

31991R2568

5.9.1991

EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA

L 248/1

KOMISJONI MÄÄRUS (EMÜ) nr 2568/91,**11. juuli 1991,****oliiviõlide ja pressimisjääkide omaduste ja asjakohaste analüüsimeetodite kohta**

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Majandusühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 22. septembri 1966. aasta määrust nr 136/66/EMÜ õli- ja rasvaturu ühise korralduse kehtestamise kohta, ⁽¹⁾ viimati muudetud määrusega (EMÜ) nr 3577/90, ⁽²⁾ eriti selle artiklit 35a,

ning arvestades, et:

määruse nr 136/66/EMÜ lisas on kirjeldatud kõigis liikmesriikides turustatud ning liikmesriikide vahel, ühendusesiseses ja kolmandate riikidega peetava kaubavahetuse objektiks olevate oliiviõlide ja pressijääkoliiviõlide kirjeldused ja määratlused;

ilma et see piiraks olemasolevate sätete kohaldamist, tuleks erinevat liiki õlide eristamiseks iga õli füüsilised ja keemilised omadused ning neitsioliiviõli organoleptilised omadused määratleda asjaomaste toodete puhtuse ja kvaliteedi tagamiseks;

erinevat liiki õlide omadused tuleks kogu ühenduses kindlaks määrata ühtsetel alustel; selleks tuleks kehtestada ühenduse keemilise analüüsi ja organoleptilise hindamise meetodid; üleminekuajal tuleks lubada kasutada ka teisi liikmesriikides kohaldatavaid analüüsimeetodeid tingimusel, et erinevate tulemuste korral on otsustavaks ühenduse meetodil saadud tulemused;

seoses oliiviõli füüsiliste ja keemiliste omaduste määratluse ja analüüsimeetoditega tuleb kaupade koondnomenklatuuri grupi 15 lisamärkusi muuta;

neitsioliiviõli organoleptiliste omaduste hindamismeetod näeb ette valitud ja koolitatud degustaatorite hindamiskomisjonide loomise; seetõttu tuleks kindlaks määrata sellise struktuuri loomiseks vajalik ajavahemik; võttes arvesse raskusi, millega mõned

liikmesriigid degustaatorite hindamiskomisjonide koostamisel kokku puutuvad, tuleks lubada ka teiste liikmesriikide hindamiskomisjonide kasutamist;

oliiviõli pressimisjääkide impordi suhtes kohaldatava impordimaksusüsteemi nõuetekohase toimimise tagamiseks tuleks sätestada nende toodete õlisisalduse kindlaksmääramise ühtne meetod;

selleks, et vältida kaubandushäireid, tuleks sätestada enne käesoleva määruse jõustumist pakendatud õli müümine teatud aja jooksul;

komisjoni määrust (EMÜ) nr 1058/77, ⁽³⁾ viimati muudetud määrusega (EMÜ) nr 1858/88, ⁽⁴⁾ on asjakohane muuta;

õli- ja rasvaturu korralduskomitee ei ole oma eesistuja määratud tähtaja jooksul arvamust esitanud,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

1. Õli, mille omadused vastavad käesoleva määruse I lisa punktides 1, 2 ja 3 sätestatutele, käsitatakse neitsioliiviõlina määruse nr 136/66/EMÜ lisa punkti 1 alapunktide a, b ja c tähenduses.
2. Õli, mille omadused vastavad käesoleva määruse I lisa punktis 4 sätestatutele, käsitatakse lambiõlina määruse nr 136/66/EMÜ lisa punkti 1 alapunkti d tähenduses.
3. Õli, mille omadused vastavad käesoleva määruse I lisa punktis 5 sätestatutele, käsitatakse rafineeritud oliiviõlina määruse nr 136/66/EMÜ lisa punkti 2 tähenduses.

⁽¹⁾ EÜT 172, 30.9.1966, lk 3025/66.⁽²⁾ EÜT L 353, 17.12.1990, lk 23⁽³⁾ EÜT L 128, 24.5.1977, lk 6.⁽⁴⁾ EÜT L 166, 1.7.1988, lk 10.

4. Õli, mille omadused vastavad käesoleva määruse I lisa punktis 6 sätestatutele, käsitatakse puhta oliiviõlina määruse nr 136/66/EMÜ lisa punkti 3 tähenduses.

5. Õli, mille omadused vastavad käesoleva määruse I lisa punktis 7 sätestatutele, käsitatakse oliivijääkõlina määruse nr 136/66/EMÜ lisa punkti 4 tähenduses.

6. Õli, mille omadused vastavad käesoleva määruse I lisa punktis 8 sätestatutele, käsitatakse rafineeritud oliiviõlina määruse nr 136/66/EMÜ lisa punkti 5 tähenduses.

7. Õli, mille omadused vastavad käesoleva määruse I lisa punktis 9 sätestatutele, käsitatakse oliivijääkõlina määruse nr 136/66/EMÜ lisa punkti 6 tähenduses.

Artikkel 2

1. I lisas sätestatud õlide omadused määratakse kindlaks järgmiste analüüsimeetoditega:

- oleiinhappe protsendina väljendatud vabad rasvhapped määratakse kindlaks II lisas sätestatud meetodil,
- peroksiid arv määratakse kindlaks III lisas sätestatud meetodil,
- alifaatsed alkoholid määratakse kindlaks IV lisas sätestatud meetodil,
- steroolisisaldus määratakse kindlaks V lisas sätestatud meetodil,
- erütrodiool ja uvalool määratakse kindlaks VI lisas sätestatud meetodil,
- triglütseriidi 2. positsioonis olevad küllastunud rasvhapped määratakse kindlaks VII lisas sätestatud meetodil,
- trilinoleiini sisaldus määratakse kindlaks VIII lisas sätestatud meetodil,
- spektrofotomeetriline analüüs tehakse IX lisas sätestatud meetodil,
- rasvhapete koostis määratakse kindlaks X A ja X B lisas sätestatud meetodil,
- halogeenitud lenduvad lahustid määratakse kindlaks XI lisas sätestatud meetodil,
- neitsioliiviõli organoleptilisi omadusi hinnatakse XII lisas sätestatud meetodil,
- tõendid rafineerimise kohta saadakse XIII lisas sätestatud meetodil.

2. Organoleptiliste omaduste hindamine tehakse XII lisa nimeetatud degusteerimisjuhendis kirjeldatud korras analüüsija ja vajaduse korral spetsialisti abil. Kui analüüsi käigus ilmnevad toote kirjeldusest erinevad omadused, peab proovi hindama degustatorite hindamiskomisjon XII lisa sätetele vastavalt.

Hindamiskomisjon teeb nimetatud sätetele vastavalt teise analüüsi.

Kui organoleptiliste omaduste analüüs tehakse seoses sekkumissüsteemiga seotud toimingutega, teeb degustatorite komisjon selle hindamise XII lisa sätetele vastavalt.

Artikkel 3

Kuni 31. oktoobrini 1992 ei takista artiklis 2 sätestatud analüüsimeetodite kasutuselevõtmine liikmesriikidel kasutada teisi kontrollitud ja teaduslikult usaldusväärseid meetodeid tingimusel, et ühenduse meetoditega kehtivatele eeskirjadele vastavaks tunnistatavad tooted võivad vabalt liikuda. Enne teiste meetodite kasutamist teatavad asjaomased liikmesriigid sellest komisjonile.

Kui mõne teise meetodiga saadakse ühenduse meetodiga saadud tulemustest erinev tulemus, on otsustav ühenduse meetodiga saadud tulemus.

Artikkel 4

1. Liikmesriigid loovad XII lisa sätestatud meetodiga ettenähtud eeskirjade alusel organoleptiliste omaduste hindamiseks koolitatud ja valitud degustatorite hindamiskomisjonid.

2. Kui liikmesriigil on oma riigis hindamiskomisjoni moodustamisel raskusi, võib see liikmesriik kasutada teises liikmesriigis töötavat hindamiskomisjoni.

Artikkel 5

Kaupade koondnomenklatuuri grupi 15 lisamärkused 2, 3 ja 4 asendatakse XIV lisa märkustega.

Artikkel 6

1. Oliiviõli ekstraheerimisest tulenev õlikoogi ja muude jääkide õlisisaldus (CN-koodid 2306 90 11 ja 2306 90 19) määratakse kindlaks XV lisa sätestatud meetodil.

2. Lõikes 1 osutatud õlisisaldus väljendatakse õli massiprotsendina kuivaine massist.

Artikkel 7

Kohaldatakse ühenduse sätteid, mis käsitlevad muude ebasoovitavate ainete esinemist, kui XI lisa osutatud.

Artikkel 8

1. Liikmesriigid teatavad komisjonile käesoleva määruse rakendamiseks võetud meetmetest.

2. Liikmesriigid saadavad komisjonile iga poolaasta alguses aruande eelmise poolaasta jooksul tehtud katsete analüütiliste andmete kohta.

Õli- ja rasvaturu korralduskomitee võtab tulemusi arvesse määruse nr 136/66/EMÜ artiklis 39 sätestatud korras.

Artikkel 9

Määrus (EMÜ) nr 1058/77 tunnistatakse kehtetuks.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 11. juuli 1991

Artikkel 10

1. Käesolev määrus jõustub kolmandal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Ühenduste Teatajas*.

XII lisas sätestatud meetodit kohaldatakse siiski 1. jaanuarist 1992, välja arvatud sekkumissüsteemiga seotud toimingute puhul.

2. Käesolevat määrust ei kohaldata enne käesoleva määruse jõustumist pakendatud ja kuni 31. oktoobrini 1992 turustatava oliiviõli ja oliivijääkõli suhtes.

Komisjoni nimel

komisjoni liige

Ray MAC SHARRY

LISAD

Kokkuvõte

	Lehekülg
I lisa: Oliiviõli omadused	372
II lisa: Vabade rasvhapete määramine	374
III lisa: Peroksiidaru määramine	376
IV lisa: Alifaatsete alkoholide sisalduse määramine kapillaargaasikromatograafia teel	378
V lisa: Steroolide koostise ja sisalduse gaasikromatograafiline määramine kapillaarkolonniga	383
VI lisa: Erütrodiooli ja uvalooli määramine	391
VII lisa: Triglutseriidi 2. positsioonis olevate küllastunud rasvhapete määramine	393
VIII lisa: Trilinoleiini sisalduse määramine	397
IX lisa: Spektrofotomeetiline analüüs ultraviolettpiirkonnas	401
X A lisa: Rasvhapete metüülestrite gaasikromatograafiline analüüs	405
X B lisa: Rasvhapete metüülestrite ettevalmistamine	413
XI lisa: Oliiviõli halogeenitud lenduvate lahustite määramine	417
XII lisa: Neitsioliiviõli organoleptiline hindamine	418
XIII lisa: Õli rafineerimise tõendamine	444
XIV lisa: Kaupade koondnomenklatuuri grupi 15 lisamärkused 2, 3 ja 4	446
XV lisa: Oliiviõli pressimisjäakide õlisisaldus	449
XVI lisa: Joodiarvu määramine	451

I LISA

OLIIVIÕLI OMADUSED

Liik	Happesus %	Peroksiid- arv meq(O ₂)/kg	Halogeeni- tud lahus- tid mg/kg (1)	Allifaatsed alkoholid mg/kg	Külastu- nud rasv- happed 2. positiiv- mis triglü- seriidide % arvestu- ses	Eritro- diol + uvalool %	Triinoleiin %	Kolesterool %	Brassikas- terool %	Kampeste- rool %	Stigmaeste- rool %	β-sitosterool % (2)	Delta-7- stigmaeste- rool %	Steroidid kokku mg/kg
1. Ekstra neitsioliiviõli	M 1,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
2. Neitsioliiviõli	M 2,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
3. Tavaline neitsioliiviõli	M 3,3	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
4. Lambiõli	> 3,3	> 20	> 0,20	M 400	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	—	m 93,0	M 0,5	m 1 000
5. Rafineeritud oliiviõli	M 0,5	M 10	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
6. Oliiviõli	M 1,5	M 15	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
7. Töötlemita oliivijääkõli	M 2,0	—	—	—	M 1,8	M 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	—	m 93,0	M 0,5	m 2 500
8. Rafineeritud oliivijääkõli	M 0,5	M 10	M 0,20	—	M 2,0	M 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 800
9. Oliivijääkõli	M 1,5	M 15	M 0,20	—	M 2,0	> 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 800

M = maksimaalne, m = minimaalne.

(1) Elektroniharde detektoriga kindlakstehtud ühendite ülempiir kokku. Üksikult kindlakstehtud komponentide ülempiir on 0,10 mg/kg.

(2) Delta-5-2-3-stigmastadiernool + klerosterool + sitosterool + sitostanol + delta-5-avenosterool + delta-5-24 stigmastadiernool.

Märkus:

Kui mõni õli omadustest ei ole sätestatud piirides, ei võeta õli vastu.

Liik	Happesisaldus							K ₂₇₀	K ₂₇₀ koos alumiiniumoksiidiga (1)	Delta K	Eksperthinnang
	Mürisihape %	Linoleenihape %	Arahiinhape %	Eikoseenihape %	Beheenihape %	Lignotseriinhape %	K ₃₃₂				
1. Ekstra neitsioliiviõli	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 2,40	M 0,20	M 0,10	M 0,01	≥ 6,5
2. Neitsioliiviõli	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 2,50	M 0,25	M 0,10	M 0,01	≥ 5,5
3. Tavaline neitsioliiviõli	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 2,50	M 0,25	M 0,10	M 0,01	≥ 3,5
4. Lambiõli	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 3,70	> 0,25	M 0,11	—	< 3,5
5. Rafineeritud oliiviõli	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 3,40	M 1,20	—	M 0,16	—
6. Oliiviõli	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 3,30	M 1,00	—	M 0,13	—
7. Töötlemta oliivijääkõli	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	—	—	—	—	—
8. Rafineeritud oliivijääkõli	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 5,50	M 2,50	—	M 0,25	—
9. Oliivijääkõli	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 5,30	M 2,00	—	M 0,20	—

Märkus:

(1) Õlide puhul, mille happesus on suurem kui 3,3 %, on juhul, kui K₂₇₀ on pärast alumiiniumoksiidiga töötlemist üle 0,1, vaja teha XIII lisas osutatud rafineerimiskatse. Puhituse kindlaksmääramisel määratakse juhul, kui K₂₇₀ ületab asjaomase kategooria piiri, puhtus kindlaks pärast alumiiniumoksiidiga töötlemist.

II LISA

VABADE RASVHAPETE MÄÄRAMINE

1. HAPPESUSE MÄÄRAMINE

Vabade rasvhapete määramine oliiviõlis. Vabade rasvhapete sisaldust väljendatakse tavapärasel viisil arvutatud happesusena.

1.1. Põhimõte

Proov lahustatakse lahustite segus ja vabad rasvhapped tiitritakse kaaliumhüdrosiidi etanoolilahuses.

1.2. Reaktiivid

Kõik reaktiivid peaksid olema tunnustatud analüütilise kvaliteediga ja vesi peaks olema kas destilleeritud või samaväärselt puhtusega.

1.2.1. Dietüüleetri ja 95 % etanooli (V/V) segu võrdsetes osades.

Märkus: Dietüüleeter on väga kergesti süttiv ning võib moodustada plahvatusohtlikke peroksiide. Selle kasutamisel tuleks olla ettevaatlik.

Segu neutraliseeritakse kasutamise hetkel kaaliumhüdrosiidi lahusega (1.2.2) lisades 100 ml segu kohta 0,3 ml fenoolftaleiini lahust (1.2.3).

Märkus: Kui dietüületrit ei ole võimalik kasutada, võib kasutada etanooli ja tolueni sisaldavate lahustite segu. Vajaduse korral võib etanooli asendada 2-propanool.

1.2.2. Kaaliumhüdrosiid, tiitritud etanoolilahusena, c(KOH) 0,1 mol/l või vajaduse korral c(KOH) 0,5 mol/l.

Kaaliumhüdrosiidi etanoolilahuse täpne kontsentratsioon peab olema teada ning seda tuleb enne kasutamist vahetult kontrollida. Kasutatakse lahust, mis on valmistatud vähemalt viis päeva enne kasutamist, ning see dekanteeritakse kummist punniga tumedasse klaaspudelisse. Lahus peaks olema värvitu või helekollast värvi.

Märkus: Kaaliumhüdrosiidi stabiilset värvusetut lahust saab valmistada järgmiselt: 1 000 ml etanooli lastakse koos 8 g kaaliumhüdrosiidi ja 0,5 g alumiiniumilaastudega keema ning keedetakse püstjahutiga kolvis tund aega. Destilleeritakse kohe. Destillaadis lahustatakse vajalik kogus kaaliumhüdrosiidi. Lahus jäetakse mitmeks päevaks seisma ja kaaliumkarbonaadi sademest dekanteeritakse selge supernatant.

Lahuse võib valmistada ilma destilleerimiseta järgmiselt: 1 000 ml etanoolile lisatakse 4 ml alumiiniumbutülaati ja segu jäetakse mitmeks päevaks seisma. Supernatant dekanteeritakse ja selles lahustatakse vajalik kogus kaaliumhüdrosiidi. Lahus on kasutamiskvalm.

1.2.3. Fenoolftaleiin, 10 g/l lahust 95–96 % etanoolis (V/V) või alkalisinises, (väga tugeva värviga rasvade puhul) 20 g/l lahust 95–96 % etanoolis (V/V).

1.3. Seadmed

Tavalised laboriseadmed, sealhulgas:

1.3.1. analüütilised kaalud;

1.3.2. 250 ml Erlenmeyeri kolb;

1.3.3. 10 ml bürett, mõõtskaala ühikutega 0,05 ml.

1.4. Menetlus

1.4.1. Proovi ettevalmistamine analüüsiks

(Katse tehakse filtreeritud prooviga. Kui niiskus ja lisandid on kokku alla 1 %, kasutatakse proovi ilma täiendava töötlemiseta; kui need on üle 1 %, tuleks proov filtreerida.)

1.4.2. Proovi võtmine

Proov võetakse sõltuvalt eeldatavast happesusest järgmise tabeli alusel:

Hinnanguline happearv	Proovi mass (g)	Kaalumistäpsus (g)
< 1	20	0,05
1–4	10	0,02
4–15	2,5	0,01
15–75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Proov kaalutakse Erlenmeyeri kolvis (1.3.2).

1.4.3. Määramine

Proov (1.4.2) lahustatakse 50–150 ml dietüüleetri ja etanooli (1.2.1) varem neutraliseeritud segus.

Lahus tiitritakse, segades sellesse kaaliumhüdroksiidi 0,1 mol/l lahusega (1.2.2) (vt märkus 2), kuni indikaator muutub (fenooltaleiini roosa värvus püsib vähemalt 10 sekundit).

Märkus 1. Kaaliumhüdroksiidi tiitritud etanoolilahuse (1.2.2) võib asendada kaalium- või naatriumhüdroksiidi vesilahusega tingimusel, et lisatud vee maht ei põhjusta faaside eraldumist.

Märkus 2. Kui 0,1 mol/l kaaliumhüdroksiidilahust on vaja rohkem kui 10 ml, kasutatakse 0,5 mol/l lahust.

Märkus 3. Kui lahus muutub tiitrimise ajal häguseks, tuleb lisada nii palju lahustit (1.2.1) kui on vaja selge lahuse saamiseks.

1.5. Happesus: väljendatud oleinhappe protsendina

Happesus massiprotsendina on võrdne:

$$V \times c \times \frac{M}{1000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

kus:

V on kasutatud tiitritud kaaliumhüdroksiidi maht milliliitrites;

c on täpne kontsentratsioon moolides kasutatud kaaliumhüdroksiidi tiitritud lahuse liitri kohta;

M on molaarmass grammides tulemuse väljendamiseks (282) kasutatud happe mooli kohta;

m on proovi mass grammides.

Tulemus on kahe määramise aritmeetiline keskmine.

III LISA

PEROKSIIDARVU MÄÄRAMINE

1. KOHALDAMISALA

Käesolevas standardis kirjeldatakse õlide ja rasvade peroksiidaru määramise meetodit.

2. KASUTUSVALDKOND

Standardit kohaldatakse loomsete ja taimsete õlide ja rasvade suhtes.

3. MÄÄRATLUS

Peroksiidaru on nende proovis olevate ainete kogus aktiivse hapniku milliekvivalentina kilogrammi kohta, mis kirjeldatud töötamistingimustel kaaliumjodiidi oksüdeerivad.

4. PÕHIMÕTE

Katsekogust töödeldakse äädikhappe ja kloroformi lahuses kaaliumjodiidi lahusega. Eraldunud jood tiitritakse naatriumtiosulfaadi standardlahusega.

5. SEADMED

Seadmetel ei tohi olla redutseerivaid või oksüdeerivaid aineid.

Märkus: Lihvitud pindu ei tohi määrdainega määrida.

5.1. 3 ml klaasist kühvel.

5.2. Lihvitud kaela ja punniga 250 ml mahuga kolvid, enne kuivatatud ja täidetud puhta kuiva vääriskaasiga (lämmastik või soovitatavalt süsinikdioksiid).

5.3. 25 või 50 ml bürett, jaotatud 0,1 ml ühikuteks.

6. REAKTIIVID

6.1. Analüütiliselt puhta reaktiivi kvaliteediga kloroform, millest hapnik on vabastatud puhta, kuiva inertgaasi barboteerimisel.

6.2. Analüütiliselt puhta kvaliteediga jää-äädikas, millest hapnik on vabastatud puhta, kuiva inertgaasi voolu barboteerimisel.

6.3. Kaaliumjodiidi küllastunud vesilahus, vahetult ette valmistatud ning joodi ja jodaatideta.

6.4. Naatriumtiosulfaat, 0,01 või 0,002 Mol/L täpsusega vahetult enne kasutamist standarditud vesilahust.

6.5. Tärglise lahus, 10 g/l vesilahus, värskest looduslikust lahustuvast tärglisest valmistatud.

7. PROOV

Tagatakse proovi võtmine ja selle säilitamine varjus, jahedas ja täielikult täidetud klaasmahutites, mis on hermeetiliselt lihvkorgi või korgist punniga suletud.

8. TÖÖ KÄIK

Katsed tehakse hämara päevavalguse või kunstliku valgustusega. Klaasist kühvlisse (5.1) või selle puudumise korral kolbi (5.2) kaalutakse 0,001 g täpsusega järgmisele tabelile vastava massiga proov, mille aluseks on eeldatav peroksiidaru:

Hinnanguline peroksiid arv (meq)	Katsekoguse mass (g)
0–12	5,0–2,0
12–20	2,0–1,2
20–30	1,2–0,8
30–50	0,8–0,5
50–90	0,5–0,3

Kolvilt (5.2) eemaldatakse punn ning sellesse pannakse klaasist kühvel, millel on katsekogus. Lisatakse 10 ml kloroformi (6.1). Katsekogus lahustatakse kiiresti segamise teel. Lisatakse 15 ml äädikhapet (6.2) ja seejärel 1 ml kaaliumjodiidi lahust (6.3). Kolvile pannakse kiiresti punn, loksutatakse üks minut ja jäetakse siis viieks minutiks temperatuurile 15–25 °C varju seisma.

Lisatakse umbes 75 ml destilleeritud vett. Vabastatud jood tiitritakse naatriumtiosulfaadi lahusega (6.4) (0,002 Mol/L lahuse eeldatava väärtuse < 12 puhul ja 0,01 Mol/L eeldatava väärtuse > 12 puhul), loksutatakse kõvasti, kasutades indikaatorina tärglase lahust (6.5).

Ühe ja sama prooviga tehakse 2 määramist.

Samal ajal tuleb teha ka pimekatse. Kui pimekatse tulemus on suurem kui 0,05 ml 0,01 Mol/L naatriumtiosulfaadi lahust (6.4), asendatakse puhastamata reaktiivid.

9. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

Peroksiid arv aktiivse hapniku milliekvivalentidena kilogrammi kohta saadakse valemiga:

$$PV = \frac{V \times T \times 1\,000}{m}$$

kus

V on katses kasutatud naatriumtiosulfaadi standardlahuse (6.4) milliliitrite arv, mida on pimekatse arvesse võtmiseks parandatud;

T on kasutatud naatriumtiosulfaadi lahuse (6.4) täpne molaarsus;

m on katsekoguse mass grammides.

Tulemus on kahe määramise aritmeetiline keskmine.

IV LISA

ALIFAATSETE ALKOHOLIDE SISALDUSE MÄÄRAMINE KAPILLAARGAASIKROMATOGRAAFIA TEEL

1. EESMÄRK
Käesolev meetod kirjeldab alifaatsete alkoholide sisalduse määramist õlides ja rasvades.
2. PÕHIMÕTE
Rasvaine, millele on sisestandardina lisatud 1-eikosanooli, seebistatakse kaaliumhüdroksiidi etanoolilahusega ning seebistumatu aine ekstraheeritakse dietüülestriga.
Alkoholfraktsioon eraldatakse seebistumatust ainest kromatograafiaga kaaliumhüdroksiidi kihiga immutatud silikageeliga; silikageelist saadud alkohol muundatakse trimetüülsilüülestriteks ja analüüsitakse kapillaargaasikromatograafiaga.
3. SEADMED
 - 3.1. 250 ml ümarapõhjaline püstjahutiga ja klaasist lihvorgiga kolb.
 - 3.2. 500 ml mahuga jaotuslehtrid.
 - 3.3. Kolvid mahuga 250 ml.
 - 3.4. Kromatograafiline ilmutusnõu planaarkromatograafiliseks (ÕKK) analüüsiks klaasplaatidega mõõtmetes 20 × 20.
 - 3.5. UV-valgus lainepikkusega 366 või 254 nm, ÕKK-plaatide uurimiseks.
 - 3.6. 100 µl ja 500 µl mikrosüstal doseerimiseks.
 - 3.7. Klaasist filterlehter poorse filtriga G 3 (15–40 µm), mille ligikaudne diameeter on 2 cm ja ligikaudne kõrgus 5 cm ning mis sobib filtreerimiseks vaakumis ja millel on 12/21 lihvkernel.
 - 3.8. 50 ml vaakumkolb, millel on 12/21 lihvmuhv kasutamiseks koos filterlehteriga (3.7).
 - 3.9. 10 ml katseklaas koonusekujulise põhja ja tropiga.
 - 3.10. Gaasikromatograaf, mida kasutatakse kapillaarkolonniga ja mis on varustatud järgmistest seadistest koosnevate jaotussüsteemidega:
 - 3.10.1. termostaatiline kolonnikamber (kolonnahi), mis hoiab nõutavat temperatuuri ±1 °C täpsusega;
 - 3.10.2. reguleeritava temperatuuriga aurustamise seade silaniseeritud klaasist aurustajaga;
 - 3.10.3. leekionisatsioonidetektor ja muundurvõimendi;
 - 3.10.4. koos muundurvõimendiga kasutatav integraatormeerik (3.10.3), mille reageerimisaeg ei ületa 1 sekundit ja mille paberi kiirust saab muuta.
 - 3.11. Klaasist või sulatatud ränidioksiidist kapillaarkolonn pikkusega 20–30 cm, sisediameetriga 0,25–0,32 mm, millel on SE-52 või SE-54 vedelfaas või samaväärne ja mille statsionaarse faasi kile paksus on 0,10–0,30 µm.
 - 3.12. 10 µl karastatud nõelaga gaasikromatograafias kasutatav mikrosüstal.
4. REAKTIIVID
 - 4.1. Kaaliumhüdroksiid, umbes 2 mol/L etanoolilahus: 130 g kaaliumhüdroksiidi (miinimumkontsentratsiooniga 85 %) lahustatakse samal ajal 200 ml destilleeritud vees jahutades ja täiendatakse etanooliga kuni 1 l märgini. Lahust tuleks hoida õhukindlalt suletud tumedat värvi klaaspudelil.
 - 4.2. Dietüüleeter, analüüsipuhas.
 - 4.3. Veevaba naatriumsulfaat, analüüsipuhas.

- 4.4. Silikageeliga kaetud ÕKK-plaadid, ilma fluorestsentsindikaatorita, paksusega 0,25 mm (võib osta valmis-kujul).
- 4.5. Kaaliumhüdroksiid, umbes 0,2 mol/L etanoolilahus; 13 g kaaliumhüdroksiidi lahustatakse 20 ml destilleeritud vees ja täiendatakse etanooliga 1 l märgini.
- 4.6. Benseen, kromatograafia jaoks. (Vt 5.2.2).
- 4.7. Atsetoon, kromatograafia jaoks. (Vt 5.2.2).
- 4.8. Heksaan, kromatograafia jaoks. (Vt 5.2.2).
- 4.9. Dietüüleeter, kromatograafia jaoks. (Vt 5.2.2).
- 4.10. Kloroform, kromatograafia jaoks.
- 4.11. Võrdluslahus, planaarkromatograafia jaoks: 5 % C₂₀–C₂₈ alkoholide segu kloroformis.
- 4.12. 0,2 % 2,7-deklorofluorestseiini lahus etanoolis. Lahust muudetakse veidi aluseliseks mõne tilga 2 mol/L kaaliumhüdroksiidi lahuse lisamisega.
- 4.13. Veevaba püridiin, kromatograafia jaoks.
- 4.14. Heksametüüldisilasaan.
- 4.15. Trimetüülklorosilaan.
- 4.16. Alifaatsete alkoholide (C₂₀–C₂₈) trimetüülsilüüleeterite standardlahused. Standardlahused võivad olla valmistatud puhaste alkoholide segudest vahetult enne kasutamist.
- 4.17. 0,1 % (m/V) 1-araanhappe lahus CHCl₃-s (sisestandard).
- 4.18. Kandegaasid: vesinik ja heelium, gaasikromatograafia kvaliteediga.
- 4.19. Abigaasid:
— vesinik, gaasikromatograafia kvaliteediga,
— õhk, gaasikromatograafia kvaliteediga.
5. TÖÖ KÄIK
- 5.1. Seebistumatu aine ettevalmistamine.
- 5.1.1. 500 µl mikrosüstlaga pannakse 250 ml ümarapõhjalisse kolbi 0,1protsendilist 1-eikosanooli (kasutada võib ka 1-heneikosanooli) lahust (4.17), milles sisalduva 1-eikosanooli määra on ligikaudu 10 % analüüsimiseks võetud proovi alifaatsete alkoholi sisaldusest. Näiteks 5 g oliiviõli või seemneõli proovile lisatakse 250 µl ja 5 g oliivijääkõlile lisatakse 1 500 µl 0,1protsendilist 1-eikosanooli lahust. Sisestandardi lahus aurustatakse atmosfääril N₂ kuivaks.
- Kolbi kantakse kvantitatiivselt 5 g kuiva filtreeritud proovi.
- 5.1.2. Lisatakse 50 ml 2 mol/L kaaliumhüdroksiidi etanoolilahust, seejärel käivitatakse püstjahuti ja lahust kuumutatakse auruvannil tasakesi keemiseni ning segatakse kogu keemisprotsessi ajal pidevalt, kuni toimub seebistamine (lahus muutub selgeks). Kuumutatakse veel 20 minutit ning siis lisatakse kondensaatori kaudu 50 ml destilleeritud vett, seejärel ühendatakse kondensaator lahti ning kolb jahutatakse temperatuurile ligikaudu 30 °C.
- 5.1.3. Kolvi sisu kantakse kvantitatiivselt 500 ml jaotuslehtrisse ja kolbi loputatakse 2 × 25 ml destilleeritud veega. Lisatakse ligikaudu 80 ml dietüületrit, loksutatakse tugevasti 30 sekundit ja need kaks faasi jäetakse siis kihistuma (vt märkus 1).
- Madalam vesifaas kantakse teise lehtrisse. Veefaasi ekstraheeritakse samal viisil veel kaks korda, kasutades mõlemal korral 60–70 ml dietüületrit.
- Märkus 1. Emulsioonid võib eraldada, lisades sisse pihustades väikse koguse etüülalkoholi või metüülalkoholi.
- 5.1.4. Dietüüleetri ekstraktid koondatakse jaotuslehtrisse ja pestakse destilleeritud veega (50 ml korraga), kuni pesuvee annab neutraalse reaktsiooni.
- Vesifaas visatakse ära, eetrifaas kuivatatakse veevaba naatriumsulfaadiga ja filtreeritakse enne kaalutud 250 ml kolbi, seejärel pestakse lehter ja filter väikse koguse dietüüleetriga, mis liidetakse kogumassile.

5.1.5. Eeter aurustatakse aeglaselt kuumutades, kuni seda on järele vaid mõni milliliiter, ja kuivatatakse nõrgas vaakumis või lämmastikuvoolus; lõpuks kuivatatakse ahjus temperatuuril 100 °C umbes 15 minutit ning jääk kaalutakse pärast eksikaatoris jahutamist.

5.2. Alkoholifraktsioonide eraldamine.

5.2.1. Aluseliste TLC-plaatide (4.4) ettevalmistamine. Plaadid immutatakse 10 sekundi jooksul täielikult 0,2 mol/L kaaliumhüdrosiidi lahuses, jäetakse seejärel kaheks tunniks katte all kuivama ning lõpuks asetatakse need ahju üheks tunniks temperatuurile 100 °C.

Plaadid võetakse ahjust ning neid hoitakse kuni kasutamiseni kaltsiumkloriidi eksikaatoris. Selliselt töödeldud plaadid tuleb kasutada kahe nädala jooksul.

Märkus 2. Kui aluselisi silikageeli plaate kasutatakse alkohoolse fraktsiooni eraldamiseks, ei ole seebistumatuid aineid vaja A1203-ga töödelda. Selliselt on kõik happühendid (rasvhapped ja muud) algsel kujul, sisaldades nii alifaatse alkoholi ja eeterliku alkoholi sidemeid, mis on mõlemad selgelt steroolsideemest eraldatud.

