowania odważyć 0,1 g oleju przygotowanego zgodnie z pkt 5.1. Dodać 2 ml roztworu buforowego (4.6), 0,5 ml roztworu cholanu sodu (4.7) i 0,2 ml roztworu chlorku wapnia, dobrze wstrząsając po dodaniu każdej z tych substancji. Zamknąć probówkę szlifowanym korkiem i umieścić ją w termostacie o temperaturze $40 \pm 0,5$ °C.

5.2.2. Dodać 20 mg lipazy, ostrożnie wstrząsać (nie dopuszczając do zwilżenia korka) i włożyć probówkę do termostatu na dokładnie 2 minuty, następnie wyjąć ją, wstrząsać energicznie i dokładnie przez 1 minutę i odstawić do schłodzenia.

5.2.3. Dodać 1 ml eteru dietylowego, zatkać korkiem i wstrząsać energicznie, następnie odwirować i przenieść roztwór eteru do czystej i suchej probówki przy użyciu mikrostrzykawki.

5.3. Przygotowanie pochodnych silanizowanych i chromatografii gazowej

5.3.1. Przy użyciu mikrostrzykawki wprowadzić 100 µl roztworu (5.2.3) do probówki ze stożkowym dnem o pojemności 10 ml.

5.3.2. Usunąć rozpuszczalnik pod słabym strumieniem azotu, dodać 200 µl odczynnika wywołującego reakcję sililowania (4.15), zatkać probówkę i odstawić na 20 minut.

5.3.3. Po 20 minutach dodać od 1 do 5 ml n-heksanu (zależnie od warunków chromatografowania): uzyskany roztwór jest gotowy do chromatografii gazowej.

5.4. Chromatografia gazowa

Warunki robocze są następujące:

— temperatura urządzenia nastrzykującego (nastryk „na kolumnę”) niższa od temperatury wrzenia roztworu (68 °C),

— temperatura detektora: 350 °C,

— temperatura kolumny: zaprogramowanie temperatury pieca: 60 °C przez 1 minutę, ze zwiększaniem temperatury o 15 °C na minutę aż do 180 °C, następnie o 5 °C na minutę do 340 °C, następnie 340 °C przez 13 minut,

— gaz nośny: wodór lub hel, z regulacją do odpowiedniej liniowej szybkości przepływu w celu uzyskania rozdzielczości przedstawionej na rysunku 1. Czas retencji triglicerydu C₅₄ musi wynosić 40 ± 5 minut (patrz: rysunek 2); (Wskazane powyżej warunki robocze zostały zaproponowane orientacyjnie. Każdy operator musi je zoptymalizować w celu uzyskania pożądanej rozdzielczości. Wysokość piku odpowiadającego 2-monopalmitynianowi glicerolu musi wynosić minimum 10 % skali rejestratora),

▼ M21

— ilość nastrzykiwanej substancji: 0,5–1 µl roztworu (5 ml) n-heksanu (5.3.3.).

5.4.1. Identyfikacja pików

Poszczególne monoglicerydy są identyfikowane według czasów retencji oraz przez porównanie z pikami uzyskanymi ze standardowymi mieszaninami monoglicerydów analizowanymi w tych samych warunkach.

5.4.2. Ocena ilościowa

Oblicza się pole pod każdym pikiem przy użyciu elektronicznego integratora.

6. PREZENTACJA WYNIKÓW

Zawartość procentową monopalmitynianu glicerolu oblicza się na podstawie stosunku pola pod odpowiednim pikiem do sumy pól pod pikami wszystkich monoglicerydów (patrz: rysunek 2), na podstawie wzoru:

$$\text{Glyceril monopalmitate (\%)}: \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

gdzie:

A_x = pole pod pikiem odpowiadającym monopalmitynianowi glicerolu

A = suma pól pod wszystkimi pikami monoglicerydów

Wynik należy podać z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

7. SPRAWOZDANIE Z ANALIZY

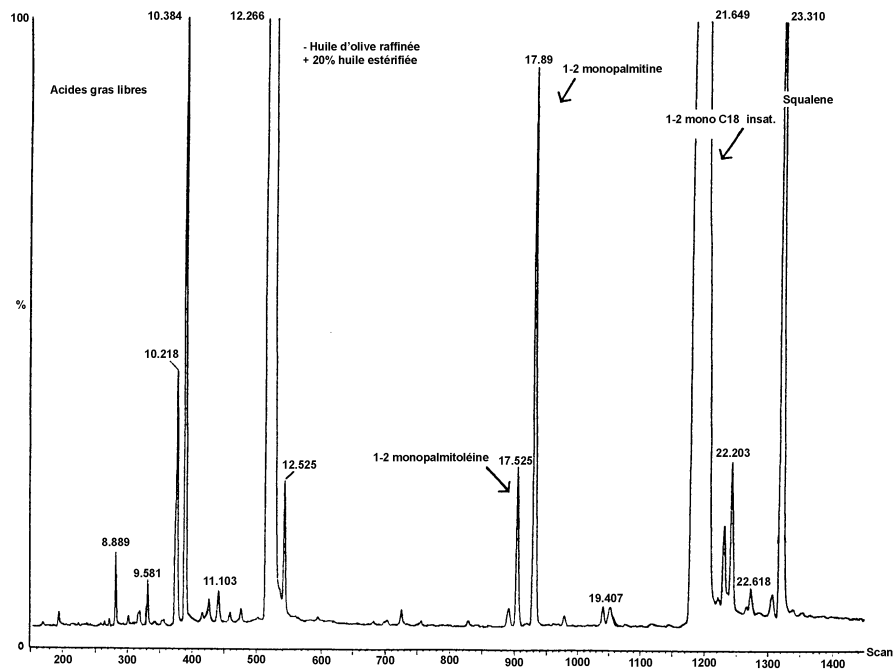
Sprawozdanie z testu powinno zawierać:

- odwołanie do niniejszej metody,
- wszelkie informacje niezbędne do pełnej identyfikacji próbki,
- wynik analizy,
- wszelkie odchylenia od metody będące wynikiem decyzji zainteresowanych stron lub zaistniałe z innego powodu,
- dane identyfikujące laboratorium, datę analizy i podpisy osób odpowiedzialnych za tę ostatnią.

▼ M21

Rysunek 1

Chromatogram produktów reakcji silylowania uzyskanych po zadziałaniu lipazą na rafinowaną oliwę z oliwek, do której dodano 20 % zestryfikowanego oleju (100 %)



Objaśnienie: „Acides gras libres” = Wolne kwasy tłuszczowe; „Huile d’olive raffinée” = Rafinowana oliwa z oliwek – „+ 20 % huile estérifiée” = + 20 % oliwa z oliwek estryfikowana; „1-2 monopalmitine” = 1-2 monopalmityn – „1-2 monopalmitoléine” = 1-2 monopalmitoleina; „1-2 mono C₁₈ insat.” = 1-2 mono C₁₈ nenasyc.; Squalène = Skwalen

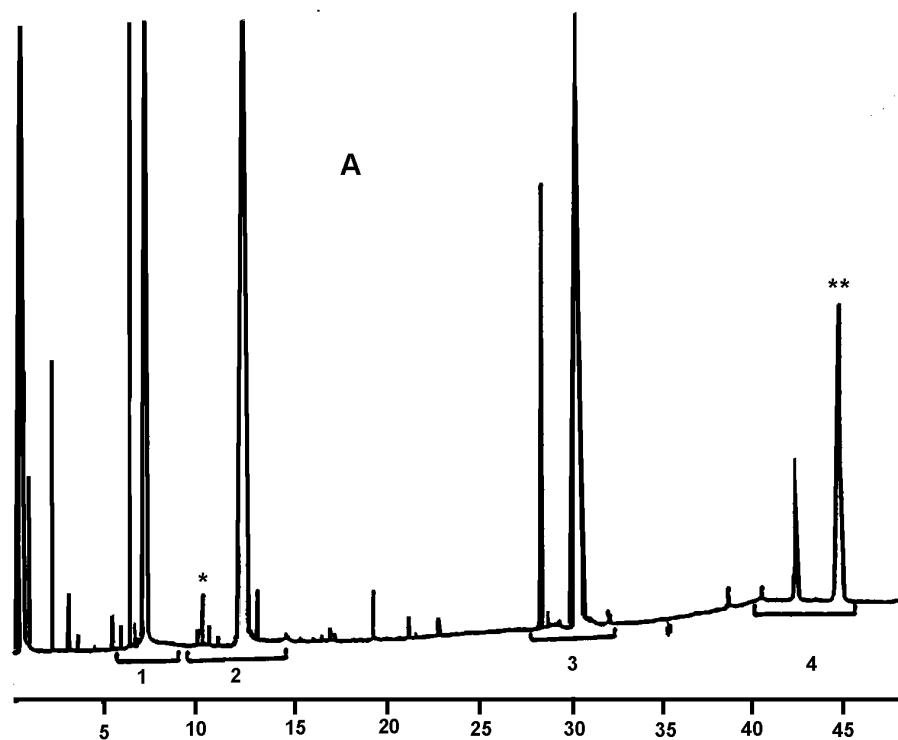
▼ M21

Rysunek 2

Chromatogram:

A) nie estryfikowanej oliwy z oliwek, po zadziałaniu na nią lipazą; po silylowaniu; w podanych warunkach (kolumna kapilarna 8–12 m) frakcja wosków ulega elucji równocześnie z frakcją diglicerydów lub nieco później.

Po zadziałaniu lipazą zawartość triglicerydów nie powinna przekraczać 15 %.

*Objaśnienie:*

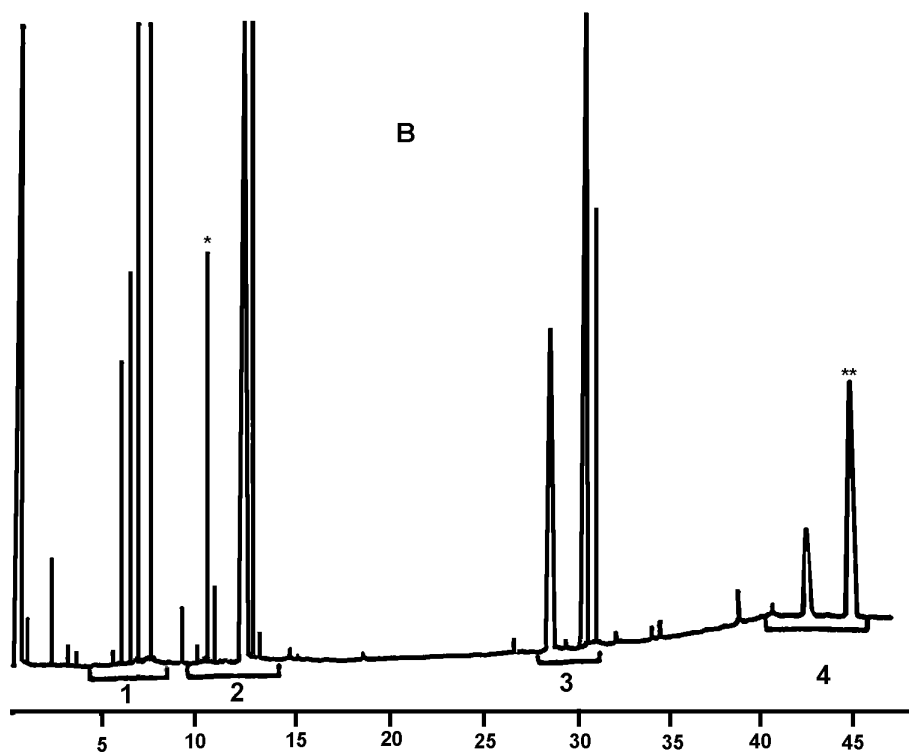
- 1 = Wolne kwasy tłuszczowe
- 2 = Monoglicerydy
- 3 = Diglicerydy
- 4 = Triglicerydy
- * = 2-monopalmityn
- ** = Trigliceryd C₅₄

▼ M21

Chromatogram:

B) oliwy estryfikowanej po zadziałaniu lipazą; po siliwaniu; w tych warunkach (kolumna kapilarna 8–12 m) frakcja wosków ulega elucji równocześnie z frakcją diglicerydów lub nieco później.

Po zadziałaniu lipazą zawartość triglicerydów nie powinna przekraczać 15 %.



Objaśnienie:

1 = Wolne kwasy tłuszczowe

2 = Monoglicerydy

3 = Diglicerydy

4 = Triglicerydy

* = 2-monopalmityn

** = Trigliceryd C₅₄

▼ M21

8. UWAGI

Uwaga 1. PRZYGOTOWANIE LIPAZY

W handlu dostępne są lipazy o zadowalającej aktywności. Możliwe jest również ich przygotowanie w laboratorium w następujący sposób:

Schłodzić w 0 °C 5 kg świeżej trzusty wieprzowej. Usunąć tłuszcz stały i otaczającą go tkankę łączną i utrzeć w młynku do uzyskania płynnej pasty. Wymieszać tę pastę z 2,5 litra bezwodnego acetonu w czasie od 4 do 6 godzin, następnie odwirować. Poddać pozostałość jeszcze trzykrotnej ekstrakcji taką samą objętością bezwodnego acetonu, a następnie dwukrotnej ekstrakcji mieszaniną acetonu i eteru dietylowego w stosunku 1 do 1 (V/V) i dwukrotnej ekstrakcji eterem dietylowym.

Suszyć pozostałość w próżni przez 48 godzin w celu uzyskania stabilnego proszku nadającego się do przechowywania przez dłuższy czas w lodówce, w miejscu chronionym przed wilgocią.

Uwaga 2. KONTROLA DZIAŁANIA LIPAZY

Przygotować emulsję oliwy z oliwek w następujący sposób:

Wstrząsać przez 10 minut w mieszadło mieszaninę składającą się ze 165 ml roztworu gumy arabskiej o stężeniu 100 g/l, 15 g skruszonego lodu i 20 ml wcześniej zobojętnionej oliwy z oliwek.

Do zlewki o pojemności 50 ml wlać 10 ml tej emulsji, a następnie 0,3 ml roztworu cholanu sodu o stężeniu 0,2 g/ml i 20 ml wody destylowanej.

Umieścić zlewkę w termostacie, którego temperatura utrzymywana jest na poziomie 37 °C; umieścić w nim elektrody pH-metru i mieszadło spiralne.

Za pomocą biurety dodawać kroplami 0,1 N roztwór wodorotlenku sodu, aż pH osiągnie wartość 8,3.

Dodać dostateczną objętość wodnej zawiesiny lipazy w proszku (0,1 g/ml lipazy). Z chwilą gdy pH-metr wskaże 8,3, włączyć stoper i rozpocząć wkraplanie roztworu wodorotlenku sodu z prędkością umożliwiającą utrzymanie pH na poziomie 8,3. Co minutę zapisywać objętość zużytego roztworu.

Nanieść zanotowane wartości na diagram, zaznaczając na osi odciętych czas, a na osi rzędnych liczby mililitrów 0,1 N roztworu zasadowego zużytego w celu utrzymania stałego pH. W wyniku tego powinno się otrzymać linię prostą.

Aktywność lipazy wyrażoną w jednostkach lipazowych na mg oblicza się według następującego wzoru:

$$A = \frac{V \times N \times 100}{m}$$

gdzie:

A oznacza aktywność w jednostkach lipazowych/mg

V oznacza liczbę mililitrów 0,1 N roztworu wodorotlenku sodu na minutę (obliczoną na podstawie wykresu)

N oznacza normalność roztworu wodorotlenku sodu

m oznacza masę w mg oznaczanej lipazy.

Jednostkę lipazową definiuje się jako ilość enzymu uwalniająca 10 mikroekwiwalentów kwasu na minutę.

▼ M20

▼ **M28****ZAŁĄCZNIK IX****BADANIE SPEKTROFOTOMETRYCZNE W ULTRAFIOLECIE****WPROWADZENIE**

Dzięki badaniu spektrofotometrycznemu w ultrafiolecie można uzyskać informacje o jakości substancji tłuszczowej, jej stanie zachowania i zmianach wywołanych procesami technologicznymi. Efekty absorpcji fal o długości ustalonej w tej metodzie wywołane są obecnością sprzężonych systemów dienowych i trienowych wynikającą z utleniania lub rafinacji. Wielkość takiej absorpcji jest wyrażana jako właściwa gęstość optyczna $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (gęstość optyczna 1 % w/v roztworu substancji tłuszczowej w określonym rozpuszczalniku w ogniwie 10 mm) oznaczona zgodnie z konwencją jako K (zwana również „współczynnikiem ekstynkcji”).

1. ZAKRES

W niniejszym załączniku opisuje się procedurę przeprowadzania badania spektrofotometrycznego oliwy z oliwek w zakresie ultrafioletu.

2. PODSTAWOWA ZASADA METODY

Próbkę rozpuszcza się w wymaganym rozpuszczalniku, a następnie mierzy się absorbancję roztworu dla określonych długości fal w porównaniu z czystym rozpuszczalnikiem.

Właściwą gęstość optyczną oblicza się przy 232 nm i 268 nm w izooktanie lub przy 232 nm i 270 nm w cykloheksanie dla stężenia 1 % w/v w ogniwie 10 mm.

3. URZĄDZENIA

3.1. Spektrofotometr odpowiedni do pomiarów długości fal ultrafioletowych (220 nm do 360 nm) z możliwością odczytu pojedynczych jednostek nanometrycznych. Zaleca się regularną kontrolę dokładności i odtwarzalności skal absorbancji i długości fal, a także kontrolę światła rozproszonego.

3.1.1. *Skala długości fal:* Można ją sprawdzić poprzez zastosowanie materiału wzorcowego złożonego z filtra ze szkła optycznego zawierającego tlenek holmu lub roztwór tlenku holmu (zamkniętego hermetycznie lub niehermetycznie) o wyraźnych pasmach absorpcyjnych. Materiały wzorcowe służą do weryfikacji i kalibracji skali długości fal w spektrofotometrach w świetle widzialnym i ultrafiolecie o nominalnej spektralnej szerokości wiązki do 5 nm. Pomiary są wykonywane względem próbki wzorcowej z powietrzem otoczenia w zakresie długości fal od 640 do 240 nm, według instrukcji załączonej do materiałów wzorcowych. Przeprowadzana jest korekta bazowa przy pustym torze wiązki dla każdej zmiany szerokości szczeliny. Długości fal dla normy są wymienione w certyfikacie materiału wzorcowego.

3.1.2. *Skala absorbancji:* Można ją sprawdzić z użyciem dostępnych w sprzedaży hermetycznie zamkniętych materiałów wzorcowych złożonych z kwasowych roztworów dichromianu potasu o określonych stężeniach i certyfikowanych wartościach absorbancji przy λ_{max} (4 roztwory dichromianu potasu w kwasie nadchlorowym szczelnie zamkniętych w czterech kwarcowych ogniwach ultrafioletowych do pomiaru wartości referencyjnej liniowości i dokładności fotometrycznej w ultrafiolecie). Pomiary roztworów dichromianu potasu są wykonywane względem próbki wzorcowej użytego kwasu, po dokonaniu korekty bazowej, według instrukcji załączonej do materiału wzorcowego. Wartości absorbancji są wymienione w certyfikacie materiału wzorcowego.

Inną możliwością sprawdzenia reakcji ogniwa fotoelektrycznego i powielacza fotoelektrycznego jest następująca procedura: odważyć 0,2000 g czystego chromianu potasu do badań spektrofotometrycznych, rozpuścić w roztworze 0,05 N wodorotlenku potasu i dopełnić do kreski w kolbie o pojemności 1 000 ml. Następnie pobrać dokładnie 25 ml otrzymanego roztworu i przenieść do kolby miarowej o pojemności 500 ml, po czym uzupełnić do kreski tym samym roztworem wodorotlenku potasu.

▼ **M28**

Zmierzyć gęstość optyczną otrzymanego w ten sposób roztworu dla długości fali 275 nm, używając roztworu wodorotlenku potasu jako wzorca. Gęstość optyczna zmierzona przy użyciu kuwety o grubości 1 cm powinna wynosić $0,200 \pm 0,005$.

- 3.2. Prostokątne kuwety kwarcowe z pokrywą, odpowiednie do pomiarów przy długości fal ultrafioletowych (220–360 nm) o długości drogi optycznej 10 mm. Po napełnieniu ich wodą lub innym odpowiednim rozpuszczalnikiem kuwety nie powinny się różnić między sobą o więcej niż 0,01 jednostki gęstości optycznej.
- 3.3. Kolby miarowe z miarką, pojemność 25 ml, klasa A.
- 3.4. Waga analityczna z dokładnością odczytu do najbliższego 0,0001 g.

4. ODCZYNNIKI

W trakcie analizy, jeżeli nie ma innych wskazań, stosuje się jedynie odczynniki o uznanej klasie analitycznej oraz wodę destylowaną lub demineralizowaną lub wodę o równorzędnej czystości.

Rozpuszczalnik: izooktan (2,2,4-trimetylopentan) do pomiarów przy 232 nm i 268 nm i cykloheksan do pomiarów przy 232 nm i 270 nm, przy czym absorbancja wynosi mniej niż 0,12 przy 232 nm i mniej niż 0,05 przy 270 nm w stosunku do wody destylowanej; pomiar w ogniwie 10 mm.

5. PROCEDURA

- 5.1. Próbką musi być całkowicie jednorodna i pozbawiona wszelkich zanieczyszczeń występujących w postaci zawiesiny. W przeciwnym razie musi zostać przefiltrowana przez filtr papierowy w temperaturze około 30 °C.
- 5.2. Odważyć około 0,25 g (z dokładnością do najbliższego 1 mg) przygotowanej w ten sposób próbki w kolbie miarowej o pojemności 25 ml, uzupełnić wskazanym rozpuszczalnikiem do kreski i poddać homogenizacji. Uzyskany roztwór musi być idealnie przezroczysty. W razie wystąpienia opalizacji lub mętnienia przefiltrować szybko przez filtr papierowy.

UWAGA: Zasadniczo próbka 0,25–0,30 g jest wystarczająca do pomiarów absorbancji oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia i oliwy z oliwek najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia przy 268 nm i 270 nm. Dla pomiarów 232 nm zazwyczaj wymaga się próbki 0,05 g, przygotowuje się zatem dwa oddzielne roztwory. W pomiarach absorbancji oliwy z wyłoczyn z oliwek, rafinowanej oliwy z oliwek oraz fałszowanej oliwy z oliwek potrzebna jest zazwyczaj mniejsza próbka, np. 0,1 g, ze względu na większą absorbancję tych oliw.

- 5.3. Jeżeli jest to konieczne, przeprowadzić korektę bazową (220–290 nm) rozpuszczalnikiem w obu ogniwach kwarcowych (próbka i materiał wzorcowy), a następnie wypełnić ogniwo kwarcowe próbki badanym roztworem i zmierzyć gęstość optyczną przy 232, 268 lub 270 nm względem rozpuszczalnika wzorcowego.

Zarejestrowane wartości gęstości optycznej muszą mieścić się w przedziale od 0,1 do 0,8 lub w przedziale liniowości spektrofotometru, którą należy zweryfikować. Jeżeli się nie mieszczą, należy powtórzyć pomiary, stosując odpowiednio silniejsze lub słabsze roztwory.

- 5.4. Po dokonaniu pomiaru absorbancji przy 268 lub 270 nm, zmierzyć absorbancję przy λ_{\max} , $\lambda_{\max}+4$ i $\lambda_{\max}-4$. Uzyskanych wartości absorbancji używa się do określenia zmienności właściwej gęstości optycznej (ΔK).

UWAGA: λ_{\max} jest przyjmowane za 268 nm dla izooktanu używanego jako rozpuszczalnik i 270 nm dla cykloheksanu.

▼ M28

6. PREZENTACJA WYNIKÓW

- 6.1. Należy zarejestrować właściwe gęstości optyczne (współczynniki ekstynkcji) dla różnych długości fal, obliczając je w następujący sposób:

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{c \times s}$$

gdzie:

$K\lambda$ = właściwa gęstość optyczna przy długości fali λ ;

$E\lambda$ = gęstość optyczna zmierzona przy długości fali λ ;

c = stężenie roztworu w g/100 ml;

s = droga optyczna ogniwa kwarcowego w cm;

z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku.

- 6.2. Zmienność właściwej gęstości optycznej (ΔK)

Zmienność wartości bezwzględnej gęstości (ΔK) oblicza się według wzoru:

$$\Delta K = \left| K_m - \left(\frac{K_{\lambda m} - 4 + K_{\lambda m} + 4}{2} \right) \right|$$

gdzie K_m oznacza właściwą gęstość optyczną przy długości fali dla maksymalnej absorpcji 270 nm i 268 nm w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika.

Wynik należy podać z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku.

▼ **M28***ZAŁĄCZNIK X***OZNACZANIE ESTRÓW METYLOWYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ****1. ZAKRES**

Niniejszy załącznik zawiera wytyczne w zakresie oznaczania metodą chromatografii gazowej wolnych i związanych kwasów tłuszczowych w tłuszczach i olejach roślinnych po ich przekształceniu na estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME).

