

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 702/2007**z dnia 21 czerwca 2007 r.****zmieniające rozporządzenie (EWG) nr 2568/91 w sprawie właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wyłoczyn oliwek oraz w sprawie odpowiednich metod analizy**

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając rozporządzenie Rady (WE) nr 865/2004 z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie wspólnej organizacji rynku oliwy z oliwek i oliwek stołowych oraz zmieniające rozporządzenie (EWG) nr 827/68 ⁽¹⁾, w szczególności jego art. 5 ust. 3,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Rozporządzenie Komisji (EWG) nr 2568/91 ⁽²⁾ określa fizyczne i chemiczne właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wyłoczyn oliwek oraz ustanawia metody oceny tych właściwości. Metody te oraz limity dotyczące właściwości oliwy muszą być zaktualizowane w celu uwzględnienia opinii ekspertów z dziedziny chemii, zgodnie z pracami wykonanymi w ramach Międzynarodowej Rady ds. Oliwy z Oliwek.
- (2) Eksperti z dziedziny chemii uznali w szczególności, że oznaczenie ilościowe zawartości procentowej 2-monopalmitynianu glicerolu jest metodą oznaczania oliwy estryfikowanej o większej precyzji. Zmniejszenie limitu zawartości stigmastadienów w oliwach z oliwek z pierwszego tłoczenia umożliwia również lepsze rozdzielenie oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia i rafinowanej.
- (3) W celu dopuszczenia okresu dostosowania do nowych norm i udzielenia czasu na wprowadzenie środków niezbędnych do ich stosowania oraz w celu uniknięcia zakłóceń w transakcjach handlowych należy odsunąć w czasie początek stosowania niniejszego rozporządzenia do dnia 1 stycznia 2008 r. Z tych samych przyczyn należy przewidzieć, aby oliwa z oliwek i oliwa z wyłoczyn oliwek legalnie wyprodukowane

i oznakowane we Wspólnocie lub legalnie przywiezione do Wspólnoty i dopuszczone do swobodnego obrotu przed wspomnianą datą mogły być sprzedawane aż do wyczerpania zapasów.

- (4) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Komitetu Zarządzającego ds. Oliwy z Oliwek i Oliwek Stołowych,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

W rozporządzeniu (EWG) nr 2568/91 wprowadza się następującą zmianę:

- 1) w art. 2 ust. 1, tiret siódme otrzymuje brzmienie:

„— metoda przedstawiona w załączniku VII do oznaczania zawartości procentowej 2-monopalmitynianu glicerolu;”

- 2) załączniki zostają zmienione zgodnie z załącznikiem do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie trzeciego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie stosuje się od dnia 1 stycznia 2008 r.

Jednakże produkty, które zostały legalnie wyprodukowane i oznakowane we Wspólnocie lub legalnie przywiezione do Wspólnoty i dopuszczone do swobodnego obrotu przed dniem 1 stycznia 2008 r. mogą być wprowadzone do obrotu do chwili wyczerpania wszystkich zapasów.

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

Sporządzono w Brukseli, dnia 21 czerwca 2007 r.

W imieniu Komisji
Mariann FISCHER BOEL
Członek Komisji

⁽¹⁾ Dz.U. L 161 z 30.4.2004, str. 97.

⁽²⁾ Dz.U. L 248 z 5.9.1991, str. 1. Rozporządzenie ostatnio zmienione rozporządzeniem (WE) nr 1989/2003 (Dz.U. L 295 z 13.11.2003, str. 57).

ZAŁĄCZNIK

W załącznikach do rozporządzenia (EWG) nr 2568/91 wprowadza się następujące zmiany:

1) w streszczeniu wprowadza się następujące zmiany:

a) tytuł załącznika II otrzymuje brzmienie:

„Oznaczanie wolnych kwasów tłuszczowych, metoda na zimno”;

b) tytuł załącznika VII otrzymuje brzmienie:

„Oznaczanie zawartości procentowej 2-monopalmitynianu glicerolu”;

2) załącznik I otrzymuje brzmienie:

„ZAŁĄCZNIK I

WŁAŚCIWOŚCI OLIWY Z OLIWEK

Kategoria	Kwasowość (%) (*)	Liczba nadtlenkowa mEq O ₂ /kg (*)	Woski mg/kg (**)	2-monopalmitynian glicerolu (%)	Stigmatiden mg/kg (1)	Różnica między HPLC ECN42 a teoretycznym ECN42	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Ocena organoleptyczna Mediana błędów (Md) (*)	Ocena organoleptyczna Mediana owocowości (Mf) (*)
1. Oliwa z oliwek ekstrakta z pierwszego tłoczenia	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 % ≤ 1,0 jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 % ≤ 1,0 jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Oliwa z oliwek typu lampante	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 % ≤ 1,1 jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 2,5 (2)	—
4. Rafinowana oliwa z oliwek	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 % ≤ 1,1 jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Oliwa z oliwek złożona z rafinowanej oliwy z oliwek oraz oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem ≤ 14 % ≤ 1,1 jeśli % zawartość kwasu palmitynowego ogółem > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Surowa oliwa z wycłoczonych oliwek	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Rafinowana oliwa z wycłoczonych oliwek	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Oliwa z wycłoczonych oliwek	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

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

(2) Lub jeżeli mediana błędów jest mniejsza lub równa 2,5, a mediana owocowości wynosi 0.

(3) Oliwa z zawartością wosków między 300 mg/kg a 350 mg/kg uznawana jest za oliwę lampante, jeżeli całkowita zawartość alkoholi alifatycznych jest mniejsza lub równa 350 mg/kg lub jeżeli zawartość procentowa erytrodiolu i uwaolu jest niższa lub równa 3,5.

(4) Oliwa z zawartością wosków między 300 mg/kg a 350 mg/kg uznawana jest za surową oliwę z wycłoczonych oliwek, jeżeli całkowita zawartość alkoholi alifatycznych wynosi powyżej 350 mg/kg i jeżeli zawartość procentowa erytrodiolu i uwaolu jest większa niż 3,5.

Kategoria	Zawartość kwasów (1)						Suma izomerów trans-oleinowych (%)	Suma izomerów trans-nolenowych (%)	Skład steroli						Łącznie sterole (mg/kg)	Erytrodiol i uwaol (%) (**)
	Mirystynowy (%)	Linolenowy (%)	Arachidowy (%)	Elkoazynowy (%)	Behenowy (%)	Lignocerynowy (%)			Cholesterol (%)	Brassikasterol (%)	Kamposterol (%)	Stigmatsterol (%)	Betasitosterol (%) (2)	Delta-7-stigmastenol (%)		
1. Oliwa z oliwek ekstraktu z pierwszego tłoczenia	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Oliwa z oliwek typu lampante	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (3)
4. Rafinowana oliwa z oliwek	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Oliwa z oliwek złożona	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Surowa oliwa z wyciżczonych oliwek	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (4)
7. Rafinowana oliwa z wyciżczonych oliwek	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Oliwa z wyciżczonych oliwek	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

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

(2) Suma: delta-5,2,3-stigmastadienol+cholesterol+beta-sitosterol+stiosiano+delta-5-awenasterol+delta-5,2,4-stigmastadienol.

(3) Oliwa z zawartością wosków między 300 mg/kg a 350 mg/kg uznawana jest za oliwę lampante, jeżeli całkowita zawartość alkoholi alifatycznych jest niższa lub równa 350 mg/kg lub jeżeli zawartość procentowa erytrodiolu i uwaolu jest niższa lub równa 3,5.

(4) Oliwa z zawartością wosków między 300 mg/kg a 350 mg/kg uznawana jest za surową oliwę z wyciżczonych oliwek, jeżeli całkowita zawartość alkoholi alifatycznych wynosi powyżej 350 mg/kg i jeżeli zawartość procentowa erytrodiolu i uwaolu jest większa niż 3,5.

Uwagi:

- Wyniki analiz muszą być wyrażone ze wskazaniem tej samej liczby miejsc po przecinku, jak te, które zostały użyte w odniesieniu do każdej właściwości. Ostatnia cyfra musi być powiększona o jeden, jeżeli następną cyfrą jest większa niż 4.
- Wystarczy, że jedna właściwość nie jest zgodna z wartościami wskazanymi, a kategoria oliwy może być zmieniona lub zgłoszona jako niezgodna w odniesieniu do czystości do celów niniejszego rozporządzenia.
- Jeżeli właściwość oznaczona jest gwiazdką (*), odnosząc się do jakości oliwy, oznacza to, że:
 - dla oliwy lampante, odpowiednie limity jej dotyczące nie muszą być równocześnie przestrzegane,
 - dla oliwy z oliwek pierwszego tłoczenia, jeżeli co najmniej jeden z tych limitów różni się od wartości wskazanych, kategoria oliwy będzie zmieniona, chociaż oliwa będzie zmieniona, chociaż oliwa będzie zmieniona w jednej z kategorii oliwy z oliwek pierwszego tłoczenia.
- Jeżeli właściwość oznaczona jest dwiema gwiazdkami (**) oznacza to, dla wszystkich typów oliwy z wyciżczonych oliwek, że odpowiednie limity jej dotyczące mogą nie być równocześnie przestrzegane.