5.2.2. Ilmutusnõusse viiakse ligikaudu 1 cm-ni benseeni ja atsetooni 95 : 5 lahus. Selle asemel võib kasutada ka heksaani ja dietüüleetri 65 : 35 lahust. Ilmutusnõu suletakse ja lahus jäetakse auru ja vedeliku tasakaalustumiseks sinna vähemalt pooleks tunniks. Selleks et vähendada ilmutusaega umbes ühe kolmandiku võrra ja saavutada komponentide ühtsem ja korrapärasem eluent, võib ilmutusnõu sisepinnale kinnitada eluendiga kastetud filterpaberiribad.

Märkus 3. Reproduitseeritavate ilmutustingimuste saamiseks tuleb igaks analüüsiks kasutada uut ilmutuslahust.

5.2.3. Kloroformis valmistatakse umbes 5 % seebistamatu aine (5.1.5) lahus ja 300 µl lahust kantakse 100 µl mikrosüstlaga võimalikult õhukese ja ühtlase kihina ÖKK-plaadile 2 cm kaugusele ÖKK-plaadi alumisest servast. Selleks et alifaatse alkoholi sidet oleks pärast ilmutamist lihtsam identifitseerida, pannakse 2–3 µl alifaatse alkoholi võrdluslahust (4.11) ühele plaadi servale eelmisega samale tasandile.

5.2.4. Plaat asetatakse ilmutusnõusse, nagu punktis 5.2.2 ette nähtud. Temperatuuri hoitakse vahemikus 15—20 °C. Ilmutusnõu suletakse kohe ning proov jäetakse elueeruma, kuni lahusti piir on jõudnud plaadi ülemisest servast 1 cm kaugusele. Seejärel võetakse plaat ilmutusnõust välja ning lahusti aurustatakse kuuma õhu voolus või lastakse plaadil natuke aega kaane all seista.

5.2.5. Plaadile pritsitakse õhukese ja ühtlase kihina 2,7-diklorofluorestseini lahust; kui plaati vaadeldakse ultravioletvalguses, on alifaatse alkoholi võõndid võimalik identifitseerida võrdlemisel vahetult selle kohal oleva triterpeenalkoholide võõndi alifaatsete alkoholidega; alifaatsete alkoholide ja triterpeenalkoholide võõndid märgistatakse musta pliitsiga.

Märkus 4. Alifaatsete alkoholide ja triterpeenalkoholide võõndi eemaldamise nõude tingib mõningate alifaatsete alkoholide võimalik migreerumine triterpeenalkoholide võõndisse.

5.2.6. Märgistatud piirkonnas olev silikageel kraabitakse metallist spaatliga ära. Eemaldatud materjal jagatakse väikesteks osakesteks ning kantakse filterlehtrisse (3.7), seejärel lisatakse 10 ml kuuma kloroformi, lehtri sisu segatakse põhjalikult metallist spaatliga, filtreeritakse vaakumis ning filtraat kogutakse filterlehtri seotud kolbi (3.8).

Lehtri olevat jääki pestakse 3 × 10 ml etüüleetriga ning filtraat kogutakse samasse lehtri olevasse kolbi. Filtraat aurustatakse ligikaudu 4—5 ml mahuni ning jääklahus juhatakse 10 ml enne kaalutud katseklaasi (3.9); katseklaas kuivatatakse nõrgas lämmastiku voolus aeglaselt kuumutades. Jääk lahustatakse uuesti mõne tilga atsetooni lisamise teel, kuivatatakse ning asetatakse 10 minutiks ahju temperatuuril 105 °C, võetakse seejärel välja, jahutatakse eksikaatoris ja kaalutakse.

Katseklaasis olev jääk koosneb alkoholifraktsioonist.

5.3. Trimetüülsilüüleerite valmistamine.

5.3.1. Niiskuse imendumist (märkus 6) vältides lisatakse alkoholifraktsiooni sisaldavasse katseklaasi iga alkoholi milligrammi kohta 50 µl silüülivat reagenti, mis koosneb 9 : 3 : 1 mahuga (märkus 5) püridiiniheksametüüldisilasaan-trimetüülklorosilaani segust.

Märkus 5. Müügil on kasutusvalmid lahused; näiteks silüülivad reagentid nagu N, 0-bis-trimetüülsilüültrifluorsetamiid + 1 % trimetüülklorosilaan segamiseks sama mahu veevaba püridiiniga.

- 5.3.2. Katseklaas suletakse punniga ning loksutatakse hoolikalt kuni alkoholide lahustumiseni, ilma et katseklaas ümber läheks. Seejärel jäetakse see vähemalt 15 minutiks toatemperatuurile ning tsentrifuugitakse mõni minut; selge lahus on gaasikromatograafiliseks analüüsiks valmis.

Märkus 6. Kerge opalestsentsi tekkimine on tavaline ning ei sega. Valge helbelise massi tekkimine või roosa värvuse ilmumine on niiskuse esinemise või reaktiivi halvenemise märgiks. Sel juhul katsed korratakse.

- 5.4. Gaasikromatograafiline analüüs.

- 5.4.1. Esialgsed toimingud ja kapillaarkoloni ettevalmistamine.

- 5.4.1.1. Kapillaarkolonn paigaldatakse gaasikromatograafi nii, et koloni algus ühendatakse aurustiga, mis on seotud jaotussüsteemiga, ning koloni lõpp ühendatakse detektoriga.

Tehakse gaasikromatograafi üldine kontroll (gaasiseadmete lekkedindlus, detektori, jaotussüsteemi ja registreerimise süsteem jne tõhusus).

- 5.4.1.2. Tuleks ette valmistada kapillaarkolonid, mida kasutatakse esimest korda. Kapillaarkoloni suunatakse natuke kandegaasi ning seejärel lülitatakse sisse gaasikromatograaf ning kuumutatakse järkjärguliselt kuni saavutatakse temperatuur, mis on töötemperatuurist vähemalt 20 °C kõrgem (vt märkus 7). Seda temperatuuri hoitakse vähemalt kaks tundi ning seejärel viiakse gaasikromatograaf töötingimustele vastavaks (gaasi juurdevoolu ja jaotumise reguleerimine, leegi süütamine, elektrilise meerikuga ühendamine, kolonni ahju temperatuuri kohandamine, detektor ja injektor jne) ning signaali tundlikkus kohandatakse vähemalt kaks korda suuremaks, kui analüüsi tegemiseks kavandatud. Nulljoon peab olema sirge, selles ei tohi olla mingisuguseid piike ning see ei tohi triivida.

Negatiivne rektilineaarne/sirgjooneline triiv osutab kolonniühenduste puudulikule tihedusele, samas kui positiivne triiv osutab koloni puudulikule ettevalmistamisele.

Märkus 7. Ettevalmistamisel on temperatuur kasutatava vedelfaasi maksimaalsest temperatuurist vähemalt 20 °C madalam.

- 5.4.2. Töötingimuste valik.

- 5.4.2.1. Üldised töötingimused on järgmised:

- koloni temperatuur: alguses määratakse isoterm kaheksaks minutiks temperatuurile 180 °C ja seadistatakse seejärel iga minuti järel 5 °C võrra ning 15 minuti pärast temperatuurini 260 °C tõusma,
- aurusti temperatuur: 280 °C,
- aurusti temperatuur: 290 °C,
- kandegaasi voolukiirus: heelium 20–35 cm/s, vesinik 30–50 cm/s,
- jaotussuhe: 1 : 50 1 : 100 juures,
- seadme tundlikkus: 4–16-kordne minimaalne sumbumine,
- registreerimise tundlikkus: 1–2 mV fs,
- paberi kiirus: 30–60 cm/h,
- süstitava aine kogus: 0,5–1 µl TMSE lahust.

Selleks et kromatogrammid vastaksid alljärgnevatele tingimustele, võib eespool nimetatud tingimusi kooskõlas koloni ja gaasikromatograafi omadustega muuta:

- alkoholi peetumisaeg C_{26} on 18 ± 5 minutit,
- alkoholi C_{22} piik on 80 ± 20 % oliiviõli skaala lõppväärtusest ja 40 ± 20 % seemneõli skaala lõppväärtusest.

- 5.4.2.2. Eespool nimetatud tingimusi kontrollitakse TMSE alkoholide standardlahuse korduva sissepritse teel ning töötingimusi kohandatakse parimate võimalike tulemuste saamiseks.

- 5.4.2.3. Piikide integreerimise parameetrid määratakse selliselt, et saavutatakse arvessevõetavate piigipindalade õige hindamine.

- 5.4.3. Analüüsi käik.

- 5.4.3.1. 10 µl mikrosüstlasse tõmmatakse 1 ml heksaani, seejärel 0,5 µl õhku ning lõpuks 0,5–1 µl proovilahust; nõel tõmmatakse mikrosüstla kolbiga tühjaks.

Nõel torgatakse läbi vaheseina sissepritseosas ja 1–2 sekundi järel süstitakse kiiresti lahus ning umbes viie sekundi möödumisel tõmmatakse nõel aeglaselt välja.

- 5.4.3.2. Registreerimine meerikuga jätkub, kuni lahuses sisalduvate alkoholide TMSE on täielikult elueeritud. Nulljoon peab alati vastama punkti 5.4.1.2 nõuetele.

- 5.4.4. Piikide määramine.

Üksikpiigid määratakse peetumisaja alusel ning neid võrreldakse samadel tingimustel analüüsitud alifaatsete alkoholide TMSE-seguga.

Neitsioliiviõli alkoholifraktsiooni kromatogramm on esitatud joonisel 1.

- 5.4.5. Kvantitatiivne hindamine.

- 5.4.5.1. 1-eikosanooli ja alifaatsete alkoholide C_{22} – C_{28} piigipindala arvutatakse integraatoriga.

5.4.5.2. Iga alkoholi sisaldus milligrammides 100 g rasvaine kohta arvutatakse järgmiselt:

$$\text{alkohol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 100}{A_s \cdot m}$$

kus

A_x = alkoholipiigi x pindala (mm²);

A_s = 1-eikosanooli pindala (mm²);

m_s = 1-eikosanooli mass milligrammides;

m = määramiseks võetud proovi mass grammides.

6. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

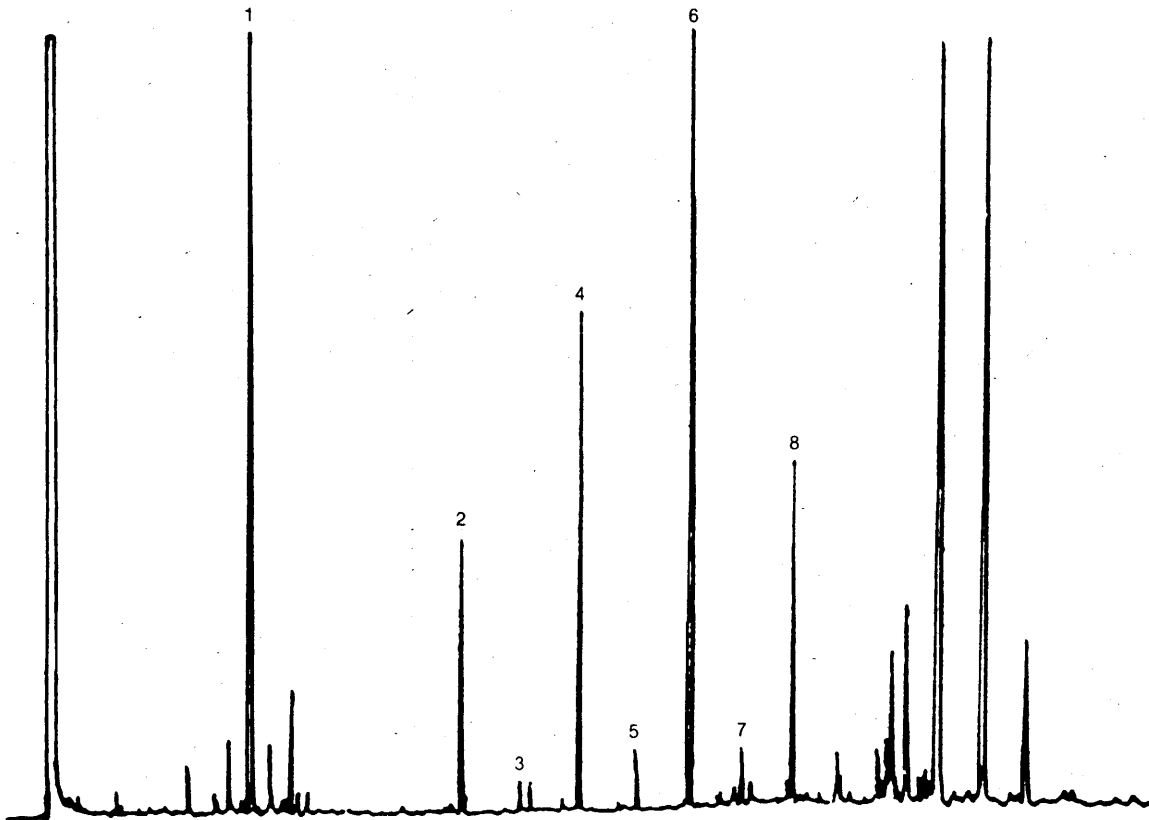
Märgitakse üksikute alifaatsete alkoholide sisaldus milligrammides 100 g rasvaine kohta ja alifaatsete alkoholide kogusumma.

LIIDE

Gaasi voolukiiruse määramine

Tavapärastel töötingimustel süstitakse gaasikromatograafi 1–3 µl metaani või propaani ning stopperiga mõõdetakse aeg, mille jooksul metaan või propaan süstimise hetkest kuni piigi moodustumiseni (t_M) läbi kolonni läheb.

Voolukiirus (cm/s) määratakse valemiga L/t_M , kus L on kolonni pikkus sentimeetrites ja t_M on stopperiga mõõdetud aeg sekundites.



Joonis 1 Neitsioliiviõli alkoholifraktsionno kromatogramm

1 = eikosanool (SI)

2 = dokosanool,

3 = trikosanool,

4 = tetrakosanool,

5 = pentakosanool,

6 = heksakosanool,

7 = heptakosanool,

8 = oktakosanool.

V LISA

**STEREOLIDE KOOSTISE JA SISALDUSE GAASIKROMATOGRAAFILINE MÄÄRAMINE
KAPILLAARKOLONNIGA**

1. KOHALDAMISALA
Meetod kirjeldab rasvainete steroolide individuaalse ja üldsisalduse määramist.
2. PÕHIMÕTE
Rasvaine, millele on sisestandardina lisatud β -kolestanooli, seebistatakse kaaliumhüdroksiidiga etanoolilahuses ja seebistumatud komponendid ekstraheeritakse dietüületriga.
Steroolifraktsioon eraldatakse seebistamatust ekstraktist kromatograafiaga aluselise silikageeli plaadi põhjal. Silikageelist saadud steroolid töödeldakse trimetüülsilüületriteks ja neid analüüsitakse gaasikromatograafiliselt kapillaarkolonniga.
3. SEADMED
 - 3.1. Püstjahutiga varustatud lihühendustega 250 ml kolb.
 - 3.2. 500 ml jaotuslehtrid.
 - 3.3. 250 ml kolvid.
 - 3.4. Täielikud seadmed planaarkromatograafiaga analüüsimiseks, kasutades 20 × 20 cm klaasplaate.
 - 3.5. Ultraviolettlamp lainepikkusega 366 või 254 nm.
 - 3.6. 100 ja 500 μ l mikrosüstlad.
 - 3.7. Silindriline filterlehter, mille poorne septum on G3 (15–40 μ m), diameeter ligikaudu 2 cm ja sügavus 5 cm ning milles on vaakumfiltrerimiseks sobiv liide ja 12/21 lihvkernel.
 - 3.8. 50 ml vaakumkolb 12/21 lihvjuhiga, mida on võimalik paigaldada filterlehtrisse (3.7).
 - 3.9. 10 ml katseklaas koonusekujulise põhja ja tihenduskitiga.
 - 3.10. Gaasikromatograaf, mis võimaldab kasutada kapillaarkolonna ja on varustatud järgmistest seadistest koos-
tatud jaotussüsteemiga:
 - 3.10.1. termostateeritav kolonnikamber, mis hoiab nõutavat temperatuuri täpsusega ± 1 °C;
 - 3.10.2. reguleeritava temperatuuriga aurustamiseseade, millel on silaniseeritud klaasist aurustaja;
 - 3.10.3. leekionisatsioonidetektor ja muundurvõimendi;
 - 3.10.4. meerikuga integraator, mida saab kasutada koos muundurvõimendiga (3.10.3), mille reageerimisaeg on kuni 1 sekund ning mille paberikiirust on võimalik muuta.
 - 3.11. Klaasist või sulatatud ränidioksiidist kapillaarkolonn, mille pikkus on 20–30 m, sisediameeter 0,251–0,32 mm, üleni ühtlase 0,10–0,30 μ m kihina kaetud SE-52 või SE-54 vedeliku või samaväärse vedelikuga.
 - 3.12. 10 μ l karastatud nõelaga gaasikromatograafias kasutatav mikrosüstal.
4. REAKTIIVID
 - 4.1. Kaaliumhüdroksiid, umbes 2 mol/L etanoolilahus. 130 g kaaliumhüdroksiidi (väikseim kontsentratsioon 85 %) lahustatakse 85 % destilleeritud vees samal ajal jahutades ning täiendatakse kuni 1 liitri määrgini etanooliga. Lahust tuleb hoida õhukindlalt suletud tumedates klaaspudelites.

- 4.2. Dietüüleeter, analüütiliselt puhas.
- 4.3. Veevaba naatriumsulfaat, analüütiliselt puhas.
- 4.4. Silikageeliga kaetud klaasplaadid, fluorestsentsindikaatorita, paksusega 0,25 mm (müügil kasutusvalmina).
- 4.5. Kaaliumhüdroksiid, 0,2 mol/L etanoolilahus. 13 g kaaliumhüdroksiidi lahustatakse 20 ml destilleeritud vees ning täiendatakse kuni 1 liitri määrgini etanooliga.
- 4.6. Benseen, kromatograafia jaoks. (Vt. 5.2.2)
- 4.7. Atsetoon, kromatograafia jaoks. (Vt. 5.2.2)
- 4.8. Heksaan, kromatograafia jaoks. (Vt. 5.2.2)
- 4.9. Dietüüleeter, kromatograafia jaoks. (Vt. 5.2.2)
- 4.10. Kloroform, analüütiliselt puhas. (Vt. 5.2.2)
- 4.11. Planaarkromatograafia võrdluslahus: kolesterool või fütosteroolid, 5 % kloroformilahus.
- 4.12. 2,7-diklorofluorestseiin, 0,2 % etanoolilahus. Muudetakse kergelt aluseliseks mõne tilga 2 mol/L alkohoolse kaaliumhüdroksiidilahuse lisamisega.
- 4.13. Veevaba püridiin, kromatograafia jaoks.
- 4.14. Heksametüül disilasaan.
- 4.15. Trimetüülklorosilaan.
- 4.16. Sterooltrimetüülsilüüleerite võrdluslahused. Valmistatakse kasutamise ajal puhastest steroolidest või steroolide sisaldavatest õlidest saadud steroolisegudest.
- 4.17. β -kolestanool, 0,2 % kloroformilahus (m/V) (sisestandard).
- 4.18. Kandegaas: lämmastik või heelium, gaasikromatograafiliselt puhas.
- 4.19. Abigaasid:
 - vesinik, gaasikromatograafiliselt puhas,
 - õhk, gaasikromatograafiliselt puhas.

5. TÖÖ KÄIK

- 5.1. Mitteseebistuvate komponentide ettevalmistamine.
 - 5.1.1. 250 ml kolbi viiakse 500 μ l mikrosüstlaga selline kogus 0,2 % β -kolestanooli kloroformilahust (4.17), milles sisalduv kolestanooli kogus on umbes 10 % kolbis määratava alikvoodi steroolisisaldusest. Näiteks lisatakse 5 grammise oliiviõli proovi puhul 500 μ l 0,2 protsendilist β -kolestanooli lahust ja seemneõli või oliivijääkõli proovi puhul 1 500 μ l.

Proov aurustatakse lämmastikuvoolumis kuivaks ning samasse kolbi kaalutakse 5 grammi kuiva filtreeritud proovi.

Loomsete või taimsete õlide ja rasvade puhul, mis sisaldavad palju kolesterooli, võib tekkida piik, mille peetumisaeg on sama kui kolestanooli peetumisaeg. Sellisel juhul tuleb steroolifraktsiooni analüüsida kaks korda, sisestandardiga ja ilma.
 - 5.1.2. Lisatakse 50 ml 2 mol/L kaaliumhüdroksiidi etanoolilahust, käivitatakse püstjahuti ning kuumutatakse pidevalt kiiresti segades veevannil tasase keemiseni kuni seebistumiseni (lahus muutub selgeks). Kuumutatakse veel 20 minutit, seejärel lisatakse kondensaatori ülaosasse 50 ml destilleeritud vett, eemaldatakse püstjahuti ning kolb jahutatakse ligikaudu temperatuurini 30 °C.
 - 5.1.3. Kolvi sisu valatakse kvantitatiivselt 500 ml jaotuslehtrisse ning seda loputatakse mitu korda kokku 50 ml destilleeritud veega. Lisatakse ligikaudu 80 ml dietüületrit, loksutatakse tugevasti umbes 30 sekundit ning jäetakse seisma (märkus 1).

Põhjas olev veefaas kogutakse teise jaotuslehtrisse. Veefaasi ekstraheeritakse samal viisil veel kaks korda, kasutades selleks mõlemal korral 60–70 ml dietüületrit.

Märkus 1. Võimalikku emulsiooni on võimalik eemaldada väikse koguse etanooli või metanooli sissepritsimisega.

- 5.1.4. Etüüleetri ekstraktid koondatakse jaotuslehtrisse ja pestakse destilleeritud veega (50 ml korraga), kuni pesuvesi annab neutraalse reaktsiooni.

Kui pesuvesi on eemaldatud, kuivatatakse veevaba naatriumsulfaadiga ja filtreeritakse veevabal naatriumsulfaadil enne kaalutud 250 ml kolbi, pestes lehrtrit ja filtrit väikse koguse dietüüleetriaga.

- 5.1.5. Eeter destilleeritakse selliselt, et seda on vaid mõni ml, ning seejärel kuivatatakse seda kerges vaakumis või lämmastikuvoolus ning lõpuks umbes veerand tundi ahjus temperatuuril 100 °C ning seejärel kaalutakse pärast jahutamist eksikaatoris.

- 5.2. Steroolifraktsiooni eraldamine.

- 5.2.1. Aluseliste plaatide ettevalmistamine. Silikageeli plaadid (4.4) kastetakse 10 sekundiks täielikult 0,2 mol/L kaaliumhüdrosiid etanoolilahusesse (4.5), lastakse kaks tundi tõmbekapis kuivada ning lõpuks asetatakse üheks tunniks ahju temperatuurile 100 °C.

Seejärel võetakse silikageeli plaadid ahjust ning neid hoitakse kuni kasutamiseni kaltsiumkloriidi eksikaatoris (selliselt töödeldud plaadid tuleb kasutada 15 päeva jooksul).

Märkus 2. Kui aluselisi silikageeli plaate kasutatakse steroolifraktsiooni eraldamiseks, ei ole mitteseebistuvaid komponente vaja alumiiniumoksiidiga töödelda. Selliselt jäävad kõik happelised ühendid (rasvhapped ja muud) lähedele ja steroolivõond eraldub selgelt alifaatsete alkoholide ja triterpeenalkoholide võõndist.

- 5.2.2. 95 (V/V) benseeni/atsetooni segu pannakse plaatide ilmutusnõusse umbes 1 cm sügavusele. Kasutada võib ka 65/35 (V/V) heksaani/etüüleetri segu. Ilmutusnõu suletakse nõuetekohase kaanega ning jäetakse umbes pooleks tunniks seisma, et tekiks vedeliku ja auru tasakaal. Ilmutusnõu siseseintele võib kinnitada filterpaberi ribad, mis ulatuvad eluendini. See vähendab ilmutusaega ligikaudu kolmandiku võrra ning komponentide elueerumine on ühtlasem ja korrapärasem.

Märkus 3. Täielikult korratavate elueerimistingimuste saavutamiseks tuleb igaks katseks võtta uus ilmutussegu.

- 5.2.3. Valmistatakse umbes 5 % seebistumatute komponentide kloroformilahus (5.1.5) ning 100 µl mikrosüstlaga tõmmatakse 300 µl kromatograafiaplaadile (5.2.1) umbes 2 cm kaugusele plaadi servast võimalikult õhuke ja ühtlane viir. 2–3 µl sterooli võrdluslahust (4.11) asetatakse samale jonele plaadi ühte serva nii, et steroolivõõndit oleks võimalik pärast ilmutamist identifitseerida.

- 5.2.4. Vastavalt punktile 5.2.2 ettevalmistatud plaat asetatakse ilmutusnõusse. Temperatuuri tuleks hoida vahemikus 15–20 °C. Ilmutusnõu suletakse kohe kaanega ning plaadil lastakse elueeruda, kuni lahusti serv ulatub umbes 1 cm kaugusele plaadi ülemisest servast. Plaat võetakse ilmutusnõust välja ning lahusti aurustatakse kuuma õhu voolus või jättes selle lühikeseks ajaks ilma katteta.

- 5.2.5. Plaati pritsitakse kergelt ja ühtlaselt 2,7-diklorofluorestseiini lahusega. Kui plaati vaadeldakse ultravioletvalguses, on sterooli võõndit võimalik identifitseerida selliselt, et see on samas kohas kui võrdluslahuse võõnd. Võõndi piirid märgitakse musta pliatsiga mööda fluorestsentsi servi.

- 5.2.6. Metallspaatliga kraabitakse märgistatud alalt maha silikageel. Eemaldamisel saadav hästi peenestatud materjal pannakse filterlehtrisse (3.7). Lisatakse 10 ml kuuma kloroformi, segatakse hoolikalt metallist spaatliga ning filtreeritakse vaakumi all, seejärel kogutakse filtraat filterlehtriiga ühendatud Erlennymeri kolbi (3.8).

Jääki pestakse lehrtris kolm korda dietüüleetriaga (iga kord umbes 10 ml) ning filtraat kogutakse samasse lehrtriga ühendatud kolbi. Filtraat aurustatakse ligikaudu 4–5 ml mahuni ning jääklahus valatakse enne kaalutud 10 ml katseklaasi (3.9), seejärel aurustatakse madala kuumutamise teel õrna lämmastiku voolu all kuivaks, täidetakse uuesti paari tilga atsetooniga, aurustatakse taas kuivaks ning asetatakse umbes 10 minutiks ahju temperatuurile 105 °C, lastakse eksikaatoris jahtuda ning kaalutakse.

Katseklaasis olev jääk koosneb sterooli fraktsioonist.

- 5.3. Trimetüülsilüületrite ettevalmistamine.

- 5.3.1. Katseklaasis olevale steroolifraktsioonile lisatakse 50 µl igas katseklaasis oleva sterooli milligrammi kohta silüüliv reagent, mis koosneb mahus 9 : 3 : 1 (V/V/V) püridiini, heksametüüldisilasaani ja trimetüülklorosilaani segust (märkus 4), selliselt, et niiskus ei pääseks ligi (märkus 5).

Märkus 4. Müügil on kasutusvalmid lahused. Müügil on ka muud silüülivad reagentid, näiteks bis-trimetüülsilüültrifluoratsetaamid + 1 % trimetüülklorosilaan, mida tuleb lahjendada sama mahu veevaba püridiiniga.

- 5.3.2. Katseklaas suletakse punniga, loksutatakse hoolikalt (ilma et see ümber läheks), kuni steroolid on täielikult lahustunud. Lastakse ümbritseva õhu temperatuuril vähemalt 15 minutit seista ning seejärel tsentrifuugitakse paar minutit. Selge lahus on gaasikromatograafiliseks analüüsiks valmis.

Märkus 5. Kerge opalestsentsi tekkimine on tavaline ning ei sega. Valge helbelise massi tekkimine või roosa värvuse ilmumine on niiskuse esinemise või reaktiivi halvenemise märgiks. Nende esinemise korral tuleb katset korrata.

- 5.4. Gaasikromatograafiline analüüs.

- 5.4.1. Eeltoimingud, kolonnide täitmine.

- 5.4.1.1. Kolonn pannakse gaasikromatograafi, sisselaskepunkt ühendatakse aurustiga, mis on seotud jaotussüsteemiga, ning väljalaskepunkt ühendatakse detektoriga.

Tehakse gaasikromatograafi üldine kontroll (lekked gaasiliidetes, detektori, jaotussüsteemi ja registreerimissüsteemi toimimine jne).

- 5.4.1.2. Kui kolonni kasutatakse esimest korda, on soovitatav see ette valmistada. Kolonni lastakse kerge gaasivool, seejärel lülitatakse tööle gaasikromatograaf ning alustatakse järkjärgulist kuumutamist temperatuurini, mis on vähemalt 20 °C võrra kõrgem kui töötemperatuur (märkus 6). Seda temperatuuri hoitakse vähemalt kaks tundi, seejärel pannakse terve seade tööasendisse (gaasi juurdevoolu ja jaotumise reguleerimine, leegi süütamine, elektrilise meerikuga ühendamine, kolonnahju, detektori ja injektori temperatuuri kohandamine jne) ning signaali tundlikkus reguleeritakse vähemalt kaks korda suuremaks, kui analüüsiks tegemiseks kavandatud. Tekkiv nulljoon peab olema lineaarne, ilma igasuguste piikideta, ja see ei tohi triivida.

Negatiivne sirgjooneline triiv osutab lekkele kolonniühendustes. Positiivne triiv osutab kolonni puudulikule ettevalmistamisele.

Märkus 6. Ettevalmistamisel on temperatuur kasutatava vedelfaasi maksimaalsest temperatuurist vähemalt 20 °C madalam.

- 5.4.2. Tööttingimuste valik.

- 5.4.2.1. Töö pühitingimused on järgmised:

- kolonni temperatuur: 260 ± 5 °C,
- aurusti temperatuur: 280 °C,
- detektori temperatuur: 290 °C,
- kandegaasi voolukiirus: heelium 20–35 cm/s, vesinik 30–50 cm/s,
- jaotussuhe: 1 : 50 — 1 : 100,
- seadme tundlikkus: 4–16-kordne minimaalne sumbumine,
- registreerimise tundlikkus: 1–2 mV fs,
- paberi kiirus: 30–60 cm/h,
- süstitava aine kogus 0,5–1 µl TMSE lahust.

Olenevalt kolonni ja gaasikromatograafi karakteristikutest võib neid tingimusi muuta, nii et kromatogrammid vastaksid järgmistele nõuetele:

- β-sitosterooli peetumisaeg peaks olema 20 ± 5 minutit,
- kampesterooli piik peaks olema: oliiviõli puhul (keskmine sisaldus 3 %) 15 ± 5 % kogu mõõtepiirkonnast; sojaõli puhul (keskmine sisaldus 20 %) 80 ± 10 % kogu mõõtepiirkonnast,
- kõik olemasolevad steroolid peavad olema eraldatud. Lisaks sellele peavad piigid olema ka täielikult eraldunud, see tähendab, et piigi jälg peab enne järgmise piigi juurde liikumist minema tagasi piigi nulljoonele. Puudulik resolutsioon on siiski lubatud tingimusel, et piiki on TRR 1,02 juures võimalik mõõta risti.

- 5.4.3. Analüüsi käik.

- 5.4.3.1. 10 µl mikrosüstlaga tõmmatakse 1 µl heksaani, seejärel 0,5 µl õhku ning lõpuks 0,5–1 µl proovilahust. Nõela kolbi tõstetakse veelgi nii, et nõel tühjendatakse. Nõel surutakse läbi injektorseadme kesta ning ühe või kahe sekundi pärast süstitakse kiiresti, seejärel tõmmatakse nõel umbes 5 sekundi pärast aeglaselt välja.

- 5.4.3.2. Jätkatakse registreerimist, kuni olemasolevate steroolide TMSE on täielikult elueeritud.

Nulljoon peab vastama nõuetele (5.4.1.2).

- 5.4.4. Piigi määramine.

Piigid määratakse peetumisaja põhjal ning samadel tingimused analüüsitud steroolide TMSE segudega võrdlemise teel.

Steroolid elueeritakse sellises järjekorras: kolesterool, brassikasterool, 24-metüleenkolesterool, kampesterool, kampestanool, stigmasterool, Δ-7-kampesterool, Δ-5,23-stigmastadienool, klerosterool, β-sitosterool, sitostanool, Δ-5-avenasterool, Δ-5,24-stigmastadienool, Δ-7-stigmastanool, Δ-7-avenasterool.

Sitosterooli peetumisajad SE-52 ja SE-54 kolonnide puhul on esitatud tabelis 1.

Joonised 1 ja 2 kirjeldavad mõnede õlide tüüpilisi kromatogramme.

5.4.5. Kvantitatiivne hindamine.

5.4.5.1. β -kolestanooli ja steroolipiikide pindala arvutatakse integraatoriga. Välja tuleb jätta nende ühendite piigid, mida ei ole tabelis 1 loetletud. β -kolestanooli kalibreerimistegur peab olema 1.

5.4.5.2. Iga sterooli kontsentratsioon milligrammides 100 g rasvaine kohta arvutatakse järgmiselt:

$$\text{sterool } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 100}{A_s \cdot m}$$

kus

A_x = sterooli x piigipindala (mm^2);

A_s = α -kolestanooli piigipindala (mm^2);

m_s = lisatud α -kolestanooli mass (mg);

m = määramisel kasutatud proovi mass grammides.

6. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

6.1 Registreeritakse sterooli kontsentratsioonid milligrammides 100 g rasvaine kohta ning nende summa steroolide üldsisaldusena.

Iga sterooli protsent arvutakse vastava piigipindala ja steroolide piikide kogupindala suhtena.

$$\text{sterool } x\% = \frac{A_x}{\sum A} \cdot 100$$

kus

A_x = x'i piigi pindala;

$\sum A$ = steroolide piigipindala kokku.

LIIDE

Gaasi voolukiiruse määramine

Normaalsel töötingimustel gaasikromatograafi süstitakse 1–3 ml metaani (või propaani) ja mõõdetakse aeg, mis kulub gaasi voolamiseks läbi kolonni alates süstimisest kuni piigi ilmumiseni (t_M).