Związane kwasy tłuszczowe w formie triglicerydów (TAG) oraz – w zależności od metody estryfikacji – wolne kwasy tłuszczowe (FFA) są przekształcane na estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME), które oznacza się metodą chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych.

Metoda opisana w niniejszym załączniku pozwala na oznaczanie FAME od C12 do C24, w tym estrów metylowych kwasów tłuszczowych nasyconych, *cis*- i *trans*-jednonienasyconych oraz *cis*- i *trans*-wielonienasyconych.

2. ZASADA

Do analizy ilościowej FAME stosuje się chromatografię gazową (GC). FAME są przygotowywane zgodnie z częścią A. Następnie są wstrzykiwane do dozownika i odparowywane. Rozdział FAME przeprowadza się w kolumnach analitycznych o określonej polarności i długości. Do wykrywania FAME stosuje się detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). Warunki badania określono w części B.

W chromatografii gazowej FAME z użyciem FID można użyć wodoru lub helu jako gazu nośnego (faza ruchoma). Wodór przyspiesza rozdział i daje wyraźniejsze piki. Fazą stacjonarną jest mikroskopijna warstwa cienkiego filmu cieczy naniesiona na obojętną powierzchnię z topionej krzemionki.

Podczas przejścia związków lotnych poddawanych analizie przez kolumnę kapilarną następuje ich oddziaływanie z fazą stacjonarną pokrywającą wewnętrzną powierzchnię kolumny. W wyniku różnych oddziaływań różnych związków elucja ma miejsce w różnym czasie – jest to tak zwany czas retencji związku chemicznego przy danym zbiorze parametrów analitycznych. Porównanie czasów retencji służy identyfikacji różnych związków chemicznych.

CZĘŚĆ A**PRZYGOTOWANIE ESTRÓW METYLOWYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH Z OLIWY Z OLIWEK ORAZ OLIWY Z WYTŁOCZYN Z OLIWEK****1. ZAKRES**

W niniejszej części opisano przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Zawarto w niej metody przygotowania estrów metylowych kwasów tłuszczowych z oliw z oliwek oraz z oliw z wytłoczyn z oliwek.

2. ZAKRES ZASTOSOWANIA

Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych z oliw z oliwek oraz z oliw z wytłoczyn z oliwek przeprowadza się w drodze transestryfikacji roztworem metanolem wodorotlenku potasu w temperaturze pokojowej. Konieczność oczyszczania próbki przed transestryfikacją zależy od zawartości wolnych kwasów tłuszczowych w próbce oraz od oznaczanych parametrów analitycznych; metodę można wybrać zgodnie z następującą tabelą:

▼ **M28**

Kategoria oliwy	Metoda
Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia, o kwasowości $\leq 2,0$ %	1. Kwasy tłuszczowe 2. Kwasy tłuszczowe <i>trans</i> 3. Δ ECN42 (po oczyszczeniu żelem krzemionkowym SPE)
Rafinowana oliwa z oliwek	
Oliwa z oliwek złożona z rafinowanej oliwy z oliwek i oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia	
Rafinowana oliwa z wycłoczyn z oliwek	
Oliwa z wycłoczyn z oliwek	
Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia, o kwasowości $> 2,0$ % Surowa oliwa z wycłoczyn z oliwek	1. Kwasy tłuszczowe (po oczyszczeniu żelem krzemionkowym SPE) 2. Kwasy tłuszczowe <i>trans</i> (po oczyszczeniu żelem krzemionkowym SPE) 3. Δ ECN42 (po oczyszczeniu żelem krzemionkowym SPE)

3. METODOLOGIA

3.1. **Transestryfikacja roztworem metanolem wodorotlenku potasu w temperaturze pokojowej**3.1.1. *Zasada*

Estry metylowe powstają w wyniku transestryfikacji roztworem metanolem wodorotlenku potasu na etapie pośrednim przed zmydleniem.

3.1.2. *Odczynniki*

3.1.2.1. Metanol o zawartości wody nieprzekraczającej 0,5 % (m/m).

3.1.2.2. Heksan, jakość chromatograficzna.

3.1.2.3. Heptan, jakość chromatograficzna.

3.1.2.4. Eter dietylowy do analizy, stabilizowany.

3.1.2.5. Aceton, jakość chromatograficzna.

3.1.2.6. Rozpuszczalnik elucyjny do oczyszczania oliwy metodą chromatografii kolumnowej/SPE, w mieszaninie heksanu z eterem dietylowym 87/13 (v/v).

3.1.2.7. Wodorotlenek potasu, roztwór metanolem ok. 2M: rozpuścić 11,2 g wodorotlenku potasu w 100 ml metanolu.

3.1.2.8. Wkłady z żelem krzemionkowym, 1 g (6 ml), do ekstrakcji do fazy stałej.

3.1.3. *Aparatura*

3.1.3.1. Probówki zakręcane (objętość 5 ml), zakrętka z uszczelką PTFE.

3.1.3.2. Pipety miarowe lub automatyczne, 2 ml i 0,2 ml.

▼ **M28**3.1.4. *Oczyszczanie próbek oliwy*

W razie potrzeby próbki można oczyścić przez przepuszczenie oliwy przez wkład z żelalem krzemionkowym do ekstrakcji do fazy stałej. Wkład z żelalem krzemionkowym (3.1.2.8) umieszcza się w elucyjnej aparaturze próżniowej i przemywa się 6 ml heksanu (3.1.2.2); przemywanie odbywa się bez próżni. Następnie do kolumny podaje się roztwór oliwy (około 0,12 g) w 0,5 ml heksanu (3.1.2.2). Roztwór przepuszcza się przez kolumnę, a następnie poddaje elucji mieszaniną 10 ml heksanu/eteru dietylowego (87:13 v/v) (3.1.2.6). Wszystkie eluaty są homogenizowane i dzielone na dwie podobne objętości. Podwielokrotność odparowuje się do suchości w wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej. Pozostałość rozpuszcza się w 1 ml heptanu i roztwór jest gotowy do analizy kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej. Drugą podwielokrotność odparowuje się, a pozostałość rozpuszcza się w 1 ml acetonu do analizy triglicerydów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), jeśli jest to konieczne.

3.1.5. *Procedura*

W zakręcanej probówce o pojemności 5 ml (3.1.3.1) odważyć ok. 0,1 g próbki oliwy. Dodać 2 ml heptanu (3.1.2.2) i wstrząsnąć. Dodać 0,2 ml roztworu metanolowego wodorotlenku potasu (3.1.2.7), zamknąć nakrętką z uszczelką PTFE, zacisnąć nakrętkę i wstrząsnąć energicznie przez 30 sekund. Pozostawić do rozwarstwienia, aż górna warstwa roztworu stanie się klarowna. Dekantować górną warstwę zawierającą estry metylowe. Roztwór heptanu jest gotowy do wstrzyknięcia do chromatografu gazowego. Zaleca się przechowywanie roztworu w chłodziarce do czasu analizy metodą chromatografii gazowej. Nie zaleca się przechowywania roztworu dłużej niż przez 12 godzin.

CZĘŚĆ B

**ANALIZA ESTRÓW METYLOWYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH
METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ**1. **ZAKRES**

Niniejsza część zawiera ogólne wytyczne stosowania chromatografii gazowej na kolumnach kapilarnych do oznaczania składu jakościowego i ilościowego mieszaniny estrów metylowych kwasów tłuszczowych uzyskanych zgodnie z metodą określoną w części A.

Niniejsza część nie stosuje się do spolimeryzowanych kwasów tłuszczowych.

2. **ODCZYNNIKI**2.1. **Gaz nośny**

Gaz obojętny (hel lub wodór) dokładnie osuszony i zawierający mniej niż 10 mg/kg tlenu.

Uwaga 1: Wodór może dwukrotnie przyspieszyć analizę, ale stwarza zagrożenie. Istnieją jednak urządzenia zabezpieczające.

2.2. **Gazy pomocnicze**

2.2.1. Wodór (czystość $\geq 99,9\%$) niezawierający zanieczyszczeń organicznych.

2.2.2. Powietrze lub tlen niezawierające zanieczyszczeń organicznych.

2.2.3. Azot (czystość $> 99\%$).

2.3. **Produkty wzorcowania**

Mieszanina estrów metylowych czystych kwasów tłuszczowych lub estrów metylowych substancji tłuszczowej o znanym składzie, o ile to możliwe jak najbardziej zbliżonym do składu substancji tłuszczowej poddawanej analizie. Izomery *cis* i *trans*, oktadekanowe, oktadekadonowe i oktadekatrienowe estrów metylowych są przydatne w identyfikacji izomerów *trans* kwasów nienasyconych.

Należy przedsięwziąć wszelkie środki ostrożności, aby zapobiec utlenieniu kwasów tłuszczowych wielonienasyconych.

▼ **M28****3. APARATURA**

Podane zalecenia dotyczą powszechnie stosowanego sprzętu do chromatografii gazowej z wykorzystaniem kolumn kapilarnych i detektora płomieniowo-jonizacyjnego.

3.1. Chromatograf gazowy

Chromatograf gazowy składa się z następujących elementów:

3.1.1. System dozowania

Należy korzystać z systemu dozowania z kolumnami kapilarnymi, przy czym system ten powinien być tak skonstruowany, aby można było go używać z takimi kolumnami. Może to być dozownik z rozdziałem strumienia lub dozownik typu *on-column* bez rozdziału strumienia.

3.1.2. Piec

Piec musi być w stanie nagrzać kolumnę kapilarną do temperatury co najmniej 260 °C i utrzymać pożądaną temperaturę z dokładnością do 0,1 °C. Ten drugi wymóg jest szczególnie istotny w przypadku użycia rurki z topionej krzemionki.

Stosowanie urządzenia wyposażonego w programator temperatury jest zalecane we wszystkich przypadkach, w szczególności w przypadku kwasów tłuszczowych o liczbie atomów węgla mniejszej niż 16.

3.1.3. Kolumna kapilarna

3.1.3.1. Rurka z materiału obojętnego w stosunku do badanych substancji (na ogół ze szkła lub topionej krzemionki). Wewnętrzna średnica musi mieścić się w przedziale 0,20–0,32 mm. Powierzchnia wewnątrz musi być poddana odpowiedniej obróbce (np. przygotowanie powierzchni, dezaktywacja) przed nałożeniem warstwy fazy stacjonarnej. Długość 60 m jest wystarczająca dla kwasów tłuszczowych oraz izomerów *cis* i *trans* kwasów tłuszczowych.

3.1.3.2. Odpowiednie są kolumny z fazą sieciowanych polisiloksanów polarnych (cyjanopropylosilikon).

Uwaga 2: Istnieje ryzyko, że polisiloksany polarne mogą spowodować trudności przy określaniu i rozdzielaniu kwasu linolenowego i kwasów C20.

Warstwy powinny być cienkie, tj. 0,1–0,2 µm.

3.1.3.3. Montaż i kondycjonowanie kolumny

Należy przestrzegać normalnych środków ostrożności obowiązujących przy czynnościach montażu kolumn kapilarnych, takich jak umieszczenie kolumny w piecu (podłoże), dobór i montaż połączeń (szczelność), rozmieszczenie końcówek kolumny w dozowniku i detektorze (zmniejszenie martwych przestrzeni). Umieścić kolumnę pod strumieniem gazu nośnego (na przykład o ciśnieniu 0,3 bara (30 kPa) dla kolumny o długości 25 m i średnicy wewnętrznej 0,3 mm).

Kondycjonować kolumnę, programując wzrost temperatury pieca na 3 °C/min od poziomu temperatury otoczenia aż do temperatury niższej o 10 °C od granicznej wartości temperatury, w której następuje rozpad fazy stacjonarnej. Utrzymywać tę temperaturę pieca przez jedną godzinę do momentu stabilizacji linii podstawowej. Obniżyć temperaturę do 180 °C, aby kontynuować pracę w warunkach stałej temperatury.

Uwaga 3: Odpowiednio prekondycjonowane kolumny są dostępne w handlu.

3.1.4. Detektor płomieniowo-jonizacyjny i konwerter-wzmacniacz**3.2. Strzykawka**

Strzykawka musi mieć maksymalną pojemność 10 µl i być wyskalowana co 0,1 µl.

3.3. System odbioru danych

System odbioru danych, połączony bezpośrednio z detektorami i używany wraz z oprogramowaniem odpowiednim do integracji i normalizacji piku.

▼ **M28**

4. PROCEDURA

Szczegółowe zasady postępowania podane w pkt. 4.1–4.3 odnoszą się do stosowania detektora płomieniowo-jonizacyjnego.

4.1. **Warunki badania**4.1.1. *Dobór optymalnych warunków pracy dla kolumn kapilarnych*

W związku ze sprawnością i drożnością kolumn kapilarnych rozdzielanie składników i czas trwania analizy zależą w bardzo dużym stopniu od natężenia przepływu gazu nośnego w kolumnie. Konieczne będzie zatem dokonanie optymalizacji warunków pracy przez dostosowanie tego parametru (lub spadku ciśnienia na wlocie kolumny) w zależności od tego, czy celem jest poprawa rozdzielania czy przyspieszenie analizy.

Poniższe warunki okazały się odpowiednie do rozdziału FAME (C₄–C₂₆). Przykładowe chromatogramy są zamieszczone w dodatku B:

Temperatura dozownika:	250 °C
Temperatura detektora:	250 °C
Temperatura pieca:	165 °C (8 min) do 210 °C przy 2 °C/min
Gaz nośny wodór:	ciśnienie na wlocie kolumny, 179 kPa
Przepływ łącznie:	154,0 ml/min;
Stosunek strumienia dzielonego:	1:100
Dozowana objętość:	1 µl

4.1.2. *Określanie rozdzielczości (zob. dodatek A)*

Obliczyć rozdzielczość R dwóch sąsiednich pików I i II, stosując wzór:

$$R = 2 \times ((d_{r(II)} - d_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ lub } R = 2 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ (USP) (United States Pharmacopeia),}$$

lub

$$R = 1,18 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)})/(\omega_{0,5(I)} + \omega_{0,5(II)})) \text{ (EP, BP, JP, DAB),}$$

(JP (Japanese Pharmacopeia), EP (Pharmacopée Européenne), BP (British Pharmacopeia))

gdzie:

$d_{r(I)}$ to odległość retencji pików I;

$d_{r(II)}$ to odległość retencji pików II;

$t_{r(I)}$ to czas retencji pików I;

$t_{r(II)}$ to czas retencji pików II;

$\omega_{(I)}$ to szerokość pików I przy podstawie;

$\omega_{(II)}$ to szerokość pików II przy podstawie;

$\omega_{0,5}$ to szerokość pików danego związku w połowie wysokości pików;

Jeżeli $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$, należy obliczyć R, korzystając z następujących wzorów:

$$R = (d_{r(II)} - d_{r(I)})/\omega = (d_{r(II)} - d_{r(I)})/4\sigma$$

gdzie:

σ to odchylenie standardowe (zob. dodatek A, rys. 1).

▼ **M28**

Jeżeli odległość d_r pomiędzy dwoma pikami $d_{r(II)} - d_{r(I)}$ jest równa 4σ , wówczas współczynnik rozdzielczości $R = 1$.

Jeżeli dwa piki nie są całkowicie oddzielone, styczne do punktów przebiegania tych dwóch pików przecinają się w punkcie C. Aby oddzielić całkowicie te dwa piki, odległość między nimi musi być równa:

$$d_{r(II)} - d_{r(I)} = 6 \sigma \text{ skąd } R = 1,5 \text{ (zob. dodatek A, rys. 3).}$$

5. PREZENTACJA WYNIKÓW

5.1. **Analiza jakościowa**

Należy określić piki estrów metylowych próby z chromatogramu w dodatku B, rys. 1 w razie potrzeby przez interpolację lub przez porównanie z pikami mieszanin wzorcowych estrów metylowych (jak określono w pkt 2.3).

5.2. **Analiza ilościowa**5.2.1. *Oznaczanie składu*

Należy obliczyć ułamek masowy w_i poszczególnych estrów metylowych kwasów tłuszczowych, wyrażony jako wartość procentowa masy estrów metylowych, w następujący sposób:

5.2.2. *Metoda obliczania*5.2.2.1. *Przypadek ogólny*

Obliczyć zawartość danego składnika i , wyrażoną jako wartość procentowa masy estrów metylowych, określając wartość procentową powierzchni odpowiedniego piku do sumy powierzchni wszystkich pików, stosując wzór:

$$w_i = (A_i/\Sigma A) \times 100$$

gdzie:

A_i to powierzchnia pod pikiem danego estru metylowego kwasu tłuszczowego i ;

ΣA to suma powierzchni pod wszystkimi pikami dla wszystkich estrów metylowych kwasów tłuszczowych.

Wyniki podaje się z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku.

Uwaga 4: Dla tłuszczów i olejów, ułamek masowy estrów metylowych kwasów tłuszczowych jest równy ułaskowi masowemu w przypadku triglicerydów w gramach na 100 g. W przypadkach, gdy takie założenie jest niedopuszczalne, zob. pkt. 5.2.2.2.

5.2.2.2. *Stosowanie współczynników korygujących*

W niektórych przypadkach, na przykład w obecności kwasów tłuszczowych o liczbie atomów węgla mniejszej niż osiem lub kwasów z grupami drugorzędowymi, powierzchnie koryguje się odpowiednimi współczynnikami korygującymi (F_{ci}). Współczynniki te ustala się dla każdego instrumentu. W tym celu należy używać odpowiednich materiałów wzorcowych z certyfikowaną zawartością kwasów tłuszczowych w odpowiednim zakresie.

Uwaga 5: Współczynniki korygujące nie są identyczne z teoretycznymi współczynnikami korygującymi FID, które podano w dodatku A, ponieważ obejmują one również wydajność systemu dozowania itp. Jednakże w przypadku większych różnic, należy sprawdzić działanie całego systemu.

▼ **M28**

Dla tej mieszaniny wzorcowej ułamek masowy FAME i oblicza się zgodnie ze wzorem:

$$w_i = (m_i / \Sigma m) \times 100$$

gdzie:

m_i to masa FAME i w mieszaninie wzorcowej;

Σm to suma mas różnych składników jako FAME w mieszaninie wzorcowej.

Na podstawie chromatogramu mieszaniny wzorcowej, należy obliczyć wartość procentową według powierzchni dla FAME i w następujący sposób:

$$w_i = (A_i / \Sigma A) \times 100$$

gdzie:

A_i to powierzchnia FAME i w mieszaninie wzorcowej;

ΣA to suma wszystkich powierzchni wszystkich FAME w mieszaninie wzorcowej.

Współczynnik korygujący F_c wynosi wówczas

$$F_c = (m_i \times \Sigma A) / (A_i \times \Sigma m)$$

Dla próbki ułamek masowy każdego FAME i wynosi:

$$w_i = (F_i \times A_i) / \Sigma (F_i \times A_i)$$

Wyniki podaje się z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku.

Uwaga 6: Obliczona wartość odpowiada wartości procentowej masy każdego kwasu tłuszczowego obliczonej jako zawartość triglicerydów w 100 g tłuszczu.

5.2.2.3. Stosowanie wzorca wewnętrznego

W niektórych analizach (na przykład wówczas, gdy nie wszystkie kwasy tłuszczowe są oznaczane ilościowo i obok kwasów C16 i C18 występują kwasy C4 i C6, lub gdy zachodzi konieczność oznaczenia bezwzględnej ilości kwasów tłuszczowych w próbce), niezbędne jest zastosowanie wzorca wewnętrznego. Stosowane są często kwasy tłuszczowe z 5, 15 lub 17 atomami węgla. Należy wyznaczyć współczynnik korygujący wewnętrznego wzorca (jeżeli zachodzi taka potrzeba).

Procentowy udział masy składnika i wyrażony jako estry metylowe jest określany wzorem:

$$w_i = (m_{IS} \times F_i \times A_i) / (m \times F_{IS} \times A_{IS})$$

gdzie:

A_i to powierzchnia FAME i ;

A_{IS} to powierzchnia wzorca wewnętrznego;

F_i to współczynnik korygujący kwasu tłuszczowego i , wyrażony jako FAME;

F_{IS} to współczynnik korygujący wzorca wewnętrznego;

m to masa naważki, w miligramach;

m_{IS} to masa wzorca wewnętrznego, w miligramach;

Wyniki podaje się z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku.

▼ M28**6. SPRAWOZDANIE Z BADANIA**

Sprawozdanie z badania musi określać metody zastosowane do przygotowania estrów metylowych i do analizy za pomocą chromatografii gazowej. Musi także ujmować wszystkie dane operacyjne niesprecyzowane w niniejszej metodzie normatywnej lub uznane za fakultatywne, łącznie z danymi dotyczącymi incydentów, które mogły wpłynąć na wyniki.

W sprawozdaniu z badania podaje się wszystkie informacje konieczne do pełnej identyfikacji próbki.

7. PRECYZJA**7.1. Wyniki badania międzylaboratoryjnego**

Szczegółowe dane odnośnie do badania międzylaboratoryjnego dotyczącego precyzji metody podano w załączniku C do normy IOC/T.20/Doc. No 33. Wartości uzyskane w tym badaniu międzylaboratoryjnym nie mogą mieć zastosowania do zakresów stężeń i matryc innych niż podane.

7.2. Powtarzalność

Różnica bezwzględna między dwoma niezależnymi wynikami oddzielnych badań uzyskanymi przy użyciu tej samej metody i materiału badanego, w tym samym laboratorium, przez tego samego operatora, na tym samym sprzęcie i w zbliżonym czasie, nie może być w więcej niż 5 % przypadków większa od „r” podanego w tabelach 1–14 w załączniku C do normy IOC/T.20/Doc. No 33.

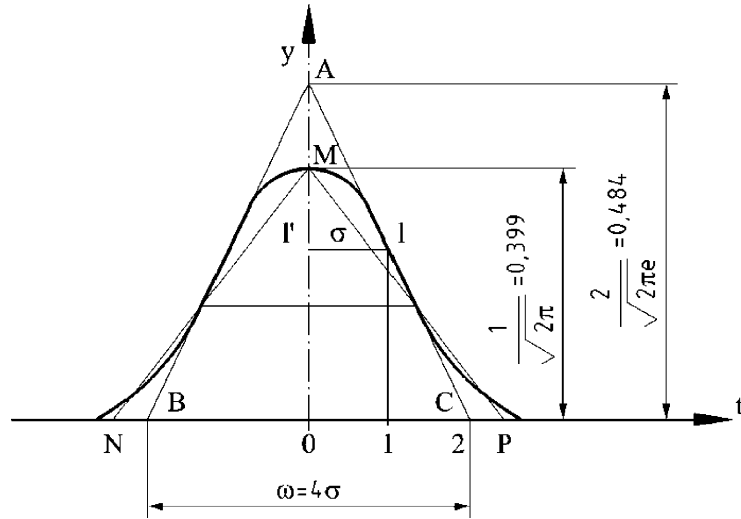
7.3. Odtwarzalność

Różnica bezwzględna między dwoma wynikami oddzielnych badań uzyskanymi przy użyciu tej samej metody i materiału badanego, w różnych laboratoriach, przez różnych operatorów korzystających z różnego sprzętu, nie może być w więcej niż 5 % przypadków większa od „R” podanego w tabelach 1–14 w załączniku C do normy IOC/T.20/Doc. No 33.

▼ M28

Dodatek A

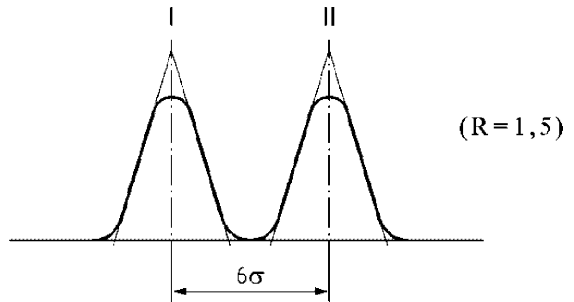
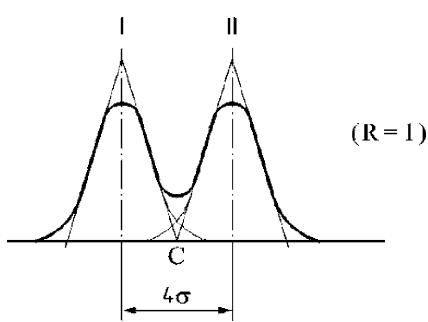
Rysunek 1



$\omega_{0,5}$ – szerokość w połowie wysokości trójkąta (ABC) i b – szerokość w połowie wysokości trójkąta (NPM).