3) w dodatku 1 wprowadza się następujące zmiany:

a) pierwsze tiret otrzymuje brzmienie:

„— Kwasowość Załącznik II Oznaczenie wolnych kwasów tłuszczowych, metoda na zimno”;

b) tiret trzynaste otrzymuje brzmienie:

„— Kwasy tłuszczowe nasycone Załącznik VII Oznaczenie zawartości procentowej 2-monopalmitynianu w pozycji 2 glicerolu”;

4) tytuł załącznika II otrzymuje brzmienie:

„OZNACZANIE WOLNYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH, METODA NA ZIMNO”;

5) załącznik IV otrzymuje brzmienie:

„ZAŁĄCZNIK IV

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WOSKÓW METODĄ CHROMATOGRAFII 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 wytłocznym).

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 010–0,30 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 $\pm 0,1$ 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.

- 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 wytlóczyn 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 °C \pm 4.

Uwagi:

- Mieszaninę n-heksanu/eteru etylowego (99/1) należy przygotowywać codziennie.
- W celu wzrokowego skontrolovania 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 chromatografie gazowym (3.3), łącząc szczelną 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 (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 nachylenia.

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 nastrzykowego 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.

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:

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

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.

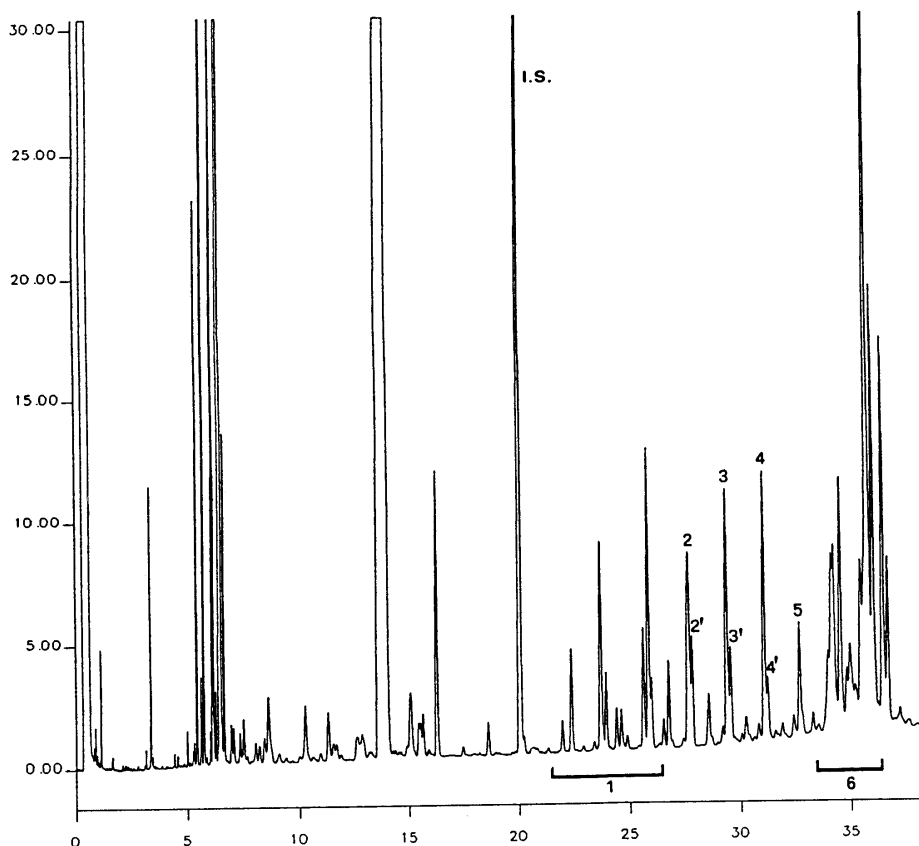
6. PREZENTACJA WYNIKÓW

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 wyciżczyn oliwek, gdzie C₄₆ łatwo jest zidentyfikować, ponieważ wykazuje wyraźną przewagę ilościową.