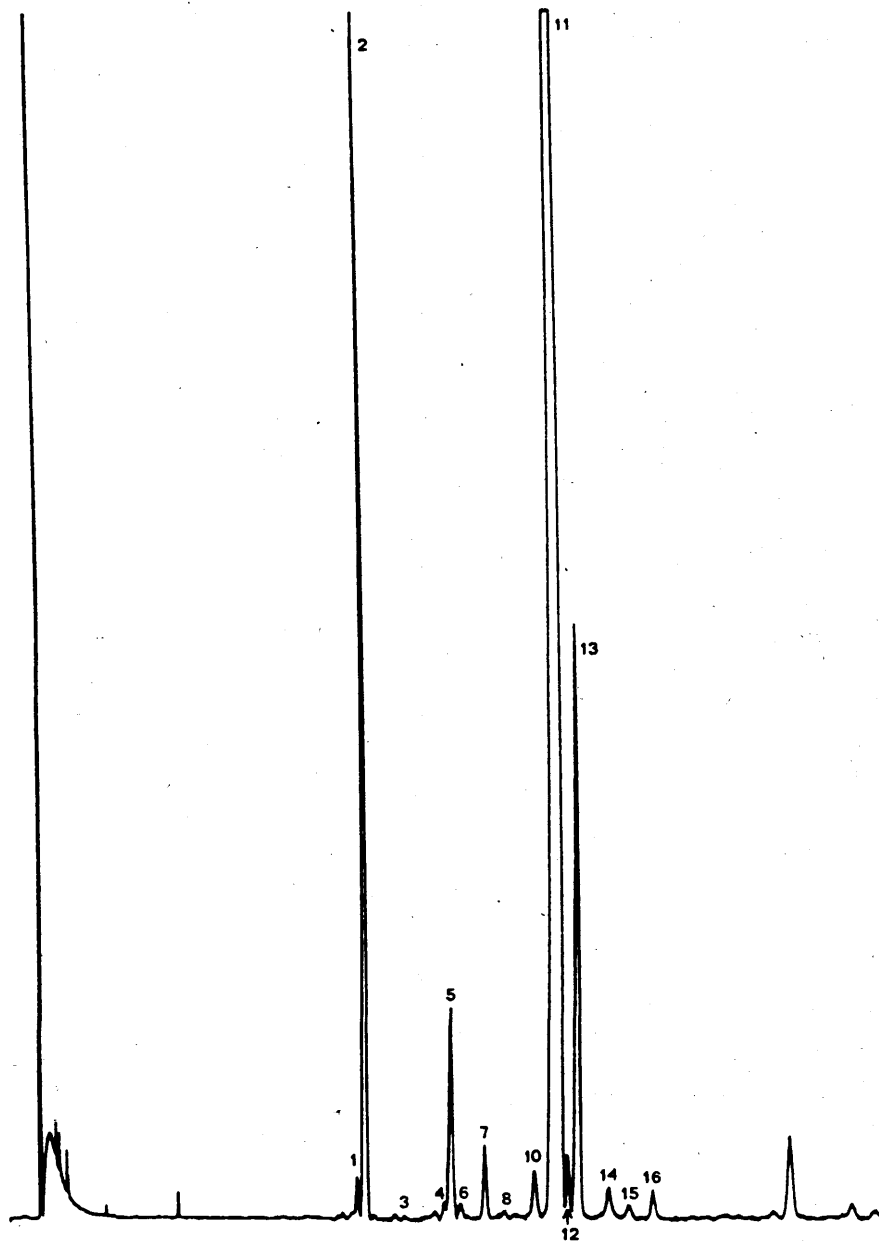
Voolukiirus cm/S on esitatud valemiga L/t_M , kus L on kolonni pikkus sentimeetrites ja t_M on mõõdetud aeg sekundites.

Tabel 1

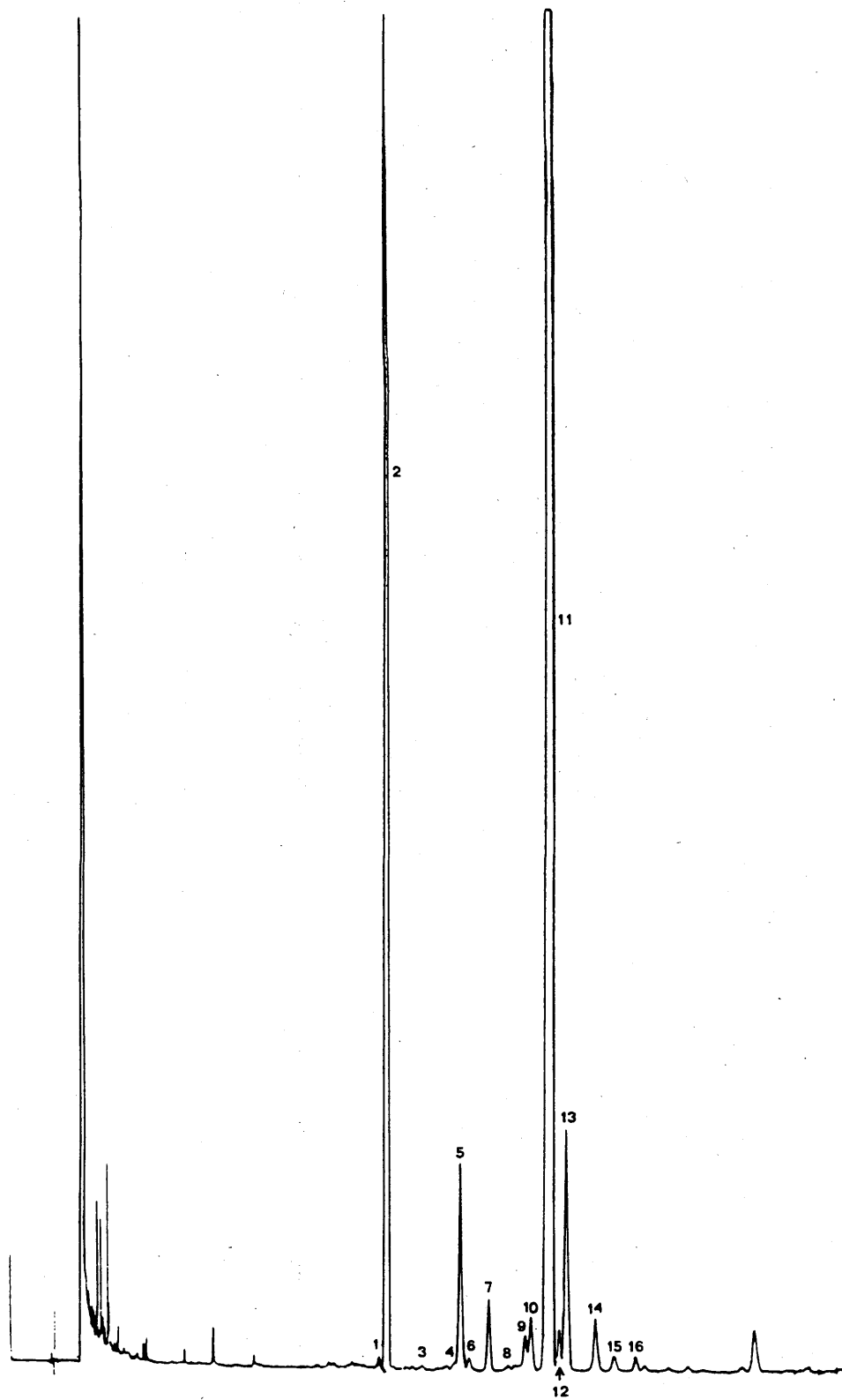
Steroolide suhtelised peetumisajad

Piik	Identifitseerimine		Suhteline peetumisaeg	
			SE 54 kolonn	SE 52 kolonn
1	kolesterool	Δ -5-kolesteen-3 β -ool	0,67	0,63
2	kolestanool	5 α -kolestaan-3 β -ool	0,68	0,64
3	brassikasterool	[24S]-24-metüül- Δ -5,22-kolestadien-3 β -ool	0,73	0,71
4	24-metüleen-kolesterool	24-metüleen- Δ -5,24-kolesteen-3 β -ool	0,82	0,80
5	kampesterool	[24R]-24-metüül- Δ -5-kolestadien-3 β -ool	0,83	0,81
6	kampestanool	[24R]-24-metüül-kolestaan-3 β -ool	0,85	0,82
7	stigmasterool	[24R]-24-etüül- Δ -5,22-kolestadien-3 β -ool	0,88	0,87
8	Δ -7-kampesterool	[24R]-24-metüül- Δ -7-kolesteen-3 β -ool	0,93	0,92
9	Δ -5,23-stitmastadienool	[24S, R]-24-etüül- Δ -5,23-kolestadien-3 β -ool	0,95	0,95
10	klerosterool	[24S]-24-etüül- Δ -5,25-kolestadien-3 β -ool	0,96	0,96
11	β -sitosterool	[24R]-24-etüül- Δ -5-kolestaan-3 β -ool	1,00	1,00
12	sitostanool	24-etüül-kolestaan-3 β -ool	1,02	1,02
13	Δ -5-avenasterool	[24R]-24-etülideen-5-kolesteen-3 β -ool	1,03	1,03
14	Δ -5,24-stitmastadienool	[24R, S]-24-etüül- Δ -5,24-kolestadien-3 β -ool	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastenoool	[24R, S]-24-etüül- Δ -7,24-kolestadien-3 β -ool	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasterool	[24Z]-24-etülideen- Δ -7-kolesteen-3 β -ool	1,16	1,16

Joonis 1

Rafineerimata oliiviõli sterooli fraktsiooni gaasikromatogramm

Joonis 2

Rafineeritud oliiviõli sterooli fraktsiooni gaasikromatogramm

VI LISA

ERÜTRODIOOLI JA UVALOOLI MÄÄRAMINE

SISSEJUHATUS

Erütrodiool (üldiselt mõeldakse selle all koos glükoole erütrodiool ja uvalool) on mõnele rasvainele iseloomulik seebistumatu fraktsiooni komponent. Erütrodiooli leidub ekstraheeritud oliiviõlis märkimisväärselt suuremas kontsentratsioonis kui teistes erütrodiooli sisalduvates õlides (pressitud oliiviõli ja viinamarjaseemneõli, jne) ning seetõttu võib selle esinemine osutada sellele, et lisatud on ekstraheeritud oliiviõli.

1. KOHALDAMISALA

Käesolev meetod kirjeldab erütrodiooli määramist rasvainetes.

2. PÕHIMÕTE

Rasvaine seebistatakse etanoolilahuses kaaliumhüdroksiidiga. Mitteseebistuvad fraktsioonid ekstraheeritakse dietüüleeriga ja puhastatakse läbi alumiiniumoksiidi kolonni juhtimise teel.

Seebistumatutele komponentidele tehakse silikageeli plaadil planaarkromatograafia, kuni sterooli ja erütrodiooli fraktsioonide vööndid on eraldunud. Plaadilt saadud steroolid ja erütrodiool muundatakse trimetüülsilüüleeriteks ning seda segu analüüsitakse gaasikromatograafiliselt.

Tulemus väljendatakse erütrodiooli protsendina erütrodiooli ja steroolide segus.

3. SEADMED

3.1. V lisa (steroolide sisalduse määramine) kirjeldatud seadmed.

4. REAKTIIVID

4.1. V lisa (steroolide sisalduse määramine) kirjeldatud reaktiivid.

4.2. Erütrodiooli standardlahus, 0,5 % lahus kloroformis.

5. TÖÖ KÄIK

5.1. **Mitteseebistuvate komponentide ettevalmistamine.**

Nagu V lisa lõikes 5.1.2 kirjeldatud.

5.2. **Erütrodiooli ja steroolide eraldamine.**

5.2.1. Vaata V lisa lõiget 5.2.1.

5.2.2. Vaata V lisa lõiget 5.2.2.

5.2.3. Valmistatakse seebistumatute komponentide 5 % kloroformilahus.

0,1 ml mikrosüstlaga tõmmatakse 0,3 ml kromatograafiaplaadile umbes 1,5 cm kaugusele plaadi alumisest servast võimalikult õhuke ja ühtlane viir.

Ühele plaadiservale pannakse võrdluseks mõned mikrolitrid kolesterooli ja erütrodiooli lahust.

5.2.4. Vastavalt punktile 5.2.1 ette valmistatud plaat pannakse ilmutusnõusse. Ümbritseva õhu temperatuur peaks olema umbes 20 °C. Ilmutusnõu suletakse kohe kaanega ning plaadil lastakse elueerida, kuni lahusti serv ulatub umbes 1 cm kaugusele plaadi ülemisest servast. Plaat võetakse ilmutusnõust välja ning lahusti aurustatakse kuuma õhu voolus.

5.2.5. Plaati pritsitakse kergelt ja ühtlaselt 2,7-diklorofluorestseiini lahusega. Kui plaati vaadeldakse ultravioletvalguses, on sterooli ja erütrodiooli vööndid võimalik identifitseerida selliselt, et see on samas kohas kui võrdluslahuste vööndid. See vöönd tähistatakse täpiga vahetult fluorestsentsi piiridest väljapool.

5.2.6. Metallspaatliga kraabitakse märgistatud alalt maha silikageel. Plaadilt saadud materjal pannakse 50 ml kolbi. Lisatakse 15 ml kuuma kloroformi, loksutatakse hoolikalt ning filtreeritakse läbi lehtri, millel on paagutatud klaasketas nii, et silikageel jääb filtrisse. Pestakse kolm korda kuuma kloroformiga (iga kord 10 ml) ning filtraat kogutakse 100 ml kolbi. Filtraat aurustatakse ligikaudu 4–5 ml mahuni ning valatakse 10 ml tsentri- fuugiküvetti, seejärel kuivatatakse õrna lämmastiku voolu all ning kaalutakse.

5.3. **Trimetüülsilüülestrite valmistamine**

Nagu V lisa lõikes 5.3 kirjeldatud.

5.4. **Gaasikromatograafiline analüüs**

Nagu V lisa punktis 5.4 kirjeldatud. Gaasikromatograafilise analüüsi tegemise tingimused peavad olema sellised, et need võimaldavad läbi viia sterooli analüüsi ning eraldada TMSE erütrodioolist ja uvaloolist.

Kui proov on injekteeritud, jätkatakse registreerimist, kuni proovis olevad steroolid, erütrodiool ja uvalool on elueeritud. Seejärel tehakse kindlaks piigid (erütrodiooli ja uvalooli peetumisajad on suhtes β -sitosterooliga vastavalt 1,45 ja 1,55) ning piigipindala arvutatakse nagu steroolide puhul.

6. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

$$\text{Erütrodiooli \%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{sterols}}} \times 100$$

kus

A_1 = erütrodiooli piigipindala (mm²);

A_2 = uvalooli piigipindala (mm²);

$\sum A_{\text{steroolid}}$ = steroolide piigipindala kokku (mm).

Tulemus väljendatakse ühe kümnendkoha täpsusega.

VII LISA

TRIGLÜTSEERIIDI 2. POSITSIOONIS OLEVATE RASVHAPETE MÄÄRAMINE

1. KOHALDAMISALA

Käesolevas standardis kirjeldatakse meetodit, millega määratletakse selliste rasvade ja õlide rasvhapped, mida on esterdatud glütserooli 2. positsioonis (või keskmises positsioonis).

2. KASUTUSVALDKOND

Käesolevat standardit kohaldatakse nende õlide ja rasvade suhtes, mille sulamispunkt on pankrease lipaasi toime eripäradest tulenevalt alla 45 °C.

Käesolevat meetodit ei kohaldata õlide ja rasvade suhtes, mis sisaldavad märkimisväärset kogust: rasvhappeid, millel on 12 süsinikuaatomit või vähem (kookospähkli- ja palmituumaõlid, piimarasv), või enam kui nelja kaksiksidemega rasvhappeid, mis sisaldavad 20 aatomit või rohkem (kala- ja mereimetajate õli), või rasvhappeid, mis sisaldavad hapnikuga küllastatud rühmi, välja arvatud happerühmad.

3. PÕHIMÕTE

Happelised õlid ja rasvad neutraliseeritakse vajaduse korral lahustis. Rasva või õli puhastamiseks juhitakse see alumiiniumoksiidi kolonni. Triglütseriidid hüdrolüüsitakse osaliselt pankrease lipaasi abil etteantud aja jooksul. Tekkivad monoglütseriidid eraldatakse planaarkromatograafiaga ning esterdatakse metanooliga. Metüülestreid analüüsitakse gaasikromatograafiaga.

4. SEADMED

- 4.1. 100 ml ümarapõhjaline kolb.
- 4.2. 25 ml ümarapõhjaline kolb, lihvhendusega.
- 4.3. 1 m õhkjahuti, mis sobib kolbi 4.2.
- 4.4. 250 ml Erlenmeyeri kolb.
- 4.5. 50 ml keeduklaas.
- 4.6. 500 ml jaotuslehter.
- 4.7. Klaaskolonn kromatograafia jaoks, sisediameetriga 13 mm, pikkusega 400 mm, kuhu on paigutatud paagutatud klaasketas ja kraan.
- 4.8. 10 ml lihvkorgiga tsentrifuugiküvett.
- 4.9. 5 ml bürett skaalajaotise väärtusega 0,05 ml.
- 4.10. 1 ml hüpodermiline peene nõelaga süstal.
- 4.11. Mikrosüstal, millega saadakse 3–4 µl tilgad.
- 4.12. Statsionaarse faasi plaadile kandmise seade.
- 4.13. Klaasplaadid planaarkromatograafia jaoks, 20 × 20 cm.
- 4.14. Klaasist ilmutusnõu planaarkromatograafia jaoks, millel on lihvkork ja mis sobib 20 × 20 plaatidele.
- 4.15. Planaarkromatograafia ilmutusreagent.
- 4.16. Ahi, mis on reguleeritud temperatuurile 103 ± 2 °C.
- 4.17. Termostaat, mida on võimalik 5 °C täpsusega reguleerida vahemikku 30–45 °C.
- 4.18. Vaakumpöördaurusti.
- 4.19. Vibratsioonsegisti, mis võimaldab tsentrifuugiküveti tugevalt loksutada.
- 4.20. Ultraviolettlamp planaarploade uurimiseks.

Lipaasi aktiivsuse kontrollimiseks:

- 4.21. pH-meeter.
- 4.22. Spiraalsegisti.
- 4.23. 5 ml bürett.
- 4.24. Stopper.

Lipaasi võimalikuks ettevalmistamiseks:

- 4.25. Laborisegisti, mis sobib heterogeensete materjalide hajutamiseks ja segamiseks.
- 5. REAKTIIVID
- 5.1. n-heksaan, või selle puudumise korral petrooleeter (bp 30–50 °C), kromatograafilise kvaliteediga.
- 5.2. 95 % 2-propanool või etanool (V/V), analüütiliselt puhta reaktiivi kvaliteediga.
- 5.3. 2-propanool või etanool, 1/1 vesilahus.
- 5.4. Dietüüleeter, peroksiidivaba.
- 5.5. Atsetoon.
- 5.6. Sipelghape, vähemalt 98 protsendiline (m/m).
- 5.7. Ilmutuslahus: n-heksaani (5.1), dietüüleetri (5.4) ja sipelghappe (5.6) segu proportsioonis 70/30/1 (V/V/V).
- 5.8. Aktiveeritud alumiiniumoksiid kromatograafia jaoks, neutraalne, Brockmann I kvaliteediga.
- 5.9. Silikageel, koos sideainega, mille kvaliteet on sobiv planaarkromatograafia jaoks.
- 5.10. Pankrease lipaas, sobiva kvaliteediga (märkused 1 ja 2).
- 5.11. Naatriumhüdroksiid, 120 g/l vesilahus.
- 5.12. Soolhape, vesilahus 6 mol/L.
- 5.13. Kaltsiumkloriid (CaCl₂), 220 g/l vesilahus.
- 5.14. Naatriumkolaat (ensümaatilise kvaliteediga), 1 g/l vesilahus.
- 5.15. Puhverlahus: 1 M tris-hüdroksümetüülaminometaani lahus reguleeritakse väärtusele pH 8, lisades selleks soolhapet (5.12) (kontrollitakse potentsiomeetriga).
- 5.16. Fenoolftaleiin, 10 g/l lahus 95protsendilises (V/V) etanoolis.
- 5.17. 2',7'-diklorofluorestseiin, 2 g/l lahus 95protsendilises (V/V) etanoolis, muudetud pisut aluseliseks ühe tilga 1 N naatriumhüdroksiidilahuse lisamisega 100 ml kohta.

Lipaasi aktiivsuse kontrollimiseks:

- 5.18. Neutraliseeritud õli.
- 5.19. 0,1 M naatriumhüdroksiidi vesilahus.
- 5.20. Naatriumkolaat (ensümaatilise kvaliteediga), 200 g/l vesilahus.
- 5.21. Kummiraabik, 100 g/l vesilahus.

6. PROOVI ETTEVALMISTAMINE

Kui proovi happesus on vastavalt II lisale määramisel alla 3 %, puhastatakse proovi alumiiniumoksiidi kohal, nagu punktis 6.2 ette nähtud.

Kui proovi happesus on vastavalt II lisale määramisel üle 3 %, neutraliseeritakse proov leelisega lahusti juuresolekul punktile 6.1 vastavalt ja seejärel alumiiniumoksiidiga punktile 6.2 vastavalt.

6.1. Leelisega neutraliseerimine lahusti juuresolekul

Jaotuslehtrisse (4.6) pannakse umbes 10 g toorõli ning lisatakse 100 ml heksaani (5.1), 50 ml 2-propanooli (5.2), paar tilka fenoolftaleiini lahust (5.16) ja selline kogus naatriumhüdroksiidi lahust (5.11), mis vastab õli 0,3 % võrra suuremale vabade rasvhapete sisaldusele. Loksutatakse tugevasti 1 minuti jooksul, lisatakse 50 ml destilleeritud vett, loksutatakse uuesti ning lastakse settida.

Pärast eraldamist eemaldatakse alumine seebistunud kiht. Eemaldatakse ka keskmised kihid (taimeliim, lahustumatud ained). Neutraliseeritud õli heksaanilahust pestakse korduvalt 25–30 ml 2-propanoolilahuse (5.3) kogustega, kuni fenoolftaleiini roosa värvus on kadunud.

Enamus heksaanist eemaldatakse vaakumi all vaakumpöördaurustus (4.18) destilleerimise teel, seejärel kuivatatakse õli 30–40 °C juures vaakumi all puhta lämmastiku vooluga, kuni heksaan on täielikult eemaldatud.

6.2. Puhastamine alumiiniumoksiidiga

Valmistatakse ette 15 g aktiveeritud alumiiniumoksiidi (5.8) suspensioon 50 ml heksaanis (5.1) ja valatakse samal ajal segades kromatograafia kolonni peale (4.7). Alumiiniumoksiidil lastakse ühtlaseks kihiks vajuda ning lahustikihil lastakse valguda selliselt, et see on 1–2 mm absorbendist ülalpool. Kolonni valatakse ettevaatlikult 5 g õli ja 25 ml heksaani (5.1) lahus; heitvesi kogutakse kolonnist ümarapõhjalisse kolbi (4.1).

7. Kromatograafiliste plaatide ettevalmistamine

Klaasplaadid (4.13) puhastatakse võimalike rasvainete eemaldamiseks korralikult etanooli, petrooleetri ja atsetooniga.

Erlenmeyeri kolbi (4.4) pannakse 30 g silikageeli (5.9). Lisatakse 60 ml destilleeritud vett. Suletakse punniga ning loksutatakse tugevasti ühe minuti jooksul. Suspensioon kantakse kohe seadmele (4.12) ja puhtad plaadid kaetakse 0,25 mm paksuse kihiga.

Plaatid kuivatatakse õhu käes 15 minutit ja siis tund aega ahjus (4.16) temperatuuril 103 ± 2 °C. Plaadid jahutatakse enne kasutamist eksikaatoris toatemperatuurile.

Ettevalmistatud plaadid on müügil.

8. TÖÖ KÄIK

8.1. Hüdrolyüs pankrease lipaasiga.

Tsentrifuugiküveti (4.8) kaalutakse umbes 0,1 g ettevalmistatud proovi; kui prooviks on vedel õli, toimatakse alljärgnevalt.

Lisatakse 20 ml lipaasi (5.10) ja 2 ml puhvrit (5.15). Segatakse hoolega, kuid ettevaatlikult, ning seejärel lisatakse 0,5 ml naatriumkoolaadi lahust (5.14) ja 0,2 ml kaltsiumkloriidi lahust (5.13). Katseklaas suletakse lihv-korgiga, loksutatakse ettevaatlikult (vältitakse korgi kokkupuutumist lahusega) ja katseklaas pannakse kohe termostaati (4.17), mida hoitakse temperatuuril $40 \pm 0,5$ °C, ning loksutatakse käega täpselt üks minut.

Katseklaas võetakse termostaadist välja ning loksutatakse tugevasti täpselt 2 minutit elektrilise loksutiga (4.19).

Jahutatakse kohe jooksva vee all; lisatakse 1 ml soolhapet (5.12) ja 1 ml dietüületrit (5.4). Suletakse korgiga ja segatakse tugevasti elektrilise loksutiga. Lastakse seista ning orgaaniline kiht eemaldatakse süstlaga (4.10), vajaduse korral pärast tsentrifuugimist.

8.2. Monoglütseriidide eraldamine planaarkromatograafiaga

Ekstrakt kantakse mikrosüstlaga (4.11) kromatograafilisele plaadile umbes 1,5 cm kaugusele alumisest servast võimalikult õhukese, kitsa ja ühtlase joonena. Plaat asetatakse hästi küllastunud ilmutusnõusse (4.14) ja proovi ilmutatakse ilmutuslahusega (5.7) temperatuuril ligikaudu 20 °C kuni 1 sentimeetri ni plaadi ülemisest servast.

Plaati kuivatatakse õhu käes ilmutusnõu temperatuuril ning sellele pihustatakse 2',7'-diklorofluorestseiini lahust (5.17). Monoglütseriidi võõnd (R_f umbes 0,035) määratakse ultravioletvalguses (4.20).

8.3. Monoglütseriidide analüüsimine gaasikromatograafiaga

Punktis 8.2 saadud võõnd eemaldatakse spaatliga (vältida tuleks nulljoonel olevate komponentide eemaldamist) ning pannakse metüülimiskolbi (4.2).

Kogutud silikageel töödeldakse X B lisas kirjeldatud meetodil selliselt, et monoglütseriidid muudetakse metüüleestriks, ning seejärel uuritakse estreid gaasikromatograafiaga, nagu X A lisas kirjeldatud.

9. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

Rasvhappe koostis 2. positsioonis arvutatakse ühe kümnendkoha täpsusega (märkus 3).

10. MÄRKUSED

Märkus 1: Lipaasi aktiivsuse kontrollimine

Valmistatakse ette emulsioon, milleks loksutatakse sobivas segistis 165 ml kummiaraabiku lahuse (5.21), 15 g purustatud jää ja 20 ml neutraliseeritud õli (5.18) segu.

Keeduklaasi (4.5) pannakse 10 ml nimetatud emulsiooni, sellele lisatakse 0,3 ml naatriumkolaadi lahust (5.20) ja 20 ml destilleeritud vett.

Keeduklaas pannakse termostaati, mida hoitakse temperatuuril $37 \pm 0,5$ °C (märkus 4); vedelikku pannakse pH-meetri (4.21) elektroodid ning spiraalne segisti (4.22).

Büretiga (4.23) lisatakse tilkhaaval naatriumhüdroksiidi lahus (5.19) kuni pH on 8,5.

Lisatakse piisav kogus lipaasi vesisuspensiooni (vaata allpool). Kui pH-meetri näit on 8,3, pannakse tööle stopper (4.24) ning katseklaasi tilgutatakse naatriumhüdroksiidilahust (5.19) sellise kiirusega, et pH oleks jätkuvalt 8,3. Kasutatud leeliselahuse maht pannakse kirja iga minuti kohta.

Vaatlustulemused märgitakse graafikule, märkides abtsissteljele aja ja ordinaatteljele pH taseme püsimiseks vajaliku leeliselahuse koguse milliliitrites. Selle tulemusel peaks tekkima sirgjoon.

Eespool nimetatud lipaasi suspensioon on 1/1 000 (m/m) suspensioon vees. Iga katse puhul tuleks kasutada sellist kogust suspensiooni, et leeliselahust kuluks umbes 1 ml 4–5 minutis. Tavaliselt kulub umbes 1–5 mg pulbrit.

Lipaasiühik on selline ensüümikogus, mida on vaja selleks, et vabastada 10 happe μ -ekvivalenti minutis. Kasutatud pulbri aktiivsus lipaasiühikutes mg kohta saadakse valemiga:

$$A = \frac{V \times 10}{m}$$

kus V on naatriumhüdroksiidilahuse (5.19) kulumine minutis (arvutatud graafiku põhjal), m on pulbriproovi mass (mg).

Märkus 2: Lipaasi ettevalmistamine

Müügil on piisava lipaasiaktiivsusega lipaase. Lipaase on siiski võimalik ka laboratooriumis järgmisel viisil valmistada:

5 kg värsket sea kõhunääret jahutatakse temperatuurile 0 °C; eemaldatakse ümbritsev tahke rasv ja sidekude ning jahvatatakse segistis kuni taigenaolise vedeliku saamiseni. Tekkinud pastat ja 2,5 l veevaba atsetooni segatakse segistiga (4.25) 4–6 tundi ja seejärel tsentrifuugitakse. Jääki ekstraheeritakse veel kolm korda sama koguse atsetooniga, siis kaks korda 1/1 (V/V) atsetooni ja dietüüleetri seguga, ning kaks korda dietüüleetriga.

Stabiilse pulbri saamiseks tuleks jääki vaakumis 48 tundi kuivatada ning seejärel tuleks seda hoida külmikus.

Märkus 3: Rasvhapete üldmass tuleks soovitavalt määrata alati samas proovis, kuna tulemuste tõlgendamine on lihtsam, kui 2. positsioonis olevate hapete määra on võimalik võrrelda rasvhapete üldmassiga.*Märkus 4:* Vedela õli puhul on hüdrolüüsi temperatuur 37 °C. Selleks et uurida kuni 45kraadise sulamistemperatuuriga rasvu, määratakse hüdrolüüsi temperatuuriks 40 °C.

VIII LISA

TRILINOLEIINI SISALDUSE MÄÄRAMINE

1. KOHALDAMISALA

Triglütseriidi koostise määramine oliiviõlis nende ekvivalentse süsinikuarvu alusel kõrgrõhuvedelikkromatograafiaga.

Käesolevas meetodis kirjeldatakse meetodit, millega on võimalik eraldada ja määrata kvantitatiivselt triglütseriidide koostis taimsetes õlides nende molekulmassi ja küllastumatusastmega ekvivalentse süsinikuarvu funktsioonina (vt märkus 1).

2. KASUTUSVALDKOND

Käesolevat meetodit kohaldatakse kõikide pikaahelalisi rasvhapete triglütseriidide sisaldavate taimsete õlide suhtes. See meetod sobib eelkõige selleks, et teha valdava küllastamata rasvhappena oleiinhapet sisaldavates taimsetes õlides (näiteks oliiviõli) kindlaks väikeste koguste poolkuivavate õlide (mis sisaldavad palju linoolhapet) esinemine.

3. PÕHIMÕTE

Triglütseriidid eraldatakse vastavalt nende ekvivalentsele süsinikuarvule kõrgrõhuvedelikkromatograafiaga (muudetud polaarsus) ja kromatogrammide tõlgendamise teel.

4. SEADMED

4.1. Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia, mis võimaldab kolonni temperatuuri reguleerida.

4.2. 10 µl süstal injekeerimiseks.

4.3. Detektor: diferentsiaalrefraktomeeter. Kogu mõõtepiirkonna tundlikkus peaks olema vähemalt 10^{-4} murdmisnäitaja ühikust.

4.4. Kolonnid: roostevabast terasest katseklaas kõrgusega 250 mm ja sisediameetriga 4,5 mm, kus on 5 µm diameetriga ränidioksiidiosakesed, milles on 22—23 % süsinikku oktadeküülsilaani kujul (märkus 2).

4.5. Meerik ja/või integraator.

5. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peaksid olema analüütiliselt puhtad. Elueerimislahustid peaksid olema degaseeritud ja neid võib korduvalt kasutada, ilma et see eraldamist mõjutaks.

5.1. Kloroform.

5.2. Atsetoon.

5.3. Atsetonitriil.

5.4. Elueerimislahusti: atsetonitriil + atsetoon (vahekordi tuleb soovitud eraldumise saamiseks kohandada; alustada tuleks 50 : 50 seguga).

5.5. Lahusti: atsetoon või 1 : 1 atsetooni ja kloroformi segu.

5.6. Võrdlustriglütseriidid: võib kasutada müügil olevaid triglütseriidide (tripalmiitiin, trioleiin, jne) ning nende peetumisaeg tuleb määrata kooskõlas vastava ekvivalentse süsinikuarvuga, või sojaõli põhjal saadud võrdluskromatogrammi (vt märkus 3 ja 4 ning joonised 1 ja 2).

6. PROOVIDE ETTEVALMISTAMINE

Valmistatakse ette uuritava proovi 5 % lahus, milleks kaalutakse 10 ml mõõtekolbi $0,5 \pm 0,001$ g proovi ja katseklaas täidetakse lahustiga (5.5) kuni 10 ml märgini.

7. TÖÖ KÄIK

- 7.1. Valmistatakse ette kromatograaf. Kogu süsteemi puhastamiseks pumbatakse sellesse elueerimislahustit (5.4) kiirusega 1,5 ml/mm. Oodatakse, kuni tekib stabiilne nulljoon.

Süstatakse 10 µl proovi, mis on ette valmistatud vastavalt punktile 6.

8. TULEMUSTE ARVUTAMINE JA ESITAMINE

Kasutatakse sisestandardiseerimise meetodit, see tähendab, et eeldatakse, et erinevatele triglütseriidide piikide pindalade summa on 100 %. Vastavate triglütseriidide protsendid arvutatakse järgmise valemiga:

$$\text{triglütseriidi \%} = \frac{\text{piigi pindala}}{\text{piigi pindalade summa}} \times 100$$

Tulemus väljendatakse ühe kümnendkoha täpsusega.