Rysunek 2

Rysunek 3

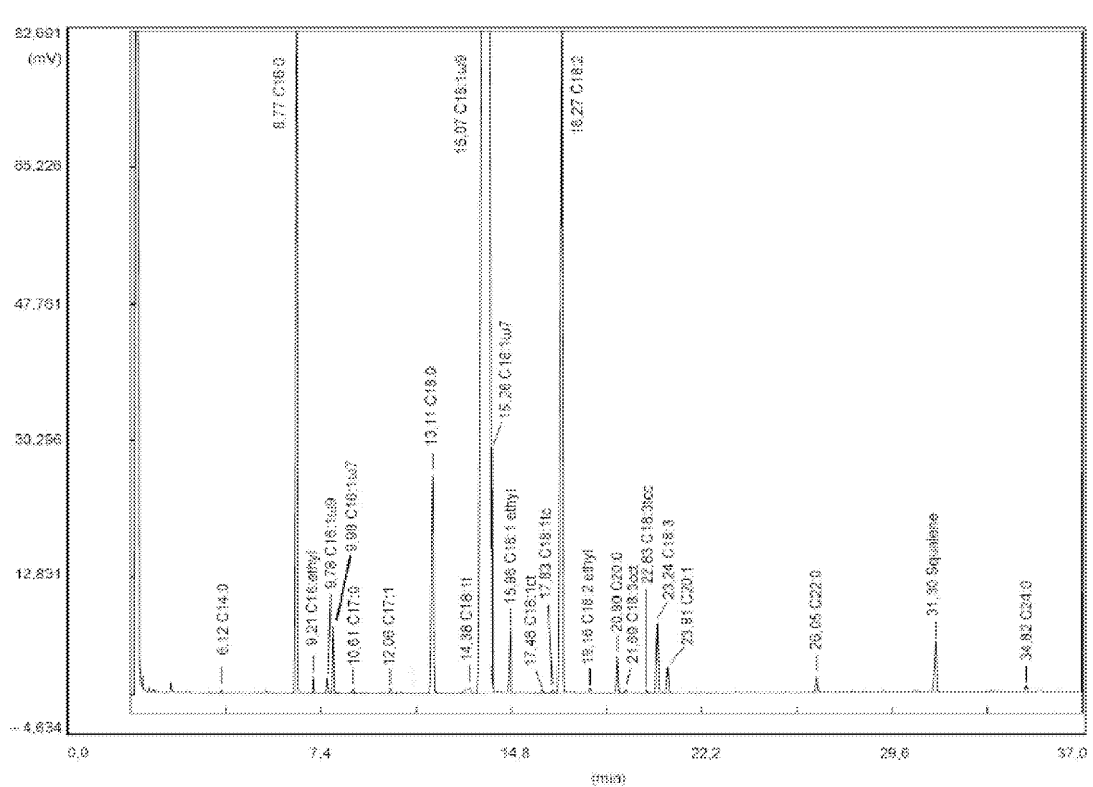


▼M28

Dodatek B

Rysunek 1

Chromatogram gazowy otrzymany po metylacji na zimno z oliwy z wytłoczyn z oliwek



Piki chromatograficzne odpowiadają estrom metylowym i etylowym, o ile nie wskazano inaczej.



ZAŁĄCZNIK XI

OZNACZANIE LOTNYCH FLUOROWCOWANYCH ROZPUSZCZALNIKÓW OLIWY Z OLIWEK

1. METODA

Analiza metodą chromatografii gazowej przeprowadzana techniką Analizy fazy gazowej nad roztworem.

2. SPRZĘT

2.1. Chromatograf gazowy wyposażony w detektor wychwyty elektronów (ecd).

2.2. Aparatura do analizy fazy gazowej nad roztworem.

2.3. Szklana kolumna chromatograficzna do chromatografii gazowej o wysokości 2 m i średnicy 2 mm, faza nieruchoma. OV101 do 10 % lub równoważnik, nasycający ziemię okrzemkową, przepłukaną kwasami i potraktowaną krzemometanem, o uziarnieniu odpowiadającym sitom 80-100.

2.4. Gaz nośny i gaz pomocniczy: azot do chromatografii gazowej odpowiedni do wykrywania metodą wychwytywania elektronów.

2.5. Kolby szklane o wielkości 10-15 ml z wykładziną teflonową i korkiem aluminiowym wyposażonym w system pozwalający pobierać zawartość za pomocą strzykawki.

2.6. Szczypce z hermetycznym zamknięciem.

2.7. Strzykawka do gazu o pojemności 0,5 lub 2 mm.

3. ODCZYNNIKI

Standard: lotne rozpuszczalniki chlorowcowane charakteryzujące się stopniem czystości kwalifikującym je do chromatografii gazowej.

4. PROCEDURA

4.1. Odważyć dokładnie 3 g oliwy w szklanej kolbie (jednorazowego użytku), zamknąć kolbę hermetycznie. Umieścić kolbę w termostacie na okres jednej godziny w temperaturze 70 °C. Pobrać dokładnie za pomocą strzykawki 0,2-0,5 ml fazy gazowej z nad roztworu i wprowadzić do kolumny aparatu chromatograficznego do chromatografii gazowej wyregulowanego w następujący sposób:

— temperatura iniektora: 150 °C,

— temperatura kolumny: 70-80 °C

— temperatura detektora: 200-250 °C

Inne temperatury mogą być również stosowane pod warunkiem, że wyniki pozostaną równoważne.

4.2. Roztwory wzorcowe: przygotować roztwory mianowane stosując rafinowaną oliwę z oliwek bez śladu rozpuszczalników, o stężeniach wahających się 0,05-1 ppm (mg/kg) i odpowiadających przewidywanej zawartości próbki. Ewentualne rozcieńczanie należy prowadzić za pomocą pentanu.

4.3. Ocena ilościowa: powiązać powierzchnie lub wysokości wykresu dla największych wartości próbki i roztworu mianowanego o najbardziej zbliżonym zakładanym stężeniu. Jeżeli względna rozbieżność przekracza 10 % analiza wymaga powtórzenia w porównaniu z innym roztworem mianowanym dopóki jego stężenie nie będzie się mieściło we wspomnianych granicach. Zawartość jest ustalona na podstawie średniej podstawowych wtrysków.

4.4. Przedstawienie wyników: w mg/kg (ppm). Granica wykrywalności metody wynosi 0,01 mg/kg.

▼ **M26**

ZAŁĄCZNIK XII

METODA MIĘDZYNARODOWEJ RADY DS. OLIWY SŁUŻĄCA DO ORGANOLEPTYCZNEJ OCENY OLIWY Z OLIVEK Z PIERWSZEGO TŁOCZENIA▼ **M28**

1. CEL I ZAKRES

Celem międzynarodowej metody opisanej w niniejszym załączniku jest określenie procedury oceny organoleptycznych cech charakterystycznych oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia w rozumieniu pkt 1 w części VIII załącznika VII do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1308/2013⁽¹⁾ 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 oliw 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.

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

▼ **M26**

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.

Zjelczwały smak lub zapach oliwy, która uległa intensywnemu utlenianiu.

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

⁽¹⁾ Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1308/2013 z dnia 17 grudnia 2013 r. ustanawiające wspólną organizację rynków produktów rolnych oraz uchylające rozporządzenia Rady (EWG) nr 922/72, (EWG) nr 234/79, (WE) nr 1037/2001 i (WE) nr 1234/2007 (Dz.U. L 347 z 20.12.2013, s. 671).

▼ **M28**3.1.1. *Pozostałe cechy negatywne*

<i>Zapach gotowania lub spalania</i>	charakterystyczny zapach oliwy spowodowany nadmiernym lub długotrwałym podgrzewaniem podczas przetwarzania, w szczególności podczas termougniatania masy, jeżeli proces ten prowadzony jest w niewłaściwych warunkach termicznych.
<i>Zapach siana i drewna</i>	charakterystyczny zapach niektórych rodzajów oliwy wyprodukowanych z wysuszonych oliwek.
<i>Szorstkie wrażenie</i>	charakterystyczne wrażenie, jakie dają niektóre rodzaje starszej oliwy, których degustacja pozostawia w ustach uczucie gęstości i maziowatości.
<i>Zapach smaru</i>	zapach oliwy przypominający zapach oleju napędowego, smaru lub oleju mineralnego.
<i>Zapach wody pochodzenia roślinnego</i>	zapach, którego oliwa nabrała na skutek długotrwałego kontaktu z wodą pochodzenia roślinnego, która przeszła proces fermentacji.
<i>Smak solanki</i>	smak oliwy pozyskanej z oliwek zakonserwowanych w solance.
<i>Metaliczny</i>	smak lub zapach przypominający metal. Jest charakterystyczny dla oliwy, która miała długotrwały kontakt z powierzchniami metalicznymi w trakcie rozdrabniania, ugniatania, wyciskania lub przechowywania.
<i>Zapach ostnicy</i>	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.
<i>Zapach robaczywych owoców</i>	zapach oliwy uzyskanej z oliwek silnie zaatakowanych przez larwy muszki oliwnej (<i>Bactrocera oleae</i>).
<i>Smak ogórka</i>	smak oliwy powstający w wyniku zbyt długiego przechowywania w zamkniętym hermetycznie opakowaniu, w szczególności w pojemnikach z blachy cynowanej, przypisywany powstawaniu 2,6-nonadienu.

3.2. **Cechy pozytywne**

<i>Owocowy</i>	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.
<i>Gorzki</i>	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.
<i>Ostry</i>	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.

▼ **M29**3.3. **Nieobowiązkowa terminologia stosowana do celów etykietowania**

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

▼ **M29**

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

- określenie *mocny* 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.

Owocowy 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.

Owocowy 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 zrównoważona oliwa, która nie wykazuje braku równowagi, co oznacza wrażenie węchowo-smakowe i dotykowe, w którym mediana gorzkości i mediana ostrego smaku są co najwyżej o dwa punkty wyższe od mediany owocowego smaku/zapachu.

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

Wykaz określeń w odniesieniu do intensywności percepcji:

Określenia pod warunkiem przedstawienia świadectwa badania organoleptycznego	Mediana danej cechy
Owocowy	—
Owocowy dojrzały	—
Owocowy niedojrzały	—
Lekko owocowy	mniej niż 3
Średnio owocowy	od 3 do 6
Mocno owocowy	ponad 6
Owocowy lekko dojrzały	mniej niż 3
Owocowy średnio dojrzały	od 3 do 6
Owocowy mocno dojrzały	ponad 6
Owocowy lekko niedojrzały	mniej niż 3

▼ **M29**

Określenia pod warunkiem przedstawienia świadectwa badania organoleptycznego	Mediana danej cechy
Owocowy średnio niedojrzały	od 3 do 6
Owocowy mocno niedojrzały	ponad 6
Lekko gorzki	mniej niż 3
Średnio gorzki	od 3 do 6
Mocno gorzki	ponad 6
Lekko ostry	mniej niż 3
Średnio ostry	od 3 do 6
Mocno ostry	ponad 6
Oliwa zrównoważona	Mediana goryczy i mediana ostrego smaku są co najwyżej o dwa punkty wyższe od mediany owocowego smaku/zapachu.
Oliwa łagodna	Mediana goryczy i mediana ostrego smaku są niższe lub równe 2.

▼ **M26**

4. POJEMNIK SZKLANY PRZEZNACZONY DO DEGUSTACJI OLIWY
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.

▼ M26**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 otrzymanymi przez inne zespoły zajmujące się analizą oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia w celu ustalenia, czy zespół funkcjonuje poprawnie.

▼ M26

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 otrzymany 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.

▼ M28**7.1.1. Zastępca kierownika zespołu**

Kierownik zespołu degustatorów może, w uzasadnionych przypadkach, być zastępowany przez zastępcę kierownika zespołu, który może zastępować go w obowiązkach związanych z przeprowadzaniem badań. Zastępca musi mieć wszystkie niezbędne umiejętności wymagane od kierownika zespołu.

7.2. Degustatorzy

Osoby pełniące funkcje degustatorów w ocenie organoleptycznych właściwości oliwy z oliwek wykonują swoje zadania dobrowolnie. 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 próbce.

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

▼ M26**8. WARUNKI BADANIA****8.1. Prezentacja próbek**

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 wazone, 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 $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. 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”.

▼ **M26**

Temperatura w pomieszczeniu, w którym odbywa się badanie, musi wynosić 20–25 °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**▼ **M29**

- 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. Wąchanie 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.

▼ **M29**

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.

N.B. Kiedy degustatorzy nie wyczuwają owocowego smaku w próbce a intensywność decydującej o zaklasyfikowaniu cechy negatywnej wynosi co najwyżej 3,5, wówczas kierownik zespołu degustatorów może podjąć decyzję, aby degustatorzy zbadali próbkę jeszcze raz w temperaturze otoczenia (COI/T.20/Doc. No 6/Rev. 1, wrzesień 2007 r., sekcja 3 – Ogólne wskazówki dotyczące urządzenia pomieszczenia, w którym odbywa się badanie), określając jednocześnie pojęcie „temperatura otoczenia” i jego kontekst. Kiedy próbka osiągnie temperaturę pomieszczenia, degustatorzy badają ją ponownie jedynie w celu sprawdzenia, czy wyczuwają w niej smak/zapach owocowy. Jeśli tak, powinni oznaczyć jego intensywność na skali.

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

▼ **M26**

9.1.2. Dokonując organoleptycznej oceny oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia, zaleca się, aby podczas jednej sesji poddawać ocenę nie więcej niż CZTERY PRÓBKĘ 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 sopluchki. 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⁽¹⁾. Następnie musi zaznaczyć na dziesięciocentymetrowej skali udostępnionego formularza intensywność wrażeń doznanych w odniesieniu do cech negatywnych i pozytywnych.

⁽¹⁾ 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.

▼ M26

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.

▼ M28**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. Zob. pkt 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 n linijek odpowiadających 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 odchyień w celu sprawdzenia efektywności zespołu (IOC/T.20/Doc. No 14, § 6).

▼ M29**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.

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.

▼ **M29**

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.

W przypadku analiz przeprowadzonych w ramach kontroli zgodności przeprowadza się jeden test. W przypadku sprzeczności ocen należy zorganizować przeprowadzenie dwóch ocen w różnych sesjach. Wyniki ocen z obu sesji muszą być statystycznie jednorodne. (zob. pkt 9.5). Jeśli tak nie jest, próbkę należy zbadać ponownie na dwóch sesjach. Ostateczną wartość mediany cech decydujących o zaklasyfikowaniu oblicza się stosując średnią obu median.

9.5. Kryteria przyjmowania i odrzucania podwójnych oznaczeń

Zdefiniowany poniżej błąd znormalizowany należy wykorzystywać w celu ustalenia, czy dwa wyniki wykonanej dwa razy analizy są statystycznie jednorodne lub dopuszczalne:

$$E_n = \frac{|Me_1 - Me_2|}{\sqrt{U_1^2 + U_2^2}}$$

Gdzie Me_1 i Me_2 to mediany otrzymane w wyniku dwóch analiz (odpowiednio pierwszej i drugiej) a U_1 i U_2 to niepewności rozszerzone uzyskane dla tych dwóch wartości, obliczone w sposób następujący, zgodnie z dodatkiem:

$$U_1 = c \times s^* \text{ and } s^* = \frac{(CV_r \times Me_1)}{100}$$

Dla niepewności rozszerzonej, $c = 1,96$; stąd

$$U_1 = 0,0196 \times CV_r \times Me_1$$

gdzie CV_r jest odpornym współczynnikiem zmienności.

Aby można było stwierdzić, że dwie otrzymane wartości nie różnią się pod względem statystycznym, E_n nie może być większe od 1,0.

▼ **M26***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 ocenających będących członkami zespołu.

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

▼ M26**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 liczbę 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.

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

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

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..

▼ M20

▼ M19



ZAŁĄCZNIK XV

ZAWARTOŚĆ OLEJU W POZOSTAŁOŚCI Z OLIWEK

1. ZAWARTOŚĆ OLIWY W WYTŁOCZKACH OLIWKOWYCH

1.1. Aparatura

- odpowiednia aparatura ekstrakcyjna wyposażona w kolbę stożkową z okrągłym dnem o pojemności 200-250 ml,
- elektrycznie podgrzewana łaźnia (np. łaźnia piaskowa, łaźnia wodna) lub płytka grzejna,
- waga analityczna,
- piec regulowany do maksymalnie 80 °C,
- elektrycznie podgrzewany piec wyposażony w urządzenie termostaticzne regulowane do 103 ± 2 °C, który można omiatać strumieniem powietrza lub obsługiwać pod obniżonym ciśnieniem,
- młynek mechaniczny, łatwy do czyszczenia, który umożliwia zmielenie wyłoczków oliwkowych bez podwyższenia ich temperatury i bez jakiegokolwiek innej stwierdzonej zmiany zawartości w ich wilgoci, substancji lotnych lub substancji ulegających ekstrakcji przy użyciu heksanu,
- gilza do ekstrakcji i bawełna lub bibuła filtracyjna, z których usunięto już substancje ulegające ekstrakcji heksanem,
- suszarka laboratoryjna,
- sito o otworach o średnicy 1 mm,
- małe cząstki wcześniej wysuszonego pumeksu,

1.2. Odczynnik

Normalny heksan, czystości technicznej, po którym zostaje mniej niż 0,002 g pozostałości na 100 ml po pełnym odparowaniu.

2. PROCEDURA

2.1. Przygotowanie próbki do badania

W razie potrzeby wykorzystać młynek mechaniczny, który został uprzednio odpowiednio oczyszczony, do zmielenia próbki laboratoryjnej w celu rozdrobnienia jej do cząstek, które mogą całkowicie przejść przez sito.

Wykorzystać około jednej dwudziestej próbki, aby dokończyć proces czyszczenia młynka, odrzucić zmielony materiał, zemleć pozostałość i zebrać ją, starannie wymieszać i niezwłocznie poddać analizie.

2.2. Badana porcja

Natychmiast po zakończeniu operacji mielenia odważyć około 10 g próbki do zbadania z dokładnością do 0,01 g.

2.3. Przygotowanie gilzy do ekstrakcji

Umieścić porcję badaną w gilzie i zatkać tę ostatnią bawełną. W razie stosowania bibuły filtracyjnej owinąć nią porcję badaną.

2.4. Wstępne suszenie

W przypadku, gdy wyłoczki oliwkowe są bardzo wilgotne (tj. ilość zawartej w nich wilgoci i substancji lotnych przekracza 10 %), przeprowadzić wstępne suszenie przez umieszczenie napełnionej gilzy do ekstrakcji (lub bibuły filtracyjnej) w piecu podgrzewanym przez odpowiedni czas do nie więcej niż 80 °C w celu zmniejszenia zawartości wilgoci i substancji lotnych do mniej niż 10 %.

▼ B**2.5. Przygotowanie kolby stożkowej z okrągłym dnem**

Odważyć z dokładnością do 1 mg kolbę stożkową zawierającą jedną lub dwie cząstki pumeksu, wcześniej wysuszoną w piecu w temperaturze 103 ± 2 °C i schłodzoną w suszarce laboratoryjnej przez nie mniej niż jedną godzinę.

2.6. Wstępna ekstrakcja

Do aparatury ekstrakcyjnej wprowadzić gilzę (lub bibułę filtracyjną) zawierającą porcję badaną. Wlać do kolby stożkowej wymaganą ilość heksanu. Podłączyć kolbę do aparatury ekstrakcyjnej i umieścić całość na elektrycznie podgrzewanej łaźni. Wyregulować szybkość podgrzewania w taki sposób, aby szybkość odcieku nie była niższa od trzech kropli na sekundę (umiarkowane, nie gwałtowne podgrzewanie). Po ekstrakcji przez cztery godziny pozostawić całość do schłodzenia. Usunąć gilzę z aparatury ekstrakcyjnej i umieścić ją w strumieniu powietrza, aby odprowadzić większość impregnującego rozpuszczalnika.

2.7. Druga ekstrakcja

Wsypaną zawartość gilzy do mikromłynka i zemleć jak najdrobniej. Zwrócić zmieszanie do gilzy bez straty i umieścić ją z powrotem w aparaturze ekstrakcyjnej.

Kontynuować ekstrakcję przez następne dwie godziny przy użyciu tej samej okrągłodennej kolby stożkowej zawierającej wstępny ekstrakt.

Roztwór powstały w kolbie ekstrakcyjnej musi się sklarować. Jeżeli tak się nie stanie, należy go kilka razy przefiltrować przez bibułę filtracyjną i kilka razy wymyć pierwotną kolbę i bibułę filtracyjną kilka razy przy pomocy heksanu. Zebrać filtrat i rozpuszczalnik zastosowany do przemywania do drugiej okrągłodennej kolby stożkowej, która została uprzednio wysuszona i wytarowana z dokładnością do 1 mg.

2.8. Usunięcie rozpuszczalnika i odważenie ekstraktu

Usunąć większą część rozpuszczalnika przez destylację na elektrycznie podgrzewanej łaźni. Usunąć ostatnie ślady rozpuszczalnika przez podgrzewanie kolby stożkowej w piecu w temperaturze 103 ± 2 °C przez 20 minut. Pomóc procesowi eliminacji przez wdmuchiwanie w pewnych odstępach czasu albo powietrza albo — w najkorzystniejszej sytuacji — gazu obojętnego, bądź też przy użyciu obniżonego ciśnienia.

Pozostawić kolbę stożkową w suszarce laboratoryjnej do schłodzenia, przez co najmniej jedną godzinę i zważyć z dokładnością do 1 mg.

Ponownie podgrzewać przez 10 minut na takich samych zasadach, schłodzić w suszarce laboratoryjnej i zważyć jeszcze raz.

Różnica między dwoma ważeniami nie może przekroczyć 10 mg. W razie takiego przekroczenia podgrzewać substancję ponownie przez okresy do 10 minut, po czym należy ją schłodzić i zważyć do uzyskania różnicy masy 10 mg lub mniejszej. Odnotować ostatnią masę kolby stożkowej.

Przeprowadzić dwa oznaczenia próbki badanej.

3. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW**3.1. Metoda obliczeń i wzór**

a) Ilość ekstraktu jako odsetek masy otrzymanego produktu wynosi:

$$S = m_1 \times \frac{100}{m_0}$$

▼ B

gdzie: S = jest odsetkiem masowym otrzymanego produktu,
 m_0 = jest masą, w gramach, porcji badanej,
 m_1 = jest masą, w gramach, ekstraktu po wysuszeniu.

Jako wynik przyjąć średnią arytmetyczną z dwóch oznaczeń, pod warunkiem spełnienia warunków powtarzalności.

Przedstawić wynik z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

- b) Ilość ekstraktu wyraża się w odniesieniu do suchej substancji zgodnie z następującym wzorem:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{zawartość procentowa oleju w ekstrakcie dla suchej masy}$$

gdzie: S = to odsetek ekstraktu na podstawie otrzymanego produktu (patrz a),

U = jest zawartością wilgoci i substancji lotnych.

3.2. Powtarzalność

Różnica między dwoma oznaczeniami wykonanymi równocześnie lub szybko jedno po drugim przez tego samego analityka nie może przekraczać 0,2 g ekstraktu heksanu na 100 g próbki.

W razie niespełnienia tego warunku powtórzyć analizę na dwóch innych porcjach badanych. Jeżeli także w tym przypadku różnica przekracza 0,2 g, przyjąć wynik jako średnią arytmetyczną z czterech wykonanych oznaczeń.



ZAŁĄCZNIK XVI

OZNACZENIE LICZBY JODOWEJ

1. ZAKRES

Niniejsza norma międzynarodowa określa metodę oznaczania liczby jodowej tłuszczów i olejów zwierzęcych i roślinnych, zwanych dalej tłuszczami.

2. DEFINICJA

Do celów niniejszej normy międzynarodowej ma zastosowanie następująca definicja:

2.1. *liczba jodowa* Masa jodu wchłonięta przez próbkę, w warunkach postępowania określonych w niniejszej normie międzynarodowej.

Liczbę jodową wyraża się jako liczbę gramów jodu na 100 g próbki.

3. ZASADA

Rozpuszczanie porcji badanej w rozpuszczalniku i dodanie odczynnika Wijsa. Po określonym czasie dodanie roztworu jodku potasu i wody oraz miareczkowanie uwolnionego jodu przy użyciu roztworu tiosiarczanu sodu.

4. ODCZYNNIKI

Wszystkie odczynniki muszą być odczynnikami o uznanej czystości do analiz:

4.1. *woda* spełniająca wymagania normy ISO 3696, stopień 3.4.2. *jodek potasu*, roztwór 100 g/l, niezawierający jodanu ani wolnego jodu.4.3. *skrobia*, roztwór.

Zmieszać 5 g skrobi rozpuszczalnej z 30 ml wody, dodać tę mieszaninę do 1 000 ml wrzącej wody, gotować przez trzy minuty i odstawić do schłodzenia.

4.4. *tiosiarczan sodu*, mianowany roztwór objętościowy $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$, standaryzowany nie wcześniej niż siedem dni przed użyciem.4.5. *rozpuszczalnik*, przygotowany przez zmieszanie równych ilości cykloheksanu i kwasu octowego.4.6. *odczynnik Wijsa*, zawierający monochlorek jodu w kwasie octowym. Należy zastosować odczynnik Wijsa dostępny w handlu.