Wynik należy podać z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

Rysunek
Chromatogram wosków oliwy z oliwek (*)



Objaśnienie:

- I.S. = Arachidnian lauryłowy
 1 = Estry diterpenowe
 2 + 2' = Estry C₄₀
 3 + 3' = Estry C₄₂
 4 + 4' = Estry C₄₄
 5. = Estry C₄₆
 6 = Estry steroli i alkohole triterpenowe.

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

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.”;

6) załącznik VII otrzymuje brzmienie:

„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 nastrzykowy »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 polifenylo-metylosiloksanem, o grubości 0,10–0,30 µm, którą można stosować w temperaturze 370 °C.
- 3.19. Mikrostrzykawka o pojemności 10 µl, wyposażona w igłę o utwardzonej powierzchni, o długości co najmniej 7,5 cm, przeznaczona 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 rozprowadzenia 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 siliowania: 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 siliowania, 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 zubożnienia przed wykonaniem chromatografii na kolumnie z żelem krzemionkowym. Oleje o wolnej kwasowości powyżej 3 % muszą być zubożnione zgodnie z ppkt 5.1.1.1.
- 5.1.1.1. Do lejki 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 zubożnionego oleju kolejnymi porcjami 50–60 ml roztworu izopropanol/woda w proporcji 1/1 (V/V) (4.4), aż zniknie różowa barwa fenoloftaleiny.
- 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 żelom 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 zawieszinę 25 g żelom 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 żelom 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 żelom 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.

(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 próbówki 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. **Hydrolyza przez lipazę trzustkową**

- 5.2.1. Do próbówki do wirowania odważyć 0,1 g oleju przygotowanego zgodnie z ppkt 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 próbówkę 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 próbówkę 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 próbówki 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 próbówki 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 próbówkę 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 nasykującego (nastrzyk »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),
- ilość nasykiwanej 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:

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

gdzie:

A_x = pole pod pikiem odpowiadającym monopalmitynianowi glicerolu

ΣA = suma pól pod wszystkimi pikami monoglicerydów

Wynik należy podać z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

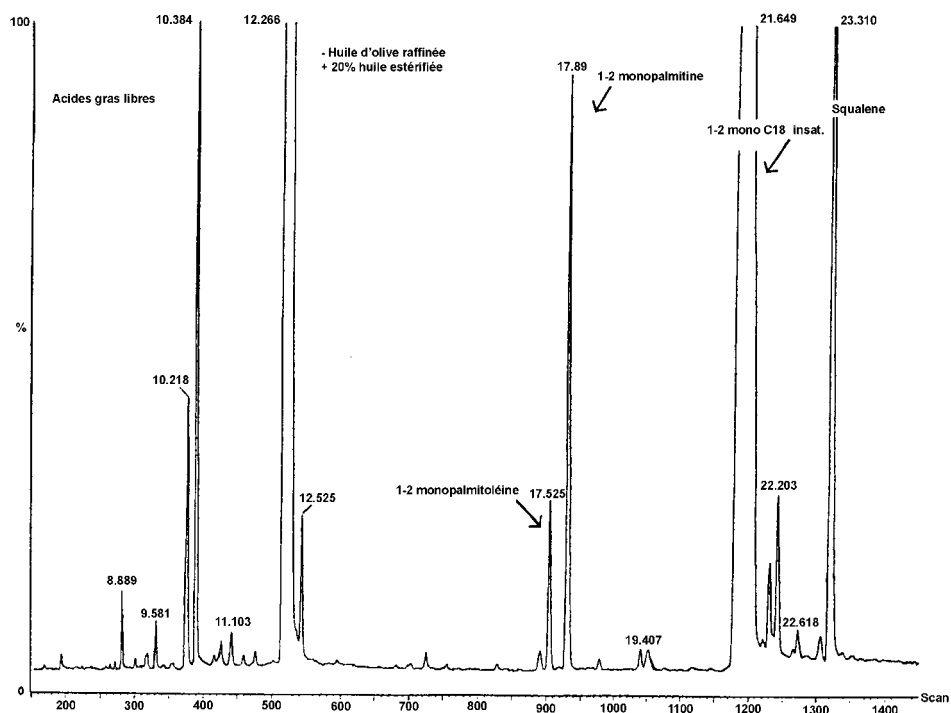
7. SPRAWOZDANIE Z ANALIZY

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.