- Märkus 1.* Elueerimisjärjekorda võib määrata ekvivalentse süsinikuarvu arvutamise teel, mida väljendab sageli suhe $ECN = CN - 2n$, kus CN on süsinikuarv ja n on kaksiksidemete arv; seda on võimalik kaksiksideme päritolu arvesse võttes täpsemalt arvutada. Kui n_0 , n_1 ja n_{1n} on vastavalt oleiinihappe, linoolhappe ja linoleenhappe kaksiksidemete arvud, on ekvivalentseid süsinikuarvusi võimalik arvutada järgmise valemiga:

$$ECN = CN - d_0 n_0 - d_1 n_1 - d_{1n} n_{1n}$$

kus koefitsiente d_0 , d_1 ja d_{1n} on võimalik arvutada võrdlustriglütseriididega. Käesolevas meetodis täpsustatud tingimustel sarnaneb valem järgmise valemiga:

$$ECN = CN - [2,60 n_0] - [2,35 n_1] - [2,17 n_{1n}]$$

- Märkus 2.* Näited: Lichrosorb (Merck) RP18 Art 50333;

Lichrosphere (Merck) 100 CH18 Art 50377 või samaväärne.

- Märkus 3.* Mitme võrdlustriglütseriidiga on võimalik arvutada trioieini resolutsioon.

$$\alpha = RT'/RT'_{oleiin}$$

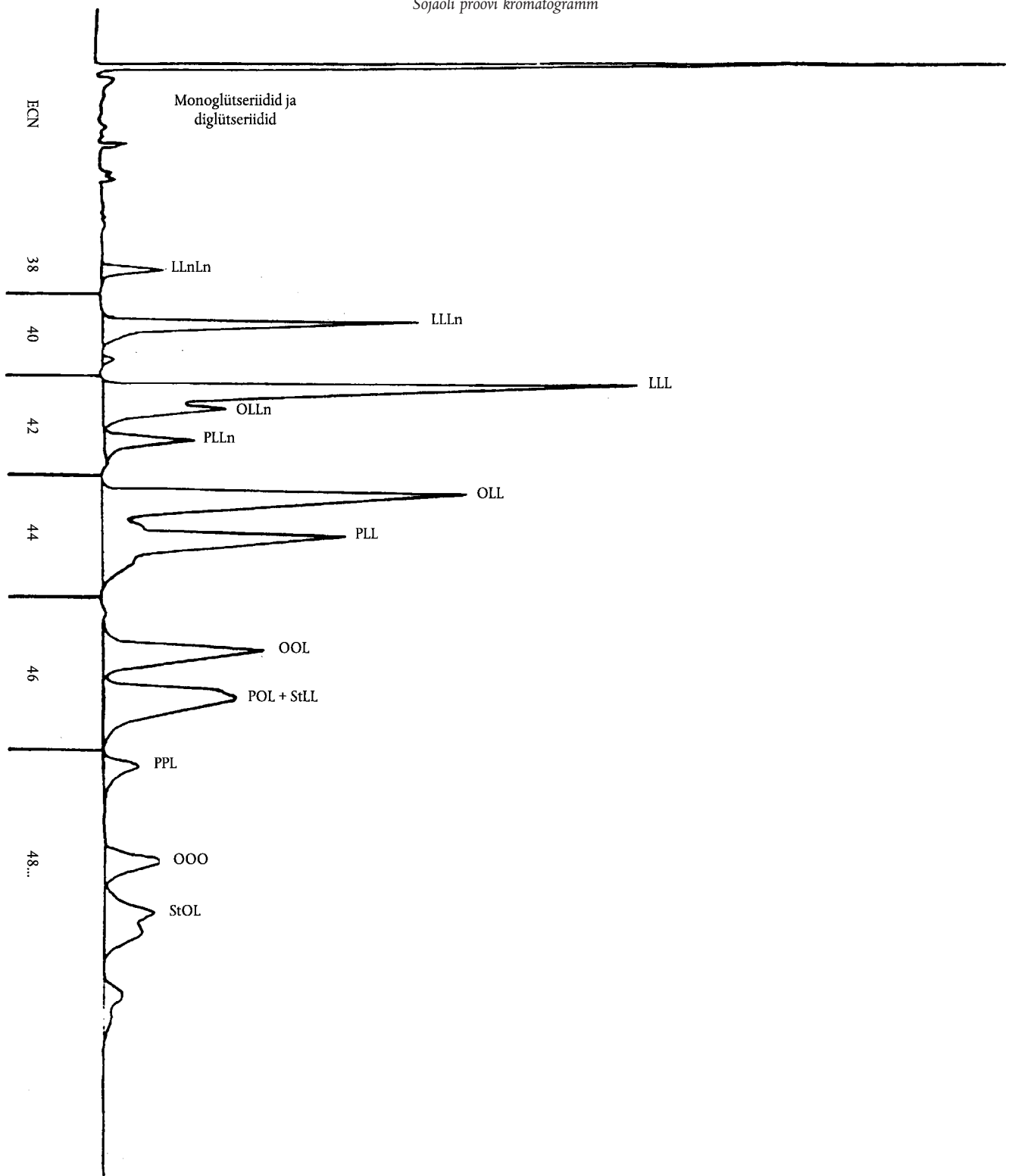
kasutades korrigeeritud peetumisaega $RT' = RT - RT_{lahusti}$

Graafik log α muutumine (kaksiksidemete arv) funktsioonina võimaldab määrata kindlaks kõikide võrdlustriglütseriidides sisalduvate rasvhapete triglütseriidide peetumisväärtuse (vt joonis 2).

- Märkus 4.* Kolonn peab olema nii tõhus, et trilinoleiini piik eristub selgelt nende triglütseriidide piikidest, mille peetumisaeg on peaaegu sama.

Joonis 1

Sojaõli proovi kromatogramm

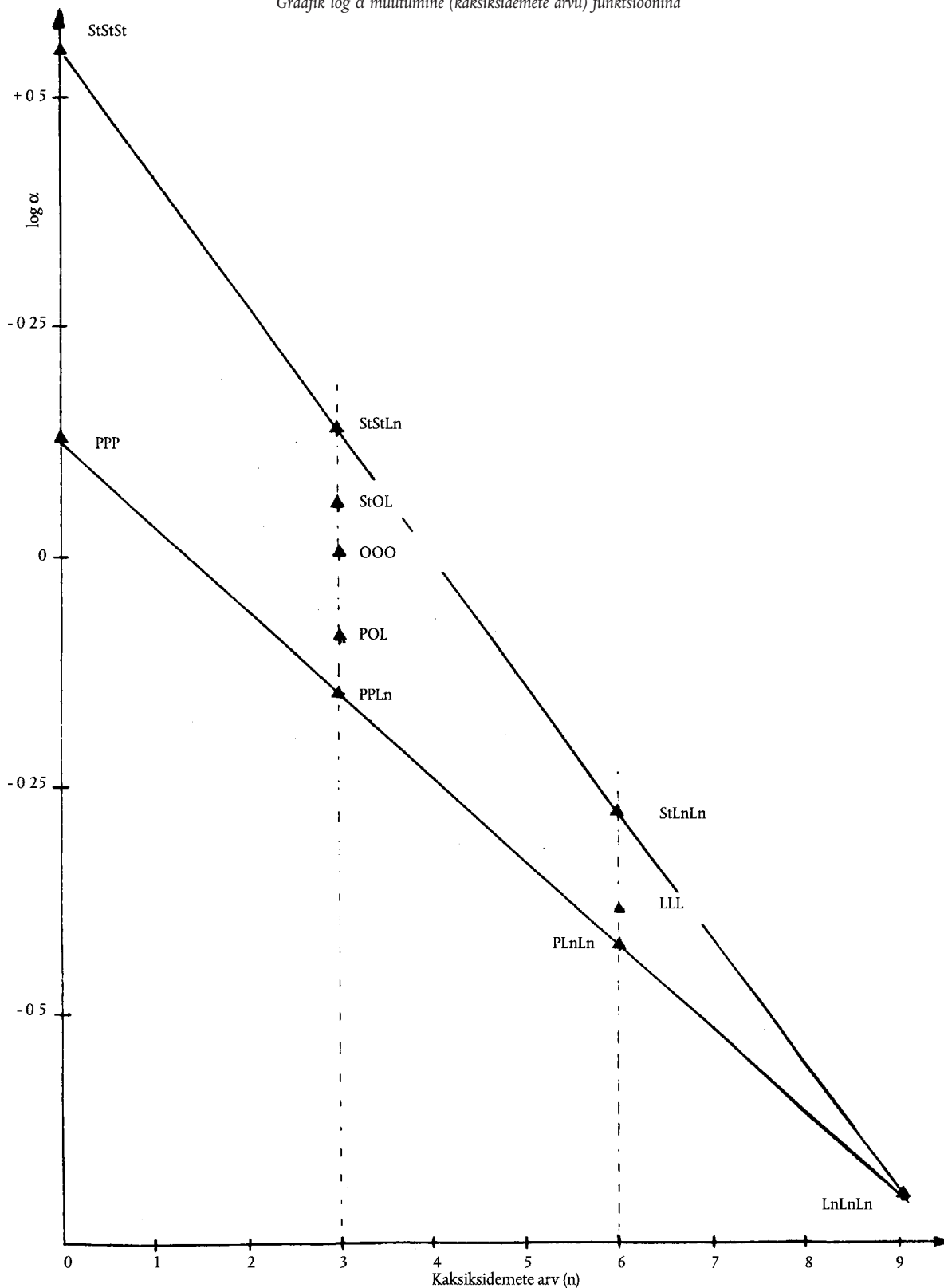


P = palmitiinhape
L = linoolhape

St = steariinhape
In = linoleenhape

O = oleiinhape

Joonis 2

Graafik $\log \alpha$ muutumine (kaksiksidemete arv) funktsioonina

La = lauriinhape
 St = steariinhape
 Ln = linoleenhape

My = müristiinhape
 O = oleiinhape

P = palmitiinhape
 L = linoolhape

IX LISA

SPEKTROFOTOMEETRILINE ANALÜÜS ULTRAVIOLETTPIIRKONNAS

EESSÕNA

Spektrofotomeetiline analüüs ultraviolettpiirkonnas võib anda teavet rasva kvaliteedi, selle säilivuse ja tehnoloogilistest protsessidest tulenevate muutuste kohta.

Käesolevas meetodis kirjeldatud lainepikkustel esinev neeldumine on tingitud konjugeeritud dieeni ja trieeni süsteemide olemasolust. Need neeldumised on väljendatud eri-ekstinktsioonina $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ (ekstinktsioon, mis leiab aset teatud lahustist valmistatud 1protsendilise rasvalahuse 1 cm paksuses kihis), mida tavaliselt väljendatakse tähisega K (samuti tuntud ekstinktsiooni koefitsiendina).

1. KOHALDAMISALA

Käesolevas meetodis kirjeldatakse oliiviõli spektrofotomeetrist analüüsi ultraviolettpiirkonnas.

2. PÕHIMÕTE

Rasv lahustatakse ettenähtud lahustis ja lahusti ekstinktsioon määratakse kindlaks teatud lainepikkusel kasutades võrdluslahusena puhast lahustit. Üksikekstinktsioonid arvutatakse spektrofotomeetri tulemuste põhjal.

3. VAHENDID

- 3.1. Spektrofotomeeter ekstinktsiooni mõõtmiseks ultraviolettpiirkonnas 220–360 nm vahel, mis võimaldaks tulemusi märkida ühe nanomeetri täpsusega.
- 3.2. Risttahukakujulised kaanega kvartsküvetid optilise pikkusega 1 cm. Vee või mõne muu sobiva lahustiga täitmise korral ei tohiks küvetide tulemuste erinevus olla suurem kui 0,01 ekstinktsiooniühikut.
- 3.3. 25 ml mõõtekolvid.
- 3.4. Kromatograafia kolonn, pikkusega 450 mm ja läbimõõduga 35 mm, väljalasketoru läbimõõduga umbes 10 mm.

4. REAKTIIVID

- 4.1. Spektrofotomeetriselt puhas iso-oktaan (2,2,4-trimetüülpentaan). Võrreldes destilleeritud veega peab selle läbitustegur olema vähemalt 60 % 220 nm juures ja mitte alla 95 % 250 nm juures, või
 - spektrofotomeetriselt puhas tsükloheksaan: võrreldes destilleeritud veega peab selle läbitustegur olema vähemalt 40 % 220 nm juures ja mitte alla 95 % 250 nm juures, või
 - muu sobiv lahusti, milles rasv täielikult lahustub (näiteks etanool või kastoorõli).
- 4.2. Aluseline alumiiniumoksiid kolonnkromatograafia jaoks, mis on valmistatud ja kontrollitud, nagu I liites kirjeldatud.
- 4.3. n-heksaan kromatograafia jaoks.

5. TÖÖ KÄIK

- 5.1. Kõnealune proov peab olema täiesti homogeenne ja heljuvate lisanditeta. Ümbritseva õhu temperatuuril vedelad õlid filtreeritakse läbi paberi temperatuuril ligikaudu 30 °C, tahked rasvad homogeniseeritakse ja filtreeritakse temperatuuril, mis võib olla rasva sulamistemperatuurist kuni 10 °C kõrgem.

- 5.2. 25 ml mõõtekolbi kaalutakse 0,25 g eespool kirjeldatud viisil ettevalmistatud proovi, täidetakse kuni märgini ettenähtud lahustiga ning homogeniseeritakse. Tekkiv lahus peab olema täiesti selge. Opalestsentsi või hägususe korral tuleb proov kiiresti läbi paberi filtreerida.
- 5.3. Kuvett täidetakse saadud lahusega ning ekstinktsioonid mõõdetakse nõutavatel lainepikkustel vahemikus 232–276 nm, kasutades selleks võrdluslahustina kasutatud lahustit.
- Registreeritud ekstinktsiooniväärtused peavad jääma vahemikku 0,1–0,8. Vastasel korral tuleb mõõtmisi korrata ja kasutada vajaduse korral suurema kontsentratsiooniga või rohkem lahjendatud lahuseid.
- 5.4. Kui pärast alumiiniumoksiidiga töötlemist on vaja määrata konkreetne ekstinktsioon, tehakse seda järgmiselt. Kromatograafia kolonni pannakse 30 grammi aluselist alumiiniumoksiidi heksaani suspensioonis. Pärast adsorbendi settimist eemaldatakse üleliigne heksaan selliselt, et seda on alumiiniumoksiidi peal umbes 1 cm.

10 g rasva, mis on punktis 5.1 kirjeldatud viisil homogeniseeritud ja filtreeritud, lahustatakse 100 ml heksaanis ning lahus valatakse kolonni. Eluaat kogutakse kokku ning lahusti aurustatakse vaakumi all temperatuuril alla 25 °C.

Saadud rasva kasutades järgitakse punktis 5.2 kirjeldatud korda.

6. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

- 6.1. Registreeritakse individuaalsed ekstinktsioonid (ekstinktsiooni koefitsiendid) eri lainepikkustel, mis arvutatakse järgmise valemi alusel:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s}$$

kus

K_{λ} = on konkreetne ekstinktsioon lainepikkusel λ ;

E_{λ} = on ekstinktsioon lainepikkusel λ ;

c = on lahuse kontsentratsioon g/100 ml;

s = küveti paksus (cm).

Tulemused väljendatakse kahe kümnendikkohta täpsusega.

- 6.2. Oliiviõli spektrofotomeetriline analüüs kooskõlas EMÜ ametliku meetodiga näeb ette konkreetse ekstinktsiooni määramise iso-oktaani lahuses lainepikkusel 232 ja 270 nm ning K määramist järgmise valemiga:

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2}$$

kus K_m on konkreetne ekstinktsioon lainepikkusel m , maksimaalse neeldumise lainepikkus on umbes 270 nm.

I LIIDE

Alumiiniumoksiidi ettevalmistamine ja selle aktiivsuse kontrollimine

A.1.1. Alumiiniumoksiidi ettevalmistamine

Ahjus temperatuuril 380–400 °C kolm tundi enne kuivatatud alumiiniumoksiid asetatakse hermeetiliselt suletavasse mahutisse, lisatakse destilleeritud vett 5 ml iga 100 g alumiiniumoksiidi kohta, seejärel suletakse mahuti kohe, loksutatakse korduvalt ning lastakse enne kasutamist vähemalt 12 tundi seista.

A.1.2. Alumiiniumoksiidi aktiivsuse kontrollimine

30 grammi alumiiniumoksiidiga valmistatakse ette kromatograafia kolonn. Toimitakse, nagu lõikes 5.4 kirjeldatud, ning läbi kolonni lastakse segu, mis koosneb:

- 95 % neitsioliiviõlist, mille konkreetne ekstinktsioon on 268 nm juures alla 0,18,
- 5 % maapähkliõlist, mida on rafineerimise ajal aktiivmullaga töödeldud ja mille konkreetne ekstinktsioon on 268 nm

jooksul mitte vähem kui 4.

Kui segu konkreetne ekstinktsioon on pärast kolonni läbimist 268 nm juures üle 0,11, on alumiiniumoksiid sobiv, kui ei, tuleb dehüdraatimise taset suurendada.

II LIIDE

Spektrofotomeetri kalibreerimine

- A.2. Seadmeid tuleb korrapäraselt (vähemalt iga kuue kuu järel) kontrollida nii lainepikkuse vastavuse kui täpsuse suhtes.
- A.2.1. Lainepikkust võib kontrollida elavhõbe-kvartslambi või sobivate filtritega.
- A.2.2. Fotoelemendi ja fotokordisti tulemusi kontrollitakse järgmiselt: 1 000 ml mõõtekolbi kaalutakse 0,2000 g puhast kaaliumkromaatit, see lahustatakse 0,05 N kaaliumhüdroksiidi lahuses ning täidetakse kuni 1 000 ml märgini. Seejärel võetakse 25 ml saadud lahust, kantakse 500 ml mõõtekolbi, ning täidetakse sama kaaliumhüdroksiidi lahusega märgini.

Saadud lahuse ekstinktsioon mõõdetakse 275 nm juures, kasutades võrdluslahusena kaaliumhüdroksiidi lahust. 1 cm küvetiga mõõtmisel peaks ekstinktsioon olema $0,200 \pm 0,5000$.

X A LISA

RASVHAPETE METÜÜLESTRITE GAASIKROMATOGRAAFILINE ANALÜÜS

1. KOHALDAMISALA

Käesoleva meetodiga antakse üldjuhised täidetud või kapillaarkolonniga gaaskromatograafia kohaldamiseks kooskõlas X B lisaga saadud rasvhapete metüülestrite segu kvalitatiivse ja kvantitatiivse koostise kindlakstegemisel.

Seda meetodit ei kohaldata polümeriseeritud rasvhapete suhtes.

2. REAKTIIVID

2.1. Kandegaas

Inertgaas (lämmastik, heelium, argoon, vesinik), põhjalikult kuivatatud ja hapnikusisaldusega kuni 10 mg/kg.

Märkus 1. Vesinik, mida kasutatakse kandegaasina ainult kapillaarkolonnidega, võib analüüsi kiirust kahekordistada, kuid on ohtlik. Saadaval on ohutusseadmed.

2.2. Abigaasid

2.2.1. Lämmastik (puhtus $\geq 99,9\%$), orgaaniliste lisanditeta.

2.2.2. Õhk või hapnik, orgaaniliste lisanditeta.

2.3. Võrdlusstandard

Puhaste rasvhapete metüülestrite segu või teadaoleva, eelistatult analüüsitava rasvaineiga sarnase koostisega rasva metüülestrid.

Tuleb tagada, et polüküllastumata rasvhapped ei oksüdeeruks.

3. SEADMED

Juhendid käsitlevad tavapäraseid gaaskromatograafia seadmeid, rakendades täidetud ja/või kapillaarkolonne ja leekionisatsioonidetektorit. Sobivad kõik punktis 4.1.2 nimetatud efektiivsuse ja resolutsiooniga seadmed.

3.1. Gaaskromatograaf

Gaaskromatograaf koosneb järgmistest elementidest.

3.1.1. Sissepritsesüsteem

Kasutatakse sissepritsesüsteemi, millel on:

- täidetud kolonnid, väikseima võimaliku tühimahuga (sellisel juhul peab sissepritsesüsteemi olema võimalik kuumutada 20–50 °C kuumemaks kui kolonni); või
- kapillaarkolonnid, sellisel juhul peab sissepritsesüsteem olema spetsiaalselt vastavaks otstarbeks kavandatud. See võib olla jaotatud või jaotamata vooluga injektor.

Märkus 2. Vähem kui 16 süsinikuaatomiga rasvhapete puudumise korral võib kasutada liikuva nõelaga injektorit.

3.1.2. Ahi

Kolonni peab olema võimalik ahjus kuumutada vähemalt temperatuurini 260 °C ning ahi peab soovitud temperatuuri hoidma täidetud kolonniga 1 °C ja kapillaarkolonniga 0,1 °C täpsusega. Viimane nõue on eriti oluline juhul, kui kasutatakse kvartsklaasist kolonni.

Temperatuuriregulaatoriga kuumutamine on kõikidel juhtudel soovitatav, eelkõige rasvhapete puhul, millel on vähem kui 16 süsinikuaatomit.

3.1.3. Täidetud kolonn

3.1.3.1. Kolonn, analüüsitava ainega inertsest materjalist (klaasist või roostevabast terasest), millel on järgmised mõõtmed.

- pikkus: 1–3 m. Kui esineb pikaahelisi rasvhappeid (üle C_{20}), tuleks kasutada suhteliselt lühikest kolonni. 4–6 süsinikuaatomiga hapete analüüsimisel on soovitatav kasutada 2 m pikkust kolonni;
- sisediameeter: 2–4 mm.

Märkus 3. Kui esineb rohkem kui kolme kaksiksidemega polüküllastumata komponente, võib need lagundada roostevabast terasest kolonnis.

Märkus 4. Kasutada võib kahe täidetud kolonniga süsteemi.

3.1.3.2. Täitmine, kasutatakse järgmisi komponente:

- tugiaine:* happega pestud ja silaanitud kobediatomiit või muu sobiv inertne kandegaas, millel on kitsas terasuuruste väärtus (25 μm ulatus 125–200 μm) ning tera keskmine suurus on seotud kolonni sisediameetri ja pikkusega;
- statsionaarne faas:* polüestri tüüpi polaarne vedelik (nt detüleen-glükool-polüsuktsinaat, butanediool-polüsuktsinaat, etüleen-glükool-polüadipaati jne), tsüanosilikooneid või mõni muu vedeldi, mis võimaldab vajaliku kromatograafilist eraldamist (vt punkt 4). Statsionaarse faasi osakaal peaks kolonni täitmisest moodustama 5–20 %. Teatavate eraldamiste puhul võib kasutada ka mittepolaarset statsionaarset faasi.

3.1.3.3. Kolonni tasakaalustamine

Kui kolonn on võimaluse korral detektorist eraldatud, kuumutatakse ahju järk-järgult temperatuurini 185 °C ning vahetult ettevalmistatud kolonni lastakse sellel temperatuuril vähemalt 16 tunni jooksul inertgaasi vool kiirusega 20–60 ml/min ja täiendavalt 2 tunni jooksul temperatuuril 195 °C.

3.1.4. Kapillaarkolonn

3.1.4.1. Katseklaas, mis on valmistatud analüüsitava ainega inertsest materjalist (tavaliselt klaas või kvartsklaas). Sisediameeter on 0,2–0,8 mm. Sisekülge tuleb enne statsionaarse faasi kihiga katmist nõuetekohaselt töödelda (nt pinna ettevalmistamine, inaktiveerimine). Enamikul juhtudel on piisavaks pikkuseks 25 mm.

3.1.4.2. Statsionaarne faas, tavaliselt poliüglükooli (polü(etüleen-glükool)20 000), polüestri (butanediool-polüsuktsinaat) või polaar-polüsiloksaani (tsüanosilikooneid) tüüpi. Sobivad seotud (võrkstruktuuriga) kolonnid.

Märkus 5. Polaar-polüsiloksaanid võivad raskendada linoleenhappe ja C_{20} hapete identifitseerimist ja eraldamist.

Kiht peab olema õhuke, st 0,1–0,2 μm .

3.1.4.3. Kolonni monteerimine ja tasakaalustamine

Järgitakse kapillaarkolonnide tavapäraseid ettevaatusabinõusid: kolonni asetus ahjus (tugirajatised), liitekohtade valik ja paigaldus (lekketundlus), kolonni otste asetus injektoris ja detektoris (võimalikult vähe tühja ruumi). Läbi kolonni juhitakse kandegaas (nt 0,3 baari (30 kPa) läbi 25 mm pikkuse ja 0,3 mm sisediameetriga kolonni).

Kolonn tasakaalustatakse ahju reguleerides sellisel, et temperatuur tõuseb ümbritseva õhu temperatuurilt 3 °C minutis, saavutades sellise temperatuuri, mis on 10 °C madalam kui statsionaarse faasi hajumistemperatuur. Ahju hoitakse sellisel temperatuuril tund aega, kuni nulljoon stabiliseerub. Temperatuuri alandatakse taas tagasi 180 °C-le ja katset jätkatakse isotermilistel tingimustel.

Märkus 6. Nõuetekohaselt tasakaalustatud kolonnid on müügil.

3.1.5. Detektor, mida on soovitatavalt võimalik kuumutada temperatuurini, mis on kolonni omast kõrgem.

3.2. Süstal

Süstla ülemine mõõtepiir on 10 ml ning mõõtskaala jagatud 0,1-milliliitristeks ühikuteks.

3.3. Meerik

Kui meeriku kõverat kasutatakse analüüsitava segu koostise arvutamiseks, on vaja väga täpset elektrimeerikut, mis sobib kokku kasutatavate seadmetega. Meerikul peavad olema järgmised omadused:

- vastamisaeg alla 1,5 s, soovitatavalt 1 s (vastamisaeg on aeg, mis kulub meeriku nõelal liikumiseks vahemikus 0–90 % pärast seda kui ootamatult antakse 100 % signaal);
- paberi laius, vähemalt 20 cm;
- paberi kiirus, mida on võimalik kohandada kiiruseni 0,4–2,5 cm/min.

3.4. **Integraator**

Elektroonilise integraatoriga on võimalik kiiresti ja täpselt arvutada. Elektroonilise integraatoriga on võimalik saavutada piisava tundlikkusega lineaarne vastus ning nulljoone kõrvalekalde korrigeerimine on rahuldav.

4. TÖÖ KÄIK

Punktides 4.1–4.3 kirjeldatud toimingud käsitlevad leekionisatsioonidetektori kasutamist.

Kasutada võib ka gaasikromatograafi, milles on kataromeeter (töötab soojusjuhtivuse põhimõttel). Töötin-
gimusi kohandatakse, nagu punktis 6 kirjeldatud.

4.1. **Katsetingimused**

4.1.1. Optimaalsete töötingimuste valik

4.1.1.1. Täidetud kolonn

Katsetingimuste valimisel tuleks arvesse võtta järgmisi muutujaid:

- a) kolonni pikkus ja diameeter;
- b) statsionaarse faasi laad ja kogus;
- c) kolonni temperatuur;
- d) kandegaasi vool;
- e) nõutav resolutsioon;
- f) katsekoguse suurus, mis on valitud selliselt, et detektor ja elektromeeter annavad lineaarse tulemuse;
- g) analüüsi kestus.

Tavaliselt annavad tabelis 1 ja 2 esitatud väärtused soovitud tulemuse, st vähemalt 2 000 teoreetilist plaati ühe kolonnimeetri kohta metüülstearaadile selle elueerimiseks 15 minutiga.

Kui seadmed võimaldavad, peaks injektor olema temperatuuril ligikaudu 200 °C ja detektor kolonni temperatuuriga võrdsel või kõrgemal temperatuuril.

Sõltuvalt kolonni diameetrist on leekionisatsioonidetektorisse suunatud lämmastiku voolukiiruse suhe võrreldes kandegaasi omaga reeglina 1 : 2 kuni 1 : 1. Hapniku voolukiirus on umbes 5–10 korda vesiniku omast kiirem.

Tabel 1

Kolonni sisediaameeter mm	Kandegaasi voolukiirus ml/min
2	15–25
3	20–40
4	40–60

Tabel 2

Statsionaarse faasi kontsentratsioon % (m/m)	Kolonni temperatuur °C
5	175
10	180
15	185
20	185

4.1.1.2. Kapillaarkolonn

Kapillaarkolonna tõhusus- ja täituvusomadused tingivad selle, et koostisosade eraldamine ja analüüsi kestvus sõltuvad suuresti kandegaasi voolukiirusest kolonnis. Seetõttu on vaja töötingimusi optimeerida, muutes seda parameetrit (ehk kolonna survekadu) sõltuvalt sellest, kas soovitakse tõsta eraldamise kvaliteeti või muuta analüüsid kiiremaks.

4.1.2. Teoreetiliste plaatide arvu (tõhususe) ja resolutsiooni määramine (vt joonis 1).

Tehakse võrdsetes kogustes oleva metüülstearaadi ja metüüloleaadi segu analüüs (näiteks kakaovõis olevad metüülestrid).

Kolonna temperatuur ja kandegaasi voolukiirus valitakse selliselt, et umbes 15 minutit pärast lahusti piigi registreerimist registreeritakse võimalikult suur metüülstearaadi piik. Kasutada tuleb piisavat kogust metüülestrite segu, mis võimaldab metüülstearaadi piigil moodustada $\frac{3}{4}$ kogu skaalast.

Arvutatakse teoreetiliste plaatide arv, n (tõhusus), kasutades järgmist valemit:

$$n = 16 \left[\frac{dr_1}{\omega_1} \right]^2$$

ja resolutsioon, R , kasutades valemit:

$$R = \frac{2\Delta}{\omega_1 + \omega_2}$$

kus

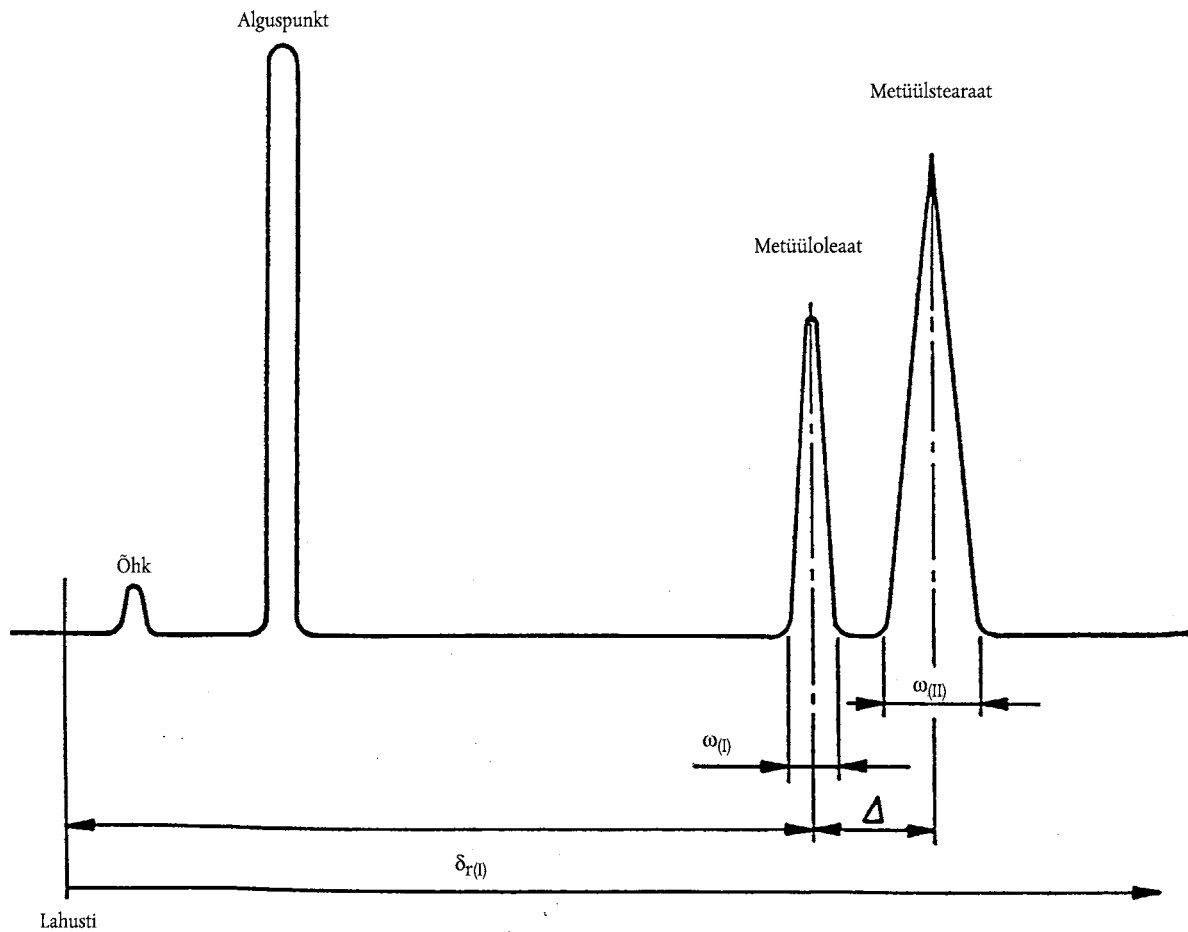
dr_1 on peetumisdistants millimeetrites, kromatogrammi algusest kuni metüülstearaadi piigi maksimumini;

ω_1 ja ω_2 on vastavalt metüülstearaadi ja metüüloleaadi piigilaiused millimeetrites, mis mõõdetakse kohas, kus piigikõvera lõikepunktid lõikuvad nulljoonega;

Δ on metüülstearaadi ja metüüloleaadi piigimaksimumide distants millimeetrites.

Joonis 1

Kromatogramm teoreetiliste plaatide arvu (tõhususe) ja resolutsiooni määramiseks.