5. APARATURA

Zwykła aparatura laboratoryjna, w szczególności następująca:

5.1. *szklane szufelki* do odważania substancji, nadające się do pobrania porcji badanej i wprowadzenia jej do kolb (6.2).5.2. *kolby stożkowe*, o pojemności 500 ml, wyposażone w szlifowane korki szklane i całkowicie suche.

6. PRZYGOTOWANIE PRÓBKI BADANEJ

Homogenizowaną próbkę suszy się nad siarczanem sodowym i filtruje.

7. PROCEDURA

7.1. Porcja badana

Masa porcji badanej zmienia się w zależności od spodziewanej liczby jodowej, jak przedstawiono w tabeli 1.

▼ B

Tabela 1

Oczekiwana liczba jodowa	Masa badanej próbki
poniżej 5	3,00
5 do 20	1,00
21 do 50	0,40
51 do 100	0,20
101 to 150	0,13
151 do 200	0,10

Badaną próbkę należy odważyć z dokładnością do 0,1 mg na szklanej szalce (5.1).

7.2. Oznaczanie

Badaną próbkę umieścić w kolbie o pojemności 500 ml (6.2). Dodać 20 ml rozpuszczalnika (4.5), w celu rozpuszczenia tłuszczu. Dodać dokładnie 25 ml odczynnika Wijs'a (4.6), zakorkować, zawartość zawirować i umieścić kolbę w ciemni. Do odczynnika Wijs'a nie wolno używać pipety doustnej.

Podobnie należy przygotować ślepą próbę z rozpuszczalnikiem i odczynnikiem, lecz z pominięciem badanej próbki.

W przypadku próbek o liczbie jodowej poniżej 150, kolby należy pozostawić na godzinę w ciemni; próbki o liczbie jodowej powyżej 150 oraz produkty poddane polimeryzacji lub utlenione w znacznym stopniu należy pozostawić na dwie godziny.

Pod koniec określonego czasu, do każdej kolby należy dodać 20 ml roztworu jodku potasu (4.2) oraz 150 ml wody (4.1).

Miareczkować przy pomocy standardowego roztworu pomiarowego tiosiarczanu sodu (4.4) aż do momentu, kiedy żółte zabarwienie od jodiny stanie się prawie niewidoczne. Dodać kilka kropli roztworu skrobiowego (4.3) i kontynuować miareczkowanie do chwili, w której niebieskie zabarwienie zniknie po bardzo energicznym wstrząśnięciu.

Uwaga: Dopuszczalne jest oznaczanie potencjometryczne punktu końcowego.

7.3. Liczba oznaczeń

Jedną próbkę analityczną oznacza się dwukrotnie.

8. Wyrażanie wyników

Liczbę jodową podaje się za pomocą wzoru

$$\frac{12,69 c (V_1 - V_2)}{m}$$

gdzie:

c = wartość liczbową dokładnego stężenia użytego standardowego roztworu pomiarowego tiosiarczanu sodu (4.4), wyrażona w molach na litr;

V_1 = wartość liczbową objętości standardowego roztworu pomiarowego tiosiarczanu sodu (4.4) użytego do ślepej próby, wyrażona w mililitrach;

▼B

V_2 = wartość liczbową objętości standardowego roztworu pomiarowego tiosiarczanu sodu (4.4) użytego do oznaczenia, wyrażona w mililitrach;

m = wartość liczbową masy badanej próbki (7.1), wyrażona w gramach.

Wynik będzie średnią arytmetyczną z dwóch oznaczeń, pod warunkiem spełnienia wymogu w zakresie powtarzalności (9.2).

▼ **M11***ZAŁĄCZNIK XVII***METODA OZNACZANIA STIGMASTADIENÓW W OLEJACH ROŚLINNYCH**

1. CEL
oznaczanie stigmastadienów w olejach roślinnych o niskim stężeniu tych węglowodorów, w szczególności w oliwie z oliwek pierwszego tłoczenia i surowej oliwie z wyciżczyn oliwek.
2. ZAKRES
norma może być stosowana do wszystkich olejów roślinnych, chociaż wyniki pomiarów są pewne tylko przy zawartości tych węglowodorów między 0,01 i 4,0 mg/kg. Metoda ta jest szczególnie przydatna do wykrywania obecności rafinowanych olejów roślinnych (z oliwek, wyciżczyn oliwek, słonecznika, palmy itd.) w oliwie z oliwek pierwszego tłoczenia, ponieważ oleje rafinowane zawierają stigmastadieny, a oliwy z pierwszego tłoczenia ich nie zawierają.
3. ZASADA
wyodrębnienie substancji niezmydlających się. Oddzielenie steroidowej frakcji węglowodorowej przez chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym i analiza przez kapilarną chromatografię gazową.
4. APARATURA
 - 4.1. Kolby 250 ml nadające się do użycia z chłodnicą zwrotną.
 - 4.2. Rozdzielacze o pojemności 200 ml.
 - 4.3. 100 ml kolby okrągłodenne.
 - 4.4. Wyparka obrotowa.
 - 4.5. Szklana kolumna chromatograficzna (o średnicy wewnętrznej 1,5 do 2 cm na 50 cm długości) z teflonowym gwintownikiem oraz zatyczką z waty szklanej lub krążkiem ze spiekane szkła na dnie. W celu przygotowania kolumny z żelu krzemionkowego wlać heksan do kolumny chromatograficznej na wysokość około 5 cm, a następnie wypełnić zawiesiną żelu krzemionkowego w heksanie (15 g w 40 ml) za pomocą heksanu podzielonego na części. Odstawić do opadnięcia i zakończyć osadzanie, stosując lekkie drgania. Dodać bezwodny siarczan sodowy do wysokości około 0,5 cm, na koniec wymyć nadmiar heksanu.
 - 4.6. Chromatograf gazowy z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym, nastrzyk z dzieleniem strumienia lub zimny nakolumnowy wtryskiwacz i piec programowalny z dokładnością do ± 1 C.
 - 4.7. Kolumna kapilarna ze stopionej krzemionki do chromatografii gazowej (o średnicy wewnętrznej 0,25 lub 0,32 mm na 25 cm długości pokryta 5%-fenylometylosilikonową fazą, o grubości filmu 0,25 mm.
Uwaga 1:
Można użyć innych kolumn o podobnej lub niższej biegunowości.
 - 4.8. Integrator-rejestrator z trybem integracji dolina-dolina.
 - 4.9. 5-10 μ l mikrostrzykawka do chromatografii gazowej z umocowaną na stałe igłą.
 - 4.10. Elektryczny płaszcz grzejny lub gorące miejsce.

▼ M11

5. ODCZYNNIKI

Wszystkie odczynniki muszą być jakości analitycznej, chyba że określono inaczej. Używana woda musi być wodą destylowaną lub wodą o porównywalnym stopniu czystości.

- 5.1. Heksan lub mieszanina alkanów o przedziale temperatury wrzenia 65 do 70 °C, destylowana w kolumnie rektyfikacyjnej.

Uwaga 2:

Rozpuszczalnik musi być przedestylowany w celu usunięcia zanieczyszczeń.

- 5.2. 96 % (procent objętościowy) alkoholu etylowego.

- 5.3. Bezwodny siarczan sodu.

- 5.4. 10-procentowy alkoholowy roztwór wodorotlenku potasu. Dodać 10 ml wody do 50 g wodorotlenku potasu, wymieszać, a następnie rozpuścić mieszanę w etanolu do 500 ml.

Uwaga 3:

Alkoholowy potaż brązowieje przy przechowywaniu. Powinien być przygotowywany świeży każdego dnia i trzymany w dobrze zakorkowanych butelkach z ciemnego szkła.

- 5.5. Żel krzemionkowy 60 do chromatografii kolumnowej, siatka 70 do 230 (Merck, nr referencyjny 7734 lub podobny).

Uwaga 4:

Zazwyczaj można używać żelu krzemionkowego prosto z pojemnika bez żadnej obróbki. Jednakże niektóre partie żelu krzemionkowego mogą wykazywać niską aktywność, która daje w rezultacie złe wyniki oddzielania chromatograficznego. W takich okolicznościach należy postąpić w następujący sposób: Aktywować żel krzemionkowy podgrzewając go, przez co najmniej cztery godziny w temp. 550 C. Po podgrzaniu umieścić żel krzemionkowy w eksykatorze na czas stygnięcia, a potem przenieść go do zakorkowanej kolby. Dodać 2 % wody i potrząsać, dopóki wszystkie grudki nie zostaną rozbite, a proszek będzie swobodnie pływał.

Jeżeli któraś partia żelu krzemionkowego daje chromatogramy o interferujących pikach, należy z nim postąpić jak wyżej. Alternatywą może być użycie żelu krzemionkowego 60 o wyjątkowym stopniu czystości (Merck, nr 7754).

- 5.6. Roztwór podstawowy (200 części na milion, ang. ppm) cholesta-3,5-dieniu (Sigma, czystość 99 %) w heksanie (10 mg w 50 ml).

- 5.7. Roztwór mianowany heksanu cholesta-3,5-dieniu w stężeniu 20 części na milion (ppm), otrzymanym przez rozcieńczenie powyższego roztworu.

Uwaga 5:

Roztwory 5.6 i 5.7 są trwałe przez okres czterech miesięcy, jeżeli przechowuje się je w temperaturze niższej niż 4 °C.

- 5.8. Roztwór n-nonakozanu w heksanie w stężeniu około 100 części na milion.

- 5.9. Gaz nośny do chromatografii: hel lub wodór o 99,9990 % czystości.

- 5.10. Gazy pomocnicze do detektora płomieniowo-jonizacyjnego: wodór o 99,9990 % czystości i oczyszczone powietrze.

▼ M11**6. PROCEDURA****6.1. Przygotowanie substancji niezmydlącej się**

- 6.1.1. Odważyć 20 ± 0.1 g oliwy do 250-ml kolby (4.1), dodać 1 ml roztworu podstawowego cholesta-3,5-dieniu ($20 \mu\text{g}$) i 75 ml 10-procentowego alkoholowego potażu, dopasować chłodnicę zwrotną, i podgrzewać do lekkiego wrzenia przez 30 minut. Zdjąć kolbę z próbką z ognia i odstawić, żeby nieco ostygła (nie wolno dopuścić do zupełnego ostygnięcia, ponieważ próbka zestali się). Dodać 100 ml wody i przenieść roztwór do rozdzielacza (4.2) przy pomocy 100 ml heksanu. Wstrząsać mieszaninę energicznie przez 30 sekund i odstawić do oddzielenia.

Uwaga 6:

Jeśli powstanie zawiesina, która nie zniknie w szybkim czasie, dodać małe ilości alkoholu etylowego.

- 6.1.2. Przenieść fazę wodną do drugiego rozdzielacza i ponownie ekstrahować za pomocą 100 ml heksanu. Jeszcze raz zlać niższą fazę i wyciąć ekstrakty heksanu (połączone w kolejnym rozdzielaczu) trzy razy używając 100 ml mieszaniny etanol-woda (1:1) za każdym razem, dopóki pH nie stanie się obojętne.
- 6.1.3. Przepuścić roztwór heksanu przez bezwodny siarczan sodowy (50 g), wyciąć 20 mililitrami heksanu i odparowywać w wyparce obrotowej w temperaturze $30 \text{ }^\circ\text{C}$ pod zmniejszonym ciśnieniem aż do suchości.

6.2. Oddzielenie sterydowej frakcji węglowodorowej

- 6.2.1. Zebrać pozostałość do kolumny frakcjonującej przy pomocy dwóch 1-ml porcji heksanu, wprowadzić próbkę na kolumnę pozwalając, żeby poziom roztworu obniżył się do górnej powierzchni siarczanu sodowego i rozpocząć wymywanie chromatograficzne heksanem przy prędkości przepływu około 1 ml/min. Odrzucić pierwszych 25-30 ml eluatu, potem zebrać następnych 40 ml frakcji. Po zebraniu przenieść tę frakcję do 100-ml kolb okrągłodennych.

Uwaga 7:

Pierwsza frakcja zawiera węglowodory nasycone (rys 1a), a druga frakcja steroidowe. Dalsze wymywanie daje skwalen i pokrewne związki. W celu uzyskania dobrego oddzielenia węglowodorów nasyconych od steroidowych, niezbędna jest optymalizacja objętości frakcji. W tym celu należy dostosować objętość pierwszej frakcji tak, żeby przy analizowaniu drugiej frakcji piki reprezentujące węglowodory nasycone były niskie (patrz rys. 1c); jeżeli nie pojawiają się one, ale natężenie wzorcowego piksu jest niskie, objętość powinna zostać zmniejszona. Zresztą całkowite oddzielenie komponentów pierwszej frakcji od drugiej nie jest potrzebne, ponieważ w czasie analizy przez chromatografię gazową piki nie nakładają się na siebie, jeżeli warunki chromatografii gazowej są takie, jak wskazano w pkt 6.1.3. Optymalizacja objętości drugiej frakcji nie jest generalnie potrzebna, jako że istnieje dobra separacja z dalszymi składnikami. Niemniej jednak wystąpienie dużego piksu przy około 1,5 minuty krótszym czasie retencji niż normalny jest spowodowane przez skwalen i jest oznaką złej separacji.

- 6.2.2. Odparować drugą frakcję w wyparce obrotowej w temperaturze $30 \text{ }^\circ\text{C}$ pod zmniejszonym ciśnieniem do suchości i natychmiast rozpuścić pozostałość w 0,2 ml heksanu. Przechowywać roztwór w lodówce do czasu analizy.

Uwaga 8:

Pozostałości pkt 6.1.3 i 6.2.2 nie powinny być przechowywane na sucho i w temperaturze pokojowej. Zaraz po otrzymaniu należy dodać rozpuszczalnik, a roztwory przechowywać w lodówce

▼ M11**6.3. Chromatografia gazowa****6.3.1. Warunki pracy podzielonej iniekcji:**

- temperatura iniektora: 300 °C,
- temperatura detektora: 320 °C,
- integrator-rejestrator: parametry integracji powinny być ustalone tak, żeby oszacowanie pól było właściwe. Zalecany jest tryb integracji dolina-dolina.
- czułość: około 16 razy większa od minimalnego tłumienia,
- ilość wprowadzonego roztworu: 1 µl,
- temperatury programowania pieca: na wstępie 235 °C przez sześć minut, potem zwiększanie o 2 °C na minutę do 285 °C,
- iniektor z rozdzielaczem przepływu 1:15,
- nośnik: hel lub wodór o ciśnieniu około 120 kPa.

Warunki te muszą być dostosowane do właściwości chromatografu i kolumny, tak, żeby chromatogramy spełniały następujące wymagania: wewnętrzny pik standardowy w ciągu około pięciu minut od czasu podanego w ppkt 6.3.2., wewnętrzny pik standardowy powinien być w co najmniej 80 % pełnej skali.

Układ chromatografii gazowej musi zostać sprawdzony przez wstrzyknięcie mieszanki podstawowego roztworu cholestadienu (5.6) i roztworu n-nonakozanu (5.8). Pik cholesta-3,5-dieniu musi pojawić się przed pikiem n-nonakozanu (rys. 1c); jeżeli tak się nie dzieje, można podjąć dwa działania: zmniejszyć temperaturę pieca lub użyć mniej polarnej kolumny.

6.3.2. Identyfikacja pików

Wewnętrzny standardowy pik pojawia się w około 19 minucie, a 3,5-stigmastadien we względnym czasie retencji 1,29 (patrz rys. 1b). 3,5-stigmastadien pojawia się z małymi ilościami izomeru i zazwyczaj oba wymywają się razem jako pojedynczy pik chromatograficzny. Niemniej jednak, jeżeli kolumna jest zbyt polarna lub wykazuje dużą rozdzielczość, izomer może pojawić się jako mały pik przed pikiem stygmasta-3,5-dieniu (rys. 2). Aby zagwarantować, że stigmastadieny będą eluowane jako jeden pik, należałoby kolumnę zastąpić kolumną albo mniej polarną albo kolumną o większej średnicy wewnętrznej.

Uwaga 9:

Stigmastadieny odniesienia mogą być otrzymane z analizy jakiegoś rafinowanego oliwy roślinnego przez użycie mniejszej ilości próbki (1 do 2 g). Stigmastadieny dają wystający i łatwo rozpoznawalny pik.

6.3.3. Analiza ilościowa

Zawartość stigmastadienów jest określana według wzoru:

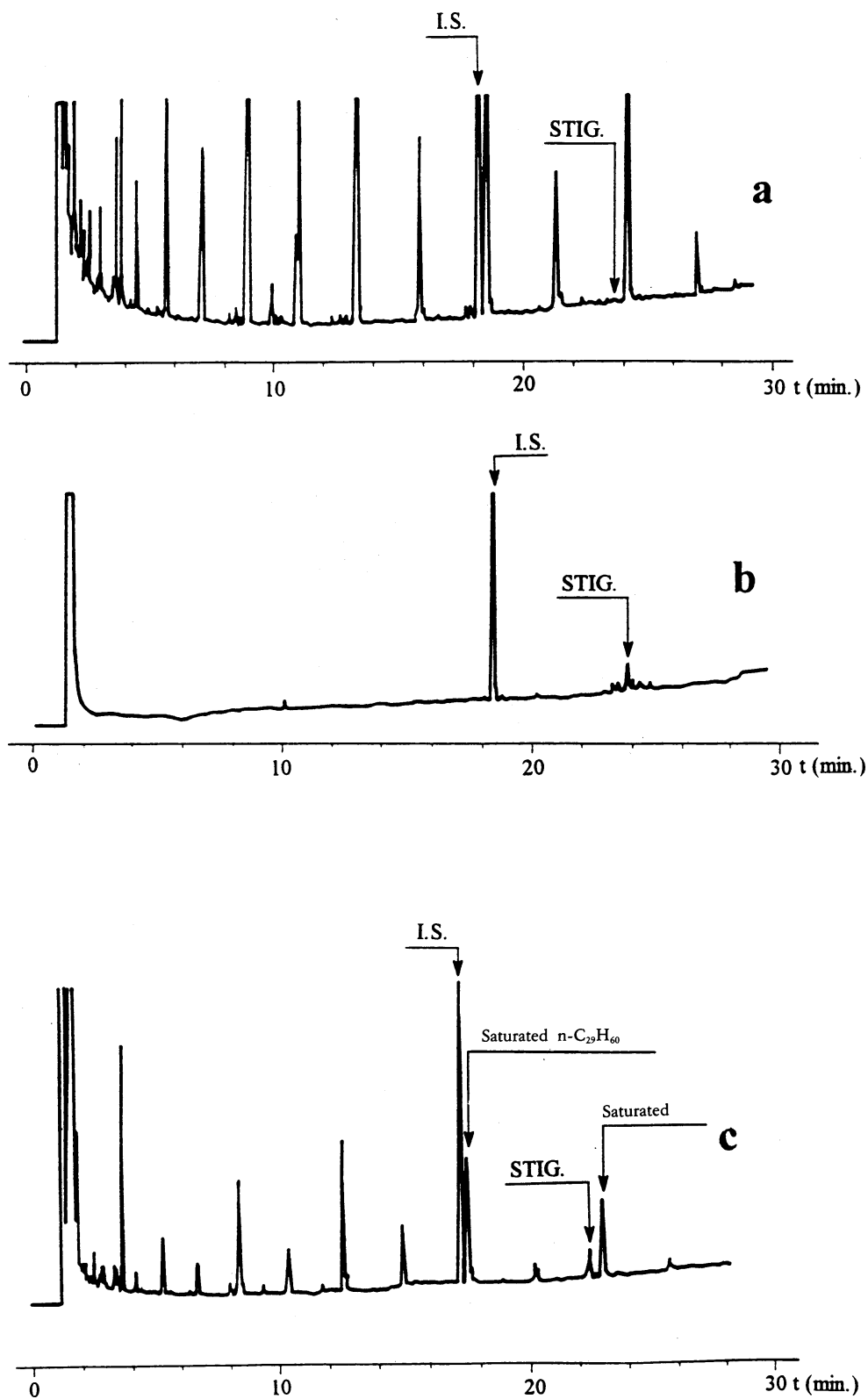
Dodaje się zał. XVII w brzmieniu: $\frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$

▼ M11

gdzie: A_s = pole pików stigmastadienów (jeżeli pik jest rozdzielony na dwa izomery, suma pól tych dwóch pików),
 A_c = pole wewnętrznego standardu (cholestadien),
 M_c = masa standardu dodanego, w mikrogramach,
 M_o = masa użytej oliwy, w gramach.

Granica wykrycia: około 0,01 mg/kg.

▼ M11

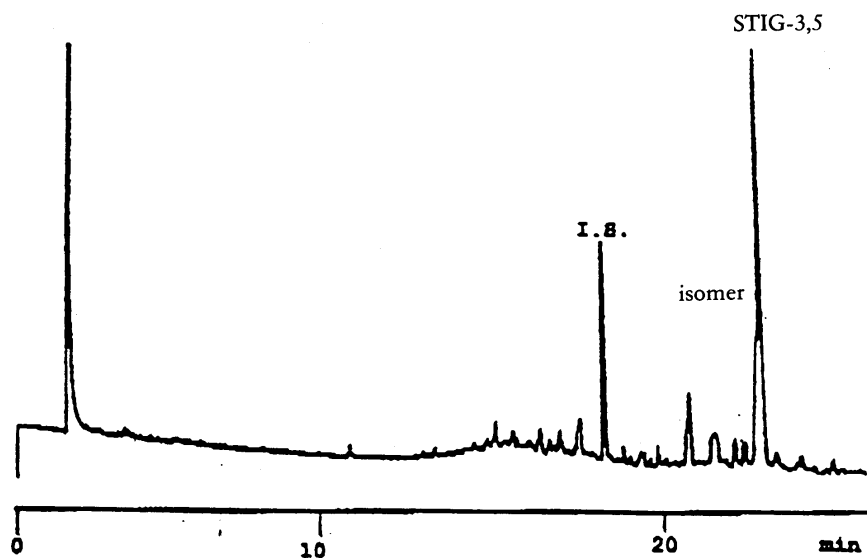


Rysunek 1

Chromatogramy gazowe otrzymane z próbek oliwy z oliwek analizowanych na kapilarnej kolumnie ze stopionej krzemionki (o średnicy wewnętrznej 0,25 mm na 25 m długości) pokrytej 5% fenylometylosilikonem, o grubości filmu 0,25 μm .

▼ **M11**

- a) Pierwsza frakcja (30 ml) z oliwy pierwszego tłoczenia, oznaczona standardem.
- b) Druga frakcja (40 ml) z oliwy z oliwek zawierającej 0,10 mg/kg stigmastadienów.
- c) Druga frakcja (40 ml) zawierająca małą porcję pierwszej frakcji.



Rysunek 2

Chromatogram gazowy otrzymany z próbki rafinowanej oliwy z oliwek analizowanej w kolumnie DB-5, wykazujący obecność izomeru 3,5-stigmastadienu.

▼ **M25***ZALĄCZNIK XVIII***OZNACZENIE RÓŻNICY MIĘDZY RZECZYWISTĄ A TEORETYCZNĄ ZAWARTOŚCIĄ TRIGLICERYDÓW Z ECN 42****1. ZAKRES**

Oznaczenie różnicy bezwzględnej między wartościami doświadczalnymi triglicerydów (TAG) z równoważną liczbą atomów węgla 42 (ECN₄₂^{HPLC}) uzyskanymi poprzez oznaczenie ich zawartości w oliwie metodą wysokowydajnej chromatografii cieczowej (HPLC) a wartością teoretyczną TAG z równoważną liczbą atomów węgla 42 (ECN 42^{teoretyczny}) obliczoną na podstawie składu kwasu tłuszczowego.

2. DZIEDZINA ZASTOSOWANIA

Metoda ma zastosowanie do oliwy z oliwek. Metodę stosuje się do wykrywania obecności małych ilości olejów z nasion (zawierających dużo kwasu linolowego) we wszystkich klasach oliwy z oliwek.

3. ZASADA

W przypadku czystej oliwy z oliwek zawartość triglicerydów z ECN 42 oznaczona metodą analizy HPLC oraz teoretyczna zawartość triglicerydów z ECN 42 (obliczona na podstawie oznaczenia składu kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowo-cieczowej (GLC)) są sobie równe w pewnych granicach. Różnice większe niż wartości przyjęte dla każdego rodzaju oliwy świadczą, że oliwa zawiera oleje z nasion.

4. METODA

Metoda obliczania teoretycznej zawartości triglicerydów z ECN 42 oraz różnicy w stosunku do danych uzyskanych metodą HPLC polega w zasadzie na koordynacji danych analitycznych uzyskanych innymi metodami. Można wyróżnić trzy fazy: oznaczenie składu kwasów tłuszczowych metodą kapilarną chromatografii gazowej, obliczenie teoretycznego składu triglicerydów z ECN 42, oznaczenie triglicerydów z ECN 42 metodą HPLC.