Rysunek 1

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



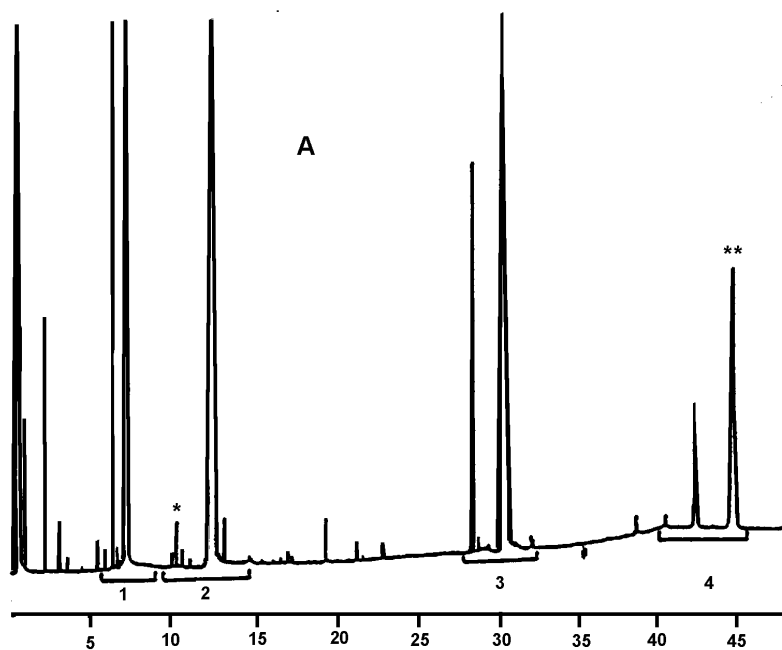
Objaśnienie: »Acides gras libres« = Wolne kwasy tłuszczowe; »Huile d'olive raffinée« = Rafinowana oliwa z oliwek – »+ 20 % huile estérifiée« = + 20 % oliwa z oliwek estryfikowana; »1-2 monopalmitine« = 1-2 monopalmityn – »1-2 monopalmitoléine« = 1-2 monopalmitoleina; »1-2 mono C₁₈ insat.« = 1-2 mono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

Rysunek 2

Chromatogram:

A) nie estryfikowanej oliwy z oliwek, po zadziałaniu na nią lipazą; po siliowaniu; 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 %.



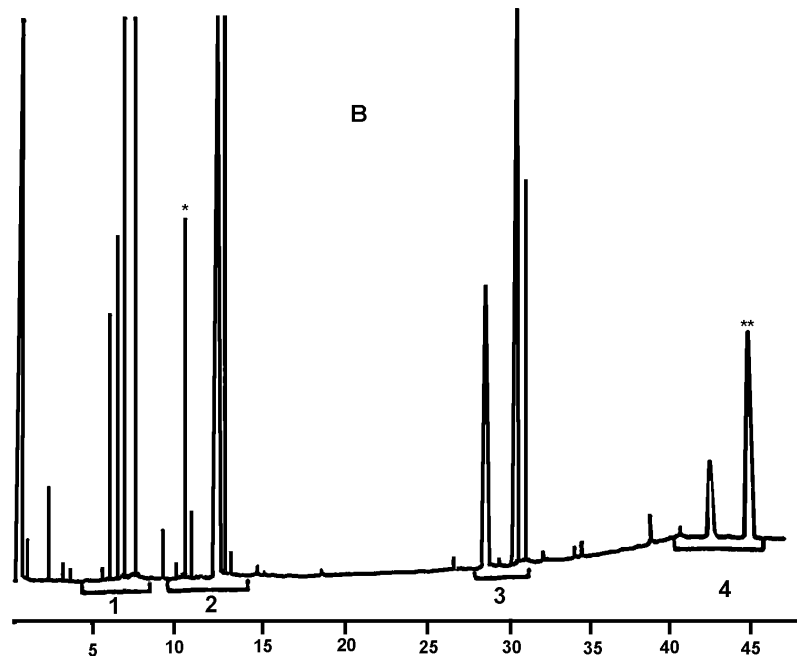
Objaśnienie:

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

Chromatogram:

B) oliwy estryfikowanej po zadziałaniu lipazą; po siliowaniu; 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

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 mieszadłe 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 uwalniającą 10 mikroekwiwalentów kwasu na minutę.”;

7) punkt 6.2 załącznika X „A” otrzymuje brzmienie:

„6.2. Estry metylowe przygotowuje się zgodnie z procedurą B przedstawioną w drugim załączniku X »B«. Substancje tłuszczowe o wolnej kwasowości powyżej 3 % muszą zostać uprzednio zobojętnione zgodnie z pkt 5.1.1 załącznika VII.”.