Töötingimused tuleb valida selliselt, et metüülstearaadi jaoks saadakse vähemalt 2 000 teoreetilist plaati kolonnimeetri kohta ning resolutsioon on vähemalt 1,25.

4.2. Katsekogus

Süstlaga (3.2) võetakse 0,1–2 µl metüülestriite lahust, mis on valmistatud kooskõlas X B lisaga, ning süstitakse kolonni.

Kui estrid ei ole lahusesena, valmistatakse ligikaudu 100 mg/ml kromatograafilise kvaliteediga heptaanilahust ja süstitakse seda lahust 0,1–1 ml.

Kui analüüsi käigus määratakse koostisosi, mida on vähe, võib katsekogust suurendada (kuni kümnekordses).

4.3. Analüüs

Üldjuhul on töötingimused sellised, nagu punktis 4.1.1 kirjeldatud.

Siiski on võimalik töötada ka madalama kolonnitemperatuuriga juhul, kui on vaja määrata rasvhappeid, millel on vähem kui 12 süsinikuaatomit, või kõrgemal temperatuuril, kui on vaja määrata rasvhappeid, millel on rohkem kui 20 süsinikuaatomit. Nendel juhtudel on võimalik kasutada temperatuuri programmeerimist. Näiteks kui proov sisaldab rasvhapete metüülestreid, millel on vähem kui 12 süsinikuaatomit, süstitakse proov temperatuuril 100 °C (või 50–60 °C võihapet) ja tõstetakse kohe temperatuuri 4–8 °C võrra minutis, kuni saavutatakse optimaalne temperatuur. Teatavatel juhtudel on neid kahte meetodit võimalik ühendada.

Pärast programmeeritud kuumutamist jätkatakse elueerimist püsival temperatuuril, kuni kõik komponendid on elueeritud. Kui seade ei võimalda programmeeritud kuumutamist, kasutatakse kahte 100–195 °C vahel olevat kindlaksmääratud temperatuuri.

Vajaduse korral soovitatakse teha analüüs kahel erineva polaarsusega kindlaksmääratud faasil, et kontrollida varjatud piigi puudumist, näiteks kui proovis on üheaegselt konjugeeritud $C_{18:3}$ ja $C_{20:0}$, või $C_{18:3}$ ja $C_{18:2}$.

4.4. Võrdluschromatogrammi ja -graafikute ettevalmistamine

Analüüsitakse võrdlusstandardi lahust (2.3), kasutades selleks samu töötingimusi nagu proovi puhul, ning mõõdetakse lahuse rasvhapete peetumisajad või peetumisdistantsid. Iga küllastamatusmäära kohta konstrueeritakse poollogaritmilisel paberil graafikud, kus oleks süsinikuaatomite arvu funktsioonina näha peetumisaja või -distantsi logaritmi. Isotermilistel tingimustel peaksid sama küllastamatusmääraga hargnemata ahelaga hapete graafikuteks olema sirgjooned. Need jooned peaksid olema enam-vähem paralleelsed.

Tuleks vältida tingimusi, milles võib esineda varjatud piike, st kus resolutsioon ei ole kahe koostisosa eraldamiseks piisav.

5. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

5.1. Kvalitatiivne analüüs

Proovi metüülestripiigid määratakse proovis punktis 4.4 koostatud graafikutega, vajaduse korral interpolatsiooni abil.

5.2. Kvantitatiivne analüüs

5.2.1. Koostise määramine

Välja arvatud erandjuhud, kasutatakse sisemise normaliseerimise meetodit, st oletatakse, et kromatogrammil on kõik proovi koostisosad ja kogu piigi pindala vastab koostisosadele 100protsendilisel (täielik elueerumine).

Kui seadmed sisaldavad ka integraatoreid, kasutatakse integraatoriga saadud tulemusi. Kui integraator puudub, määratakse konkreetsed piigipindalad piigi kõrguse korrutamisega piigi laiusega kõrguse keskkohas, vajaduse korral võetakse arvesse erinevaid registreerimise ajal kasutatud sumbumisi.

5.2.2. Arvutamine

5.2.2.1. Üldjuhul

Teatava komponendi i sisaldus väljendatuna metüülestriite massiprotsendina arvutatakse selliselt, et määratakse piigipindala suhteline osa kõikide piikide pindalast järgmise valemil alusel.

$$\frac{A_i}{\Sigma A} \times 100$$

kus

A_i on komponendi i piigipindala;

ΣA on piikide pindala summa.

Tulemus esitatakse ühe kümnendkoha täpsusega.

Märkus 7: Üldjuhul põhineb arvutustulemus sellel, et suhtelised pindalad vastavad massi protsentuaalsetele suhetele. Kui seda üldistust ei saa kohaldada, vaadata punkti 5.2.2.2.

5.2.2.2. Parandustegurite kasutamine

Teatavatel juhtudel, näiteks kui rasvhapetes on vähem kui kaheksa süsinikuaatomit või kui happes on sekundaarsed rühmad, või kui kasutatakse soojusjuhtivuse detektorit või kui on vaja maksimaalset täpsust, tuleks kasutada parandustegurit, et arvestada piigipindalade protsent ümber komponentide massiprotsentideks.

Parandustegur määratakse kindlaks kromatogrammiga, mis saadakse teadaoleva koostisega metüülestriite võrdlussegu analüüsimisel proovi töötingimustega samadel töötingimustel.

Selle võrdlussegu komponendi i massiprotsent määratakse järgmise valemiga:

$$\frac{m_i}{\Sigma m} \times 100$$

kus

m_i on komponendi i massi võrdlussegu;

Σm on võrdlussegu erinevate komponentide üldmass.

Võrdlussegu (4.4) kromatogrammi alusel arvutatakse komponendi i protsent (pindala/pindala) järgmiselt:

$$\frac{A_i}{\Sigma A} \times 100$$

kus

A_i on komponendi i piigipindala;

ΣA on piikide pindalade summa.

Parandustegur arvutatakse järgmiselt:

$$K_i = \frac{m_i \times \Sigma A}{A_i \times \Sigma m}$$

Tavaliselt väljendatakse parandustegureid suhtes $K_{C_{16}}$ -ga, nii et parandustegurid on järgmised:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C_{16}}}$$

Proovi iga komponendi i määr metüülestrite massiprotsendina on järgmine:

$$\frac{K'_i \times A_i}{\Sigma(K'_i \times A_i)} \times 100$$

Tulemus esitatakse ühe kümnendkoha täpsusega.

5.2.2.3. Sisestandardi kasutamine

Teatavate analüüsides puhul (nt kui kõikide rasvhapete määr ei ole teada, juhul kui nelja ja kuue süsinikuga hapete kõrval esinevad ka 16 ja 18 süsinikuga happed, või kui on vaja määrata proovis olevate rasvhapete absoluutsumma) on vaja kasutada sisestandardit. Sageli kasutatakse viie, 15 või 16 süsinikuga rasvhapeteid. Tuleks kindlaks määrata sisestandardi parandustegur (juhul kui see on vajalik).

Komponendi i massiprotsent väljendatuna metüülestritena arvutatakse valemiga:

$$\frac{m_s \times K'_i \times A_i}{m \times K'_s \times A_s} \times 100$$

kus

A_i on komponendi i piigipindala;

A_s on sisestandardi piigipindala;

K'_i on komponendi i parandustegur (suhtes $K_{C_{16}}$ -ga);

K'_s on sisestandardi parandustegur (suhtes $K_{C_{16}}$ -ga);

m on katsekoguse mass (mg);

m_s on sisestandardi mass (mg).

Tulemus esitatakse ühe kümnendkoha täpsusega.

6. ERIJUHT — KATAROMEETRI KASUTAMINE (SOOJUSJUHTIVUSE MUUTUSTE PÕHIMÕTTEL)

Rasvhappe metüülestrite segu kvalitatiivse ja kvantitatiivse koostise määramisel võib kasutada gaasikromatograafi, milles on soojusjuhtivuse muutuste põhimõttel töötav detektor (kataromeeter). Kataromeetri kasutamisel tuleb lõike 3 ja 4 tingimusi tabeli 3 alusel kohandada.

Kvantitatiivse analüüsi puhul tuleb kasutada punktis 5.2.2.2 määratletud parandustegureid.

Tabel 3

Muutujad	Väärtus/tingimus
Kolonn	Pikkus: 2–4 m Sisediameeter: 4 mm
Tugiaine	Tera suurus 160–200 µm
Statsionaarse faasi kontsentratsioon	15–25 % (m/m)
Kandegaas	Heelium või selle puudumisel vesinik, võimalikult madala hapnikusisaldusega
Abigaasid	Puuduvad
Injektori temperatuur	4–60 °C kolonni temperatuurist kõrgem
Kolonni temperatuur	180–200 °C
Kandegaasi vool	Tavaliselt 60–80 ml/min
Süstitava katsekoguse suurus	Tavaliselt 0,5–2 µl

7. KATSEPROTOKOLL

Katseprotokolli märgitakse metüülestriite valmistamisel ja gaasikromatograafilisel analüüsimisel kasutatud meetodid ning saadud tulemused. Selles märgitakse samuti kõik üksikasjad, mida ei ole nimetatud käesolevas rahvusvahelises standardis või mis on valikulised, samuti üksikasjad tulemust mõjutada võinud asjaolude kohta.

Analüüsiprotokoll sisaldab kõiki proovi täielikuks tuvastamiseks vajalikke andmeid.

X B LISA

RASVHAPETE METÜÜLESTRITE ETTEVALMISTAMINE KOOSKÖLAS MÄÄRUSE (EMÜ) nr 72/77 VI LISA I JA II JAOTISEGA VÕI ALLJÄRGNEVALT KIRJELDATUD MEETODIGA

EESSÕNA

Protsessi valik sõltub uuritava rasvaine happekoostisest ja happesusest ning tehtavast gaasikromatograafilisest analüüsist.

Täpsemalt tähendab see järgmist:

- rasvainete puhul, mis sisaldavad kuni 12 süsinikuaatomiga rasvhappeid, sobivad ainult suletud anumast toimuvad protsessid või protsessid, milles kasutatakse dimetüülsulfaati,
- rasvainete puhul, mille happesus on üle 3 %, sobivad ainult need protsessid, kus kasutatakse metanooli, soolhapet või metüülsulfaati,
- trans-isomeeride gaasikromatograafiliseks mõõtmiseks sobivad ainult need protsessid, milles kasutatakse naatriummetülaati või dimetüülsulfaati,
- metüülestrite valmistamisel väikestest rasvainekogustest, mis on eraldatud planaarkromatograafiaga, sobivad protsessid, milles kasutatakse metanooli, heksaani või väävelhapet.

Seebistumatute komponentide esinemist ei pea arvesse võtma juhul, kui nende kogus ei ületa 3 %, vastasel juhul tuleb metüülestrid valmistada rasvhapetest.

1. RAKENDUSALA JA -ULATUS

Kirjeldatakse viit protsessi, mille käigus valmistatakse rasvainetest metüülestreid koos:

- a) naatriummetülaadiga;
- b) naatriummetülaadiga suletud anumast;
- c) metanooli ja soolhappega suletud anumast;
- d) dimetüülsulfaadiga;
- e) metanooli, heksaani ja väävelhappega.

Protsess A

2. PÕHIMÕTE

Analüüsitava rasvaine kuumutatakse püstjahutiga kolvis metanooli ja naatriummetülaadiga. Saadud metüülestrid ekstraheeritakse etüüleetriga.

3. SEADMED

- 3.1. 100 ml püstjahutiga ja lihvihendusega kolb, mille peal on kaltsiumkloriiditoru.
- 3.2. 50 ml mõõtesilindrid.
- 3.3. 5 ml mõõtepipett, skaalajaotise väärtusega 0,1 ml.
- 3.4. 250 ml jaotuslehtid.
- 3.5. 200 ml kolb.

4. REAKTIIVID

- 4.1. Veevaba metanool.

- 4.2. Naatriummetülaadi 15 % lahus metanoolis; selleks lahustatakse 100 ml veevabas metanoolis 0,34 g metallilist naatriumi.
- 4.3. Etüüleeter.
- 4.4. 10 % naatriumkloriidi lahus.
- 4.5. 40–60 °C petrooleeter.
5. TÖÖ KÄIK
 - 5.1. 100 ml kolbi pannakse 2 g rasvainet, mis on enne naatriumsulfaadil kuivatatud ja filtreeritud. Lisatakse 35 ml metanooli, paigaldatakse kondensaator ning kolbi keedetakse mõni minut püstjahuti all.
 - 5.2. Kuumutamise lõpetatakse, eemaldatakse kondensaator ning lisatakse kiiresti 3,5 ml naatriummetülaadi lahust; kondensaator pannakse tagasi ning lahust keedetakse püstjahutis vähemalt kolm tundi. Metüülimine on lõppenud, kui kogu rasvaine on veeldatud ja reaktiivisegu on toatemperatuuril täiesti selge.
 - 5.3. Kolb jahutatakse ning reaktiivisegu kallatakse 250 ml jaotuslehtrisse, lisatakse 35–40 ml etüületrit, 100 ml vett ja 5–6 ml 10protsendilist naatriumkloriidi lahust. Loksutatakse ning kihtidel lastakse eralduda. Vesifaas viiakse teise jaotuslehtrisse ning ekstraheeritakse veel kord 25 ml etüületriga.

Koondatud etüüleetri ekstraktidele lisatakse 50 ml 40–60°C petrooleetrit. Eraldub vesi ning seda on võimalik eemaldada.

Seejärel pestakse eetrifaasi kolm korda 10–15 ml veega, kuivatatakse naatriumsulfaadil, filtreeritakse läbi paberi ning filtraat kogutakse 200 ml kolbi.

Lahustit aurustatakse veevannil puhta lämmastiku voolus seni, kuni seda on 20 ml.

Protsess B

2. PÕHIMÕTE

Analüüsitava rasvainet töödeldakse naatriummetülaadiga metanoolilahuses, kaanega anumates temperatuuril 85–90 °C.
3. SEADMED
 - 3.1. Tugevad klaasist anumad, mille maht on ligikaudu 5 ml (kõrgus 40–45 mm, diameeter 14–16 mm).
 - 3.2. 1 ml mõõtesilinder, skaalajaotise väärtusega 0,1 ml.
4. REAKTIIVID
 - 4.1. Naatriummetülaadi 1,5 % metanoolilahus. Selleks lahustatakse 100 ml veevabas metanoolis 0,50 g metallilist naatriumi.
5. TÖÖ KÄIK
 - 5.1. 2 g klaasanumasse pannakse 2 ml rasvainet, mis on enne naatriumsulfaadiga kuivatatud ja filtreeritud. Lisatakse 0,3 g (ligikaudu 0,4 ml) naatriummetülaadi lahust ja anuma kaas kuumutatakse kinni.
 - 5.2. Anumat kuumutatakse kaks tundi temperatuuril 85–90 °C, loksutades seda aeg-ajalt. Esterdamine on lõppenud, kui anuma sisu on pärast glütseriini ja reaktiivide jäägi sadestumist selge.
 - 5.3. Jahutatakse toatemperatuuril. Anum avatakse alles siis, kui hakatakse kasutama metüülestreid. Metüülestreid ei ole vaja enne gaasikromatograafi panemist täiendavalt töödelda.

Protsess C

2. PÕHIMÕTE

Analüüsitava rasvainet töödeldakse suletud anumates soolhappemetülaadiga temperatuuril 100 °C.

3. SEADMED
 - 3.1. Tugevad klaasanumad mahuga ligikaudu 5 ml (kõrgus 40–45 mm, diameeter 14–16 mm).
 - 3.2. 1- ja 2-milliliitrised kalibreeritud pipetid.
4. REAKTIIVID
 - 4.1. Soolhappe lahus 2protsendilises metanoolis. Valmistatakse gaasilisest soolhapest ja veevabast metanoolist (märkus 1).
 - 4.2. Heksaan gaasikromatograafiaks.
5. TÖÖ KÄIK
 - 5.1. Klaasanumasse pannakse 0,2 g enne naatriumsulfaadil kuivatatud ja filtreeritud rasvainet ja 2 ml soolhappe ja metanooli lahust. Anum kuumutatakse kinni.
 - 5.2. Anumat kuumutatakse temperatuuril 100 °C 40 minutit.
 - 5.3. Anumat jahutatakse jooksva vee all, avatakse, lisatakse 2 ml destilleeritud vett ja 1 ml heksaani. Tsentrifugeeritakse ja eemaldatakse heksaanifaas, mis on kasutamiseks valmis.

Protsess D

2. PÕHIMÕTE

Analüüsitava rasvaine seebistatakse kaaliumhüdroksiidi metanoolilahusega ning töödeldakse dimetüülsulfaadiga. Soolhappe lisamisel eraldatakse automaatselt tekkinud metüülestrid. Pärast alumiiniumoksiidiga töötlemist saadakse väga puhtad metüülestrid.
3. SEADMED
 - 3.1. Tugev katseklaas, mille maht on ligikaudu 20 ml ning millel on 10/19 lihvkork ja kaitseklaamid.
 - 3.2. Püstjahutid, 10/19 lihühendusega.
 - 3.3. Klaasfiltrid, millel on paagutatud ketas, suurus G 2 ja läbimõõt 20 mm.
 - 3.4. Ligikaudu 10-milliliitrised koonilise põhjaga klaasist katseklaasid.
 - 3.5. 1- ja 5-milliliitrised süstlad.
4. REAKTIIVID
 - 4.1. Kaaliumhüdroksiid, 10 % metanoolilahus gaasikromatograafia jaoks.
 - 4.2. Bromokresoolroheline indikaator: 0,05 % metanoolilahus.
 - 4.3. Dimetüülsulfaat (p = 1,335 temperatuuril 15 °C).
 - 4.4. Kontsentreeritud soolhappe (p = 1,19) lahjendatud 1 : 1 vahekorras metanooliga gaasikromatograafia jaoks.
 - 4.5. Alumiiniumoksiid, mida on standarditud vastavalt Brockmannile adsorptsiooni kromatograafia jaoks.
5. TÖÖ KÄIK
 - 5.1. 20milliliitrisesse katseklaasi pannakse 2,2 ml rasvainet, mis on enne naatriumsulfaadiga kuivatatud ja filtreeritud. Lisatakse 5 ml kaaliumhüdroksiidi lahust ja mõned kvartsigraanulid keemise kontrollimiseks. Kinnitatakse püstjahuti ja kuumutatakse madalal leegil viis minutit, samal ajal raputades. Seebistamine on lõpetatud, kui lahus on selge. Lõpuks jahutatakse jooksva vee all ning eemaldatakse kondensaator.

- 5.2. Lisatakse paar tilka indikaatorit ning süstlaga aeglaselt 1 ml dimetüülsulfaati. Katseklaas suletakse hermeetiliselt ning seda raputatakse 2–3 minutit, katseklaasi põhi kastetakse korrapärase ajavahemike järel keevasse veevanni. Reaktsioon on täielik, kui indikaatori värv muutub sinisest kollaseks. Lõpuks jahutatakse katseklaas jooksva vee all, avatakse ning lisatakse 5 ml soolhappe metanoolilahust.
- 5.3. Pärast mõneminutilist raputamist asetatakse katseklaas kaldu ning seda koputatakse õrnalt. See aitab metüülestritel õlitaolise massina pinnale tõusta (märkus A).
Metüülestrid eemaldatakse süstlaga, asetatakse koonilise põhjaga katseklaasi, lisatakse ¼ ulatuses metüülestrite mahust alumiiniumoksiidi, raputatakse ja filtreeritakse filterpaberiga.
Märkus A. Kui metüülestrid ei eraldu iseenesest, lisatakse katseklaasi 5 ml vett ja raputatakse.

Protsess E

2. PÕHIMÕTE

Analüüsitavaid rasvaineid kuumutatakse püstjahutiga kolvis metanooli, heksaani ja väävelhappega. Saadud metüülestrid ekstraheeritakse petrooleetriga.

3. SEADMED

- 3.1. 20 ml õhupüstjahutiga katseklaas, mille pikkus on 1 m ja millel on lihühendused.
- 3.2. 5milliliitrine kalibreeritud pipett.
- 3.3. 50milliliitrine jaotuslehter.
- 3.4. 10- ja 25-milliliitrised mõõtesilindrid.
- 3.5. 1milliliitrine koonilise põhjaga katseklaas.

4. REAKTIIVID

- 4.1. Metüülimisreaktiiv: veevaba metanooli ja heksaani ja kontsentreeritud soolhappe segu ($p = 1,84$) 75 : 25 : 1 (V/V/V).
- 4.2. 40–60 °C temperatuuril petrooleeter.
- 4.3. Veevaba naatriumsulfaat.

5. TÖÖ KÄIK

- 5.1. Plaadilt võetud aine pannakse 20milliliitrisesse katseklaasi ja lisatakse 5 ml metüülimisreaktiivi.
- 5.2. Paigaldatakse püstjahuti ja kuumutatakse 30 minutit keevas veevannis (märkus 2).
- 5.3. Segu viiakse kvantitatiivselt 50 ml jaotuslehtrisse, kasutades selleks 10 ml destilleeritud vett ja 10 ml petrooleetrit. Loksutatakse tugevalt ning faasidel lastakse eralduda, eemaldatakse veefaas ja pestakse eetrikihti 20 ml destilleeritud veega. Jaotuslehtrisse lisatakse väike kogus veevaba naatriumsulfaati, loksutatakse, lastakse mõni minut seista ja filtreeritakse, filtraat kogutakse 15milliliitrisesse koonilisse katseklaasi.

Lahusti aurustatakse veevannil lämmastikuvoolus.

Märkus 1. Väikeseid gaasilise soolhappe koguseid on võimalik laboris lihtsalt ette valmistada, lisades müügil olevale lahusele ($p = 1,18$) mõni tilk kontsentreeritud väävelhapet ($p = 1,84$). Eraldunud gaasi on lihtne kuivatada läbi kontsentreeritud väävelhappe barboteerimise teel. Kuna metanool imendab soolhappe väga kiiresti, on selle lahustamisel soovitatav võtta tavapärased ettevaatusabinõud, näiteks suunata gaas läbi väikese tagurpidi lehtri, mille serv puudutab vedeliku pinda. Suuremaid koguseid metanooli ja soolhappe lahuseid on võimalik varem ette valmistada, kuna need säilivad hästi pimedas, klaaskorgiga suletavates pudelites.

Märkus 2. Keemispunkti kontrollimiseks pannakse katseklaasi klaaspulk ning temperatuuri ei lasta tõusta üle 90 °C.

XI LISA

OLIIVIÕLI HALOGEENITUD LENDUVATE LAHUSTITE MÄÄRAMINE

1. MEETOD

Gaasikromatograafiline aurufaasi analüüs.

2. VAHENDID

- 2.1. Gaasikromatograafia seade, milles on elektronihaarde detektor (EHD).
- 2.2. Aurufaasi analüüsimise seade.
- 2.3. Klaasist gaasikromatograafia kolonn, pikkus 2 m ja läbimõõt 2 mm, statsionaarne faas. OV101 10 % või sama-väärne, kaltsineeritud, happega pestud ja silaanitud kobediatomiiti immutatud, osakeste suurus 80–100 mesh'i.
- 2.4. Kande- ja abigaas: lämmastik gaasikromatograafia jaoks, sobiv elektronihaardedetektorile.
- 2.5. 10- kuni 15-milliliitrised klaaspudelid, teflonpinna ja alumiiniumpunniga, milles on koht nõela sisseviimise jaoks.
- 2.6. Klambriid hermeetiliseks sulgemiseks.
- 2.7. Gaasisüstal, 0,5- kuni 2-milliliitrine.

3. REAKTIIVID

Standard: halogeenitud lahustid, mille puhtusaste on gaasikromatograafia jaoks sobiv.

4. TÖÖ KÄIK

- 4.1. Klaaskolbi (ühekordselt kasutatav) kaalutakse umbes 3 g õli; suletakse hermeetiliselt. Pannakse termostaati temperatuurile 70 °C üheks tunniks. Süstlaga eemaldatakse ettevaatlikult 0,2–0,5 ml aurufaasi. See injekteeritakse järgmiselt reguleeritud gaasikromatograafiaseadme kolonni:
 - injektori temperatuur: 150 °C,
 - kolonni temperatuur: 70–80 °C,
 - detektori temperatuur: 200–250 °C.Kasutada võib ka teisi temperatuure tingimusel, et tulemused jäävad samaks.
- 4.2. Võrdluslahused: valmistatakse ette standardlahused, kasutades rafineeritud oliiviõli, milles ei ole 0,05–1 ppm (mg/kg) kontsentratsiooniga lahusteid, ja mis vastab proovi eeldatavale sisaldusele. Halogeenitud lahustid võib pentaaniga lahjendada.
- 4.3. Kvantitatiivne hindamine: võrreldakse proovi ja eeldatavalt kõige sarnasema kontsentratsiooniga standardlahuse piikide pindalasisid või kõrgusi. Kui kõrvalekalle on suurem kui 10 %, tuleb analüüsi korrata mõne teise standardlahusega võrreldes, kuni kõrvalekalle jääb 10 % piiresse. Sisaldus määratakse kindlaks üksikute injekteerimiste keskmise põhjal.
- 4.4. Tulemuste esitamine: ppm (mg/kg). Meetodi avastamispiir on 0,01 mg/kg.

XII LISA

NEITSIOLIIVIÕLI ORGANOLEPTILINE HINDAMINE

1. KOHALDAMISALA

Käesoleva meetodi eesmärk on määratleda neitsioliiviõli lõhna- ja maitseomaduste hindamise kriteeriumid ning töötada välja vastav metoodika.

2. KOHALDAMISALA

Kirjeldatud meetodit kohaldatakse otsetarbimiseks ettenähtud neitsioliiviõli organoleptiliseks hindamiseks ja liigitamiseks. Nimetatud meetodiga antakse arvskaalal neitsioliiviõlile hinnang, mille aluseks on valitud degustatoritest koosneva hindamiskomisjoni poolt tehtud otsus vastava õli lõhna- ja maitseomaduste kohta.

3. ORGANOLEPTILISEKS HINDAMISEKS VAJALIK ÜLDINE PÕHISÕNAVARA

Vaadata peatükki "Organoleptiline hindamine: üldine põhisõnavara".

4. OLIIVIÕLI KÄSITLEV ERIALANE SÕNAVARA

Mandlimaitse: võib esineda kahte mandlimaitset: värsketele mandlitele omane maitse või kuivatatud, tervele mandlitele omane maitse, mida võib segi ajada kergelt räästunud maitsega. Iseloomulikku maitset kogetakse järelmaitsena, kui õli on kokkupuutes keele ja suulaega. Maitset seostatakse magusa ja maheda lõhnaga õlidega.

Õunamaitse: õunamaitset meenutava oliiviõli maitse.

"Atrojado" (kopitanud maitse): iseloomulik maitse õli puhul, mis on saadud kuhja ladustatud oliividest ja mis on läbinud kõrgema kääritamisastme.

Mõru: iseloomulik maitse õlide puhul, mis on valmistatud rohelistest oliividest või oliividest, mis muudavad värvi. Maitse võib sõltuvalt tugevusest olla meeldivam või ebameeldivam.

Soolvee maitse: soolalahustes säilitatud oliividest ekstraheeritud õli maitse.

Kurgimaitse: maitse, mis tekib siis, kui õli on liiga kaua olnud hermeetiliselt pakendatud, eelkõige plekkpurkides, see maitse tuleneb 2,6 nonadienaali tekkimisest.

Muldne: iseloomulik maitse õli puhul, mis on saadud mullase või mudasena korjatud ja pesemata oliividest. Sellele maitsele võib vahel lisanduda kopitanud ja niiske maitse.

Esparto: iseloomulik maitse õli puhul, mis on saadud uutes espartomattides pressitud oliividest. Maitse võib erineda sõltuvalt sellest, kas matid on valmistatud haljast või kuivatatud espartost.

Lame või pehme: iseloomulik maitse õli puhul, mille organoleptilised omadused on aromaatsete komponentide kadumise tõttu väga nõrgad.

Puuviljamaitse: maitse, mis meenutab tervete, optimaalsel küpsusetapil värskest koristatud viljade lõhna ja maitset.

Rohumaitse: teatavatele õlidele iseloomulik maitse, mis meenutab värskest niidetud rohu lõhna.

Rasvane: sellistest viljadest ekstraheeritud oliiviõli lõhn, mille puhul masinatelt ei ole nafta, määrded või mineraalõli jäägid korralikult eemaldatud.

Roheliste lehtede (mõru) maitse: õli maitse, mille põhjustavad liiga palju rohelisi oliive või oliivid, mis on purustatud koos lehtede ja raagudega.

Tõugumaitse: iseloomulik maitse õli puhul, mis on saadud oliivikärbse (*Dacus oleae*) tõukude poolt kõvasti kahjustatud oliividest.

Kare: maitsemisel teatavatele õlidele omane kootavuse tunne suus.

Heinamaitse: teatavatele õlile omane maitse, mis meenutab rohkem või vähem kuivatatud heina.

Kuumutatud või põletatud maitse: õlile iseloomulik maitse, mille põhjuseks ülemäärane ja/või pikaajaline kuumutamine töötlemise ajal, eriti kui pastat segatakse ja kuumutatakse ühel ajal ning kui tingimused ei ole sobivad.

Metalne maitse: maitse, mis meenutab metalli. Iseloomulik õlile, mis on olnud purustamise, segamise, pressimise või ladustamise ajal ebasobivates tingimustes ülemäära kokkupuutes toiduainete või metallpindadega.

Sogane sete: iseloomulik maitse õli puhul, mis on saadud vaatide ja veealuste paakide sette dekanteerimisel.

Kopitanud ja niiske maitse: iseloomulik maitse õlile puhul, mis on saadud viljadest, millel on hunnikutes, niisketes tingimustes mitu päeva kestnud ladustamise tulemusena palju seeni ja pärmseeni.

Vana: iseloomulik maitse õli puhul, mida on liiga kaua mahutites hoitud. Võib samuti esineda õlidel, mis on pakendatud liiga pikaks ajaks.

Pressimisjäägi maitse: iseloomulik maitse, mis meenutab oliiviõli pressimisjääkide maitset.

Pressimismati maitse: iseloomulik maitse õli puhul, mis on saadud oliivide pressimisel läbi mustade pressimismattide, kuhu on jäänud käärinud jääke.

Räästunud maitse: iseloomulik maitse kõikide õlide ja rasvade puhul, mis on liiga pika kokkupuute tagajärjel õhuga läbinud auto-oksüdatsiooni protsessi. Selline maitse on ebameeldiv ning seda ei ole võimalik parandada.

Küpsete puuviljade maitse: iseloomulik maitse küpsetest viljadest saadud oliiviõli puhul, üldiselt pisut nõrk lõhn ja magus maitse.

Tahumatu maitse: iseloomulik maitse teatavate õlide puhul, mille degusteerimisel jääb suhu paks, pastat meenutav tunne.

Seebimaitse: maitse, mis tekitab rohelist seepi meenutava maitsmis- ja/või haistmistaju.

Magus maitse: meeldiv maitse, mitte just suhkrune, kuid milles ei ole valdav kibe, tugev või lämmatav maitse.

Roiskunud maitse: iseloomulik maitse õli puhul, mis on halvasti dekanteeritud ja olnud kaua kokkupuutes setitamiseveega.

Veini ja äädika maitse: teatavatele õlile iseloomulik maitse, mis meenutab veini või äädika maitset. Tingitud eelkõige äädikhappe, etüülatsetaadi ja etanooli tekkimisest suuremas koguses, kui oliiviõli aroomi puhul tavaline.

5. ÕLI DEGUSTEERIMISE KLAAS

Vaadata peatükki "Õli degusteerimise klaas".

6. KATSE TEGEMISE RUUM

Vaadata peatükki "Katseruumi sisustamise juhised".

7. SEADMED

Selleks et degusteerija saaks oma ülesandeid nõuetekohaselt täita, peaksid igas boksis olema kergesti kättesaadavad järgmised seadmed:

- proove sisaldavad (standarditud) klaasid, millel on kahest juhuslikult valitud arvust või kahest arvust ja tähest koosnev tunnus. Märked peavad olema tehtud kustumatu ja lõhnatu pliiaatsiga,
- ühesuguste märgetega kellaklaasid klaaside katmiseks,
- hindamisleht (vt joonis 2) koos kasutamishendiga,
- pliiaats või sulepea,
- väikesed kandikud viilutatud õuntega,
- klaas ümbritseva õhu temperatuuril vett.

8. MEETODID

Käesolevas osas sätestatakse degustaatoritelt neitsioliiviõli organoleptiliseks hindamiseks nõutavad teadmised, mis võimaldavad nende tegevust ja töökorda ühtlustada, ning nähakse ette, et degustaatorid peavad tundma oliiviõli degusteerimise üldisi ja spetsiifilisi soovitusi.

8.1. Hindamiskomisjoni töö korraldaja või hindamiskomisjoni juhataja ülesanded

Hindamiskomisjoni töö korraldaja peab olema vastava koolituse ja teadmistega isik, kes tunneb väga hästi õlisisid, millega ta töö käigus kokku puutuma hakkab. Ta on hindamiskomisjoni töös võtmeisikuks ning vastutab komisjoni töö korraldamise ja juhtimise eest. Ta kutsub degustaatorid kokku piisavalt vara ja lahendab küsimused, mis on seotud katsete tegemisega, kuid ei paku neile välja omapoolset arvamust proovide kohta.

Ta vastutab seadmete inventuuri ning nende korraliku puhastamise eest, proovide ettevalmistamise ja kodeerimise ning nende esitamise eest degustaatoritele kooskõlas katseplaanidega, samuti saadud andmete kogumise ja statistilise töötlemise eest nii, et väikseimate pingutustega saavutataks parimad tulemused.

