

Tämä asiakirja on ainoastaan dokumentointitarkoituksiin. Toimielimet eivät vastaa sen sisällöstä.

► **B****KOMISSION ASETUS (ETY) N:o 2568/91,****annettu 11 päivänä heinäkuuta 1991,****oliiviöljyn ja uutetun oliiviöljyn ominaisuuksista sekä niiden määritysmenetelmistä**

(EYVL L 248, 5.9.1991, s. 1)

Muutettu:

	virallinen lehti		
	N:o	sivu	päivämäärä
► M1 Komission asetus (ETY) N:o 3682/91, annettu 17 päivänä joulukuuta 1991	L 349	36	18.12.1991
► M2 Komission asetus (ETY) N:o 1429/92, annettu 26 päivänä toukokuuta 1992	L 150	17	2.6.1992
► M3 Komission asetus (ETY) N:o 1683/92, annettu 29 päivänä kesäkuuta 1992	L 176	27	30.6.1992
► M4 Komission asetus (ETY) N:o 1996/92, annettu 15 päivänä heinäkuuta 1992	L 199	18	18.7.1992
► M5 Komission asetus (ETY) N:o 3288/92, annettu 12 päivänä marraskuuta 1992	L 327	28	13.11.1992
► M6 Komission asetus (ETY) N:o 183/93, annettu 29 päivänä tammikuuta 1993	L 22	58	30.1.1993
► M7 muutettu commission Regulation (EEC) No 826/93 of 6 April 1993 (*)	L 87	6	7.4.1993
► M8 Komission asetus (ETY) N:o 620/93, annettu 17 päivänä maaliskuuta 1993	L 66	29	18.3.1993
► M9 Komission asetus (EY) N:o 177/94, annettu 28 päivänä tammikuuta 1994	L 24	33	29.1.1994
► M10 Komission asetus (EY) N:o 2632/94, annettu 28 päivänä lokakuuta 1994	L 280	43	29.10.1994
► M11 Komission asetus (EY) N:o 656/95, annettu 28 päivänä maaliskuuta 1995	L 69	1	29.3.1995
► M12 Komission asetus (EY) N:o 2527/95, annettu 27 päivänä lokakuuta 1995	L 258	49	28.10.1995
► M13 Komission asetus (EY) N:o 2472/97, annettu 11 päivänä joulukuuta 1997	L 341	25	12.12.1997
► M14 Komission asetus (EY) N:o 282/98, annettu 3 päivänä helmikuuta 1998	L 28	5	4.2.1998
► M15 Komission asetus (EY) N:o 2248/98, annettu 19 päivänä lokakuuta 1998	L 282	55	20.10.1998

(*) Tätä asiakirjaa ei ole julkaistu suomenkielisenä.



KOMISSION ASETUS (ETY) N:o 2568/91,

annettu 11 päivänä heinäkuuta 1991,

oliiviöljyn ja uutetun oliiviöljyn ominaisuuksista sekä niiden määrittymenetelmistä

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon rasva-alan yhteisestä markkinajärjestelystä 22 päivänä syyskuuta 1966 annetun neuvoston asetuksen 136/66/ETY⁽¹⁾, sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (ETY) N:o 3577/90⁽²⁾, ja erityisesti sen 35 a artiklan,

sekä katsoo, että

asetuksen 136/66/ETY liitteessä määrätään kussakin jäsenvaltiossa sekä yhteisön maiden välisessä ja kolmansien maiden kanssa käytävässä kaupassa kaupan pidettävän puristetun oliiviöljyn ja uutetun oliiviöljyn nimityksistä ja määrittelmistä,

eri öljytyyppien erottamiseksi toisistaan kunkin tyyppin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ja neitsytöljyn aistinvaraiset ominaisuudet on syytä määrittellä kyseisten tuotteiden puhtauden ja laadun takaamiseksi, sanotun kuitenkin rajoittamatta muiden voimassa olevien tätä koskevien säännösten soveltamista,

eri öljytyyppien ominaisuuksien esiintyminen olisi määritettävä yhtenäisesti kaikkialla yhteisössä; tätä varten on syytä vahvistaa yhteisön menetelmät kemiallista määrittystä ja aistinvaraista arviointia varten; siirtymäkauden aikana olisi kuitenkin sallittava jäsenvaltioissa sovellettavien muiden määrittymenetelmien käyttö ottaen kuitenkin huomioon, että jos tulokset ovat erilaisia, yhteisellä menetelmällä saadut tulokset ovat ratkaisevia,

oliiviöljyn fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien sekä määrittymenetelmien määrittäminen johtaa yhdistetyn nimikkeistön 15 ryhmän lisähuomautusten mukauttamiseen,

neitsytöljyn aistinvaraisten ominaisuuksien arviointimenetelmään kuuluu valituista ja koulutetuista maistajista koostuvien raatien muodostaminen; tämän vuoksi olisi säädettävä tällaisen järjestelyn luomiseen tarvittavasta määräajasta; ottaen huomioon joidenkin jäsenvaltioiden vaikeudet maistajien raadin muodostamisessa olisi sallittava muiden jäsenvaltioiden raatien käyttö,