4.1. Aparatura

- 4.1.1. Kolby okrągłodenne o pojemności 250 i 500 ml.
- 4.1.2. Zlewki 100 ml.
- 4.1.3. Szklana kolumna chromatograficzna, o średnicy wewnętrznej 21 mm, długości 450 mm, z kranikiem i znormalizowanym szlifem górnym (żeńskim).
- 4.1.4. Rozdzielacze, 250 ml, ze znormalizowanym szlifem dolnym (męskim), dopasowanym do połączenia z górą kolumny.
- 4.1.5. Szklana pałeczka o długości 600 mm.
- 4.1.6. Szklany lejek o średnicy 80 mm.
- 4.1.7. Kolby miarowe, 50 ml.
- 4.1.8. Kolby miarowe, 20 ml.
- 4.1.9. Wyparka obrotowa.
- 4.1.10. Wysokowydajny chromatograf cieczowy umożliwiający termostatyczną kontrolę temperatury kolumny.
- 4.1.11. Zespoły iniekcyjne dla pojemności 10 µl.
- 4.1.12. Detektor: refraktometr różnicowy. Czulość w pełnej skali powinna wynosić co najmniej 10^{-4} jednostek detekcji refraktometrycznej.

▼ **M25**

4.1.13. Kolumna: rura ze stali nierdzewnej o długości 250 mm i wewnętrznej średnicy 4,5 mm, wypełniona cząsteczkami krzemionki o średnicy 5 µm zawierających 22-23 % węgla w postaci oktadecylosilanu.

4.1.14. Oprogramowanie do przetwarzania danych.

4.1.15. Fiolki, o objętości około 2 ml, z przegrodami z warstw teflonu i zakrętkami.

4.2. **Odczynniki**

Odczynniki powinny charakteryzować się czystością analityczną. Rozpuszczalniki elucyjne należy odgazować i mogą one być ponownie użyte kilka razy bez wpływu na operacje oddzielania.

4.2.1. Eter naftowy 40–60 °C o klasie czystości do chromatografii lub heksan.

4.2.2. Eter etylowy, wolny od nadtlenu, świeżo destylowany.

4.2.3. Rozpuszczalnik elucyjny do oczyszczania oliwy metodą chromatografii kolumnowej w mieszaninie eteru naftowego z eterem etylowym 87/13 (ułamek objętościowy).

4.2.4. Żel krzemionkowy, sito 70–230, rodzaj Merck 7734, o znormalizowanej zawartości wilgoci na poziomie 5 % (wartość procentowa masy – w/w/).

4.2.5. Wata szklana.

4.2.6. Aceton do HPLC.

4.2.7. Acetonitryl lub propionitryl do HPLC.

4.2.8. Rozpuszczalnik elucyjny do HPLC: acetonitryl + aceton (proporcje należy dostosować w celu uzyskania pożądanego oddzielenia; zaczynając od mieszaniny 50:50) lub propionitryl.

4.2.9. Rozpuszczalnik do rozpuszczania: aceton.

4.2.10. Triglicerydy wzorcowe: można zastosować triglicerydy handlowe (tripalmitynian, trioleinian itp.) i wtedy czasy retencji można nanieść zgodnie z równoważną liczbą atomów węgla lub alternatywnie chromatogramy wzorcowe uzyskane z oleju sojowego, mieszaniny oleju sojowego i oliwy z oliwek w proporcji 30:70 oraz czystej oliwy z oliwek (zob. uwagi 1 i 2 oraz rysunki 1–4).

4.2.11. Kolumnienka do ekstrakcji do fazy stałej z zastosowaniem fazy krzemionki 1 g, 6 ml.

4.3. **Przygotowanie próbek**

Jako że szereg substancji interferujących może mieć wpływ na wyniki fałszywie dodatnie, próbkę zawsze należy oczyścić zgodnie z metodą IUPAC 2.507, stosowaną do oznaczania związków jonowych w tłuszczach do smażenia.

4.3.1. *Przygotowanie kolumny chromatograficznej*

Do kolumny (4.1.3) wlać około 30 ml rozpuszczalnika elucyjnego (4.2.3), następnie do kolumny wprowadzić watę szklaną (4.2.5), przeciskając ją na dno kolumny za pomocą szklanej pałeczki (4.1.5).

W zlewce 100 ml sporządzić zawiesinę 25 g żelu krzemionkowego (4.2.4) w 80 ml mieszaniny elucyjnej (4.2.3), następnie przenieść ją do kolumny za pomocą szklanego lejka (4.1.6).

Aby zapewnić całkowite przeniesienie żelu krzemionkowego do kolumny, opłukać zlewkę mieszaniną elucyjną i przenieść do kolumny również pozostałości po opłukaniu.

Otworzyć kranik i spuścić rozpuszczalnik z kolumny, aż osiągnie poziom około 1 cm powyżej żelu krzemionkowego.

▼ **M25**4.3.2. *Chromatografia kolumnowa*

Z dokładnością do 0,001 g odważyć $2,5 \pm 0,1$ g oliwy, uprzednio przefiltrowanej, homogenizowanej i odwodnionej, w razie konieczności, w kolbie miarowej 50 ml (4.1.7).

Rozpuścić ją w około 20 ml rozpuszczalnika elucyjnego (4.2.3). W razie konieczności podgrzać go nieco, aby ułatwić rozpuszczanie. Ochłodzić w temperaturze pokojowej i dostosować objętość rozpuszczalnikiem elucyjnym.

Pipetą miarową wprowadzić 20 ml roztworu do kolumny przygotowanej zgodnie z pkt 4.3.1, otworzyć kranik i spuścić rozpuszczalnik do poziomu warstwy żelu krzemionkowego.

Następnie zlać za pomocą 150 ml rozpuszczalnika elucyjnego (4.2.3), ustawiając szybkość przepływu rozpuszczalnika na około 2 ml/min (150 ml przejdzie przez kolumnę w ciągu około 60–70 minut).

Odciek zbiera się do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml (4.1.1) uprzednio wytarowanej w piecu i dokładnie zważonej. Usunąć rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem w wyparce obrotowej (4.1.9) i zważyć pozostałość, która będzie wykorzystana do przygotowania roztworu do analizy HPLC oraz do przygotowania estru metylowego.

Poziom odzyskania próbki z kolumny musi wynosić co najmniej 90 % w przypadku kategorii oliwy z oliwek ekstra z pierwszego tłoczenia, oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia, oliwy rafinowanej zwyczajnie i oliwy z oliwek oraz co najmniej 80 % w przypadku oliwy z oliwek typu lampante i oliwy z wyciżczyn oliwek.

4.3.3. *Oczyszczanie SPE*

Kolumna z wkładem krzemionkowym SPE jest aktywowana poprzez przepuszczenie 6 ml heksanu (4.2.3) w próżni, unikając suchości.

Z dokładności do 0,001 g odważyć 0,12 g w fiolce 2 ml (4.1.15) i rozpuścić w 0,5 ml heksanu (4.2.3).

Kolumnę SPE napełnić roztworem i zlać za pomocą 10 ml mieszaniny heksanu i eteru dietylowego (87:13 w proporcji objętościowej) (4.2.3) w próżni.

Zebrałą frakcję należy odparować do suchości w wyparce obrotowej (4.1.9) pod zmniejszonym ciśnieniem, w temperaturze pokojowej. Pozostałość rozpuszcza się w 2 ml acetonu (4.2.6) na potrzeby analizy triglicerydów (TAG).

4.4. **Analiza HPLC**4.4.1. *Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej*

Przygotować 5 % roztwór próbki przeznaczonej do analizy, odważając $0,5 \pm 0,001$ g próbki w kolbie miarowej o pojemności 10 ml i uzupełnić do 10 ml rozpuszczalnikiem do rozpuszczania (4.2.9).

4.4.2. *Procedura*

Utworzyć układ chromatograficzny. Wpompować rozpuszczalnik elucyjny (4.2.8) w tempie 1,5 ml/min w celu oczyszczenia całego układu. Odczekać do uzyskania stabilnej linii podstawowej.

Wstrzyknąć 10 µl próbki przygotowanej zgodnie z pkt 4.3.

4.4.3. *Obliczanie i formułowanie wyników*

Zastosować metodę normalizacji powierzchni (normalizacji wewnętrznej), to znaczy założyć, że suma powierzchni pików odpowiadających poszczególnym triglicerydom od ECN 42 do ECN 52 wynosi 100 %.

Obliczyć względny procentowy udział każdego triglicerydu, stosując następujący wzór:

procentowy udział triglicerydu [%] = $\frac{\text{powierzchnia pików}}{\text{suma powierzchni pików}} \times 100$

Wyniki należy podawać co najmniej do dwóch miejsc po przecinku.

Zob. uwagi 1–4.

▼ **M25**4.5. **Obliczenie składu triglicerydów (odsetka molowego [%]) na podstawie danych dotyczących składu kwasów tłuszczowych (procentowego udziału powierzchni [%])**4.5.1. *Oznaczenie składu kwasów tłuszczowych*

Skład kwasów tłuszczowych oznacza się zgodnie z normą ISO 5508 za pomocą kolumny kapilarnej. Estry metylowe są przygotowywane zgodnie z COI/T.20/Doc. nr 24.

4.5.2. *Kwasy tłuszczowe przyjmowane do obliczeń*

Glicerydy są grupowane według równoważnej liczby atomów węgla (ECN), przy uwzględnieniu poniższych ekwiwalencji między ECN a kwasami tłuszczowymi. Uwzględniono jedynie kwasy tłuszczowe z liczbą atomów węgla 16 i 18, ponieważ tylko one są istotne w odniesieniu do oliwy z oliwek. Kwasy tłuszczowe należy normalizować do 100 %.

Kwas tłuszczowy	Skrót	Masa cząsteczkowa (MW)	ECN
Kwas palmitynowy	P	256,4	16
Kwas oleopalmitynowy	Po	254,4	14
Kwas stearynowy	S	284,5	18
Kwas oleinowy	O	282,5	16
Kwas linolowy	L	280,4	14
Kwas linolenowy	Ln	278,4	12

4.5.3. *Przekształcenie procentowego udziału powierzchni (% pow.) w liczbę moli w odniesieniu do wszystkich kwasów tłuszczowych (1)*

$$\text{liczba moli P} = \frac{\% \text{ pow. P}}{\text{MW P}} \quad \text{liczba moli S} = \frac{\% \text{ pow. S}}{\text{MW S}} \quad \text{liczba moli Po} = \frac{\% \text{ pow. Po}}{\text{MW Po}}$$

$$\text{liczba moli O} = \frac{\% \text{ pow. O}}{\text{MW O}} \quad \text{liczba moli L} = \frac{\% \text{ pow. L}}{\text{MW L}} \quad \text{liczba moli Ln} = \frac{\% \text{ pow. Ln}}{\text{MW Ln}}$$

4.5.4. *Normalizacja liczby moli kwasów tłuszczowych do 100 % (2)*

$$\% \text{ molowy P (1,2,3)} = \frac{\text{l. moli P} * 100}{\text{l. moli (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ molowy S (1,2,3)} = \frac{\text{l. moli S} * 100}{\text{l. moli (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ molowy Po (1,2,3)} = \frac{\text{l. moli Po} * 100}{\text{l. moli (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ molowy O (1,2,3)} = \frac{\text{l. moli O} * 100}{\text{l. moli (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ molowy L (1,2,3)} = \frac{\text{l. moli L} * 100}{\text{l. moli (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

$$\% \text{ molowy Ln (1,2,3)} = \frac{\text{l. moli Ln} * 100}{\text{l. moli (P + S + Po + O + L + Ln)}}$$

Uzyskuje się procentowy udział każdego kwasu tłuszczowego jako odsetek molowy (% molowy) w ogólnej (1, 2, 3-) pozycji triglicerydów.

Następnie oblicza się sumę nasyconych kwasów tłuszczowych P i S (SFA) oraz nienasycone kwasy tłuszczowe Po, O, L i Ln (UFA) (3):

$$\% \text{ molowy SFA} = \% \text{ molowy P} + \% \text{ molowy S}$$

$$\% \text{ molowy UFA} = 100 - \% \text{ molowy SFA}$$

▼ **M25**4.5.5. *Obliczenie składu kwasów tłuszczowych w pozycjach 2- i 1,3- triglicerydów*

Kwasy tłuszczowe rozkładają się na trzy grupy w następujący sposób: jedna na pozycję 2-, a dwie identyczne na pozycje 1- i 3-, przy czym do kwasów nasyconych (P i S) i nienasyconych (Po, O, L i Ln) odnoszą się różne współczynniki.

4.5.5.1. Nasycone kwasy tłuszczowe w pozycji 2- [P(2) i S(2)] (4)

$$\% \text{ molowy P(2)} = \% \text{ molowy P(1,2,3)} * 0,06$$

$$\text{molowy \% S(2)} = \% \text{ molowy S(1,2,3)} * 0,06$$

4.5.5.2. Nienasycone kwasy tłuszczowe w pozycji 2- [Po(2), O(2), L(2) i Ln(2)] (5):

$$\% \text{ molowy Po(2)} = \frac{\% \text{ mol. Po(1,2,3)}}{\% \text{ mol. UFA}} * (100 - \% \text{ mol. P(2)} - \% \text{ mol. S(2)})$$

$$\% \text{ molowy O(2)} = \frac{\% \text{ mol. O(1,2,3)}}{\% \text{ mol. UFA}} * (100 - \% \text{ mol. P(2)} - \% \text{ mol. S(2)})$$

$$\% \text{ molowy L(2)} = \frac{\% \text{ mol. L(1,2,3)}}{\% \text{ mol. UFA}} * (100 - \% \text{ mol. P(2)} - \% \text{ mol. S(2)})$$

$$\% \text{ molowy Ln(2)} = \frac{\% \text{ mol. Ln(1,2,3)}}{\% \text{ mol. UFA}} * (100 - \% \text{ mol. P(2)} - \% \text{ mol. S(2)})$$

4.5.5.3. Kwasy tłuszczowe w pozycjach 1,3- [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) i Ln(1,3)] (6):

$$\% \text{ molowy P(1,3)} = \frac{\% \text{ mol. P(1,2,3)} - \% \text{ mol. P(2)}}{2} + \% \text{ mol. P(1,2,3)}$$

$$\% \text{ molowy S(1,3)} = \frac{\% \text{ mol. S(1,2,3)} - \% \text{ mol. S(2)}}{2} + \% \text{ mol. S(1,2,3)}$$

$$\% \text{ molowy Po(1,3)} = \frac{\% \text{ mol. Po(1,2,3)} - \% \text{ mol. Po(2)}}{2} + \% \text{ mol. Po(1,2,3)}$$

$$\% \text{ molowy O(1,3)} = \frac{\% \text{ mol. O(1,2,3)} - \% \text{ mol. O(2)}}{2} + \% \text{ mol. O(1,2,3)}$$

$$\% \text{ molowy L(1,3)} = \frac{\% \text{ mol. L(1,2,3)} - \% \text{ mol. L(2)}}{2} + \% \text{ mol. L(1,2,3)}$$

$$\% \text{ molowy Ln(1,3)} = \frac{\% \text{ mol. Ln(1,2,3)} - \% \text{ mol. Ln(2)}}{2} + \% \text{ mol. Ln(1,2,3)}$$

4.5.6. *Obliczenie triglicerydów*

4.5.6.1. Triglicerydy z jednym kwasem tłuszczowym (AAA, w tym przypadku LLL, PoPoPo) (7)

$$\% \text{ molowy AAA} = \frac{\% \text{ mol. A(1,3)} * \% \text{ mol. A(2)} * \% \text{ mol. A(1,3)}}{10\ 000}$$

4.5.6.2. Triglicerydy z dwoma kwasami tłuszczowymi (AAB, w tym przypadku PoPoL, PoLL) (8)

$$\% \text{ molowy AAB} = \frac{\% \text{ mol. A(1,3)} * \% \text{ mol. A(2)} * \% \text{ mol. B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\% \text{ molowy ABA} = \frac{\% \text{ mol. A(1,3)} * \% \text{ mol. B(2)} * \% \text{ mol. A(1,3)}}{10\ 000}$$

▼ **M25**

4.5.6.3. Triglicerydy z trzema różnymi kwasami tłuszczowymi (ABC, w tym przypadku OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln) (9)

$$\% \text{ molowy ABC} = \frac{\% \text{ mol. A(1,3)} * \% \text{ mol. B(2)} * \% \text{ mol. C(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\% \text{ molowy BCA} = \frac{\% \text{ mol. B(1,3)} * \% \text{ mol. C(2)} * \% \text{ mol. A(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

$$\% \text{ molowy CAB} = \frac{\% \text{ mol. C(1,3)} * \% \text{ mol. A(2)} * \% \text{ mol. B(1,3)} * 2}{10\ 000}$$

4.5.6.4. Triglicerydy z ECN42

Triglicerydy z ECN42 oblicza się według wzorów 7, 8 i 9, a następnie podaje się je w kolejności przewidzianej elucji w HPLC (zazwyczaj jedynie trzy piki).

LLL

PoLL oraz izomer pozycyjny LPoL

OLLn oraz izomery pozycyjne OLnL i LnOL

PoPoL oraz izomer pozycyjny PoLPo

PoOLn oraz izomery pozycyjne OPoLn i OLnPo

PLLn oraz izomery pozycyjne LLnP i LnPL

PoPoPo

SLnLn oraz izomer pozycyjny LnSLn

PPoLn oraz izomery pozycyjne PLnPo i PoPLn

Triglicerydy z ECN42 podaje się w postaci sumy dziewięciu triglicerydów wraz z ich izomerami pozycyjnymi. Wyniki należy podawać z dokładnością co najmniej do dwóch miejsc po przecinku.

5. OCENA WYNIKÓW

Porównuje się obliczoną zawartość teoretyczną z zawartością oznaczoną metodą analizy HPLC. Jeżeli różnica między wartością bezwzględną danych z HPLC a danymi teoretycznymi jest większa niż wskazane w normie wartości dla odpowiedniej kategorii oliwy, to próbka zawiera olej z nasion.

Wyniki podaje się z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku.

6. PRZYKŁAD (DANE LICZBOWE ODNOSZĄ SIĘ DO SEKCJI TEKSTU DOTYCZĄCYCH OPISYWANEJ METODY)

— 4.5.1. *Obliczenie odsetka (%) molowego kwasów tłuszczowych na podstawie danych z GLC (znormalizowanego procentowego udziału [%] powierzchni)*

Metodą GLC uzyskano następujące dane dotyczące składu kwasów tłuszczowych:

Kwas tł.	P	S	Po	O	L	Ln
MW	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
% pow.	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼ **M25**

- 4.5.3 *Przekształcenie % powierzchni w liczbę moli w odniesieniu do wszystkich kwasów tłuszczowych (zob. wzór (1))*

$$\text{liczba moli P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ mola P}$$

$$\text{liczba moli S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ mola S}$$

$$\text{liczba moli Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ mola Po}$$

$$\text{liczba moli O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ mola O}$$

$$\text{liczba moli L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ mola L}$$

$$\text{liczba moli Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ mola Ln}$$

$$\text{Łącznie} = 0,35821 \text{ mola triglicerydów}$$

- 4.5.4 *Normalizacja liczby moli kwasów tłuszczowych do 100 % (zob. wzór (2))*

$$\% \text{ molowy P}(1, 2, 3) = \frac{0,03900 \text{ mola P} * 100}{0,35821 \text{ mola}} = 10,887 \%$$

$$\% \text{ molowy S}(1, 2, 3) = \frac{0,01054 \text{ mola S} * 100}{0,35821 \text{ mola}} = 2,942 \%$$

$$\% \text{ molowy Po}(1, 2, 3) = \frac{0,00393 \text{ mola Po} * 100}{0,35821 \text{ mola}} = 1,097 \%$$

$$\% \text{ molowy O}(1, 2, 3) = \frac{0,26549 \text{ mola O} * 100}{0,35821 \text{ mola}} = 74,116 \%$$

$$\% \text{ molowy L}(1, 2, 3) = \frac{0,03566 \text{ mola L} * 100}{0,35821 \text{ mola}} = 9,955 \%$$

$$\% \text{ molowy Ln}(1, 2, 3) = \frac{0,00359 \text{ mola Ln} * 100}{0,35821 \text{ mola}} = 1,002 \%$$

$$\text{Suma \% molowych} = 100 \%$$

Suma nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych w pozycjach 1,2,3- triglicerydów (zob. wzór (3)):

$$\% \text{ molowy SFA} = 10,887 \% + 2,942 \% = \mathbf{13,829 \%}$$

$$\% \text{ molowy UFA} = 100,000 \% - 13,829 \% = \mathbf{86,171 \%}$$

- 4.5.5 *Obliczenie składu kwasów tłuszczowych w pozycjach 2- i 1,3- triglicerydów*

- 4.5.5.1 *Nasycone kwasy tłuszczowe w pozycji 2- [P(2) i S(2)] (zob. wzór (4))*

$$\% \text{ molowy P}(2) = 10,887 \% * 0,06 = 0,653 \% \text{ molowego}$$

$$\% \text{ molowy S}(2) = 2,942 \% * 0,06 = 0,177 \% \text{ molowego}$$

- 4.5.5.2 *Nienasycone kwasy tłuszczowe w pozycji 2- [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) i Ln(1,3)] (zob. wzór (5))*

$$\% \text{ molowy Po}(2) = \frac{1,097 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,262 \% \text{ molowego}$$

$$\% \text{ molowy O}(2) = \frac{74,116 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 85,296 \% \text{ molowego}$$

$$\% \text{ molowy L}(2) = \frac{9,955 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 11,457 \% \text{ molowego}$$

$$\% \text{ molowy Ln}(2) = \frac{1,002 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,153 \% \text{ molowego}$$

▼ **M25**

- 4.5.5.3 Kwasy tłuszczowe w pozycjach 1,3- [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) i Ln(1,3)] (zob. wzór (6))

$$\% \text{ molowy P(1,3)} = \frac{10,887 - 0,653}{2} + 10,887 = 16,004 \% \text{ molowego}$$

$$\% \text{ molowy S(1,3)} = \frac{2,942 - 0,177}{2} + 2,942 = 4,325 \% \text{ molowego}$$

$$\% \text{ molowy Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,262}{2} + 1,097 = 1,015 \% \text{ molowego}$$

$$\% \text{ molowy O(1,3)} = \frac{74,116 - 85,296}{2} + 74,116 = 68,526 \% \text{ molowego}$$

$$\% \text{ molowy L(1,3)} = \frac{9,955 - 11,457}{2} + 9,955 = 9,204 \% \text{ molowego}$$

$$\% \text{ molowy Ln(1,3)} = \frac{1,002 - 1,153}{2} + 1,002 = 0,927 \% \text{ molowego}$$

- 4.5.6. *Obliczenie triglicerydów*

Na podstawie obliczonego składu kwasów tłuszczowych w pozycjach sn-2- oraz sn-1,3-:

Kwas tł. w	poz. 1,3-	poz. 2-
P	16,004 %	0,653 %
S	4,325 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,262 %
O	68,526 %	85,296 %
L	9,204 %	11,457 %
Ln	0,927 %	1,153 %
Suma	100,0 %	100,0 %

oblicza się następujące triglicerydy:

LLL

PoPoPo

PoLL z 1 izomerem pozycyjnym

SLnLn z 1 izomerem pozycyjnym

PoPoL z 1 izomerem pozycyjnym

PPoLn z 2 izomerami pozycyjnymi

OLLn z 2 izomerami pozycyjnymi

PLLn z 2 izomerami pozycyjnymi

PoOLn z 2 izomerami pozycyjnymi

- 4.5.6.1. Triglicerydy z jednym kwasem tłuszczowym (LLL, PoPoPo) (zob. wzór (7))

$$\% \text{ mol. LLL} = \frac{9,204 \% * 11,457 \% * 9,204 \%}{10\ 000} = \mathbf{0,09706 \text{ mola LLL}}$$

$$\% \text{ mol. PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 1,015 \%}{10\ 000} = \mathbf{0,00013 \text{ mola PoPoPo}}$$

▼ **M25**

— 4.5.6.2 Triglicerydy z dwoma kwasami tłuszczowymi (PoLL, SLnLn, PoPoL) (zob. wzór (8))

$$\% \text{ mol. PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,02141$$

$$\% \text{ mol. LPoL} = \frac{9,204 \% * 1,262 \% * 9,204 \%}{10\ 000} = 0,01069$$

0,03210 mola PoLL

$$\% \text{ mol. SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,325 \% * 1,153 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,00092$$

$$\% \text{ mol. LnSLn} = \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10\ 000} = 0,00002$$

0,00094 mola SLnLn

$$\% \text{ mol. PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,00236$$

$$\% \text{ mol. PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 1,015 \%}{10\ 000} = 0,00118$$

0,00354 mola PoPoL

— 4.5.6.3 Triglicerydy z trzema różnymi kwasami tłuszczowymi (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) zob. wzór (9)

$$\% \text{ mol. PPOln} = \frac{16,004 \% * 1,262 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,00374$$

$$\% \text{ mol. LnPPo} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10\ 000} = 0,00012$$

$$\% \text{ mol. PoLnP} = \frac{1,015 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\ 000} = 0,00375$$