Hindamiskomisjoni juhataja töö nõuab organoleptilisi oskusi, täpsust katsete tegemisel ja nende korraldamisel, samuti oskusi ja kannatlikkust katsete kavandamisel ja tegemisel. Hindamiskomisjoni juhataja peab looma komisjoni liikmete jaoks õhkkonna, mis tõstab huvi degusteerimise vastu ning innustab neid oma tööd võimalikult hästi tegema. Ta peab tagama, et tema enda arvamus ei oleks teada ning vältima võimalike liidrite puhul seda, et nad oma arvamust teistele peale ei suruks. Selleks et degustaatorid oleksid jätkuvalt piisavalt heal tasemel, vastutab hindamiskomisjoni juhendaja nende koolitamise, valimise ja kontrollimise eest.

8.2. Katsetingimused

8.2.1. Proovi suurus

Igas klaasis on 15 ml õli.

8.2.2. Degusteerimistemperatuur

Uuritavad õliproovid peavad klaasides olema temperatuuril 28 ± 2 °C. Selline temperatuur on valitud seetõttu, et see on normaaltingimustes, kus õli kasutatakse toidu valmistamisel maitseainena, organoleptiliste erinevuste analüüsimiseks parim. Teiseks põhjuseks on see, et madalamal temperatuuril õli aromaatsed komponendid haihtuvad ning kõrgemal temperatuuril tekivad uued, kuumutatud õlile omased lenduvad komponendid.

8.2.3. Degusteerimise aeg

Hommik on õli degusteerimiseks parim aeg. On teada, et maitse- ja lõhnaomaduste tajumiseks on olemas optimaalselt sobivad ajad.

Maitse- ja/või haistmistaju on suurem enne söögiaegu ning väiksem pärast söögiaegu.

Seda kriteeriumi ei tuleks siiski üleliia arvestada, kuna näljatunne võib degustaatorite keskendumist häirida ning vähendada seega nende võimet eristada eri õlisisid ja eelkõige mõjutada seda, milliste kriteeriumite alusel nad eelistusi teevad ja oma heakskiidu annavad.

9. DEGUSTAATORID

Söödavate oliiviõlide organoleptilistel hindamistel osalevad degustaatorid peavad olema koolitatud ja valitud vastavalt nende oskusele leida sarnaste proovide vahel erinevusi; tuleks pidada meeles, et koolitamise käigus nende töö täpsus suureneb (vaadata vastavat osa).

Katse tegemiseks on vaja 8–12 degustaatorit, kuid võimalike puudumiste puhuks oleks hea, kui on olemas paar varudegustaatorit.

9.1. Üldised soovitused kandidaatidele ja degustaatoritele

Kandidaadid ja degustaatorid peavad neid soovitusi töö ajal järgima.

Kui degustaatorite hindamiskomisjoni juhataja kutsub degustaatori organoleptilisele katsele, peab degustaatoril olema võimalik ettenähtud ajal kohale tulla ning ta peab silmas pidama järgmist:

- 9.1.1. Ta ei tohi vähemalt 30 minutit enne katse toimumise aega suitsetada.
- 9.1.2. Ta ei tohi kasutada lõhnaõli, kosmeetikatoodet või seepi, mille lõhn võib püsida katse tegemise ajani. Ta tohib käte pesemisel kasutada lõhnastamata või kergelt lõhnastatud seepi ning ta peab käsi nii kaua loputama ja kuivatama, kuni lõhn kaob.
- 9.1.3. Ta ei tohi vähemalt 1 tund enne katse tegemist süüa.
- 9.1.4. Juhul kui degustaator ei tunne ennast füüsiliselt hästi, eelkõige kui see mõjutab ta lõhna või maitseaintingut, või kui mingi emotsionaalne põhjus ei lase tal tööle keskenduda, teatab degustaator sellest hindamiskomisjoni juhatajale, et juhataja saaks arvata ta hindamiskomisjonist välja või kohaldada mõnda muud meetet, sest kõnealuse degustaatori hinnang võib ülejäänud hindamiskomisjoni keskmisest hinnangust kõrvale kalduda.
- 9.1.5. Kui degustaator vastab eelpool kirjeldatud nõuetele, võtab ta võimalikult rahulikult ja vaikselt sisse endale määratud koha boksis.
- 9.1.6. Pärast istumist kontrollib degustaator, kas tal on olemas õiged vahendid ja kas need on õigesti seatud, tagades, et klaasi tunnus vastab kellaklaasi omale.
- 9.1.7. Seejärel loeb degustaator hoolikalt läbi hindamislehel olevad instruksioonid ega alusta proovi analüüsimist enne, kui on täiesti kindel, mida ta tegema peab. Kahtluste korral räägib ta hindamiskomisjoni juhatajale esinenud probleemidest.
- 9.1.8. Degustaator tõstab klaasi üles, hoiab selle peal kellaklaasi ning kallutab seda pisut; ta keerutab klaasi sellises asendis põhjalikult, et katta võimalikul suur osa klaasist õliga. Kui see etapp on lõpetatud, võtab ta klaasi pealt kellaklaasi ning nuusutab proovi ühtlaste sügavate hingetõmmetega seni, kuni ta on hinnatava õli näitaja osas oma arvamuse kujundanud. Proovi ei nuusutata rohkem kui 30 sekundit. Kui degustaator ei jõua näitaja kohta selle aja jooksul arvamust kujundada, puhkab ta enne uut proovimist. Kui haistmiskatse on läbi viidud, hindab degustaator lõhna- ja maitset (üldine maitse-, haistmis- ja kompimistaju). Selleks võtab ta väikse suutäie (umbes 3 ml) õli. On väga oluline, et õli kataks ühtlaselt kogu suudõne, suu eesosas, keelest ja külgosast kuni tagaosa ja suulaeni, kuna on teada, et nelja peamist maitset (magusat, soolast, haput ja mõru) tajutakse sõltuvalt keele ja suulae osast erineva tugevusega.
- Oluline on see, et piisav õlikogus kataks väga aeglaselt keele kurgupoole tagaosa samal ajal, kui degustaator keskendub sellele, millises järjekorras mõru ja terav maitse ilmnevad; vastasel juhul võivad need aistingud mõne õli puhul jääda märkamatuks või näiteks jääb kibe aisting terava maitse varju.
- Õhu läbi suu sissetõmbamine lühikeste järjestikuste hingetõmmetega võimaldab degustaatoril prooviga katta kogu suu pinna ning kogeda lenduvaid aroomaatseid komponente ka nina tagaosas.
- Arvesse võetakse ka kompimisaistinguid. Seejärel märgitakse esinemise korral üles voolavus, kleepuvus, teravus ja torkavus, ja kui see on katse puhul vajalik, määratletakse nende tugevus.
- 9.1.9. Neitsioliiviõli organoleptilisel hindamisel hinnatakse iga sessiooni ajal ühte proovi, kuna proovide vahetel järjestikusel hindamisel võib tekkida kontrast.
- Kuna järjestikune hindamine võib tekitada väsimust või vähendada tundlikkust, on oluline kasutada toodet, mis kõrvaldab eelmisest degusteerimisest suus oleva õli jäägid.

Selleks soovitatakse kasutada väikest õunaviilu (umbes 15 g), mille võib pärast närimist süljekaussi sülitada. Seejärel loputatakse suud vähese ümbritseva õhu temperatuuril oleva veega. Kahe degusteerimise vahe peab olema vähemalt 15 minutit.

9.2. Kandidaatide sõelumine

Selle etapi viib läbi hindamiskomisjoni töö korraldaja, kes küsitseb isiklikult kandidaate, et õppida tundma nende iseloomu ja olukorda. Kandidaatidele esitatavad füüsilised ja psühholoogilised tingimused ei ole väga ranged, kuna teoreetiliselt peaks kõikidel inimestel üldjuhul olema võimalik katsetest osa võtta. Sellised tegurid nagu sugu, vanus, individuaalsed harjumused (suitsetamine) jne, on tänapäeval asendunud selliste teguritega nagu tervis, isiklik huvi degusteerimise vastu ning aeg degusteerimistel osalemiseks.

Hindamiskomisjoni töö korraldaja selgitab vestluse ajal tulevasele degustaatorile töö iseloomu ja seda, kui ajamahukas see töö on. Seejärel küsitseb ta kandidaati ja hindab kandidaadi huvi degusteerimise vastu ja tema motivatsiooni ning uurib, millised on kandidaadi reaalsed ajalised võimalused degusteerimisel osalemiseks. Kasutada võib järgmist küsimustikku.

KÜSIMUSTIK

Palun vastake järgmistele küsimustele:

- | | | |
|---|--------------------------|--------------------------|
| | jah | ei |
| 1. Kas te sooviksite sellelaadse tööga tegeleda? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Kas teie arvates võik selline töö tõsta toiduainete kvaliteeti nii siseriiklikul kui rahvusvahelisel tasandil? | jah | ei |
| 3. Kui jah, siis miks? ⁽¹⁾ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | | |
| | | |
| 4. Degustaator peab olema valmis kutsumise korral õlisid degusteerima. Kas te oleksite selleks valmis? | jah | ei |
| | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. Kas te sooviksite oma maitsmis- ja haistmistaju kolleegide omaga võrrelda? | jah | ei |
| | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. Kas teil on degusteerimiseks aega? Kas teil on endal võimalik oma igapäevast tööd planeerida? | jah | ei |
| | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 7. Kui te töötate kellegi alluvuses, siis kas teie arvates oleks teil võimalik mitmel päeval järjest ja mitu korda kuni poole tunni jooksul oma tavapäraselt töölt puududa? | jah | ei |
| | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 8. Kas teil oleks võimalik oma tavapärasel tööl organoleptiliste analüüside tõttu kaotatud aega tagasi teha? | jah | ei |
| | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 9. Kas teie arvates peaksite te selle töö eest tasu saama? | jah | ei |
| | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 10. Millisel viisil? | jah | ei |
| | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Hindamiskomisjoni töö korraldaja kasutab seda teavet kandidaatide valimiseks ning jätab välja need, kes näitavad selle töö vastu üles vähest huvi, ei ole piisavalt kättesaadavad või kes ei suuda ennast selgelt väljendada.

9.3. "Tüüpilistele omadustele" rühma "keskmise künnise" määramine

Hoolikalt valitakse neli õli, millest igaüks esindab ühte järgmistest omadustest: "atrojado" (kopitanud), veinimaitse, räästunud ja kibe, kusjuures õli intensiivsus peab olema võimalikult tugev ja konkreetne.

Võetakse iga õli alikvoot ning valmistatakse ette proovid, millest iga proovi lahjendatakse järjestikku sobiva tugiainega selliselt, et igaühe kontsentratsioon on 2 korda väiksem ja kuni ainult toetavat ainet sisaldava klaasi ja kahe või kolme viimase lahjenduse vahel ei ole enam erinevust. Viimaseks paariks on kaks klaasi tugiainet.

Sarja/rida täiendatakse klaasidega, milles on kõrgemad kontsentratsioonid, kuni klaase on kokku kaheksa.

Selleks et igale kandidaadile saaks anda iga omadust esindava täieliku sarja, valmistatakse ette piisav kogus erineva kontsentratsiooniga proove.

Selleks et määrata iga omaduse kohta kandidaatide "keskmine künnis", antakse igale kandidaadile klaas, milles on 15 ml ükskõik millist ettevalmistatud kontsentraati, ning teine klaas, milles on ainult 15 ml tugiainet. Pärast katsetegemist peab kandidaat määrama, kas klaaside sisu on sama või erinev.

Sama katset korratakse uuritava omaduse suhtes ülejäänud kontsentraatidega.

Märgitakse üles kõikide degustaatorite poolt iga kontsentraadi kohta antud õigete vastuste arv ning tulemused esitatakse tehtud katsete protsendina.

⁽¹⁾ Kirjeldada, mida annab ükskõik millise toiduaine või soovi korral oliiviõli organoleptiline hindamine.

Seejärel märgitakse abstsissiteljele kasvavas järjekorras katsetatud kontsentratsioonid ja ordinaatteljele iga kontsentratsiooni kohta saadud õigete määramise protsent.

Joonisel 1 on esitatud nende suuniste näidis. Tuvastamisläveks on see abstsissitelje punkt, mis vastab ordinaattelje sellele punktile, mis tähistab õigete vastuste 75protsendilist taset.

Nimetatud künniskontsentratsioon, mis võib esineda omaduse tugevusest tulenevalt eri õlide puhul erineda, peab olema eri hindamiskomisjonide eri kandidaatide rühmade puhul sarnane; see künnis ei ole seotud harjumuse või tendentsliku eelistusega. Seetõttu on see võrdluspunktiks, mis on ühine igale tavalisele inimeseterühmale, ja seda võib kasutada maitsmis- ja/või haistmistaju põhjal hindamiskomisjonide ühtlustamiseks.

Rühma künniskontsentratsiooni põhjal toimitakse järgmiselt:

Valmistatakse ette suureneva ja väheneva kontsentratsiooniga seeria selliselt, et künniskontsentratsioon oleks sellel skaalal kümnendal kohal. 11. ja 12. kontsentratsiooni on rohkem lahjendatud ning selle tulemusel on uuritava omadusega õli esinemist raskem tuvastada.

Võttes aluseks kontsentratsiooni C_{10} , saadakse ülejäänud proovid järgmise valemi alusel:

$C_{10} \times a^n$, kus a on konstant, lahjendusfaktor, väärtusega 1,5 ja n on eksponent vahemikus 9 ja -2 .

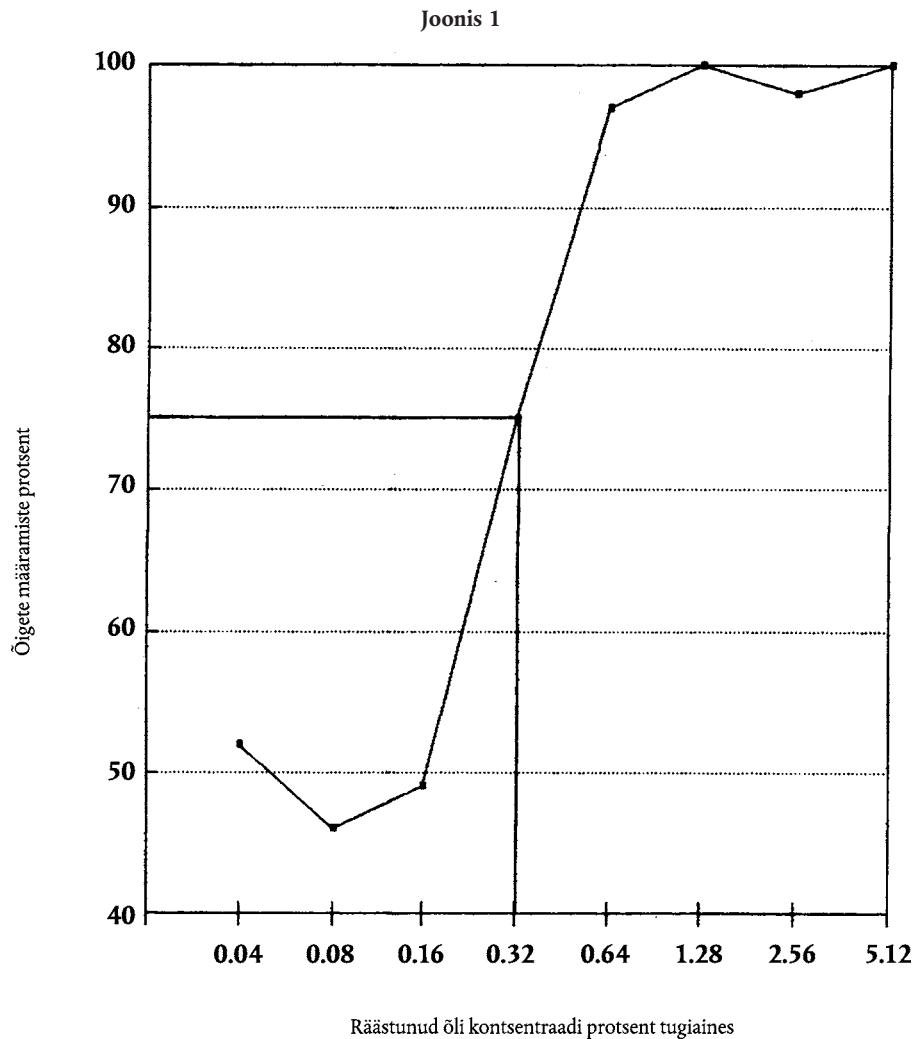
Näide: Võttes aluseks, et räästunud õli künnis on 0,32, on $C_{10} = 0,32$, ja kuna $a = 1,5$, on proovide seerial järgmised kontsentratsioonid:

Näide	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kontsentratsioon	12,30	8,20	5,47	3,65	2,43	1,62	1,08	0,72	0,48	0,32	0,21	0,14

Kui nimetatud protsessi korratakse kolme ülejäänud omaduse puhul nende vastavate künniste alusel, mis arvutatakse samuti, nagu eespool näidatud, saadakse kõikide laborite puhul iga stiimuli kohta sarnane aromaatsuse intensiivsuse skaala isegi siis, kui algsete õlide defekte tuvastatakse erineva intensiivsusega.

9.4. Degustaatorite valimine tugevuse hindamise meetodiga

Selleks et valida hindamiskomisjoni kõige tundlikumad ja kõige paremate eristamisomadustega degustaatorid, peaks valimisprotsessi olema kaasatud kaks või kolm korda rohkem kandidaate kui vaja. Soovitatav on kasutada sama toodet kui see, mida degustaatorid analüüsima hakkavad (seetõttu kasutatakse alati oliiviõli).



Meetodi valimisel tuleks meeles pidada, et lisaks tõhususele peab kasutatav meetod olema õli koguse, saadetavate proovide arvu ja valimisele kulutatava aja osas võimalikult ökonoomne. Valikumeetodi tõhusus sõltub sellest, millised optimaalsed tasemed valitakse järgmise kolme üksteisest sõltuva muutuja jaoks: a) "kulu", mis sõltub katsete arvust; b) valikust põhjendamatult väljajäetud sobilike kandidaatide osakaal; ja c) valikusse põhjendamatult kaasatud kandidaatide osakaal.

Tugevuse hindamise katset on kirjeldatud USA Materjalide Katsetamise Ühingu (ASTM) Tehnilises Eriväljaandes (STP, *Special Technical Publication*) nr 440, lk 53 ja nelja selle punkti on muudetud järgmiselt:

1. on vähendatud seerias olevate proovide arvu;
2. on laiendatud omaduste skaalat eesmärgiga suurendada valiku aluseks olevaid maitsmis- ja/või haistmistaspekte selliselt, et need vastaksid oliiviõli puhul kõige sagedamini esinevatele defektidele;
3. on vahetatud seeria kontsentratsioonisuhteid; ja
4. tulemusi on statistiliselt töödeldud.

Vajalikud seadmed

- 1 500 milliliitrised pudelid või klaaskolvid,
- tumedad degusteermisklaasid,
- gradueeritud 10-, 15-, 1 000- ja 1 500milliliitrised katseklaasid.

Vajalikud tooted

- Merck'i parafiin (viide 7 160, DAB 8, USP XX) või maitse ja lõhnata õlilaadne tugiaine (värskelt rafineeritud oliiviõli või muu sarnane õli),
- õlid: "atrojado" (kopitanud), veinimaitse, räästunud ja kibe.

9.4.1. Menetlus

Pärast lahjenduste ettevalmistamist alustatakse 25 kandidaadiga valimist ning iga maitseomaduse puhul toimitakse allpool kirjeldatud meetodil:

1. Valmistatakse ette 12 koodiga tähistatud degusteerimisklaasi (igale kandidaadile üks seeria). Igasse degusteerimisklaasi valatakse 15 ml iga erineva kontsentratsiooniga proovi, mis on valmistatud vastavalt valemile $C_{10} \times a^n$.
2. Kui degusteerimisklaasid on täidetud, tuleks need jätta enne katse tegemist kellaklaasiga kaetult vähemalt üheks tunniks degusteerimisruumi temperatuuril 20–22 °C seisma selleks, et proovide temperatuur ühtlustuks ümbritseva õhu temperatuuriga.
3. Katse korraldaja paneb seejärel iga seeria kõik 12 degusteerimisklaasi ritta alustades tugevama kontsentraadist.

Järgmisena peavad kandidaadid üksinda katse läbi tegema ja järgima järgmiseid eeskirju:

9.4.2. Juhendid kandidaatidele

Kandidaatide ees reas olevad 12 degusteerimisklaasi sisaldavad lahjendusi kõikidest omadustest: "atrojado" (kopitanud), veinimaitseiline, räästunud ja kibe. Degusteerimisklaasi sisu erineb lõhna teatud tugevuse poolest. Kõige tugevama lõhnaga klaas on vasakpoolseim ning ülejäänud klaasid asuvad kahanevalt paremal. Viimases parempoolses degusteerimisklaasis võib lõhn olla nii nõrk, et seda on raske tunda.

Toimitakse järgmiselt: tutvutakse kõikide seerias olevate degusteerimisklaaside lõhnaga. Selleks alustatakse kõige parempoolsemast (nr 12) ja püütakse tunda iga lõhna tugevust, ilma et end liigselt väsitataks.

Kui tundub, et lõhnade kontsentratsioonide skaala on selge, lahkutakse ruumist.

Samal ajal võtab katse korraldaja ühe seerias oleva degusteerimisklaasi, paneb selle ühele jonele seeria viimase parempoolse klaasiga ja liigutab kõiki ülejäänud klaase sammu võrra nii, et puuduva klaasi koht oleks täidetud. Degustaator naaseb ruumi ning jätkab katset.

Katse on järgmine:

Seeriat väljavõetud degusteerimisklaas tuleb panna tagasi õigesse kohta. Selleks tuleb proovi nuusutada ja võrrelda seda vajadust mööda teiste klaasidega, pidades meeles, et klaasi õigeks paigutamiseks peab selle lõhn olema tugevam kui paremal olevas klaasis ja nõrgem kui vasakul olevas klaasis. Seda katset korratakse veel kolme klaasiga.

Lisaks eespool kirjeldatud juhiste antakse igale kandidaadile katse tegemise vorm, mis aitab katset teha ja vastuseid koguda.

KANDIDAATIDE VALIMINE

Katse nr Omadus

Väljavõetud klaasi järjekorranumber

Kuupäev Nimi

9.4.3. Tulemuste koondamine

Hindamiskomisjoni töö korraldaja registreerib katse lihtsustamiseks igalt kandidaadilt saadud andmed järgmiselt:

Kandidaadi nimi	Analüüsiv	Märgitud järjekorranumber (K')	Õige järjekorranumber (K)	Hinne $(K' - K)^2$
.....
.....

9.4.4. Statistiline hindamismeetod

Selle meetodi puhul peavad kõik kandidaadid asetama seerias õigele kohale sama klaasi. Vastavalt tehtavatele statistilistele arvutustele vastavad degusteerimisklaasid iga omaduse seerias järgmistele kohtadele:

“Atrojado” — kopitanud (Fy)	Veinimaitseline (W)	Räästunud (Rd)	Kibe/mõru (Bt)
Klaasi nr (10, 5, 7, 2)	Klaasi nr (11, 3, 8, 6)	Klaasi nr (7, 4, 10, 2)	Klaasi nr (6, 3, 11, 9)

Numbreid, mis tähistavaid klaasi kohta seerias, ei tohi muuta, sest statistilistes arvutustes võetakse selle katse puhul arvesse tõenäosust, et klaasid pannakse nende õigesse kohta tagasi juhuslikult.

Selleks et teabe edastamine kandidaatide vahel oleks võimalikult raske, peab hindamiskomisjoni töö korraldaja tagama, et:

1. kandidaatide vahel ei oleks mingeid kontakte. Iga kandidaadi klaaside tunnused on erinevad;
2. kandidaadid ei saa mingil viisil teada seeriast väljavõetud klaasi õiget asukohta;
3. olgugi et kandidaatidele antakse ühesugused klaasid, antakse need kandidaatidele erinevas järjekorras.

Iga kandidaadi tööd hinnatakse järgmiselt:

$e^i_1, e^i_2, \dots, e^i_{12}$ on need 12 klaasi, milles on kahaneva tugevusega 12 omaduse i kontsentratsiooni (i võib olla ükskõik milline neljast omadusest: “atrojado” — kopitanud, veinimaitseline, räästunud ja mõru).

E^i_k on äravõetud klaas ja K' koht, mille kandidaat klaasile seeriasse tagasi paigutamisel annab. Seega on K ja K' täisarvud vahemikus 1–12, vastates valitud klaasi tegelikule kohanumbrile ja kandidaadi poolt antud numbrile.

T (maksimaalne lubatud hälve) on varem kindlaksmääratud väärtus, mis antud juhul on 3, ja kui $K'-K > T$, lükatakse kandidaat automaatselt tagasi. ⁽¹⁾

Kui $K'-K = T$, kiidetakse kandidaat teoreetiliselt heaks ning ta võib katset jätkata, kuna ta suudab stiimuli panna tagasi selle õigesse kohta või vähemalt sellele väga lähedale.

Stiimulit (kontsentratsiooni) — näiteks “atrojado” — kopitanud seerias (Fy) hinnanud kandidaadile antud hinne on antud juhul võrdne klaasi õige numbri ja kandidaadi poolt määratud koha vahega. Järelikult

$$P_h^{(Fy)} = (K' - K)^2.$$

Kuna seda toimingut kordavad kandidaadid iga omaduse kõigi nelja stiimuli (kontsentratsiooni) osas, oleks omaduse (näiteks Fy) vahehinne järgmine:

$$Z^{Fy} = P_h^{Fy} + P_j^{Fy} + P_i^{Fy} + P_m^{Fy}$$

Alljärgnevalt on toodud mõned näited selle protseduuri mõistmise hõlbustamiseks.

Näidis 1:

Kandidaadi A vastused nelja omaduse i seeriast väljavõetud stiimuli kohta on järgmised:

Klaasi täpne asukoht seerias (K)	Koht, kuhu kandidaat klaasi tagasi pani (K')	Hälve õige kohaga võrreldes (K'-K)
7	7	7-7 = 0
4	5	4-5 = -1
10	6	10-6 = 4 ⁽¹⁾
2	4	2-4 = -2

⁽¹⁾ Kandidaat lükatakse tagasi, sest ta sai katsel tulemuse $T > 3$.

⁽¹⁾ Hindamiskomisjoni töö korraldaja peaks suunama kandidaate mõistliku kiirusega töötama, see tähendab seda, et degustaator ei tohi maitsmis- ja haistmisvõime tõttu tundlikkust kaotada.

Näidis 2:

Kandidaat tõstab mingi omadusega klaasid ümber järgmiselt:

Klaasi täpne asukoht seerias (K)	Koht, kuhu kandidaat klaasi tagasi pani (K')	Hälve õige kohaga võrreldes (K' - K)
7	7	7-7 = 0
4	4	4-4 = 0
10	7	10-7 = 3
2	3	2-3 = -1

Kandidaati ei lükata tagasi. Ta on saanud järgmise hinde:

$$Z^i = 0^2 + 0^2 + 3^2 + (-1)^2 = 10$$

Kandidaadi lõplik hinne, mis kinnitab lõplikult, kas ta valitakse degustaatoriks või mitte ja mis sõltub tema vastustest nelja uuritava omaduse puhul, on järgmine:

$$P_h^{Fy} + P_j^{Fy} + P_l^{Fy} + P_m^{Fy} = Z^{Fy}$$

$$P_h^W + P_j^W + P_l^W + P_m^W = Z^W$$

$$P_h^{Rd} + P_j^{Rd} + P_l^{Rd} + P_m^{Rd} = Z^{Rd}$$

$$P_h^{Bt} + P_j^{Bt} + P_l^{Bt} + P_m^{Bt} = Z^{Bt}$$

$$Z \text{ final} = Z^{Fy} \dots Z^{Bt}$$

kus: Fy = "Atrojado" — kopitanud

W = veinimaitseteline

Rd = Räästunud

Bt = Mõru

Seejärel on vaja otsustada, milline peab olema kandidaadi Z väärtus, et lugeda tema tajutundlikkus, maitsmis- ja haistmisaistingute säilitamisvõime ja võime organiseeritult tegutseda nelja uuritava stiimuli osas piisavaks. Z on alati mitte-negatiivse väärtusega ja $Z = 0$ tähendab seda, et kandidaat on ära tundnud ja õigesti määranud kõik 16 tugevust (neli iga omaduse kohta). Kui Z väärtus ei ole 0, osutab see sellele, et kandidaat on valinud tugevusele õige skaala, kuid ei ole suutnud seda täpselt õigele kohale panna, kuna tema võime eristada ühe või mitme stiimuli erinevaid tugevusi ei ole piisav.

See tõttu on vaja määrata selline kriitiline väärtus (Z_c), et kui kandidaat peaks juhuslikult kõik klaasid panema õigesse kohta, on tõenäosus saada lõpphindeks Z, mis on väiksem kui Z_c , piisavalt väike (α), et seda on võimalik enne kindlaks teha. Seega tuleb tagada, et kirjeldatud meetodiga oleks tõenäosus valida hindamiskomisjoni degustaator, kellel puudub valikuprotsessi käigus kasutatavate stiimulite tugevuste jaoks piisav eristamisvõime, väiksem kui α .

Kui α väärtus on kindlaks määratud (antud juhul 0,05), saadakse Z_c muutuja Z jaotuse põhjal, mis omakorda sõltub P muutuja (K') jaotusel.

Pärast vajalike statistiliste arvutuste tegemist on Z_c väärtus 34.

Kui kõikide kandidaatide Z väärtus on arvatud, jäävad välja kõik kandidaadid, kelle puhul on väärtus suurem kui 34.

Järgnevalt on toodud näiteks kandidaatide A ja B väärtused:

Omadus	Kandidaat A	Kandidaat B
"Atrojado" — kopitanud (Fy)	$Z^{Fy} = 10$	$Z^{Fy} = 12$
Veinimaitseteline (W)	$Z^W = 10$	$Z^W = 11$
Räästunud (Rd)	$Z^{Rd} = 10$	$Z^{Rd} = 15$
Mõru (Bt)	$Z^{Bt} = 4$	$Z^{Bt} = 0$
	$\Sigma = 34$	$\Sigma = 38$

Võttes arvesse, et neil kahel kandidaadil on Z väärtus vastavalt 34 ja 38, kiidetakse kandidaat A heaks ja kandidaat B jääb välja. Kui välja on jäetud kõik kandidaadid, kelle Z väärtus on üle 34, liigitatakse ülejäänud kandidaadid nende Z väärtuste põhjal ning valitakse välja 12 parimat.

9.5. **Koolitus**

Koolitamise peamised eesmärgid on:

- a) tutvustada degustaatoritele neitsioliiviõlide erinevaid lõhna- ja maitseomadusi;
- b) tutvustada degustaatoritele organoleptilise hindamise erimetoodikat;
- c) suurendada degustaatorite oskust ära tunda, identifitseerida ja hinnata õli organoleptilisi omadusi; ja
- d) tõsta tundlikkust ja parandada mälu sellisel, et hindamiste tulemus on kõikide uuritavate omaduste osas võimalikult täpne ja ühtne.

Koolitus koosneb olenevalt hindamiskomisjoni ja uurimuse võimalustest tavaliselt mitmest sessioonist, mille käigus räägivad degustaatorid pärast õlide analüüsimist hindamiskomisjoni töö korraldajale esinenud raskustest ning selgitavad kriteeriumide ja arvamuste ühtlustamiseks hindeid, mis nad konkreetsetele õlidele andsid.

Hinnates pärast mitut sessiooni saavutatud koolituse taset, võetakse arvesse õigete vastuste protsendi kasv (kui kasutatakse eristuskatset) või hindamiskomisjoni liikmete hinnete keskmise variantide arv (katsete puhul, milles kasutatakse skaalat).

Koolituse praktilise kasu üle on pikalt arutatud, kuid praegu loetakse seda täpsete ja õigete organoleptiliste andmete saamiseks esmatähtsaks.

9.6. **Töö kontrollimine**

Staažikatest degustaatoritest koosnevad hindamiskomisjonid teevad degusteerimisi korrapäraselt ja pidevalt ning nende töö hõlmab organoleptilist hindamist, mis nõuab neilt suuri pingutusi. Nende hinnangust sõltuvad suures osas olulise tehnoloogilise ja majandusliku tähtsusega otsused. Seepärast tuleks täpse töö tagamiseks degustaatorite tööd pärast nende väljavalimist ja koolitamist kontrollida.

Nende tööd on pärast hindamiskomisjonide loomist ja tavapärase katsete tegemist vaja vajalike ajavahe-
mike järel korrapäraselt kontrollida.

10. NEITSIOLIIVIÕLI ORGANOLEPTILISE HINDAMISE KORD

Kui eespool standardites märgitud tingimused on täidetud, kui on olemas vajalikud ruumid ning kui degustaatorite hindamiskomisjon on välja valitud, nuusutab ja maitseb ⁽¹⁾ iga degustaator katseklaasis olevat õli-proovi. Ta analüüsib maitse-, lõhna- ja kinesteetilisi omadusi joonisel 2 näidatud tabeli abil, kuhu kirjutab vajalikud märkused ja nende omaduste tugevusastme. Seejärel hindab degustaator õli kvaliteeti.

10.1. **Joonisel 2 esitatud hindamislehe kasutamine** (lõhna- ja maitseomaduste kirjeldamine ja kvaliteedi hindamine)

Hindamislehe vasakul poolel on loetelu oliiviõlide levinumatest tüüpilistest organoleptiliselt tajutavatest omadustest, mis kirjeldavad õlide maitset ja lõhna. Kui degustaator puutub kokku omadustega, mis ei vasta loetletud kirjeldustele, märgitakse need kategooria "muud" alla tunnuse abil, mis neid võimalikult täpselt kirjeldab.

Tajutavaid omadusi hinnatakse nende tugevuse alusel, mis märgitakse ristiga sobivasse lahtrisse järgmiste kriteeriumide alusel:

- 1: vaevalt tajutav,
- 2: nõrk,
- 3: keskmine,
- 4: tugev,
- 5: eriti tugev.

Lehe paremal poolel on skaala 1–9 (9 erakordselt hea kvaliteedi, 1 halvima kvaliteedi jaoks), mida degustaatorid kasutavad uuritava õli omadustele ühe üldise hinnangu andmisel. See hinnang peab olema kooskõlas lehe vasakule poolele juba märgitud heade omaduste ja defektidega.