oliivijätteiden tuontiin sovellettavan tuontimaksujärjestelmän moitteetoman toiminnan varmistamiseksi olisi säädettävä yhtenäisestä menetelmästä näiden tuotteiden öljypitoisuuden määrittämiseksi,

on suotavaa säätää ennen tämän asetuksen voimaantuloa pakatun öljyn myyntiä koskevasta määräajasta, jottei kaupalle aiheutuisi haittaa,

on syytä kumota komission asetus (ETY) N:o 1058/77⁽³⁾, sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (ETY) N:o 1858/88⁽⁴⁾, ja

rasvojen hallintokomitea ei ole antanut lausuntoa puheenjohtajansa asettamassa määräajassa,

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

1 Öljyjä, joiden ominaisuudet ovat tämän asetuksen liitteessä I olevassa 1, 2 ja 3 kohdassa määritettyjen ominaisuuksien mukaiset,

⁽¹⁾ EYVL N:o 172, 30.9.1966, s. 3025/66

⁽²⁾ EYVL N:o L 353, 17.12.1990, s. 23

⁽³⁾ EYVL N:o L 128, 24.5.1977, s. 6

⁽⁴⁾ EYVL N:o L 166, 1.7.1988, s. 10

▼B

pidetään asetuksen N:o 136/66/ETY liitteessä olevissa 1 a, 1 b ja 1 c kohdassa tarkoitettuina neitsytoliiviöljyinä.

2 Öljyä, jonka ominaisuudet ovat tämän asetuksen liitteessä I olevassa 4 kohdassa määritettyjen ominaisuuksien mukaiset, pidetään asetuksen N:o 136/66/ETY liitteessä olevassa 1 d kohdassa tarkoitettuna oliivilamppuöljynä.

3 Öljyä, jonka ominaisuudet ovat tämän asetuksen liitteessä I olevassa 5 kohdassa määritettyjen ominaisuuksien mukaiset, pidetään asetuksen N:o 136/66/ETY liitteessä olevassa 2 kohdassa tarkoitettuna puhdistettuna oliiviöljynä.

4 Öljyä, jonka ominaisuudet ovat tämän asetuksen liitteessä I olevassa 6 kohdassa määritettyjen ominaisuuksien mukaiset, pidetään asetuksen N:o 136/66/ETY liitteessä olevassa 3 kohdassa tarkoitettuna oliiviöljynä.

5 Öljyä, jonka ominaisuudet ovat tämän asetuksen liitteessä I olevassa 7 kohdassa määritettyjen ominaisuuksien mukaiset, pidetään asetuksen N:o 136/66/ETY liitteessä olevassa 4 kohdassa tarkoitettuna raakana uutettuna oliiviöljynä.

6 Öljyä, jonka ominaisuudet ovat tämän asetuksen liitteessä I olevassa 8 kohdassa määritettyjen ominaisuuksien mukaiset, pidetään asetuksen N:o 136/66/ETY liitteessä olevassa 5 kohdassa tarkoitettuna puhdistettuna uutettuna oliiviöljynä.

7 Öljyä, jonka ominaisuudet ovat tämän asetuksen liitteessä I olevassa 9 kohdassa määritettyjen ominaisuuksien mukaiset, pidetään asetuksen N:o 136/66/ETY liitteessä olevassa 6 kohdassa tarkoitettuna uutettuna oliiviöljynä.

▼M15

8 Kuitenkin markkinointivuosien 1998/1999 - 2000/2001 osalta katsotaan asetuksen N:o 136/66/ETY liitteessä olevan 1 kohdan a, b, c ja d alakohdassa tarkoitetuksi neitsytoliiviöljyksi myös irtotavarana tai tuotetta lähinnä olevassa pakkauksessa, jonka sisällön nettopaino on vähintään 100 kilogrammaa, ovat öljyt, jotka ovat kokonaan peräisin Marokosta, joiden ominaisuudet ovat tämän asetuksen liitteessä I olevassa 1, 2, 3 ja 4 kohdassa määritettyjen ominaisuuksien mukaiset ja joiden linoleenihappopitoisuus on 1 ja 2 kohdasta poiketen enintään 1,0 prosenttia.

▼B*2 artikla*

1 Niiden öljyjen, joista määrätään liitteessä I, ominaisuudet määritetään seuraavia määrittämenetelmiä noudattaen:

- oleiinihappoprosentteina ilmaistavien vapaiden rasvahappojen määrittäminen liitteen II menetelmällä,
- peroksidiluvun määrittäminen liitteen III menetelmällä,
- alifaattisten alkoholien määrittäminen liitteen IV menetelmällä,
- sterolipitoisuuden määrittäminen liitteen V menetelmällä,
- erytrodiolin ja uvaolin määrittäminen liitteen VI menetelmällä,
- triglyseridin 2-asemassa olevien tyydyttyneiden rasvahappojen määrittäminen liitteen VII menetelmällä,
- trilinoleiinipitoisuuden määrittäminen liitteen VIII menetelmällä,
- spektrofotometrinen määrittäminen liitteen IX menetelmällä,
- rasvahappokoostumuksen määrittäminen liitteiden X A ja X B menetelmällä,
- haihtuvien halogeeniliuottimien määrittäminen liitteen XI menetelmällä,
- neitsytoliiviöljyn aistinvaraisten ominaisuuksien arviointi liitteen XII menetelmällä 2 kohdan mukaisesti sovellettuna,
- öljyn puhdistuksen toteaminen liitteen XIII menetelmällä,

▼M11

- stigmastadieenien määrittäykseen liitteessä XVII kuvattu menetelmä,

▼M13

— triglyseridien koostumuksen määrittämiseen ECN42:na liitteessä XVIII kuvattu menetelmä.