0,00761 mola PPOln

$$\% \text{ mol. OLLn} = \frac{68,526 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,14556$$

$$\% \text{ mol. LnOL} = \frac{0,927 \% * 85,296 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,14555$$

$$\% \text{ mol. LLnO} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 68,526 \% * 2}{10\ 000} = 0,14544$$

0,43655 mola OLLn

$$\% \text{ mol. PLLn} = \frac{16,004 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,03399$$

$$\% \text{ mol. LnPL} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,204 \% * 2}{10\ 000} = 0,00111$$

$$\% \text{ mol. LLnP} = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\ 000} = 0,03397$$

0,06907 mola PLLn

▼ **M25**

$$\% \text{ mol. PoOLn} = \frac{1,015 \% * 85,296 \% * 0,927 \% * 2}{10\ 000} = 0,01605$$

$$\% \text{ mol. LnPoO} = \frac{0,927 \% * 1,262 \% * 68,526 \% * 2}{10\ 000} = 0,01603$$

$$\% \text{ mol. OLnPo} = \frac{68,526 \% * 1,153 \% * 1,015 \% * 2}{10\ 000} = 0,01604$$

0,04812 mola PoOLn**ECN42 = 0,69512 mola TAG**

Uwaga 1: Kolejność elucji można oznaczyć poprzez obliczenie równoważnej liczby atomów węgla, często określonej stosunkiem $ECN = CN - 2n$, gdzie CN oznacza liczbę atomów węgla, a n liczbę wiązań podwójnych; obliczenie może być dokładniejsze po uwzględnieniu pochodzenia wiązania podwójnego. Jeżeli n_0 , n_1 i n_{ln} są liczbami wiązań podwójnych przypisanych, odpowiednio, kwasowi oleinowemu, kwasowi linolowemu i kwasowi linolenowemu, to równoważna liczba atomów węgla może być obliczona według wzoru:

$$EN = CN - d_0 n_0 - d_1 n_1 - d_{ln} n_{ln}$$

gdzie współczynniki d_0 , d_1 i d_{ln} można obliczyć na podstawie triglicerydów wzorcowych. Przy zachowaniu warunków określonych w tej metodzie uzyskany stosunek byłby zbliżony do poniższej postaci:

$$ECN = CN - (2,60 n_0) - (2,35 n_1) - (2,17 n_{ln})$$

Uwaga 2: Za pomocą kilku triglicerydów wzorcowych można również obliczyć rozdzielczość w odniesieniu do trioleinianu:

$$\alpha = RT^1 / RT \text{ trioleinianu}$$

poprzez zastosowania skróconego czasu retencji
 $RT^1 = RT - RT \text{ rozpuszczalnika}$

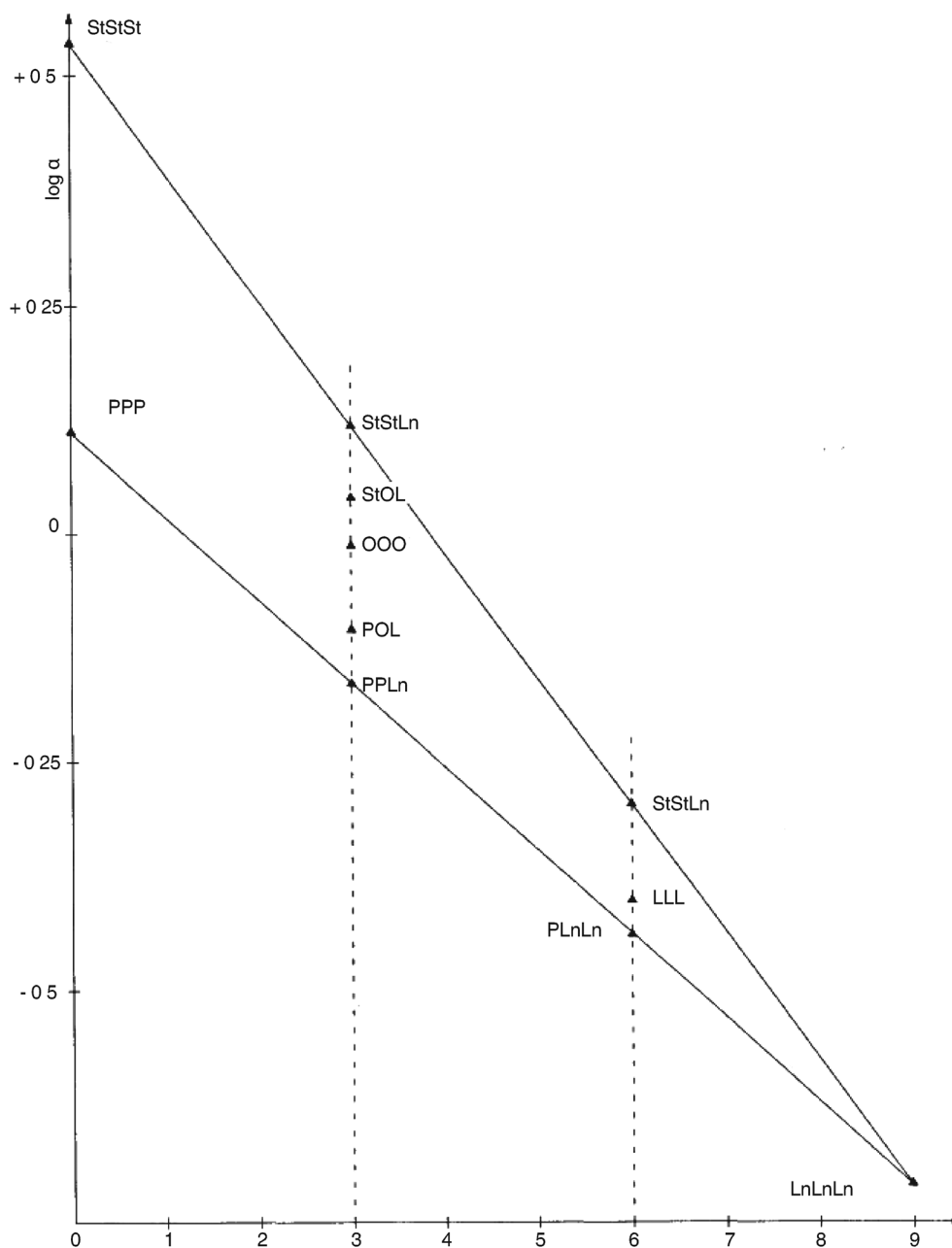
Wykres $\log \alpha$ w zależności od f (liczby wiązań podwójnych) umożliwia oznaczenie wartości retencji w odniesieniu do wszystkich triglicerydów kwasów tłuszczowych zawartych w triglicerydach wzorcowych – zob. rysunek 1.

Uwaga 3: Efektywność kolumny powinna umożliwić wyraźne oddzielenie pików trioleinianu od pików triglicerydów o zbliżonej wartości RT. Elucja jest przeprowadzana do pików ECN 52.

Uwaga 4: Prawidłowy pomiar powierzchni wszystkich pików istotnych z punktu widzenia przedmiotowego oznaczenia jest zapewniony, jeżeli drugi pik odpowiadający ECN 50 wynosi 50 % pełnej skali rejestratora.

▼ M25

Rysunek 1

Wykres $\log a$ w zależności od f (liczby wiązań podwójnych)

Liczba wiązań podwójnych

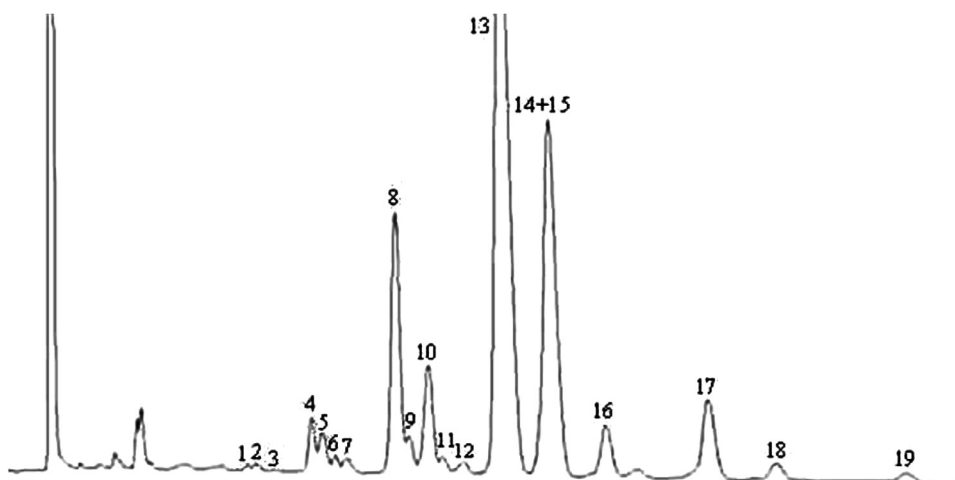
La: kwas laurynowy; My: kwas mirystynowy; P: kwas palmitynowy; S: kwas stearynowy; O: kwas oleinowy; L: kwas linolowy; Ln: kwas linolenowy

▼ **M25**

Rysunek 2

Oliwa z oliwek z niską zawartością kwasu linolowego

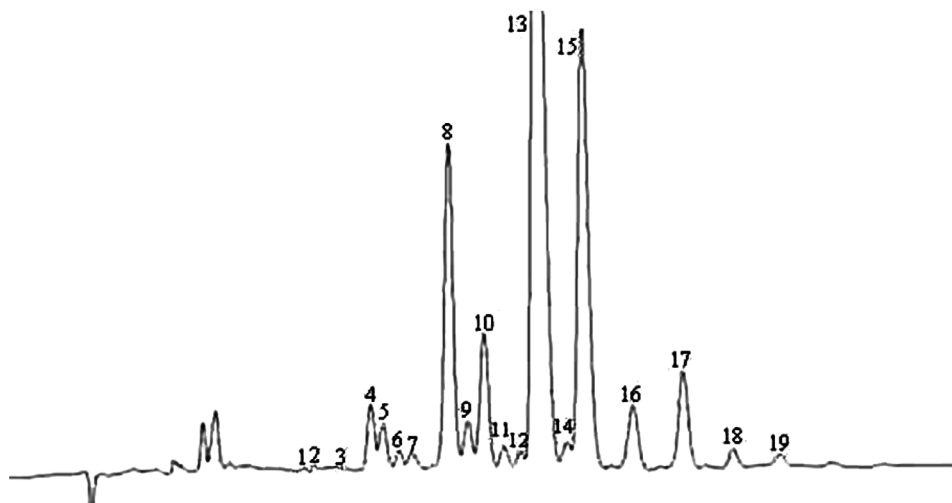
a



Z rozpuszczalnikiem: aceton/acetonitryl.

PROFIL a: Główne składowe pików chromatograficznych: **ECN42**: (1) LLL + PoLL; (2) OLLn + PoOLn; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL + PoOL; (5) OOLn + PLL; (6) POLn + PPOPo; (7) OOL + PoOO; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP; (14 + 15) SOL + POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS.

b



Z rozpuszczalnikiem: propionitryl

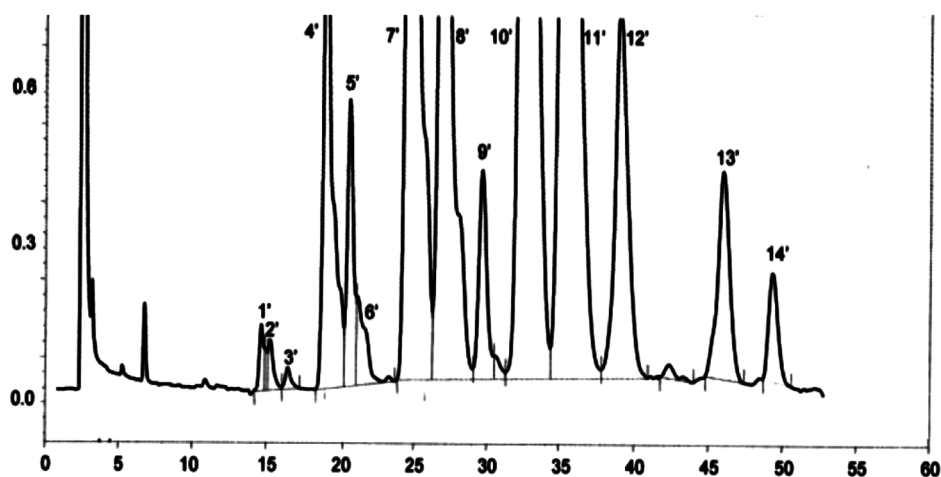
PROFIL b: Główne składowe pików chromatograficznych: **ECN42**: (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPOPo + PPOl; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS

▼ **M25**

Rysunek 3

Oliwa z oliwek z wysoką zawartością kwasu linolowego

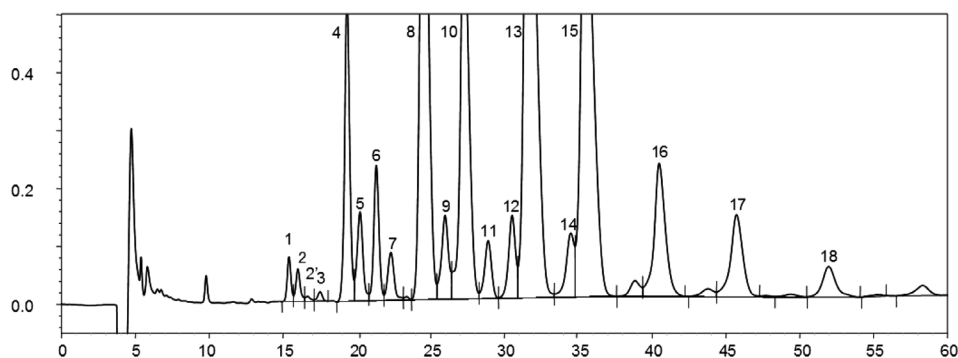
a)



Z rozpuszczalnikiem: aceton/acetonitryl (50:50).

Profil a: Główne składowe pików chromatograficznych: **ECN42**: (1') LLL + PoLL; (2') OLLn + PoOLn; (3') PLLn; **ECN44**: (4') OLL + PoOL; (5') OOLn + PLL; (6') POLn + PPOPo; **ECN46**: (7') OOL + PoOO; (8') PLO + SLL + PoOP; (9') PLP + PoPP; **ECN48**: (10') OOO; (11') POO + SLL + PPO; (12') POP + PLS; **ECN50**: (13') SOO; (14') POS + SLS

b)



Z rozpuszczalnikiem: propionitryl.

Profil b: Główne składowe pików chromatograficznych: **ECN42**: (1) LLL; (2 + 2') OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPOPo + PPOl; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; **ECN48**: (12) PLP; (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS; **ECN52**: (19) AOO.

▼ M19

ANNEX XIX

▼ M28**OZNACZANIE ZAWARTOŚCI ALKOHOLI ALIFATYCZNYCH I TRITERPENOWYCH METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ NA KOLUMNACH KAPILARNYCH**

1. PRZEDMIOT

Niniejszy załącznik opisuje metodę oznaczania zawartości alkoholi alifatycznych i triterpenowych w olejach i tłuszczach.

▼ M19

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

The fatty substance, with 1-eicosanol added as internal standard, is saponified with ethanolic potassium hydroxide and then the unsaponifiable matter extracted with ethyl ether. The alcoholic fraction is separated from the unsaponifiable matter by chromatography on a basic silica gel plate; the alcohols recovered from the silica gel are transformed into trimethylsilyl ethers and analysed by capillary gas chromatography.

3. EQUIPMENT

- 3.1. 250 ml round-bottomed flask fitted with a reflux condenser having ground-glass joints.
- 3.2. 500 ml separating funnel.
- 3.3. 250 ml round-bottomed flasks.
- 3.4. Chromatographic tank for thin-layer chromatographic analysis, for glass plates of dimensions 20 x 20 cm.
- 3.5. Ultraviolet lamp having a wavelength of 366 or 254 nm.
- 3.6. 100 µl and 500 µl microsyringes.
- 3.7. A cylindrical filter funnel with a G3 porous septum (porosity 15 to 40 µm) of diameter approximately 2 cm and a depth of some 5 cm, with an attachment suitable for filtration under vacuum and a 12/21 male ground glass joint.
- 3.8. 50 ml vacuum conical flask with a 12/21 ground-glass female joint which can be fitted to the filter funnel (3.7).
- 3.9. A 10 ml test tube with a tapering bottom and a sealing stopper.
- 3.10. Gas chromatograph for use with a capillary column, and provided with a splitting system composed of:
 - 3.10.1. Thermostatic chamber for columns (column oven) to hold the temperature desired with a precision of ± 1 °C.
 - 3.10.2. A temperature-adjustable injection unit with a persilanised glass vaporising element.
 - 3.10.3. A flame ionisation detector and converter-amplifier.
 - 3.10.4. Recorder-integrator for operation with the converter-amplifier (3.10.3), with response time not exceeding one second and with variable paper-speed.
- 3.11. Glass or fused silica capillary column, of length 20 to 30 m, internal diameter 0,25 to 0,32 mm, with SE-52 or SE-54 liquid phase or equivalent, with a film thickness between 0,10 and 0,30 µm.
- 3.12. Microsyringe for gas chromatography, of 10 µl capacity with hardened needle.
- 3.13. Analytical balance sensitive to 1 mg (with 0,1 mg display).

▼ M19

4. REAGENTS
 - 4.1. Potassium hydroxide, approximately 2 N ethanolic solution: 130 g potassium hydroxide (minimum concentration 85 %) is dissolved, with cooling, in 200 ml distilled water and then made up to one litre with ethanol. The solution should be stored in a well-stoppered opaque glass bottle.
 - 4.2. Ethyl ether, pure for analysis.
 - 4.3. Anhydrous sodium sulphate, analytical purity.
 - 4.4. Glass plates coated with silica gel, without fluorescence indicator, thickness 0,25 mm (commercially available ready for use).
 - 4.5. Potassium hydroxide, approximately 0,2 N ethanolic solution; 13 g of potassium hydroxide are dissolved in 20 ml of distilled water and made up to one litre with ethanol.
 - 4.6. Benzene, for chromatography (see 5.2.2).
 - 4.7. Acetone, for chromatography (See 5.2.2).
 - 4.8. Hexane, for chromatography (see 5.2.2).
 - 4.9. Ethyl ether, for chromatography (see 5.2.2).
 - 4.10. Chloroform, for chromatography.

▼ M28

- 4.11. Roztwór wzorcowy stosowany w chromatografii cienkowarstwowej: Alkohole (C₂₀-C₂₈) w chloroformie o stężeniu 0,5 % lub frakcja alkoholi uzyskana zgodnie z pkt 5.2 z substancji niezmydlającej się w oliwie z wycłoczyn oliwek.

▼ M19

- 4.12. 0,2 % solution of 2', 7'-dichlorofluorescein in ethanol. Make slightly basic by adding a few drops of 2 N alcoholic potassium hydroxide solution.
 - 4.13. Anhydrous pyridine, for chromatography.
 - 4.14. Hexamethyl disilazane.
 - 4.15. Trimethylchlorosilane.
 - 4.16. Standard solutions of trimethylsilyl ethers of aliphatic alcohols from C₂₀ to C₂₈. They may be prepared from mixtures of pure alcohols at the time they are required for use.
 - 4.17. A 0,1 % (m/v) solution of 1-eicosanol in chloroform (internal standard).
 - 4.18. Carrier gas: hydrogen or helium, gas-chromatographic purity.
 - 4.19. Auxiliary gas: nitrogen, gas-chromatographic purity.
5. PROCEDURE
 - 5.1. **Preparation of the unsaponifiables**
 - 5.1.1. Using a 500 µl microsyringe place, into a 250 ml round-bottom flask, a volume of 0,1 % 1-eicosanol solution in chloroform (4.17) containing a quantity of 1-eicosanol approximately equal to 10 % of the aliphatic alcohols content in that portion of sample to be taken for analysis. For example, to 5 g of sample add 250 µl of the 0,1 % 1-eicosanol solution if olive oil and 1 500 µl if olive pomace oil.

Evaporate to dryness in current of nitrogen and then weigh accurately 5 g of the dry filtered sample into the same flask.

▼ M19

5.1.2. Add 50 ml of 2 N potassium hydroxide ethanolic solution, fit the reflux condenser and heat the apparatus to slight boiling on a steam bath, stirring continuously throughout the heating process until saponification has taken place (the solution becomes clear). Continue heating for a further 20 minutes and then add 50 ml of distilled water through the condenser. The condenser is then disconnected and the flask cooled to approximately 30 °C.

5.1.3. The contents of the flask are quantitatively transferred to a separating funnel of 500 ml capacity by adding distilled water several times, using a total of around 50 ml distilled water. Add approximately 80 ml of ethyl ether, shake vigorously for approximately 30 seconds and allow to settle (Note 1).

Separate off the lower aqueous phase collecting it in a second separating funnel. Two further extractions are effected on the aqueous phase, in the same manner, using each time 60 to 70 ml ethyl ether.

Note 1: Emulsions may be eliminated by adding, using as a spray, small quantities of ethyl alcohol or methyl alcohol.

5.1.4. The ethyl ether extracts are combined in a separating funnel and washed with distilled water (50 ml at a time) until the washing water gives a neutral reaction.

Discard the washing water, dry with anhydrous sodium sulphate and filter, into a flask of 250 ml capacity which has been weighed beforehand, the funnel and filter being washed with small quantities of ethyl ether which are added to the total.

5.1.5. Distil the ether down to a few ml, then bring to dryness under a slight vacuum or in a current of nitrogen, completing drying in an oven at 100 °C for approximately a quarter of an hour, and then weigh after cooling in a desiccator.

5.2. Separation of alcoholic fractions

5.2.1. Preparation of basic TLC plates: the silica gel plates (4.4) are immersed completely, in 0,2 N potassium hydroxide solution (4.5) for 10 seconds, and then left to dry for two hours under an extractor hood and finally placed in an oven at 100 °C for one hour.

Remove from the oven and keep in a calcium chloride desiccator until required for use (plates treated in this way must be used within 15 days).

Note 2: When basic silica gel plates are used to separate the alcoholic fraction there is no need to treat the unsaponifiables with alumina. It follows that all acid compounds (fatty acids and others) are retained at the origin thereby obtaining both aliphatic alcohol and terpenic alcohol bands which are both separated distinctly from the sterol band.

5.2.2. Place a 65/35 by volume hexane/ethyl ether mixture in the plate-developing chamber to a depth of approximately 1 cm ⁽¹⁾.

Close the chamber using an appropriate cover and leave for half an hour to allow equilibration between vapour and liquid. Strips of filter paper dipping into the eluent may be affixed to the inside surfaces of the tank to reduce the development time by approximately one third and obtain more uniform, regular elution of the components.

⁽¹⁾ In these cases in particular, a 95/5 by volume benzene/acetone eluent mixture must be used to obtain distinct band separation.

▼ M19

Note 3: The developing solution must be replaced for each analysis in order to obtain reproducible developing conditions.

- 5.2.3. An approximately 5 % solution of unsaponifiable matter (5.1.5) in chloroform is prepared and 0,3 ml of the solution is streaked as a uniform strip of minimum thickness, using the 100 µl microsyringe, on a TLC plate at approximately 2 cm from the bottom of the TLC plate. Aligned with the origin, 2 to 3 µl of the aliphatic alcohols reference solution (4.11) are spotted for the identification of the aliphatic alcohols band after development has been completed.
- 5.2.4. Place the plate inside the development tank as stated in 5.2.2. The ambient temperature should be maintained between 15 and 20 °C. Immediately close the chamber with the cover and allow to elute until the solvent front reaches approximately 1 cm from the upper edge of the plate.

The plate is then removed from the development chamber and the solvent evaporated under a hot air current or the plate is left for a while under the extractor hood.

▼ M28

- 5.2.5. Spryskać płytkę lekko i równomiernie roztworem 2',7'-dichlorofluoresceiny, gdy płytka jest obserwowana w świetle ultrafioletowym. Pasma alkoholi alifatycznych można zidentyfikować przez przyrównanie go do plamy uzyskanej z roztworu wzorcowego: zaznaczyć granicę pasma czarnym ołówkiem; obrysować pasmo alkoholi alifatycznych i pasmo bezpośrednio nad nim, które jest pasmem alkoholi terpenowych (uwaga 4).

Uwaga 4: Pasma alkoholi alifatycznych i alkoholi terpenowych muszą być zgrupowane w związku z ewentualną migracją alkoholi alifatycznych do pasma alkoholi triterpenowych. Przykład rozdzielu w TLC podano na rysunku 1 w dodatku.

- 5.2.6. Należy zdrapać żel krzemionkowy umieszczony na zaznaczonym obszarze za pomocą metalowej szpatułki. Usunięty i dokładnie rozdrobniony materiał przenieść do lejka do sączenia (3.7). Dodać 10 ml gorącego chloroformu, ostrożnie wymieszać za pomocą metalowej szpatułki i przefiltrować w próżni, zbierając filtrat do kolby stożkowej (3.8) połączonej z lejkiem do sączenia.