⁽¹⁾ Degustaator võib hindamisest keelduda, kui lõhn on väga tugevalt või tugevalt ebameeldiv, märkides selle hindamislehele kui erakordse ilmingu.

Hindamistabeli esimene veerg (defektid) jaotatakse viieks osaks. Õlide liigitus peab põhinema eelkõige defektsete maitsete/lõhnade täielikul puudumisel või esinemisel, samuti sellel kui tõsine või tugev see maitse/lõhn on. Kuna hindamiskaala ulatub kuni hindele 9, tuleks teatavaid nüansse või aspekte arvesse võtta, et teha kvaliteedi üldhinnangu kohta lõplik otsus, ning need nüansid või aspektid on kirjeldatud teises veerus pealkirja "omadused" all.

10.2. Lõplik hindamine

Hindamiskomisjoni juhataja kogub kokku degustaatorite täidetud lehed ning kontrollib, et tajutavad omadused ja nende kirjelduslehel esitatud tugevused vastavad hindamislehel esitatud hinnangule. Kui erinevus on märkimisväärne, palub juhataja degustaatoril oma hindamislehte kontrollida.

Vajaduse korral teeb degustaator katse uuesti.

Lõpuks koostab hindamiskomisjoni juhataja kogu rühma hindamistulemustest tabeli ning arvutab aritmeetilise keskmise ja lubatud hälbe.

Ainult siis, kui tulemusi on vaja uuesti kontrollida, kordab hindamiskomisjon katset, kuni iga proovi kohta saadakse kolm hinnangut; lõplik, kümnendikkohta täpsusega hinnang, on kolme hindamise keskmine.

Kui mõru ja/või kirbe maitse tugevuste keskmine on suurem kui 2,5, märgistatakse õli vastavalt ning hinnangu juurde märgitakse, et õli on eriti mõru ja/või kirbe.

Tulemuste väljendamine: hindamiskomisjoni juhataja määrab keskmise hinde alusel ja vastavalt I lisas sätestatud piirnormidele kategooria, kuhu proov liigitatakse. Analüüsiaruandesse märgitakse ainult see kategooria.

Märkus. Proove tuleks kuni analüüsimiseni hoida pitseeritud külmutuskapis ning need pannakse külmutuskappi tagasi pärast iga analüüsi, kuni katset on tehtud kolm korda.

Joonis 2
Neitsioliiviõli

Kirjeldusleht
Märkused maitsmis-, haistmisomaduste kohta ⁽²⁾

	0	1	2	3	4	5
Mahlakas oliivimaitse (küps ja roheline) ⁽¹⁾						
Õunamaitse- või lõhnaline						
Muu küpse vilja maitse või lõhn						
Roheline (lehtede, rohu maitse)						
Mõru						
Kirbe						
Magus						
Muud lubatavad omadused						
(Täpsusta						
.....)						
Hapu/veinimaitse/äädikane/happeline ⁽¹⁾						
Kare						
Metalne						
Kopitanud/niiske ⁽¹⁾						
Mudane sade						
Kopitanud ("Atrojado")						
Räästunud						
Muud keelatud omadused						
(Täpsusta						
.....)						

Hindamistabel

Defektid	Omadused	Koondhinne: punktides
Puuduvad	Mahlakas oliivi maitse	9
	Mahlakas oliivimaitse ja teiste värske puuviljade maitse	8
		7
Õrn ja vaevalt tajutav	Nõrk puuviljamaitse	6
Märgatav	Üsna puudulik mahlakas maitse, sobimatu lõhn ja maitse	5
Märkimisväärne, lubatavuse piiril	Täiesti puudulik, ebameeldiv lõhn ja maitse	4
Suur ja/või tõsine, selgelt tajutav	Tarbimiseks täiesti kõlbmatu maitse ja lõhn	3
		2
		1

Märkused:

Degustaatori nimi:

Proovi tunnus:

Kuupäev:

⁽¹⁾ Mittevajalik läbi kriipsutada.

⁽²⁾ Tajumine:

0: (?),

1: vaevalt tajutav,

2: nõrk,

3: keskmine,

4: tugev,

5: eriti tugev.

ORGANOLEPTILINE HINDAMINE: ÜLDINE BAASSÕNAVARA

1. KOHALDAMISALA

Käesoleva standardi eesmärk on koondada organoleptilises analüüsis kasutatavad üldised mõisted ja esitada nende määratlused.

2. SÕNAVARA

2.1. Üldine terminoloogia

Organoleptiline hindamine (nimisõna):

toote organoleptiliste omaduste hindamine meeleorganitega.

Taju (nimisõna):

välise esemete või sündmuste tajumine.

Organoleptiline (omadussõna) (täiend):

kirjeldab toote omadust, mis on meeleorganitega tajutav.

Ekspert (nimisõna):

(seoses organoleptiliste omaduste hindamisega)

degustaator, kelle erialaks on konkreetse toote organoleptiline hindamine ja kellel on põhiteadmised toote ettevalmistamisest ja turueelistustest.

Degustaator (nimisõna):

tähelepanelik, tundlik, koolitatud inimene, kes on valitud toiduaine organoleptiliste omaduste hindamiseks meeleorganite abil.

Hindamiskomisjon:

hindajate rühm, kes on spetsiaalselt valitud ja koolitatud ning koguneb selleks, et teha kindlaksmääratud tingimustes toote organoleptiline hindamine.

Aisting (nimisõna):

meeleorganite stimuleerimise tulemusel tekkiv subjektiivne nähtus. Seda nähtust võib subjektiivselt eristada või objektiivselt määratleda sõltuvalt stiimuli iseloomust või liigist ja selle tugevusest.

Tundlikkus (nimisõna):

võime tajuda meeleorganitega kvantitatiivselt ja kvalitatiivselt väikse tugevusega stiimuleid või väikeste erinevustega stiimuleid.

Degusteerimine (nimisõna):

toiming, mis sisaldab toote organoleptiliste omaduste, eelkõige toiduaine maitse, lõhna, taktilsete ja liikumisomaduste tajumist, analüüsimist ja hindamist.

Heakskiitmine (nimisõna):

üksikisiku või inimeste rühma positiivne suhtumine tootesse.

Tasakaal (nimisõna):

toote omadus, mida väljendab üldine meeldiv aisting. See aisting tekib toote maitse-, lõhna-, taktilsete ja kinesteetiliste omaduste tajumisel, kui need omadused on sobivas kontsentratsioonis.

Aktsepteeritavus (nimisõna):

toote seisund, kui üksikisik või üksikisikute rühm on toote organoleptilisi omadusi positiivselt hinnanud.

Eristamine (nimisõna):

kahe või enama stiimuli kvalitatiivne ja/või kvantitatiivne eristamine.

Kompenseerimine (nimisõna):

eri stiimulite koostoime tulemus, mille tulemusel tajutakse stiimuleid väiksema tugevusega kui eraldi.

Aspekt (nimisõna):

visuaalselt tajutavate organoleptiliste omaduste kombinatsioon: suurus, kuju, värv, ehitus, sogasus, puhtus, voolavus, vahutamine ja kohumine. Seda mõistet tuleks eelistada mõistele välimus.

Tunnus (nimisõna):

tajutav omadus.

2.2. **Füsioloogilised mõisted**

Stiimul (nimisõna):

füüsiline või keemiline mõjur, mis kutsub esile väliste või sisemiste sensoorsete retseptorite reaktsiooni.

Maitse (nimisõna):

(maitse tajumine)

taju, mille retseptorid asuvad suus, eelkõige keelel, ja millega tajutakse erinevad lahustunud ühendeid.

Maitsmis- (omadussõna):

kirjeldab toote omadust, mis stimuleerib maitsmisorganeid, tekitades ühe või mitu neljast põhimaitsest: magus, soolane, hapu ja kibe.

Retseptor (nimisõna):

meeleorgani spetsiifiline struktuur, mida on võimalik stimuleerida ja mis võtab stiimuli vastu ning muundab selle närviimpulsiks.

Märkus : Retseptoreid liigitatakse stiimuliga seotud energia alusel (valgus, kuumus, heli, jne).

Haistmine (nimisõna):

haistmisorganite funktsioon tajuda ja eristada väliskeskkonnast gaasilisel kujul otse või kaudselt läbi nina haistmisorganiteni jõudvaid molekule.

Tugevus (nimisõna):

mingi omaduse energia suurus, mida on võimalik mõõta kvantitatiivsel skaalal selle põhjal, kui võrd see omadus ületab tajumiskünnise.

Kohandamine (nimisõna):

sensoorsete stiimulite tajutundlikkuse ajutine muutmine ühesuguse stiimuli või sarnaste stiimulite pideva, korduva kokkupuutumise tagajärjel.

Takistus (nimisõna):

tõrge meeleorgani või selle osa reageerimisel, hoolimata kokkupuutest stiimuliga, mille tugevus ületab tajumiskünnise.

Reaktsioon (nimisõna):

tegevus, mille käigus sensoorsed rakud reageerivad ühele või mitmele vastava meeleorganiga seotud stiimulile.

Tihedus (nimisõna):

taktiline aisting suus, mis kirjeldab toote tihedust, viskoossust, konsistentsi või kompaktsust.

Lõhn (nimisõna):

värske, meeldiv, hõrgutav lõhn.

Nuusutama (teigusõna):

(lõhnale kohaldatav aktiivne taju)

kirjeldab lõhna tajumist.

Objektiivne (omadussõna):

- objekti tõene, kontrollitav tõlgendus, mille puhul inimfaktor (näiteks eelistused, harjumused, kalduvused) on minimaalne.
- viis, mis sensoorsete või instrumentaalsete meetoditega vähendab maksimaalselt iseeneslikud vead.

Märkus : Mõiste "instrumentaalne" kasutamist sünonüümina ei soovitata.

Subjekttiivne (omadussõna):

kirjeldab taju, mida mõjutavad lisaks stiimulile ka inimese mõtlemine ja tunded.

Kinesteesia:

aisting, mille tekitab proovi liikumine suuõõnes või proovi käega puudutatakse (näiteks juustu vajutamine sõrmedega).

*Künnis (nimisõna)**Absoluutne künnis:*

sensoorse stiimuli miinimumkünnis, mille tekitab:

- aistingu tekkimine (stiimulikännis või tuvastamiskünnis), või
- aistingu identifitseerimine (tundmiskünnis).

Eristamiskünnis:

sensoorse stiimuli miinimumväärtus, mis tekitab aistingu tugevuses märgatavaid erinevusi.

Lõppkünnis:

stiimuli maksimumväärtus, millest suuremat tugevnemist ei märgata.

Võrdluskünnis:

stiimuli minimaalne kvantitatiivne väärtus või kriitiline künnist ületav väärtus, mis tingib neutraalse stiimuli puhul meeldiva või tõrjuva reaktsiooni, näiteks kui tuleb valida suhkrulahuse ja vee vahel.

Märkus: Eristada tuleks absoluutset ja diferentsiaalset võrdluskünnist.

Künnisest madalam (omadussõna):

allpool absoluutset künnist.

Künnist ületav (omadussõna):

ülalpool absoluutset künnist.

Organoleptiline väsimus:

sensoorse kohandumise vorm, mis toob kaasa tundlikkuse vähenemise.

Kompensatsioon (nimisõna):

stiimulite kombinatsiooni sellise koosmõju tulemus, mis tingib selle, et igat stiimulit tajutakse väiksema tugevusega kui stiimuleid eraldi.

Sünergiline (omadussõna):

uuritavate ainete koostoime, mis tingib selle, et nende ainete organoleptiliste omadused on tugevamad kui iga omadus üksinda.

Kontrast:

kahe üheaegse või üksteisele järgneva stiimuli reaktsiooni erinevuse suurenemine.

Konvergentsi vastand.

Konvergens:

kahe üheaegse või üksteisele järgneva stiimuli reaktsiooni erinevuse vähenemine. Kontrasti vastand.

2.3. **Organoleptiliste omadustega seotud mõisted**

Happeline (omadussõna):

- a) kirjeldab enamiku happeliste ainete (näiteks sidrunhape, piimhape, viinhape) lahjendatud vesilahuste esmast maitset;
- b) kirjeldab sellist maitset tekitavate puhaste ainete või segude omadusi.

Vastavaks nimisõnaks on happesus.

Hapu (omadussõna):

kirjeldab maitsemis- ja haistmisaistingut, mis tekib siis, kui käärimisel tekkivad happed on ülekaalus, samuti sellist aistingut tekitavaid toiduaineid.

Mõned sellist aistingut tekitavad tegurid on seotud käärimisega, näiteks toiduaine piimhappe- või äädik-
happekäärimine.

Mõru (omadussõna):

- a) kirjeldab ainete nagu kiniini, kofeiini ja vastavate alkaloidide lahjendatud vesilahuste esmast maitset;
- b) kirjeldab seda maitset tekitavate puhaste ainete või segude omadusi.

Vastavaks nimisõnaks on mõrudus.

Soolane (omadussõna):

- a) iseloomulik maitsmisaisting, mille kõige tüüpilisemaks näiteks on naatriumkloriidilahuse maitse;
- b) kirjeldab seda maitset tekitavate puhaste ainete või segude omadusi.

Vastavaks nimisõnaks on soolasus.

Magus (omadussõna):

- a) kirjeldab eri ainete nagu sahharoos vesilahuste esmast maitset;
- b) kirjeldab seda maitset tekitavate puhaste ainete või segude omadusi.

Vastavaks nimisõnaks on magusus.

Kokkutõmbav (omadussõna):

- a) kirjeldab eri toodete nagu tanniin (näiteks kakiploomi tanniin, laukaploomi tanniin) lahjendatud vesilahusest suus tekkivat kompleksset maitset;
- b) kirjeldab seda aistingut tekitavate puhaste ainete või segude omadusi.

(Vastavaks nimisõnaks on kokkutõmbuvus.)

Maitse ja lõhn (nimisõna):

maitse on maitse-, haistmis-, taktilsete- ja kinesteetiliste aistingute kombinatsioon, mis võimaldab hindajal identifitseerida ja näha ette kriteeriumid, mille alusel antakse tootele positiivne või negatiivne hinnang.

Maitse (nimisõna):

- a) aisting, mis tekib siis, kui mingi lahustuv aine stimuleerib maitsmisnäsaid.
- b) kirjeldab seda spetsiifilist aistingut tekitavate ainete omadusi.

Esmane maitse (nimisõna):

üks neljast iseloomulikust maitsest: magus, soolane, hapu, mõru.

Lõhn (nimisõna):

- a) lenduvate ainete maitsmisorganiga nuusutamisel tekkivate aistingute kombinatsioon;
- b) kirjeldab seda aistingut tekitavate eespool nimetatud ainete omadusi.

Aroom (nimisõna):

- a) meeldiv aisting, mis tekib kaudselt toidu maitsmisel maitsmisorganiga;
- b) parfüümitööstuses ja mitte-erialases keeles kasutatakse seda mõistet ka otse läbi nina tekkivate aistingute puhul.

Järelmaitse, jääkmaitse (nimisõna):

aistingute kombinatsioon, mis tekib pärast stiimuli suust kadumist ja mis erineb algselt tekkinud aistingust.

Aromaatne (omadussõna):

- a) kirjeldab puhaste ainete või segude omadust, mida tekitab maitsmisel aroomi aisting;
- b) kirjeldab tooteid, mille vahetult nina kaudu tajumisel tekib lõhna ja värskuse aisting.

Tekstuur (nimisõna):

toote tahke või vedela oleku omadused, mille kombinatsioon võib maitsmise ajal ärritada mehaanilisi retseptoreid, eelkõige suus asuvaid retseptoreid.

Märkus : See mõiste osutab ainult objektiivsetele omadustele, mitte nendele aistingutele, mida kirjeldatakse selliste üldiste mõistetega nagu konsistents, kiulusus, rasvasus, jne.

Suuloputamine:

tegevus, mille käigus puutub suus olev toit kokku kõikide suus olevate tundlike piirkondadega nii, et kõiki suu kaudu tekkivaid aistinguid on võimalik tajuda.

Märkus : Sõnavara võib täiendada ISO standardi 5492 I–V osa ja teiste trükiste põhjal (näiteks J. L. Magnen, “Les cahiers techniques du Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l’Alimentation”, jne.).

ÕLI DEGUSTEERIMISE KLAAS

1. KOHALDAMISALA

Käesoleva standardi eesmärk on kirjeldada toiduõlide organoleptilisel hindamisel (lõhn, maitse) kasutatava klaasi omadusi.

Lisaks sellele kirjeldatakse kuumutamisseadet, mis on vajalik analüüsi ajal õige temperatuuri saavutamiseks ja hoidmiseks.

2. KLAASI KIRJELDUS

Joonisel 1 on näidatud klaasi vajalikud optimaalsed omadused, mis on järgmised:

- a) klaas peab võimalikult hästi püsti seisma, et vältida ümberminemist ja õli väljavoolamist;
- b) klaasi põhi peab hästi sobima kuumutamisseadmesse ja klaasi põhja peab olema võimalik ühtlaselt soojendada;
- c) klaasi kuju peab olema kõige laiem klaasi alumises osas, mille tõttu õli lenduvad komponendid eralduvad lihtsalt ja kontsentreeruvad klaasisuu juures, võimaldades neid paremini tajuda ja ära tunda;
- d) klaas peab olema tehtud tumedast klaasist, et degustaator ei näeks õli värvi, sest see aitab ära hoida eelarvamusi ning võimalikku erapoolikust ja tendentslikkust.

2.1. Mõõtmed

Klaas on esitatud joonisel 1 ning selle mõõtmed on järgmised:

— üldmaht	130 ml ± 10 ml,
— üldkõrgus.....	60 mm ± 1 mm,
— klaasisuu läbimõõt	50 mm ± 1 mm,
— klaasi suurim läbimõõt	70 mm ± 1 mm,
— põhja läbimõõt	35 mm ± 1 mm,
— klaasi külje paksus	1,5 mm ± 0,2 mm,
— klaasi põhja paksus	5 mm ± 1 mm.

Igal klaas peab olema varustatud kellaklaasiga, mille läbimõõt on klaasisuust 10 mm suurem. Kellaklaasi kasutatakse klaasi katmisel selleks, et aroom ei hajuku ning tolm ei pääseks klaasi.

2.2. Valmistamise eripärad

Klaas peab olema vastupidavast klaasist; klaas peab olema tume, et sisu värvi ei oleks võimalik eristada, samuti ilma kriimustuste ja mullideta.

Serv peab olema sirge, sile ja väljapoole pööratud.

Selleks et klaas taluks katsete käigus temperatuuri muutusi, peab klaas olema löömutatud.

2.3. Kasutamisyjuhend

Klaasid pestakse lõhnastamata seebi või detergendiga ning loputatakse seni, kuni puhastusvahend on täielikult eemaldatud. Viimast korda loputatakse destilleeritud veega ning pärast seda jäetakse klaasid kuivama ning kuivatatakse siis kuivatusahjus.

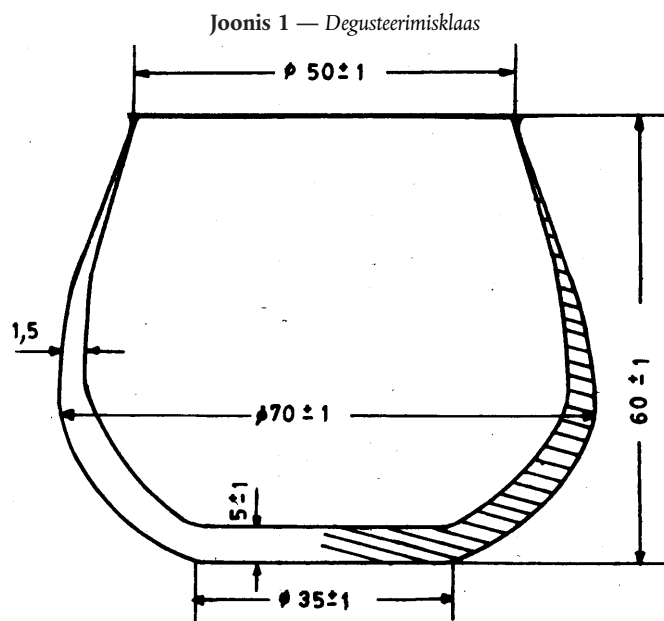
Kasutada ei tohi kontsentreeritud happeid ja kroomhappe segusid.

Klaase hoitakse kuni kasutamiseni kuivatusahjus, kus nad on kõrvallõhnade eest kaitstud.

Enne kasutamist nuusutatakse klaasi tagamaks, et sellel ei ole kõrvallõhna. Katse ettevalmistamisel tagatakse, et iga klaasi tunnus ja sellele vastav õli märgitakse üles. Ainus, kes klaasi tunnuse ja õli vastavust teab, on degusteerimise korraldaja.

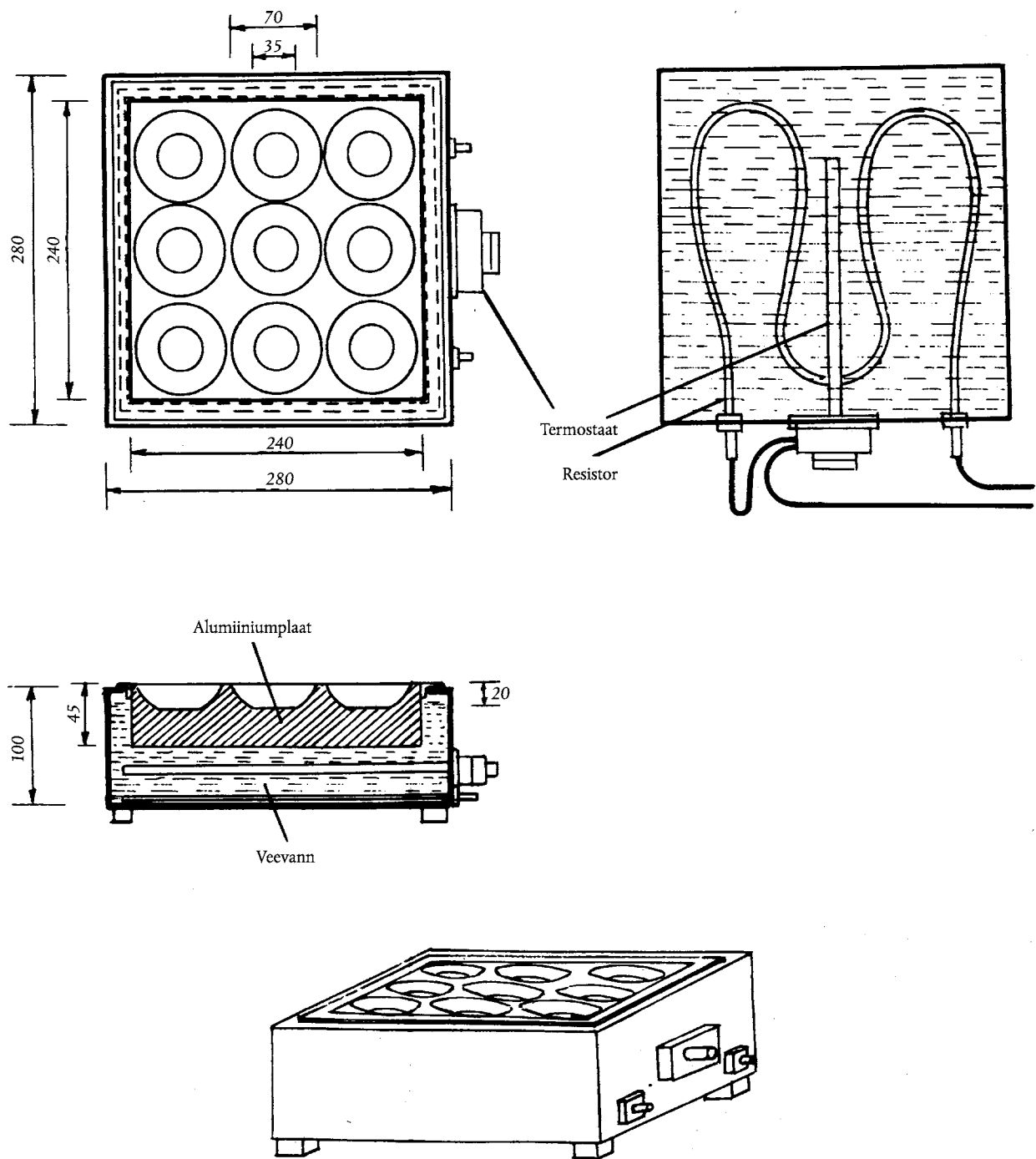
3. PROOVIDE KUUMUTAMISE SEADE

Proove hinnatakse organoleptiliselt kindlal temperatuuril, milleks on õlide puhul 28 ± 2 °C. Selleks paigaldatakse igasse boksi degustaatori käeulatusse kuumutamisseade (vt joonis 2). Kuumutamisseade koosneb alumiiniumplaadist, mis on püsiva temperatuuri hoidmiseks termostateeritavas veevannis. Sellel plaadil on rida süvendeid, millesse saab klaasid põhjapidi asetada. Kuumutamisseadme ja eri plaatide süvenditesse asetatud klaasides oleva õli temperatuurid ei või erineda rohkem kui ± 2 °C.



(Mõõdud millimeetrites)

Joonis 2 — Proovide kuumutamisseade (mõõdud millimeetrites)



KATSERUUMI SISUSTAMISE JUHISED**1. SISSEJUHATUS**

Katseruum kujundatakse sellisel, et hindamiskomisjonil oleks organoleptilisel hindamisel sobiv, mugav ja standardne keskkond, mis soodustab töötgemist ning aitab tõsta tulemuste korratavust ja reprodutseeritavust.

2. KOHALDAMISALA

Käesoleva standardi eesmärk on täpsustada katseruumi sisustamisel taidetavad põhitingimused.

3. SISUSTAMISE ÜLDISED NÕUDED

Tööruumid peavad olenemata suurusest (vt punkt 3.1) vastama järgmistele nõuetele:

Tööruumid peavad olema meeldivad ja sobiva valgustusega (vt 3.2), kuid neutraalsed. Rahuliku õhkkonna loomiseks peaksid seinad olema ühevärvilised ja heledad. ⁽¹⁾

Tööpindu peaks olema lihtne puhastada ja nad peaksid olema teistest müraallikatest eraldatud. Seetõttu peaksid tööruumid eelistatult olema helikindlad. Tööruumides ei tohi samuti olla kõrvalõhnu ning selleks tuleks ruumidesse võimaluse korral paigaldada tõhusad ventilatsiooniseadmed. Kui ümbritsev õhu temperatuur kõigub, varustatakse katseruumid vajadusel kliimaseadmega, mis hoiab õhu temperatuuri 20–22 °C juures.

3.1. Mõõtmed

Tööruumide mõõtmed sõltuvad sageli laborite või ettevõtete võimalustest. Üldiselt peaksid tööruumid olema piisavalt avarad, nii et neisse saaks paigaldada 10 boksi ja proovide ettevalmistamise ala.

Siiski on selge, et mida suurem sisustatav ala on, seda parem, sest see võimaldab ette näha alad abiruumide jaoks, näiteks seadmete puhastamiseks, hinnatavate toodete paigutamiseks ja avalike hindamiskomisjonide töö korraldamiseks.

3.2. Valgustus

Üldvalgustus, kas päikese- või lambivalgus (näiteks volframlambid), peab olema ühesugune, kontrollitav ning hajus.

3.3. Õhutemperatuur ja niiskus

Tööruumides peab olema alati meeldiv temperatuur ja sobiv niiskus. Soovitatav õhutemperatuur on 20–22 °C ja suhteline õhuniiskus 60–70 %, välja arvatud erandjuhud.

4. BOKSIDE KIRJELDUS**4.1. Üldtingimused**

Organoleptilise hindamise puhul asuvad boksid üksteise kõrval. Boksid on ühesugused ning eraldatud vaheseinadega, mis on piisavalt kõrged ja paksud, et degustaatoreid isoleerida.

Boksid võivad olla valmistatud ükskõik millisest sobivast lihtsasti puhastatavast ja hooldatavast materjalist (näiteks puit, klaasvineer, laminaatplaadid, jne). Värvil kasutamisel peab see kuivanult olema täiesti lõhnatu.

Bokside istmed peavad olema mugavad ning reguleeritava kõrgusega.

Igas boksis peab olema ka reguleeritava suuna ja tugevusega valgustus.

Oleks väga soovitatav, et boksides oleks boksist väljaspool asuva lambiga ühendatud nupp, mis võimaldab degustaatoril teisi häirimata väljasolevale assistendile teatada katse lõpetamisest, täiendavate proovide vajadusest või mõne seadme puudumisest, kõrvalekalletest või vajadusest saada teavet.

⁽¹⁾ Ruumi värvilahendus ja valgustus võivad organoleptilise hindamise tulemusi mõjutada.

4.2. Mõõtmed

Boksid peavad olema piisavalt suured ja mugavad. Üldiselt on boksidel järgmised mõõdud:

— laius:

0,75 m (ilma kraanikausita)

0,85 m (kraanikausiga),

— pikkus:

0,50 m (laud)

vähemalt 0,20 m lisaruum vaheseina jaoks,

— vaheseinte kõrgus:

vähemalt 0,60 m lauast,

— laua kõrgus:

0,75 m.

4.3. Ruumi korraldus

Lauapinda peab olema lihtne puhastada.

Osal sellest lauast on kraanikauss, mille kraanist saaks voolavat joogivett. Kui see ei ole võimalik, võib seda pinda kasutada kandiku, süljekausi või mõne muu sarnase seadmega.

Kui proove tuleb katse ajal hoida püsival temperatuuril, mis on ümbritseva õhu temperatuurist kõrgem, on selleks soovitatav kasutada sobivat seadet (veevann, kuumutusplaat, jne).

Umbes 1,10 meetri kõrgusele pörandast võib paigaldada tarvikute (klaasid, väikesed seadmed, jne) jaoks riiuli.

Kui bokside paigutus katseruumis seda võimaldab, oleks kasulik paigaldada luuk, mille kaudu on proove degusteerijale lihtsam anda. Luuk võib töötada liugukse põhimõttel (joonis 1), klaaside või tasside (kõrgete mahutite) puhul pöörlev (joonis 2) või horisontaalselt avaneda (joonis 3), kui proovinõud on väiksed. Olu-line on tagada, et ava on kandikul ja klaasidel olevate proovide jaoks piisavalt suur.

Joonisel 4 on katseruumi ja täiendavate ruumide näidis.

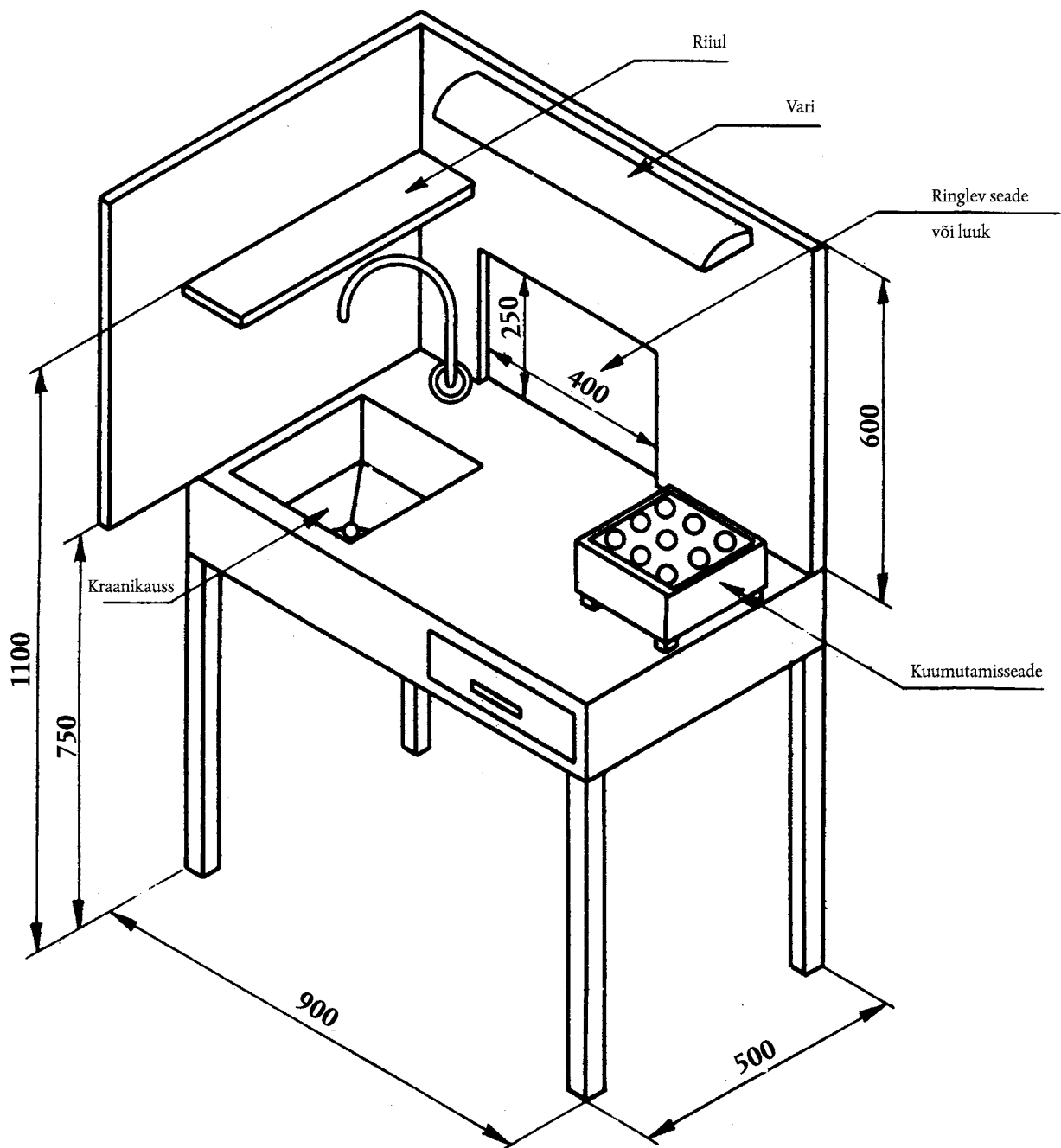
5. TÄIENDAVAD RUUMID

Kui ruumi on piisavalt, on soovitatav näha ette eraldi ruumid proovide (toidu- või muud proovid) ettevalmistamiseks, klaaside või seadmete korrastamiseks ja katsetele eelnevate või järgnevate arutluste korraldamiseks. Kui sellised ruumid on olemas, tuleb neid hoida puhtana; nendest ruumidest tulenevad lõhnad või helid ei tohi mitte mingil juhul häirida katseruumis olevate hindajate tööd.