Żel krzemionkowy znajdujący się w kolbie należy przemyć trzykrotnie eterem etylowym (ok. 10 ml każdorazowo), a filtrat zebrać do tej samej kolby połączonej z lejkiem. Filtrat odparować do objętości 4–5 ml i pozostały roztwór przelać do uprzednio odważonej próbówki o pojemności 10 ml (3.9); odparować do sucha przez lekkie podgrzewanie w słabym strumieniu azotu; pozostałość rozcieńczyć ponownie kilkoma kroplami acetonu, ponownie odparować do sucha, a następnie umieścić w piecu w temperaturze 105 °C na około 10 minut; wyjąć, schłodzić w eksykatorze i zważyć.

Pozostałość w próbówce składa się z frakcji alkoholowej.

▼ M19**5.3. Preparation of the trimethylsilyl ethers**

- 5.3.1. The reagent for silylation, consisting of a mixture of 9:3:1 by volume (Note 5) of pyridine-hexamethyldisilazane-trimethylchlorosilane in the proportion of 50 µl for each milligram of aliphatic alcohols, is added to the test tube containing the alcoholic fraction, avoiding all absorption of moisture (Note 6).

▼ M19

Note 5: Solutions which are ready for use are available commercially. Other silanising reagents such as, for example, bis-trimethylsilyl, trifluor acetamide + 1 % trimethyl chlorosilane, which has to be diluted with an equal volume of anhydrous pyridine, are also available.

Note 6: The slight opalescence which may form is normal and does not cause any interference. The formation of a white floc or the appearance of a pink colour are indicative of the presence of moisture or deterioration of the reagent. If these occur the test must be repeated.

- 5.3.2. Stopper the test tube, shake carefully (without overturning) until the aliphatic alcohols are completely dissolved. Stand for at least 15 minutes at ambient temperature and then centrifuge for a few minutes. The clear solution is ready for gas chromatographic analysis.

5.4. Gas chromatography analysis**5.4.1. Preliminary operations, column packing**

- 5.4.1.1. Fit the column in the gas chromatograph, attaching the inlet end to the injector connected to the splitting system and the outlet end to the detector. Carry out a general check of the gas chromatography assembly (tightness of gas fittings, efficiency of the detector, efficiency of the splitting system and of the recording system, etc.).

- 5.4.1.2. If the column is being used for the first time it is recommended that it should be subjected to conditioning. A little carrier gas is passed through the capillary column and then the gas chromatography assembly is switched on and gradually heated until a temperature not less than 20 °C above the operating temperature (see Note 7) is attained. That temperature is held for not less than two hours and then the assembly is brought to the operating conditions (regulation of gas flow, split flame ignition, connection to the electronic recorder, adjustment of the temperature of the capillary column oven, the detector and the injector, etc.) and the signal is adjusted to a sensitivity not less than twice the highest level contemplated for the execution of the analysis. The course of the base line must be linear, without peaks of any kind, and must not drift. A negative straight-line drift indicates leakage from the column connections; a positive drift indicates inadequate conditioning of the column.

Note 7: The conditioning temperature shall be at least 20 °C less than the maximum temperature contemplated for the liquid phase employed.

5.4.2. Choice of operating conditions

- 5.4.2.1. The guideline operating conditions are as follows:

— column temperature: the initial isotherm is set at 180 °C for eight minutes and then programmed at 5 °C/minute to 260 °C and a further 15 minutes at 260 °C,

— temperature of evaporator: 280 °C,

— temperature of detector: 290 °C,

— linear velocity of carrier gas: helium 20 to 35 cm/s, hydrogen 30 to 50 cm/s,

— splitting ratio: 1:50 to 1:100,

— sensitivity of instrument: 4 to 16 times the minimum attenuation,

▼ M19

- sensitivity of recording: 1 to 2 mV fs,
- paper speed: 30 to 60 cm/h,
- quantity of substance injected: 0,5 to 1 µl of TMSE solution.

The above conditions may be modified according to the characteristics of the column and of the gas chromatograph to obtain chromatograms satisfying the following conditions:

- alcohol C₂₆ retention time shall be 18 ± 5 minutes,
- the alcohol C₂₂ peak shall be 80 ± 20 % of the full scale value for olive oil and 40 ± 20 % of the full scale value for seed oil.

5.4.2.2. The above requirements are checked by repeated injection of the standard TMSE mixture of alcohols and the operating conditions are adjusted to yield the best possible results.

5.4.2.3. The parameters for the integration of peaks shall be set so that a correct appraisal of the areas of the peaks considered is obtained.

5.4.3. Analytical procedure

5.4.3.1. Using the microsyringe of 10 µl capacity draw in 1 µl of hexane followed by 0,5 µl of air and subsequently 0,5 to 1 µl of the sample solution; raise the plunger of the syringe further so the needle is emptied. Push the needle through the membrane of the injection unit and after one to two seconds inject rapidly, then slowly remove the needle after some five seconds.

5.4.3.2. Recording is effected until the TMSE of the aliphatic alcohols present have been eluted completely. The base line shall always correspond to the requirements of 5.4.1.2.

▼ M28

5.4.4. Wyznaczanie pików

Poszczególne piki wyznacza się w oparciu o czas retencji i porównanie ze standardową mieszaniną TMSE poddawaną analizie w tych samych warunkach.

Przykłady chromatogramu frakcji alkoholowej rafinowanej oliwy z oliwek przedstawiono na rysunkach 2 i 3 w dodatku.

▼ M19

5.4.5. Quantitative evaluation

5.4.5.1. The peak areas of 1-eicosanol and of the aliphatic alcohols C₂₂, C₂₄, C₂₆ and C₂₈ are calculated by electronic integration.

5.4.5.2. The contents of each aliphatic alcohol, expressed in mg/1 000 g fatty substance, are calculated as follows:

$$\text{alcohol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

where:

A_x = area of the alcohol peak x

A_s = area of 1-eicosanol

m_s = mass of 1-eicosanol in milligrams

m = mass of sample drawn for determination, in grams.

6. EXPRESSION OF THE RESULTS

The contents of the individual aliphatic alcohols in mg/1 000 g of fatty substance and the sum of the total aliphatic alcohols are reported.

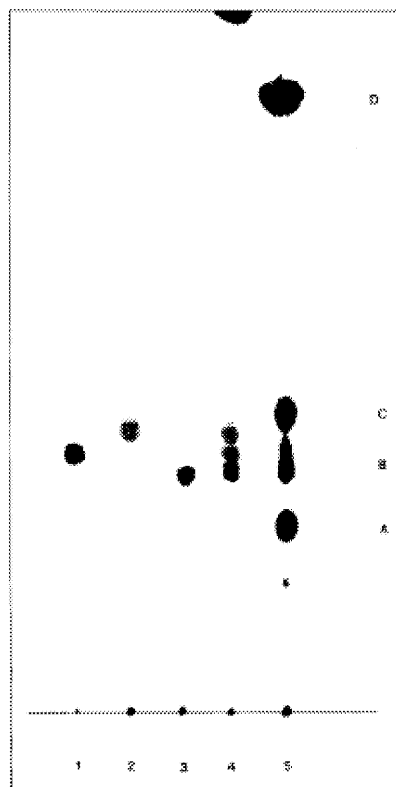
▼ M28

Dodatek

Przykład rozdziału w TLC i przykłady chromatogramów

Rysunek 1

Płytko do chromatografii cienkowarstwowej dla nieulegającej zmydleniu frakcji z oliwy z oliwek poddanej elucji heksanem/eterem etylowym (65/35)

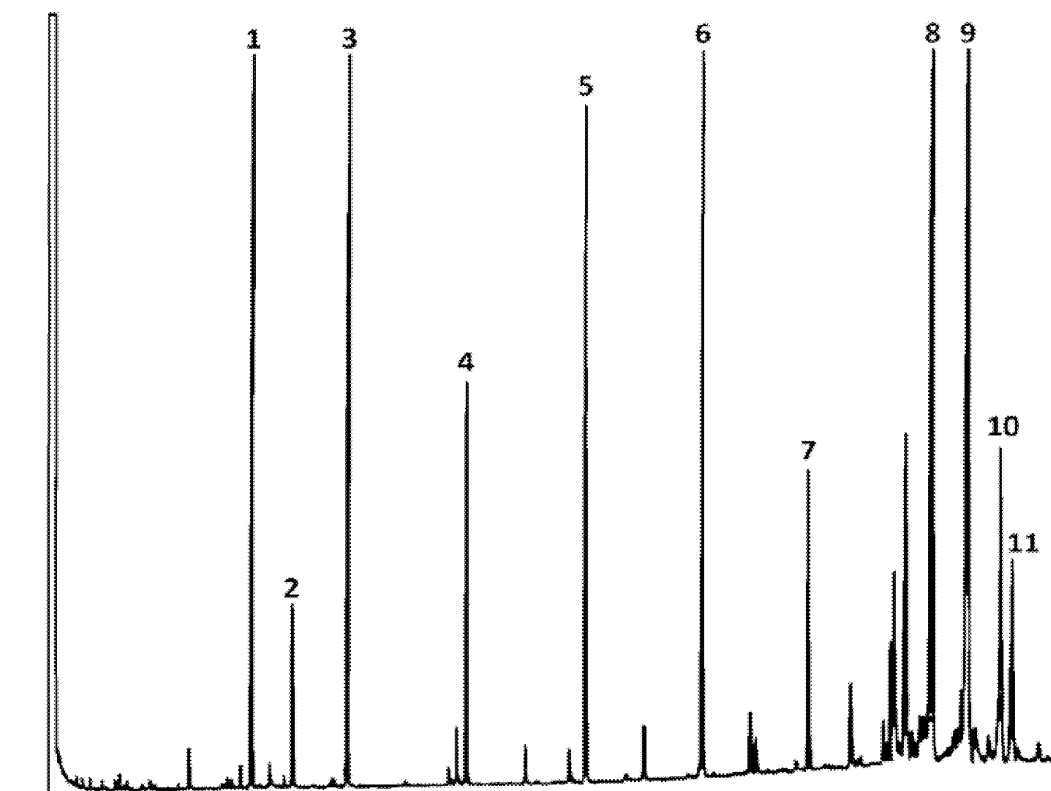


- | | | | |
|---|-------------------------------------------------------------|---|-----------------------|
| 1 | Alkohol C ₂₆ | A | Sterole |
| 2 | Alkohol C ₃₀ | B | Alkohole alifatyczne |
| 3 | Alkohol C ₂₀ | C | Alkohole triterpenowe |
| 4 | Mieszanina alkoholi C ₂₀₋₂₂₋₂₆₋₃₀ | D | Skwalen |
| 5 | Najwyższej jakości z pierwszego tłoczenia niezmydlająca się | | |

▼ M28

Rysunek 2

Chromatogram frakcji alkoholowej rafinowanej oliwy z oliwek



1 = Fitol

2 = Geraniol geranylu

3 = Alkohol C₂₀ (IS)4 = Alkohol C₂₂5 = Alkohol C₂₄6 = Alkohol C₂₆7 = Alkohol C₂₈

8 = Cykloartenol

9 = 24-metyleno-cykloartenol

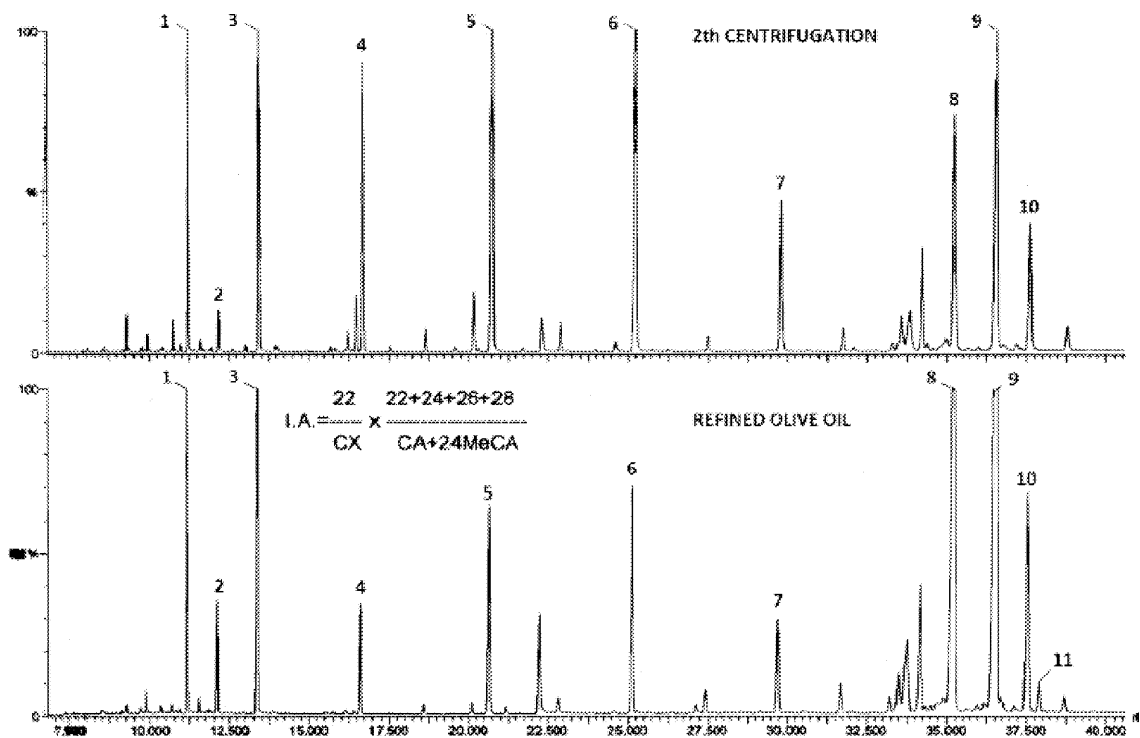
10 = Cytrostadienol

11 = Cyklobranol

▼ M28

Rysunek 3

Alkohole alifatyczne i triterpenowe w rafinowanej oliwie z oliwek i oliwie z oliwek z drugiego odwirowania oliwy z oliwek



1 = Fitol

2 = Geraniol geranylu (CX)

3 = Alkohol C₂₀4 = Alkohol C₂₂5 = Alkohol C₂₄6 = Alkohol C₂₆7 = Alkohol C₂₈

8 = Cykloartenol (CA)

9 = 24-metyleno-cykloartenol (24MeCA)

10 = Cytrostadienol

11 = Cyklobranol

▼ **M23***ZAŁĄCZNIK XX***Metoda oznaczania zawartości wosków, metylowych estrów kwasu tłuszczowego i etylowych estrów kwasu tłuszczowego metodą kapilarnej chromatografii gazowej**

1. CEL

Niniejsza metoda służy do oznaczania zawartości wosków, metylowych i etylowych estrów kwasu tłuszczowego w różnych rodzajach oliwy z oliwek. Poszczególne woski i estry alkilowe rozdziela się w zależności od liczby atomów węgla. Zaleca się stosowanie tej metody do rozróżnienia oliwy z oliwek od oliwy z wyłoczyn oliwek oraz jako wskaźnik jakości w przypadku oliwy z oliwek ekstra z pierwszego tłoczenia, który umożliwia wykrycie oszukańczych mieszanin oliwy z oliwek ekstra z pierwszego tłoczenia z rodzajami oliw o niższej jakości, takim jak oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia, oliwa z oliwek typu lampante lub niektóre rodzaje oleju dezodoryzowanego.

2. ZASADA

Dodanie odpowiednich wzorców wewnętrznych do oleju, następnie frakcjonowanie z wykorzystaniem metody chromatografii w kolumnie z uwodnionym żelem krzemionkowym. Odzyskanie frakcji wymytej uprzednio w warunkach testowych (której biegunowość jest mniejsza niż w przypadku triglicerydów), następnie przeprowadzenie bezpośredniej analizy metodą kapilarnej chromatografii gazowej.

3. APARATURA

3.1. **Kolba Erlenmeyera o pojemności 25 ml.**

3.2. **Szklana kolumna** do chromatografii cieczowej, średnica wewnętrzna 15 mm, wysokość 30–40 cm, wyposażona w odpowiedni kranik.

3.3. **Chromatograf gazowy**, który można stosować razem z kolumną kapilarną, wyposażony w system do bezpośredniego wprowadzania do kolumny, składający się z:

3.3.1. **kontrolowanego termostatem piecyka z możliwością programowania temperatury;**

3.3.2. **zimnego dozownika** do bezpośredniego wprowadzania do kolumny;

3.3.3. **detektora płomieniowo-jonizacyjnego i konwertera – wzmacniacza;**

3.3.4. współpracującego ze wzmacniaczem-konwerterem (pkt. 3.3.3) **rejestratora-integratora** (Uwaga 1), którego czas reakcji nie przekracza jednej sekundy, ze zmienną szybkością przesuwu papieru;

Uwaga 1: można również zastosować systemy informatyczne w przypadku wprowadzania danych z chromatografii gazowej przy użyciu komputera osobistego

3.3.5. **kolumny kapilarnej, z topionej krzemionki (dla celów analizy wosków oraz metylowych i etylowych estrów)**, o wysokości 8–12 m, średnicy wewnętrznej 0,25–0,32 mm, pokrytej od środka płynem rozdzielającym (Uwaga 2), o jednolitej grubości 0,10–0,30 μm ;

Uwaga 2: ogólnodostępne, odpowiednie do tego celu płyny rozdzielające typu SE52 lub SE 54, dostępne w handlu, itp.

3.4. **Mikrostrzykawka** umożliwiająca wstrzyknięcie do kolumny porcji 10 μl , wyposażona w igłę o utwardzonej powierzchni.

3.5. **Wstrząsarka elektryczna.**

3.6. **Wyparka rotacyjna.**

3.7. **Piec muflowy.**

3.8. **Waga analityczna** zapewniająca precyzję pomiaru $\pm 0,1$ mg.

▼ **M23**

3.9. Zwykłe szkło laboratoryjne.

4. ODCZYNNIKI

- 4.1. **Żel krzemionkowy** o granulometrii w zakresie od 60 do 200 μm . Umieścić żel krzemionkowy w piecu muflowym w temp. 500 °C na co najmniej 4 godziny. Po ostudzeniu dodać 2 % wody względem zastosowanej ilości żelu krzemionkowego. Dobrze wstrząsnąć do otrzymania jednolitej zawiesiny i umieścić w suszarce laboratoryjnej na nie mniej niż 12 godzin przed zastosowaniem.
- 4.2. **n-heksan** o klasie czystości do chromatografii lub do wykrywania pozostałości (należy sprawdzić czystość).

UWAGA – Opary mogą ulec samozapłonowi. Należy trzymać z daleka od źródeł ciepła, iskier lub nieosłoniętego płomienia. Należy upewnić się zawsze, że pojemniki są zawsze dobrze zamknięte. Należy zapewnić odpowiednią wentylację podczas użytkowania. Należy unikać nagromadzenia oparów i usunąć wszelkie możliwe źródła zagrożenia pożarowego takie jak grzejniki czy aparatura elektryczna wyprodukowana z materiałów innych niż materiały niepalne. Wdychanie oparów może mieć, szkodliwe skutki, ponieważ może prowadzić do uszkodzenia komórek nerwowych. Nie należy wdychać oparów. Należy w razie potrzeby zastosować odpowiednie urządzenia umożliwiające oddychanie. Chronić oczy i skórę przed kontaktem.

4.3. **Eter etylowy o klasie czystości do chromatografii.**

UWAGA – bardzo łatwopalny i umiarkowanie toksyczny. Podrażnia skórę. Wdychanie oparów może mieć, szkodliwe skutki, ponieważ może prowadzić do uszkodzenia komórek nerwowych. Może powodować uszkodzenia oczu. Skutki mogą być odczuwalne z opóźnieniem. Może tworzyć nadtlarki o właściwościach wybuchowych. Opary mogą ulec samozapłonowi. Należy trzymać z daleka od źródeł ciepła, iskier lub nieosłoniętego płomienia. Należy upewnić się każdorazowo, że pojemniki są zawsze dobrze zamknięte. Należy zapewnić odpowiednią wentylację podczas użytkowania. Należy unikać nagromadzenia oparów i usunąć wszelkie możliwe źródła zagrożenia pożarowego, takie jak grzejniki czy aparatura elektryczna wyprodukowana z materiałów innych niż materiały niepalne. Nie odparowywać do sucha lub prawie do sucha. Dodanie wody lub odpowiedniego czynnika redukującego może ograniczyć tworzenie nadtlarek. Nie pić. Nie należy wdychać oparów. Należy unikać przedłużonego lub powtarzalnego kontaktu ze skórą.

4.4. **n-heptan**, do chromatografii, lub **izooktan**.

UWAGA – łatwopalny. Wdychanie oparów może mieć, szkodliwe skutki, ponieważ może prowadzić do uszkodzenia komórek nerwowych. Należy trzymać z daleka od źródeł ciepła, iskier lub nieosłoniętego płomienia. Należy upewnić się każdorazowo, że pojemniki są zawsze dobrze zamknięte. Należy zapewnić odpowiednią wentylację podczas użytkowania. Nie należy wdychać oparów. Należy unikać przedłużonego lub powtarzalnego kontaktu ze skórą.

4.5. **Roztwór wzorca arachidynianu laurylowego (Uwaga 3)** o stężeniu 0,05 % (m/V) w heptanie (wzorzec wewnętrzny dla wosków).

Uwaga 3: można również zastosować palmitynian palmitylu, stearynian mirystylu lub arachidynian laurylowy.

4.6. **Roztwór wzorca estru metyloвого kwasu heptadekanowego o stężeniu 0,02 % (m/V) w heptanie (wzorzec wewnętrzny dla estrów metyloowych i etylowych).**

4.7. **Sudan 1 (1-fenylo-azo-2-naftol).**

▼ **M23****4.8. Gaz nośny: czysty wodór lub hel, do chromatografii gazowej.****UWAGA**

Wodór Bardzo łatwopalny, pod ciśnieniem. Należy trzymać z daleka od źródeł ciepła, iskier lub nieosłoniętego płomienia lub aparatury elektrycznej wyprodukowanej z materiałów innych niż niepalne. Należy upewnić się, że zawór butli jest zamknięty na czas przerwy w użytkowaniu. Stosować zawsze razem z reduktorem ciśnienia. Należy zmniejszyć nacisk na sprężynę reduktora przed otwarciem zaworu butli. Nie należy stać naprzeciw ujścia butli w momencie otwierania zaworu. Należy zapewnić odpowiednią wentylację podczas użytkowania. Nie należy przemieszczać wodoru z jednej butli do drugiej. Nie należy mieszać gazu w butli. Należy zapewnić stabilność butli. Należy przechowywać z dala od światła słonecznego i źródeł ciepła. Przechowywać w warunkach wolnych od czynników korozyjnych. Nie należy używać butli, jeśli są one uszkodzone lub pozbawione etykiet.

Hel Gaz sprężony pod ciśnieniem. Zmniejsza ilość tlenu dostępnego do oddychania. Należy przechowywać butlę zamkniętą. Należy zapewnić odpowiednią wentylację podczas użytkowania. Nie należy przebywać w pomieszczeniach, w których przechowywane są butle, jeżeli pomieszczenia te nie są odpowiednio wentylowane. Stosować zawsze razem z reduktorem ciśnienia. Należy zmniejszyć nacisk na sprężynę reduktora przed otwarciem zaworu butli. Nie należy przemieszczać gazu z jednej butli do drugiej. Należy zapewnić stabilność butli. Nie należy stać naprzeciw ujścia butli w momencie otwierania zaworu. Należy przechowywać z dala od światła słonecznego i źródeł ciepła. Przechowywać w warunkach wolnych od czynników korozyjnych. Nie należy używać butli, jeśli są one uszkodzone lub pozbawione etykiet. Nie wdychać. Wykorzystywać jedynie do celów technicznych.

4.9. Gazy pomocnicze:

- Czysty wodór, w postaci gazowej, do chromatografii gazowej.
- Czyste powietrze, w postaci gazowej, do chromatografii gazowej.

UWAGA

Powietrze Gaz sprężony pod ciśnieniem. Należy stosować przy zachowaniu środków ostrożności w obecności substancji palnych, ponieważ temperatura samozapłonu większości organicznych składników powietrza jest znacznie niższa w warunkach wysokiego ciśnienia. Należy upewnić się, że zawór butli jest zamknięty na czas przerwy w użytkowaniu. Stosować zawsze razem z reduktorem ciśnienia. Należy zmniejszyć nacisk na sprężynę reduktora przed otwarciem zaworu butli. Nie należy stać naprzeciw ujścia butli w momencie otwierania zaworu. Nie należy przemieszczać gazu z jednej butli do drugiej. Nie należy mieszać gazu w butli. Należy zapewnić stabilność butli. Należy przechowywać z dala od światła słonecznego i źródeł ciepła. Przechowywać w warunkach wolnych od czynników korozyjnych. Nie należy używać butli, jeśli są one uszkodzone lub pozbawione etykiet. Powietrze przeznaczone dla celów technicznych nie może być wykorzystywane do wdychania lub w urządzeniach umożliwiających oddychanie.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA**5.1. Przygotowanie kolumny chromatograficznej**

Sporządzić zawiesinę 15 g żelu krzemionkowego (pkt. 4.1) w n-heksanie (pkt. 4.2) i wprowadzić do kolumny (pkt. 3.2). Po spontanicznym wytrąceniu osadu zakończyć ten proces przy użyciu wstrząsarki elektrycznej, tak aby warstwa chromatograficzna stała się bardziej jednolita.. Przesączyć 30 ml n-heksanu, by usunąć wszelkie zanieczyszczenia. Odważyć dokładnie 500 mg próbki do kolby 25-ml (pkt. 3.1) posługując się wagą analityczną (pkt. 3.8) i dodać odpowiednią ilość wzorca wewnętrznego (pkt. 4.5), w zależności od założonej zawartości wosku, np. dodać 0,1 mg arachidynianu laurylowego w przypadku oliwy z oliwek, 0,25-0,50 mg w przypadku oliwy z wytloczyn z oliwek i 0,05 mg w przypadku estru metylowego kwasu heptadekanowego dla oliwy z oliwek (pkt. 4.6).

▼ **M23**

Do tak przygotowanej próbki dodać dwie porcje po 2 ml n-heksanu (pkt. 4.2) i przenieść do kolumny chromatograficznej.

Wprowadzić próbkę, tak aby rozpuszczalnik napłynął do wysokości 1 mm powyżej górnego poziomu absorbentu. Następnie przesączyć resztę n-heksanu/eteru etylowego (99:1) i pobrać 220 ml przy przepływie około 15 kropli w ciągu 10 sekund. (**Ta frakcja zawiera estry metylowe i etylowe oraz woski**). (*Uwaga 4*) (*Uwaga 5*).

Uwaga 4: codziennie należy przygotowywać świeżą mieszaninę n-heksanu/eteru etylowego (99/1).

Uwaga 5: w celu wzrokowego skontrolowania prawidłowości wymywania wosków można dodać do próbki 100 µl roztworu 1 % barwnika Sudan I w mieszaninie wymywającej.

Wartość retencji tego barwnika jest pośrednia pomiędzy wartościami retencji wosków i triglicerydów. Z tego względu należy zatrzymać wymywanie gdy barwnik dotrze do dna kolumny chromatograficznej, ponieważ wszystkie woski zostały już wymyte.

Otrzymaną w ten sposób frakcję suszy się w wyparce rotacyjnej do niemal całkowitego wyeliminowania rozpuszczalnika. Usuwa się ostatnie 2 ml rozpuszczalnika przy użyciu słabego strumienia azotu. Frakcję zawierającą estry metylowe i etylowe pobiera się z wykorzystaniem 2-4 ml n-heptanu lub izooktanu jako rozpuszczalnika.

5.2. Analiza metodą chromatografii gazowej

5.2.1. Procedura wstępna

Umieścić kolumnę w chromatografii gazowej (pkt. 3.3), łącząc szczelinę wlotową z systemem kolumnowym, a wylotową z detektorem. Wykonać ogólne kontrole aparatury do chromatografii gazowej (działanie pętli gazowych, sprawność detektora i systemu rejestracyjnego itp.).

Jeżeli kolumna używana jest po raz pierwszy, zaleca się jej kondycjonowanie. Przepuścić przez kolumnę gaz o małym natężeniu przepływu, następnie uruchomić aparaturę do chromatografii gazowej. Stopniowo podgrzewać do uzyskania, po około 4 godzinach, temperatury 350 °C.

Utrzymać tę temperaturę przez co najmniej 2 godziny, a następnie ustawić aparaturę według zadanych warunków pracy (ustawić natężenie przepływu gazu, zapalić płomień, podłączyć do elektronicznego przyrządu rejestrującego (pkt. 3.3.4), ustawić temperaturę pieca kolumny, ustawić detektor itd.). Rejestrować sygnał z czułością co najmniej dwukrotnie wyższą niż czułość wymagana do przeprowadzenia analizy. Przebieg linii podstawowej powinien mieć charakter liniowy, bez jakichkolwiek pików, i linia ta nie powinna wykazywać nachyleń.

Prostoliniowe, ujemne nachylenie linii wskazuje na to, że połączenia kolumn są nieprawidłowe; nachylenie dodatnie oznacza, że kolumna nie została poddana wystarczającemu kondycjonowaniu.

5.2.2. Dobór warunków roboczych dla wosków i estrów metylowych i etylowych (*Uwaga 6*).

Ogólnie należy przestrzegać następujących warunków roboczych:

— Temperatura kolumny:

20 °C/min 5 °C/min

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

— Temperatura detektora: 350 °C.

— Porcja wstrzykiwana: 1 µl roztworu (2–4 ml) n-heptanu.

▼ M23

- Gaz nośny: hel lub wodór z szybkością liniową optymalną dla wybranego gazu (patrz: dodatek A).
- Czułość urządzenia: taka, aby były spełnione warunki określone powyżej.

Uwaga 6: Ze względu na wysoką temperaturę końcową przyjmuje się dodatnie nachylenie, które nie może przekraczać 10 % objętościowych wartości pełnego zakresu skali.

Warunki te mogą być modyfikowane w sposób dostosowany do charakterystyk kolumny i aparatu do chromatografii gazowej, tak aby zostały oddzielone wszystkie woski i metylowe i etylowe estry kwasu tłuszczowego oraz aby uzyskać zadowalającą rozdzielczość pików (zob. rysunki 2, 3 i 4) oraz czas retencji 18 ± 3 minut dla wewnętrznego wzorca arachidynianu laurylowego. Najbardziej reprezentatywny pik dla wosków musi wynosić ponad 60 % wartości pełnego zakresu skali, a wewnętrzny wzorec estru metylowego kwasu heptadekanowego dla estrów metylowych i etylowych musi osiągnąć górny zakres skali.

Należy ustalić parametry całkowania pików w taki sposób, by uzyskać dokładną wartość pola powierzchni rozpatrywanego piku.

5.3. Przeprowadzenie analizy

Pobrać 10 μ l roztworu za pomocą mikrostrzykawki o pojemności 10 μ l, odciągnąć tłoczek, aż igła zostanie całkowicie opróżniona. Wprowadzić igłę do układu nastrzykowego i szybko wstrzyknąć po upływie jednej do dwóch sekund. Po upływie około 5 sekund powoli wyciągnąć igłę.

Przeprowadzać rejestrację danych aż do momentu całkowitego wymycia wosków lub stigmastadienów, w zależności od analizowanej frakcji.

Linia podstawowa musi przez cały czas spełniać ustalone wymagania.

5.4. Identyfikacja pików

Zidentyfikować piki po czasach retencji, porównując je z mieszaninami wosków o znanych czasach retencji, analizowanymi w takich samych warunkach. Estry alkilowe identyfikuje się po mieszaninach metylowych i etylowych estrów podstawowych kwasów tłuszczowych w oliwie z oliwek (palmitynowego i oleinowego).

Rysunek 1 przedstawia chromatogram wosków oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia. Rysunki 2 i 3 przedstawiają chromatogramy dwóch oferowanych w sprzedaży detalicznej rodzajów oliwy z oliwek ekstra z pierwszego tłoczenia, jeden z estrami metylowymi i etylowymi, a drugi bez nich. Rysunek 4 przedstawia chromatogram najwyższej jakości oliwy z oliwek ekstra z pierwszego tłoczenia oraz tej samej oliwy z dodatkiem 20 % oleju dezodoryzowanego.

5.5. Analiza ilościowa wosków

Ustalić za pomocą integratora pola powierzchni pików odpowiadające wzorcowi wewnętrznemu arachidynianu laurylowego i estrom alifatycznym od C₄₀ do C₄₆.

Obliczyć zawartość całkowitą wosków dodając poszczególne woski, w mg/kg tłuszczu, zgodnie ze wzorem:

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

▼ **M23**

gdzie:

A_x = pole odpowiadające pikowi każdego z estrów, zgodnie z wyliczeniami programu komputerowego dostosowanego do obliczania pola powierzchni pod pikiem

A_s = pole odpowiadające pikowi wewnętrznego wzorca arachidynianu laurylowego, zgodnie z wyliczeniami programu komputerowego dostosowanego do obliczania pola powierzchni pod pikiem

m_s = masa dodanego wewnętrznego wzorca arachidynianu laurylowego, w miligramach;

m = masa próbki pobranej do oznaczenia, w gramach.

5.5.1. *Analiza ilościowa estrów metylowych i etylowych*

Ustalić za pomocą integratora pola powierzchni pików odpowiadające wewnętrznemu wzorcowi estru metylowego kwasu heptadekanowego, estrom metylowym kwasów tłuszczowych C_{16} i C_{18} oraz estrom etylowym kwasów tłuszczowych C_{16} i C_{18} .

Obliczyć zawartość poszczególnych estrów alkilowych, w mg/kg, zgodnie ze wzorem:

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

gdzie:

A_x = pole odpowiadające pikowi poszczególnych estrów C_{16} i C_{18} , zgodnie z wyliczeniami programu komputerowego dostosowanego do obliczania pola powierzchni pod pikiem

A_s = pole odpowiadające pikowi wewnętrznego wzorca estru metylowego kwasu heptadekanowego, zgodnie z wyliczeniami programu komputerowego dostosowanego do obliczania pola powierzchni pod pikiem

m_s = masa dodanego wewnętrznego wzorca estru metylowego kwasu heptadekanowego, w miligramach;

m = masa próbki pobranej do oznaczenia, w gramach.

6. PREZENTACJA WYNIKÓW

Podać sumę zawartości różnych wosków od C_{40} do C_{46} (*Uwaga 7*) w miligramach na kilogram tłuszczu.

Podać sumę zawartości estrów metylowych i estrów etylowych od C_{16} do C_{18} oraz wartość całkowitą obydwu.

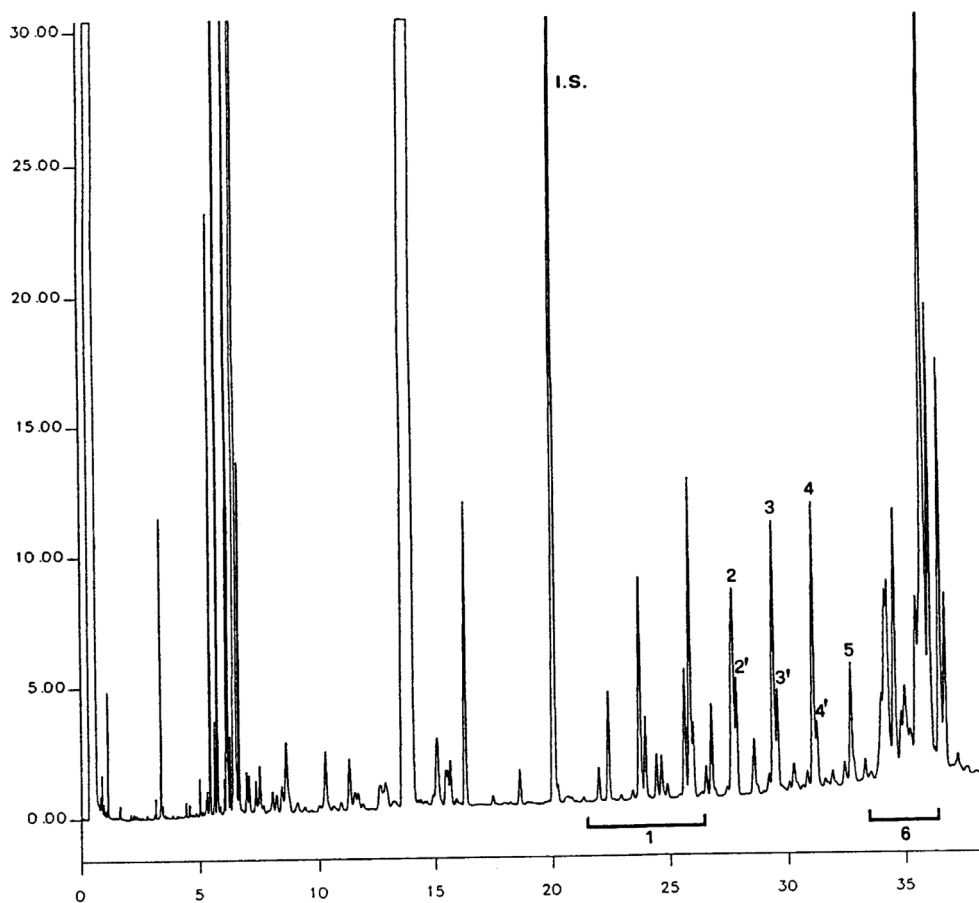
Wynik należy podać z dokładnością do mg/kg.

Uwaga 7: Składniki dla celów kwantyfikacji odnoszą się do pików o parzystej liczbie atomów węgla estrów C_{40} – C_{46} , zgodnie z przykładowym chromatogramem wosków w oliwie z oliwek przedstawionym na załączonym rysunku. Dla celów identyfikacji, jeśli ester C_{46} jest rozdzielony, zaleca się przeprowadzić analizę frakcji wosków oliwy z wycieczyn oliwek, w której pik C_{46} jest możliwy do odróżnienia ponieważ wyraźnie dominuje.

Podać stosunek estrów etylowych do estrów metylowych.

▼ M23

Rysunek 1

Przykład chromatografii gazowej frakcji wosków oliwy z oliwek ⁽¹⁾

Piki z czasem retencji od 5 do 8 minut metylowych i etylowych estrów kwasu tłuszczowego

Legenda:

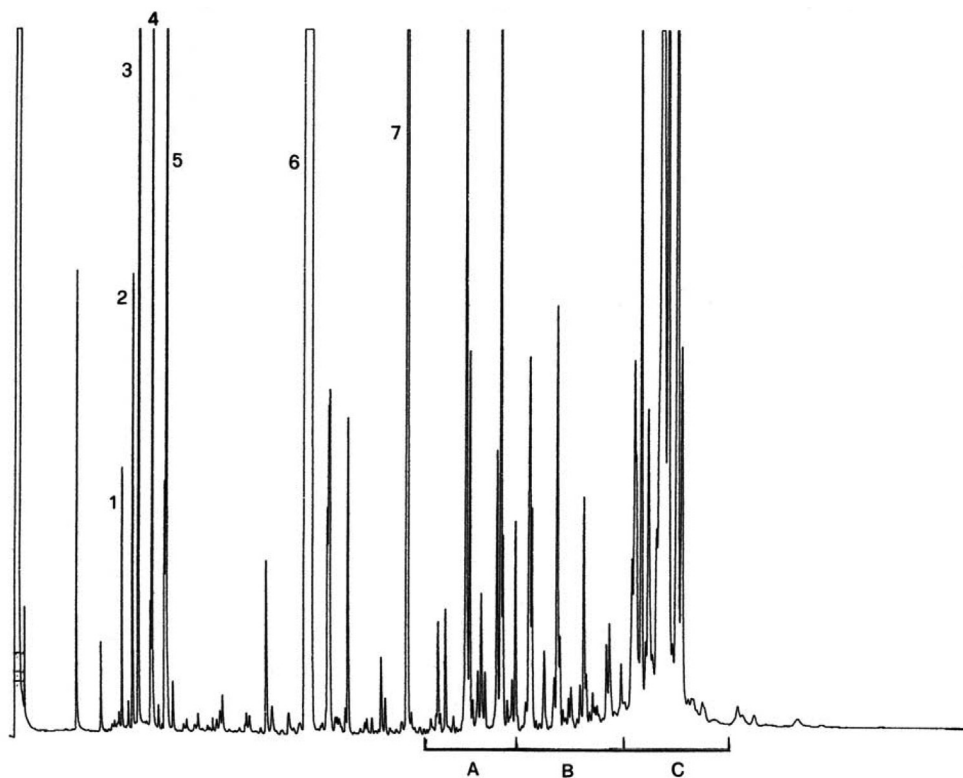
- I.S. = arachidynian laurylowy
- 1 = estry diterpenowe
- 2+2' = estry C₄₀
- 3+3' = estry C₄₂
- 4+4' = estry C₄₄
- 5 = estry C₄₆
- 6 = estry steroli i alkohole triterpenowe

⁽¹⁾ Po wymyciu estrów steroli w zapisie chromatograficznym nie powinny być widoczne istotne piki (triglicerydy).

▼ **M23**

Rysunek 2

Estry metylowe, estry etylowe i woski w oliwie z oliwek z pierwszego tłoczenia



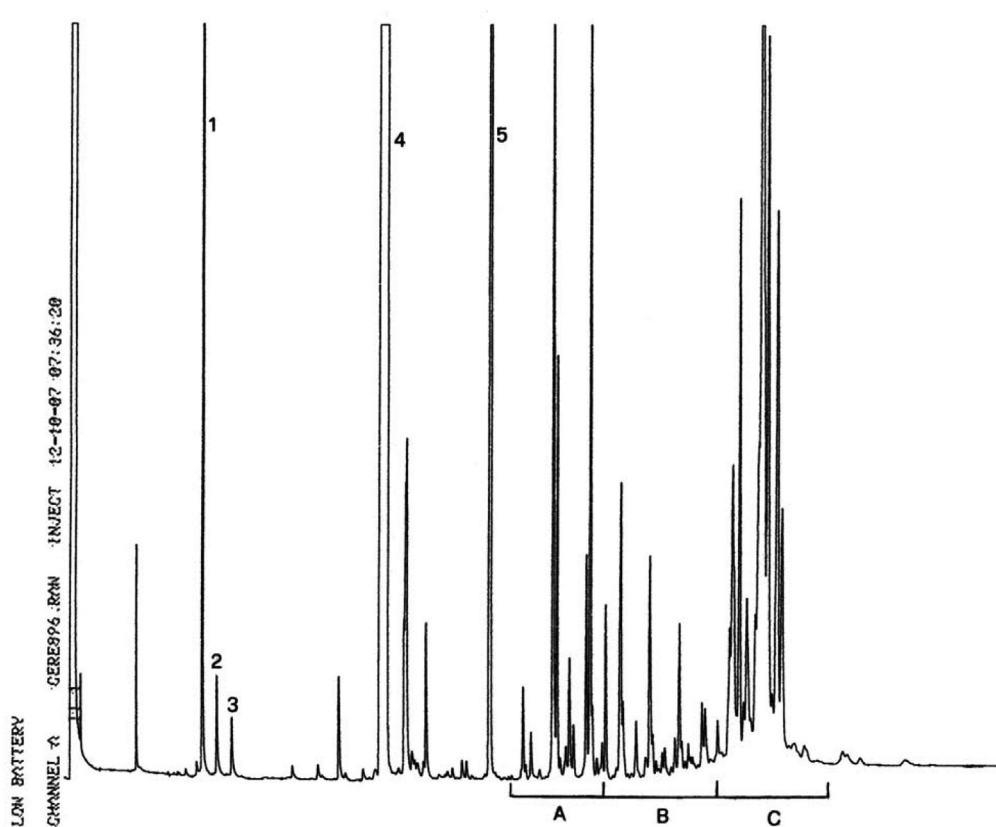
Legenda:

- 1 — metyl C_{16}
- 2 — etyl C_{16}
- 3 — ester metylowy kwasu heptadekanowego I.S.
- 4 — metyl C_{18}
- 5 — etyl C_{18}
- 6 — skwalen
- 7 — arachidynian laurylowy I.S.
- A — estry diterpenowe
- B — woski
- C — estry steroli i estry triterpenowe

▼ M23

Rysunek 3

Estry metylowe, estry etylowe i woski w oliwie z oliwek ekstra z pierwszego tłoczenia



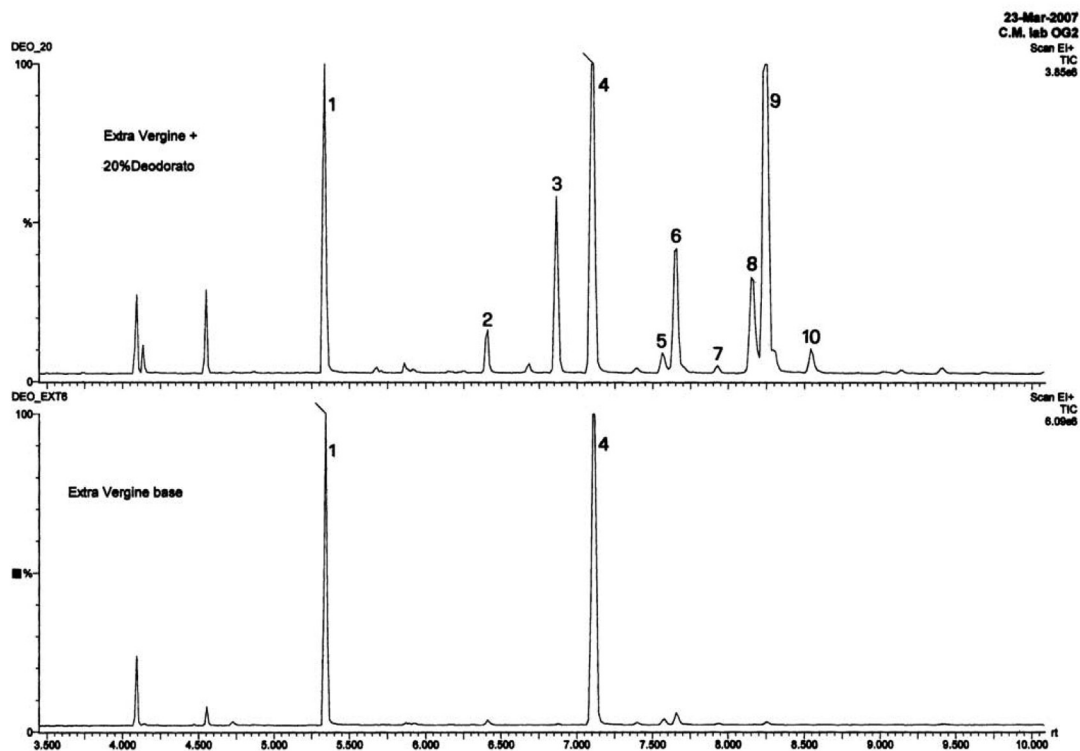
Legenda:

- 1 — ester metylowy kwasu heptadekanowego I.S.
- 2 — metyl C₁₈
- 3 — etyl C₁₈
- 4 — skwalen
- 5 — arachidynian laurylowy I.S.
- A — estry diterpenowe
- B — woski
- C — estry steroli i estry triterpenowe

▼ M23

Rysunek 4

Część chromatogramu oliwy z oliwek ekstra z pierwszego tłoczenia oraz tej samej oliwy z dodatkiem oleju dezodoryzowanego



Legenda:

- 1 – mirystynian metylu I.S.
- 2 – palmitynian metylu
- 3 – palmitynian etylu
- 4 – ester metylowy kwasu heptadekanowego I.S.
- 5 – linolenian metylu
- 6 – oleinian metylu
- 7 – stearynian metylu
- 8 – linolenian etylu
- 9 – oleinian etylu
- 10 – stearynian etylu

▼ M23*Appendix A***Oznaczenie prędkości liniowej gazu**

Wstrzyknąć 1:3 μ l metanu (lub propanu) do chromatografu gazowego ustawionego na normalne warunki robocze. Mierzyć czas potrzebny na przejście gazu przez kolumnę, począwszy od momentu wstrzyknięcia do momentu osiągnięcia wartości szczytowej (t_M).

Prędkość liniową w cm/sek. oblicza się zgodnie ze wzorem L/t_M , gdzie L jest wysokością kolumny w cm, a t_M jest czasem mierzonym w sekundach.

▼ M28

ZAŁĄCZNIK XXI

Wyniki kontroli zgodności przeprowadzonych w odniesieniu do oliwy z oliwek, o których mowa w art. 8 ust. 2

Próbka	Kategoria	Państwo pochodzenia	Miejsce inspekcji ⁽¹⁾	Oznakowanie						Właściwości chemiczne			Właściwości organoleptyczne ⁽⁴⁾			Wniosek końcowy		
				Nazwa prawna	Nazwa pochodzenia	Warunki przechowywania	Błędne informacje	Czytelność	Z/NZ ⁽³⁾	Parametry przekraczając limit T/N	Jeżeli tak, proszę wskazać który (które) ⁽²⁾	Z/NZ ⁽³⁾	Mediana błędów	Mediana owocowości	Z/NZ ⁽³⁾	Wymagane działanie	Sankcja	

⁽¹⁾ Rynek wewnętrzny (tłocznia, podmiot dokonujący butelkowania, etap sprzedaż detalicznej), wywóz, przywóz.

⁽²⁾ Każda właściwość oliwy z oliwek określona w załączniku I jest oznaczona kodem.

⁽³⁾ Zgodność/niezgodność.

⁽⁴⁾ Nie wymagane w odniesieniu do oliwy z oliwek i oliwy z wycłoczyn oliwek.