Märkused: Kirjeldatud tingimused on ideaalsed. Kui ruumi sisustamine ainult organoleptilisteks hindamiseks ei ole siiski võimalik, võib katsed teha ruumides, mis vastavad kirjeldatud miinimumtingimustele (valgus, temperatuur, müra, lõhnad), luues selleks teisaldatavad boksid, mis koosnevad lahti-kinni käivatest elementidest ja mille miinimumnõue on see, et nad eraldavad degustaatorid üksteisest.

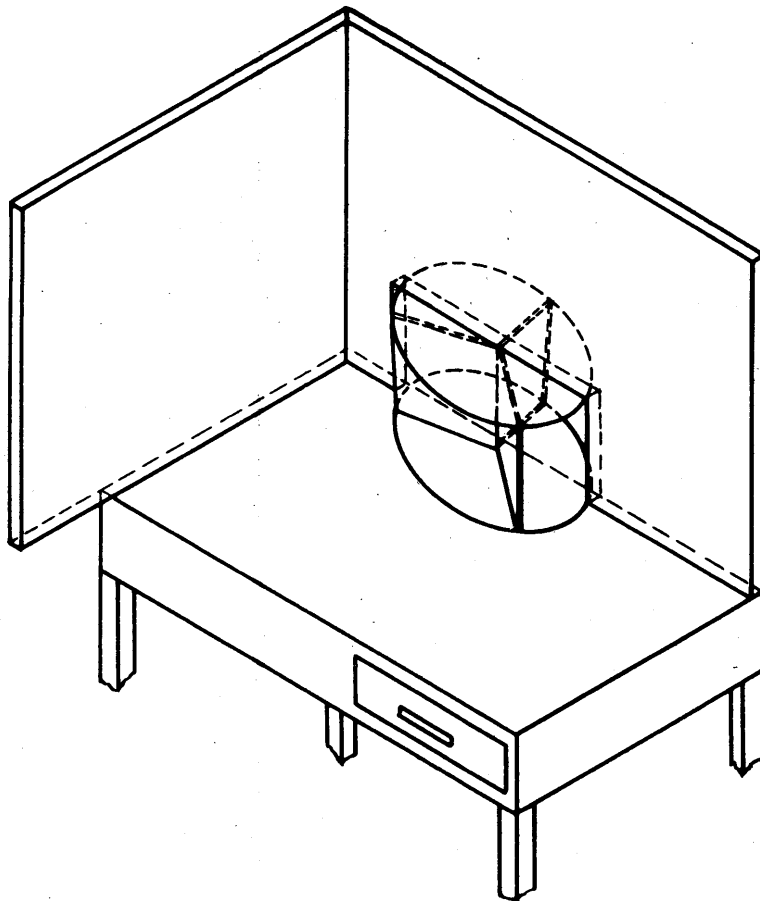
SEADMETE PAIGUTUS BOKSIS

Joonis 1



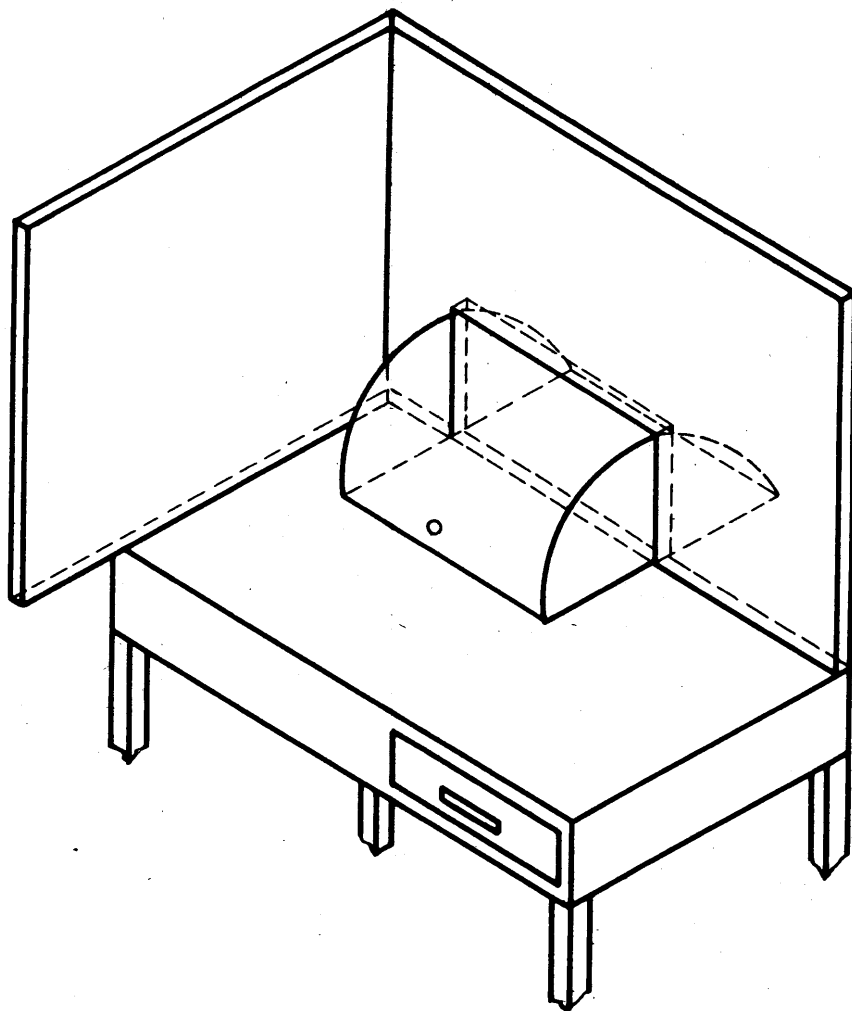
RINGLEV SEADE PROOVIDE ANDMISEKS

Joonis 2



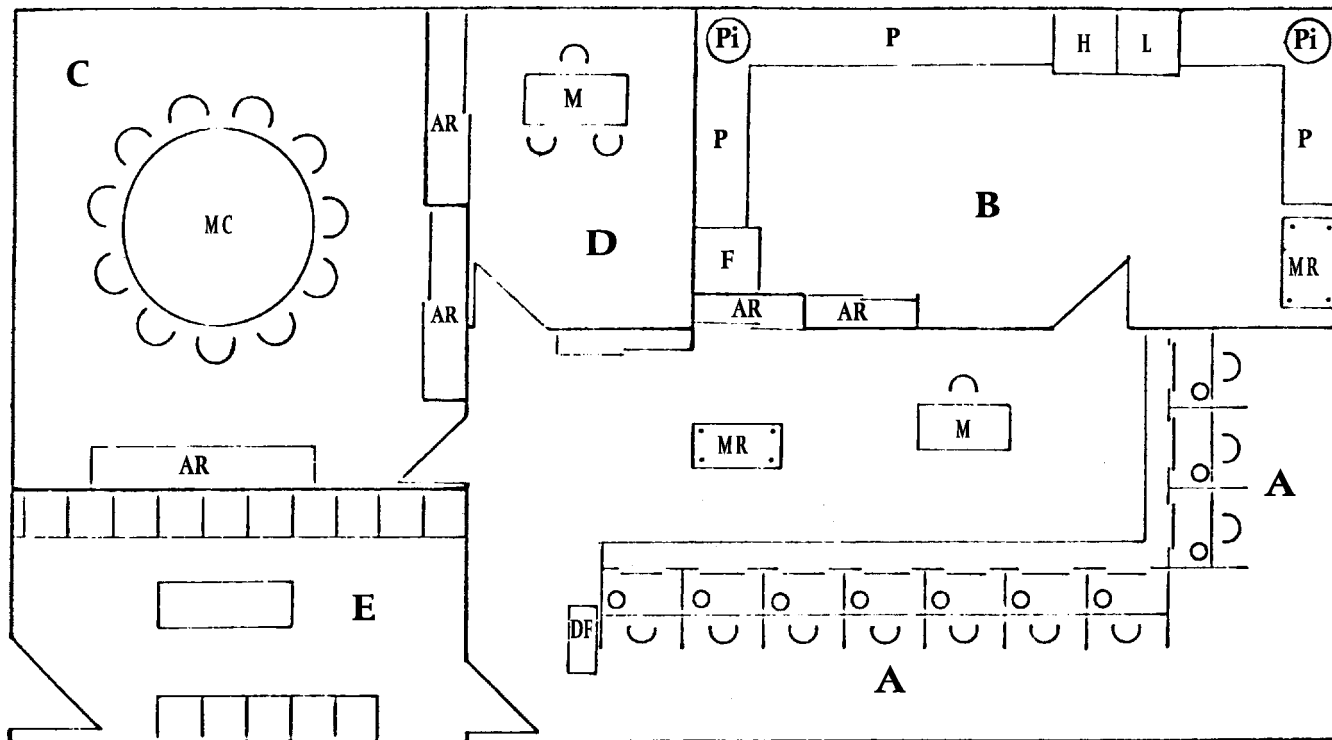
LUUK PROOVIDE ANDMISE JAOKS

Joonis 3



LABOR ORGANOLEPTILISEKS ANALÜÜSIKS (Näide)

Joonis 4 — Katseruumi näidis



- A: degusteerimisboksid,
 B: seadmete puhastamise ja proovide ettevalmistamise ruum,
 C: avalik hindamiskomisjon,
 D: kantselei,
 E: ooteruum,
 F: külmik,
 H: kuivatuskapp,
 L: nõudepesumasin,
 Pi: kraanikauss,
 AR: kapp,
 MR: vanker,
 DF: vormide jagamine,
 MC: ümmargune laud,
 P: tööpind.

XIII LISA

RAFINEERIMISE TÕENDAMINE

1. OLIIVIÕLI NEUTRALISEERIMINE JA VÄRVITUSTAMINE LABORIS

1.1. Õli neutraliseerimine

1.1.1. Seadmed

- keeduklaas, 300 ml,
- laboratoorne tsentrifuug 100 ml katseklaasidega,
- keeduklaas, 250 ml,
- ümarkolvid, 100 ml,
- jaotuslehter, 1 liiter.

1.1.2. Reaktiivid

- 12 % naatriumhüdroksiidi vesilahus,
- 1 % fenoolftaleiini etanoolilahus,
- heksaan, analüütiliselt puhas,
- 2-propanool, analüütiliselt puhas.

1.1.3. Menetlus

a) Õlid, mille oleiinhappena väljendatud vabade rasvhapete sisaldus on väiksem kui 30 %

50 g toorõli asetatakse kõrgesse 300 ml keeduklaasi ja kuumutatakse veevannis temperatuurini 65 °C. Ettevaatlikult kogu aeg segades lisatakse 12protsendilist naatriumhüdroksiidi lahust, mis vastab õli vabadest hapetest 5 % võrra suuremale kogusele. Segamist jätkatakse temperatuuril 65 °C viis minutit.

Segu kantakse 100 ml tsentrifuugiküvettesse ja seebistunud pasta eraldatakse tsentrifuugimise teel. Dekanteeritud õli valatakse 250 ml keeduklaasi ning pestakse 50–60 ml keeva destilleeritud veega, seejärel eemaldatakse vesi sifooniga. Pesemist korratakse, kuni kõik seebistunud aine jäägid on eemaldatud (fenoolftaleiini roosakas värvus kaob).

Allesjäänud vee eemaldamiseks õli tsentrifuugitakse.

b) Õlid, mille oleiinhappena väljendatud vabade rasvhapete sisaldus on suurem kui 30 %

1 l jaotuslehtresse pannakse 50 g toorõli, 200 ml heksaani, 100 ml 2-propanooli ja 12protsendilist naatriumhüdroksiidi lahust, mis vastab õli vabadest hapetest 0,3 % võrra suuremale kogusele.

Segatakse tugevalt ühe minuti jooksul. Lisatakse 100 ml destilleeritud vett, segatakse uuesti ning lastakse seista.

Pärast kihtide eraldamist lastakse seepe sisaldaval kihil nõrguda. Kahe kihi (pealne õline ja alumine veekiht) vahele tekib sageli taimeliimidest ja lahustumatutest ainetest koosnev vahekiht, mis tuleb samuti eemaldada.

1.2. Neutraliseeritud õli värvitustamine

1.2.1. Seadmed

- 250 ml ümarapõhjaline kolb, millel on kolm lihvitud kaela, et selle külge panna:
 - a) termomeeter, mis on reguleeritud kraadides ja mis võimaldab võtta näitused 90 °C juures;
 - b) mehaaniline segisti, mis töötab kiirusega 250–300 pööret minutis ja mida on võimalik kasutada vaakumis;
 - c) vaakumpumba ühendus,
- manomeetriga vaakumpump, mis võimaldab saada jääkrõhku 15–30 millibaari.

1.2.2. Analüüsi käik

Kolme kaelaga kolbi kaalutakse umbes 100 g neutraliseeritud õli. Kolbi pannakse termomeeter ja segisti, seejärel ühendatakse külge vaakumpump ja kuumutatakse pidevalt segades temperatuurini 90 °C. Sama temperatuuri hoides jätkatakse segamist, kuni analüüsitava õli on täielikult veevaba (umbes 30 minutit). Vaakum lõhutakse ja lisatakse 2–3 g aktiivmulda.

Vaakum tasakaalustatakse, kuni saavutatakse jääkrõhk 15–30 ml ja temperatuuri 90 °C hoides segatakse 30 minutit umbes 250 pööret minutis.

Filtreeritakse termostaatilises ahjus kuumalt (50–60 °C).

XIV LISA

KAUPADE KOONDNOMENKLATUURI GRUPI 15 LISAMÄRKUSED 2, 3 JA 4

1. "Märkus 2 A: CN-koodides 1509 ja 1510 tähistab "oliiviõli" ainult oliivide töötlemisel saadud õli, välja arvatud ümberesterdatud oliiviõli ning oliiviõli ja teiste õlide segud.

Ümberesterdatud oliiviõli või teiste õlide esinemine tehakse kindlaks V, VII, IX, X ja XII lisas sätestatud meetodil. Kõikide CN-koodide 1509 ja 1510 alla kuuluvate oliiviõlide sterooli- ja rasvhapete koostise analüütilised omadused on esitatud järgmises tabelis:

Tabel I — rasvhapete koostis protsendina kogumahust		Tabel II — steroolide koostis protsendina kogumahust	
Müristiinhape	M 0,1	Kolesterool	M 0,5
Linoleenhape	M 0,9	Brassikasterool	M 0,2
Arahiinhape	M 0,7	Kampesterool	M 4,0
Eikoseenhape	M 0,5	Stigmasterool	< kampesterool
Beheenhape	M 0,3	Betasitosterool (1)	m 93,0
Lignotseriinhape	M 0,5	Δ 7-stigmasterool	M 0,5

M = maksimaalne.
m = minimaalne.

(1) Delta-5-23 stigmasterool + kolesterool + betasitosterool + sitostanool + delta-5-avenasterool + delta-5-24-stigmastadienool.

Märkus 2 B:

"Neitsioliiviõli" on õli, mis on saadud oliividest üksnes mehhaaniliste või muude füüsikaliste vahenditega tingimustel, eriti temperatuuril, mis ei põhjusta õli kvaliteedi halvenemist, ja mida ei ole töödeldud muul viisil kui pesemise, dekanteerimise, tsentrifugimise või filtreerimise teel, välja arvatud õlid, mis on ekstraheeritud oliividest lahustite (1510) abil ja mis on määratletud allpool I ja II alapunktis.

- I. Alamrubriigis 1509 10 10 tähistatakse terminiga "lambiõli" oliiviõli, milles, sõltumata tema happelisusest:

- alifaatsete alkoholide sisaldus ei ületa 400 mg/kg;
- erütrodiooli ja uvalooli sisaldus ei ületa 4,5 %;
- küllastunud rasvhapete lisand 2. positsioonis triglütseriidide arvestuses ei ületa 1,3 % ja/või
- millel on üks järgmistest märgetest:
 - peroksiidid ei ületa 20 meq O₂/kg,
 - lenduvate halogeenitud lahustite sisaldus ületab kokku 0,2 mg/kg või iga eraldi võetud lahusti puhul 0,1 mg/kg,
 - ekstinktsioonitegur K₂₇₀ (100) ei ole kõrgem kui 0,250 ja pärast õli töötlemist aktiveeritud alumiiniumoksiidiga mitte kõrgem kui 0,11. Mõnedel õlidel, mis sisaldavad 100 g kohta rohkem kui 3,3 g oleiinhappena väljendatud vabu rasvhappeid, võib pärast XV lisas sätestatud meetodil aktiveeritud alumiiniumoksiidiga töötlemist olla ekstinktsioonitegur K₂₇₀ kõrgem kui 0,11. Sellisel juhul peavad nendel õlidel pärast laboris neutraliseerimist ja värvitustamist olema järgmised omadused:

- ekstinktsioonitegur K_{270} ei tohi olla kõrgem kui 1,20,
- ekstinktsiooniteguri variatsioon (ΔK) ⁽¹⁾ 270 nm piirkonnas on kõrgem kui 0,01, kuid mitte kõrgem kui 0,16,
- d4) organoleptilised omadused, mis sisaldavad lubatud piire ületades märgatavaid defekte, mille puhul on eksperthinnangu punktisumma alla 3,5.

II. Alamrubriigi 1509 10 90 puhul tähistatakse terminiga “neitsioliiviõli” õli, millel on järgmised omadused:

- a) happesisaldus, väljendatuna oleiinhappena, ei ole suurem kui 3,3 g 100 g kohta;
- b) peroksiid arv ei ületa 20 meq O₂/kg;
- c) alifaatsete alkoholide sisaldus ei ületa 300 mg/kg;
- d) lenduvate halogeenitud lahustite üldsisaldus ei ületa 0,2 mg/kg ja iga eraldivõetud lahusti sisaldus ei ületa 0,1 mg/kg;
- e) ekstinktsioonitegur K_{270} ei ole kõrgem kui 0,250 ja pärast õli töötlemist aktiveeritud alumiiniumoksiidiga mitte kõrgem kui 0,10; ⁽²⁾
- f) ekstinktsiooniteguri variatsioon (ΔK) 270 nm piirkonnas ei ole kõrgem kui 0,010;
- g) organoleptilised omadused, mis võivad sisaldada märgatavaid lubatud piire ületavaid defekte, mille puhul on eksperthinnangu punktisumma üle 3,5;
- h) erütrodiooli ja uvalooli sisaldus ei ületa 4,5 %;
- i) küllastunud rasvhapete lisand 2. positsioonis ei ületa triglütseriidide arvestuses 1,3 %.

Märkus 2 C: Alamrubriiki 1509 90 00 hõlmab oliiviõli, mis on saadud alamrubriiki 1509 10 10 või 1509 10 90 kuuluvate oliiviõlide töötlemisel, kas neitsioliiviõliga segatult või segamata, ja millel on järgmised omadused:

- a) happesisaldus, väljendatuna oleiinhappena, ei ole suurem kui 3,3 g 100 g kohta;
- b) alifaatsete alkoholide sisaldus ei ületa 350 mg/kg;
- c) ekstinktsioonitegur K_{270} (100) on suurem kui 0,250 ja mitte suurem kui 1,20 ning pärast proovi töötlemist aktiveeritud alumiiniumoksiidiga kõrgem kui 0,10 ⁽²⁾;
- d) ekstinktsiooniteguri variatsioon (ΔK) 270 nm piirkonnas on kõrgem kui 0,010, kuid mitte kõrgem kui 0,160;
- e) erütrodiooli ja uvalooli sisaldus ei ületa 4,5 %;
- f) küllastunud rasvhapete lisand 2. positsioonis ei ületa 1,5 %.

Märkus 2 D: Alamrubriigi 1510 00 10 puhul on “toorõli” eelkõige oliivide pressimisjäätmetest saadud õli, millel on järgmised omadused:

- a) happesisaldus, väljendatuna oleiinhappena, on üle 2 g 100 g kohta;
- b) erütrodiooli ja uvalooli sisaldus ei ületa 12 %;
- c) küllastunud rasvhapete lisand 2. positsioonis ei ületa triglütseriidide arvestuses 1,8 %.

Märkus 2E: Alamrubriiki 1510 00 90 kuuluvad õlid hõlmavad õlisid, mis on saadud alamrubriiki 1510 00 10 kuuluvate õlide töötlemisel, sõltumata sellest, kas neid on neitsioliiviõliga segatud või mitte ning millel ei ole I ja II punktis osutatud õlide omadusi, tingimusel et nende küllastunud rasvhapete lisand 2. positsioonis triglütseriidide arvestuses ei ületa 2 %.”

⁽¹⁾ $\Delta K = K_m - 0,5 (K_{m-4} + K_{m+4})$

K_m on ekstinktsioonitegur neeldumiskõvera maksimumi lainepikkusel 270 nm piirkonnas.
 K_{m-4} on ekstinktsioonitegurid lainepikkustel alla 4 nm ja üle K_m lainepikkuse.

⁽²⁾ Kui K_{270} on suurem kui 0,25, tehakse pärast alumiiniumoksiidiga töötlemist uus katse. K_{270} ei tohi olla suurem kui 0,10.

2. "Märkus 3: Alamrubriikidesse 1522 00 31 ja 1522 00 39 ei kuulu:
- a) õli sisaldavate rasvainete töötlemisel saadud jäägid, mille XVI lisas sätestatud meetodiga kindlaksmääratud joodiarv on väiksem kui 70 või suurem kui 100;
 - b) rasvaineid sisaldava õli töötlemisel saadud jäägid, mille joodiarv ei ole väiksem kui 70 või suurem kui 100, ja mille kooskõlas täiendavas märkuses 4 nimetatud määruse lisaga määratud beetasitosterooli sisaldusmahu piigi pindala on väiksem kui 93 % steroolide piikide üldpindalast."
3. "Märkus 4: Eespool nimetatud toodete omaduste määramise analüüsimeetodid on sätestatud määruse (EMÜ) nr 2568/91 lisades."
-

XV LISA

1. OLIIVIÖLI PRESSIMISJÄÄKIDE ÕLISISALDUS

1.1. Seadmed

- nõuetekohane ekstraheerimisaparaat, milles on 200–250 ml ümarapõhjalised kolvid,
- elektriline vann (näiteks liivavann, veevann) või pliit,
- analüütilised kaalud,
- ahi, mida on võimalik reguleerida kuni 80 kraadini,
- elektriahi, milles on 103 ± 2 kraadini reguleeritav termostaat ja kuhu on võimalik suunata õhuvool või millega on võimalik töötada alandatud rõhu all,
- mehaaniline veski, mida on lihtne puhastada ja mis võimaldab oliiviõli pressimisjääke jahvatada ilma, et nende temperatuur tõuseks või nende niiskuse, lenduvate ainete või heksaaniga ekstraheeruvate ainete sisaldus märkimisväärselt muutuks,
- ekstraheerimishülss ja vatt või filterpaber, millest on heksaaniga ekstraheeruvad ained juba eemaldatud,
- eksikaator,
- sõel, mille avade diameeter on 1 mm,
- enne kuivatatud pimsskivi väikesed terakesed.

1.2. Reaktiiv

Tehniline n-heksaan, millest jääb täielikult aurustamisel 100 ml kohta kuni 0,002 g suurune jääk.

2. TÖÖ KÄIK

2.1. Uuritava proovi ettevalmistamine

Selleks et laboriproovi osakesed mahuksid täielikult läbi sõela, kasutatakse proovi jahvatamiseks vajaduse korral enne korralikult puhastatud mehaanilist veskit.

1/20 proovist kasutatakse veski puhastamiseks, jahvatamisel tekkiv aine visatakse ära, jahvatatakse ülejäänud osa proovist ning seejärel kogutakse see kokku, segatakse hoolikalt ning analüüsitakse kohe.

2.2. Katsekogus

Pärast jahvatamist kaalutakse katse tegemiseks 10 g proovi 0,01 g täpsusega.

2.3. Ekstraheerimishülssi ettevalmistamine

Katsekogus asetatakse hülssi ning suletakse vatitropiga. Filterpaberi kasutamise korral tuleb katsekogus sellesse keerata.

2.4. Eelnev kuivatamine

Kui oliiviõli pressimisjäägid on väga niisked (näiteks kui niiskusesisaldus ja lenduvate ainete sisaldus on üle 10 %), kuivatatakse nad enne, et niiskuse- ja lenduvate ainete sisaldust vähendada, milleks asetatakse laetud hülss (või filterpaber) ettenähtud aja jooksul kuni 80 °C kraadini kuumutatud ahju.

2.5. Ümarapõhjalise kolvi ettevalmistamine

Kolb, milles on üks või kaks ahjus 103 ± 2 °C juures enne kuivatatud pimsskivitera, kaalutakse 1 mg täpsusega ning seda jahutatakse eksikaatoris vähemalt üks tund.

2.6. Esimene ekstraheerimine

Ekstraheerimisaparaati pannakse hülss (või filterpaber), milles on katsekogus. Kolbi valatakse vajalik kogus heksaani. Kolb pannakse ekstraheerimisaparaati ning ekstraheerimisaparaat asetatakse elektriga kuumutatavasse vanni. Kuumutamise kiirust kohandatakse selliselt, et tagasivoolu kiirus oleks vähemalt kolm tilka sekundis (mõõdukas, mitte tugev keemine). Pärast neljatunnist ekstraheerimist lastakse jahtuda. Hülss võetakse ekstraheerimisaparaadist ning asetatakse õhuvoolu, selleks et kõrvaldada suurem osa immutuslahustist.

2.7. Teine ekstraheerimine

Hülssi sisu pannakse mikrojahvatamisaparaati ja see jahvatatakse võimalikult peeneks. Jahvatatud segu pannakse kohe hülssi tagasi ning hülss pannakse tagasi ekstraheerimisaparaati.

Ekstraheerimist jätkatakse täiendavalt kahe tunni jooksul, kasutades sedasama ümarapõhjalist kolbi, milles on esialgne ekstrakt.

Ekstraheerimiskolbis tekkiv lahus peab olema selge. Kui lahus ei ole selge, tuleb seda läbi filterpaberi filtreerida ning pesta algset kolbi ja filterpaberit mitu korda heksaaniga. Filtraat ja pesulahus kogutakse teise ümarapõhjalise kolvi, mis on kuivatatud ning tareeritud 1 mg täpsusega.

2.8. Lahusti eemaldamine ja ekstrakti kaalumise

Suurem osa lahustist eemaldatakse elektrilisel vannil destilleerimisega. Viimased lahustijäägid eemaldatakse kolvi kuumutamisel 20 minutit ahjus temperatuuril 103 ± 2 °C. Eemaldamisel kasutatakse abivahendina teatud ajavahemike järel õhuvoolu, inertgaasi või alandatud rõhku.

Kolb jäetakse vähemalt üheks tunniks eksikaatorisse jahtuma ning kaalutakse 1 mg täpsusega.

Kuumutatakse uuesti 10 minutit samadel tingimustel, jahutatakse eksikaatoris ning kaalutakse uuesti.

Kahe kaalumistulemuse erinevus ei tohi olla suurem kui 10 mg. Kui erinevus on suurem, kuumutatakse kolbi 10 minutit, jahutatakse see ja kaalutakse ning seda korratakse seni, kuni erinevus on 10 mg või väiksem. Kolvi viimane kaal märgitakse üles.

Tehakse uuritava proovi dubleeriv määramine.

3. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

3.1. Arvutamismeetod ja valem

a) Ekstrakt saadud toote massiprotsendina on:

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

kus: S on saadud toote ekstrakti massiprotsent;
 m_0 on katsekoguse mass grammides;
 m_1 on kuiva ekstrakti mass grammides.

Tulemuseks loetakse kahe määramise aritmeetiline keskmine tingimusel, et korratavuse tingimused on täidetud.

Tulemus esitatakse ühe kümnendkoha täpsusega.

b) Ekstrakt on väljendatud kuivainena järgmise valemi alusel:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{ekstrakti õliprotsent kuivainena}$$

kus: S = on saadud toote ekstrakti protsent (vt punkt a),
 U = on selle niiskuse- ja lenduvate ainete sisaldus.

3.2. Korratavus

Ühel ja samal ajal või kohe üksteise järel sama analüüsija poolt tehtud kahe määramise tulemuste erinevus ei tohi olla suurem kui 0,2 g heksaaniekstrakti 100 g proovi kohta.

Kui see tingimus ei ole täidetud, korratakse analüüsi kahe teise katsekogusega. Kui ka nende puhul ületab erinevus 0,2 g, loetakse tulemuseks nelja määramise aritmeetiline keskmine.

XVI LISA

JOODIARVU MÄÄRAMINE

1. KOHALDAMISALA

Käesolev rahvusvaheline standard täpsustab loomsete ja taimsete rasvade ja õlide (edaspidi rasvade) joodiarvu määramise meetodi.

2. MÄÄRATLUS

Käesolevas rahvusvahelises standardis kasutatakse järgmist mõistet:

2.1. *joodiarv*. Joodiarv on proovis neeldunud joodi mass käesolevas rahvusvahelises standardis täpsustatud töötin-

gimustel.

Joodiarvu väljendatakse joodi grammides 100 g proovi kohta.

3. PÕHIMÕTE

Katsekogus lahustatakse lahustis ja sellele lisatakse wijsi reaktiiv. pärast kindlaksmääratud aega lisatakse kaaliumjodiidi lahus ja vesi ning eraldunud jood tiitritakse naatriumtiosulfaadi lahusega.

4. REAKTIIVID

Kõik reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad:

4.1. *vesi*, mis vastab 3. klassi nõuetele vastavalt ISO 3696 standardile.4.2. *kaaliumjodiid*, 100 g/l lahus, mis ei sisalda jodaati ega vaba joodi.4.3. *tärklis*, lahus.

5 g lahustuvat tärklis segatakse 30 ml vees, seejärel lisatakse see segu 1 000 ml keevale veele, keedetakse 3 minutit ning lastakse jahtuda.

4.4. *naatriumtiosulfaat*, standardne tiitrimislahus $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$, standarditud kuni 7 päeva enne kasutamist.4.5. *lahusti*, valmistatud võrdses mahus tsükloheksaanist ja äädikhapest.4.6. *Wijsi reaktiiv*, mis sisaldab joodmonokloriidi äädikhappes. Kasutatakse müügilolevat Wijsi reaktiivi.

5. SEADMED

Tavalised, eelkõige järgmised laboratooriumiseadmed:

5.1. *klaasist kaalumiskühvlid*, mis sobivad katsekoguse kaalumiseks ja kolbidesse (6.2) kandmiseks.5.2. *500 ml Erlenmeyeri kolvid*, lihvkorgiga ja täiesti kuivad .

6. UURITAVA PROOVI ETTEVALMISTAMINE

Homogeniseeritud proov kuivatatakse naatriumsulfaadi kohal ja filtreeritakse.

7. TÖÖ KÄIK

7.1. Katsekogus

Katsekoguse mass on tabelis 1 esitatud hinnanguliste joodiarvude puhul erinev.

Tabel 1

Hinnanguline joodiarv	Katsekoguse mass (g)
vähem kui 5	3,00
5–20	1,00
21–50	0,40
51–100	0,20
101–150	0,13
151–200	0,10

Katsekogus kaalutakse klaasist kaalumiskühvlis (5.1) 0,1 mg täpsusega.

7.2. Määramine

Katsekogus asetatakse 500milliliitrisesse kolbi (5.2). Rasva lahustamiseks lisatakse 20 ml lahustit (4.5). Lisatakse täpselt 25 ml Wijsi reaktiivi (4.6), suletakse punniga, segatakse ning seejärel asetatakse kolb pimedasse. Wijsi reaktiivi ei tohi pipeteerida suuga.

Samal viisi valmistatakse lahusti ja reaktiiviga pimelahus, kuhu ei lisata katsekogust.

Proovide puhul, mille joodiarv on alla 150, jäetakse kolvid pimedasse üheks tunniks; proovide puhul, mille joodiarv on üle 150, ja polümeriseeritud toodete või teatud määrani oksüdeeritud toodete puhul jäetakse kolvid pimedasse kaheks tunniks.

Nimetatud aja möödudes lisatakse mõlemasse kolbi 20 ml kaaliumjodiidi lahust (4.2) ja 150 ml vett (4.1).

Seejärel tiitritakse standardse naatriumtiosulfaadi tiitrimislahusega (4.4) kuni joodist tulenev kollane värv on peaaegu kadunud. Lisatakse paar tilka tärgkliselahust (4.3) ja jätkatakse tiitrimist kuni sinine värv pärast väga tugevat loksutamist ära kaob.

Märkus : Lubatud on lõpp-punkti potentsiomeetriline määramine.

7.3. Määramiste arv

Ühe ja sama prooviga tehakse 2 määramist.

8. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

Joodiarv arvutatakse järgmise valemiga:

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

kus

c = on kasutatud standardse naatriumtiosulfaadi tiitrimislahuse (4.4) täpse kontsentratsiooni arvvaartus milliliitrites liitri kohta;

V_1 = on pimekatses kasutatud standardse naatriumtiosulfaadi tiitrimislahuse (4.4) mahu arvvaartus milliliitrites;

V_2 = on määramisel kasutatud standardse naatriumtiosulfaadi tiitrimislahuse (4.4) mahu arvvaartus milliliitrites;

m = on katsekoguse (7.1) massi arvvaartus grammides.

Tulemuseks loetakse kahe määramise aritmeetiline keskmine tingimusel, et korratavuse nõue on täidetud.