▼B

2 Aistinvaraiset ominaisuudet arvioi ►**M3** maistaja, joka on aistinvaraisen määrittämisen asiantuntija tai jota asiantuntijat avustavat ◀ liitteen XII lomakkeessa esitettyä maistamismenettelyä noudattaen. Kun arvio on ristiriidassa tuotteen nimityksen kanssa, maistajan on annettava näyte maistajien raadin tutkittavaksi liitteen XII määräysten mukaisesti.

Maistajien raadin on tehtävä mahdolliset uusintamäärittäykset näiden määräysten mukaisesti.

Kun aistinvaraiset ominaisuudet arvioidaan interventiojärjestelmään liittyvien toimien toteuttamisen aikana, maistajien raati tekee tämän arvion liitteen XII mukaisesti.

▼M15

3 Näytteiden otto liitteessä I säädettyjen oliiviöljyjen ominaisuuksien määrittämistä varten suoritetaan näytteen valmistelun osalta kansainvälisen standardin EN ISO 661 mukaisesti.

▼B*3 artikla*

Edellä 2 artiklassa säädettyjen määrittämenetelmien käyttöönotto ei estä jäsenvaltioita käyttämästä muita kokeiltuja ja tieteellisesti päteviä menetelmiä ►**M6** 28 päivään helmikuuta 1993 ◀, jos tästä ei aiheudu haittaa sellaisten tuotteiden liikkuvuudelle, jotka on yhteisön menetelmin todettu voimassa olevien säännösten mukaisiksi. Ennen tällaisten muiden menetelmien käyttöä jäsenvaltioiden on ilmoitettava niistä komissiolle.

Kun jollakin näistä muista menetelmistä saadaan eri tulos kuin yhteisön menetelmällä, viimeksi mainitulla menetelmällä saatua tulosta pidetään ratkaisevana.

▼M5*3 a artikla*

Jos kaupallisten liiketoimien kohteena olevan oliiviöljyn aistinvaraisissa ominaisuuksissa on poikkeamia, asianomaiset osapuolet voivat kääntyä valitsemansa hyväksytyin maistajien raadin puoleen.

3 b artikla

Kun öljyn aistinvaraisten ominaisuuksien havaitaan olevan erilaiset kuin sen nimityksestä johtuvat ominaisuudet, kyseisen jäsenvaltion on sovellettava hallinnollisia rahamääräisiä seuraamuksia, joiden määrä vahvistetaan havaitun poikkeaman vakavuuden mukaisesti, sanotun kuitenkaan rajoittamatta muiden mahdollisten seuraamusten soveltamista.

Poikkeaman arvioinnissa otetaan erityisesti huomioon tavanomaisissa olosuhteissa säilytetyn öljyn ominaisuuksien luonnollinen kehittyminen.

Jäsenvaltioiden on annettava komissiolle tiedoksi kunkin vuosipuoliskon alussa havaittujen poikkeamien määrä ja luonne sekä edellisen vuosipuoliskon aikana sovelletut seuraamukset.

4 artikla

1 Aistinvaraisten ominaisuuksien arvioimiseksi jäsenvaltioiden on perustettava maistajien raateja, jotka vastaavat näiden ominaisuuksien virallisesta tarkastuksesta ja joiden on täytettävä seuraavat edellytykset:

- niiden on koostuttava valikoiduista maistajista, jotka on koulutettu liitteen XII menetelmän sääntöjä noudattaen,
- niillä on oltava laitteet ja aineistot, joita tarvitaan edellä mainitun menetelmän sääntöjen mukaisessa aistinvaraisessa arvioinnissa,

▼M5

- niiden on käytettävä mainitun menetelmän edellyttämää oliiviöljyn aistinvaraisen määrittämisen erityissanastoa, profiililomaketta ja arvostelutaulukkoa,
- niiden on järjestettävä aistinvaraisia arviointeja yhteisön tai kansainvälisellä tasolla määräraikaistarkastusten ja havaitsemisperusteiden yhdenmukaistamiskokousten yhteydessä,
- niiden on toimitettava komissiolle vuosittain kaikki raatien perustamisessa tapahtuneita muutoksia ja hyväksytyt raadin ominaisuudessa suoritettuja arviointikertoja koskevat tiedot.

Kunkin jäsenvaltion on hyväksyttävä raadit, jotka täyttävät edellä esitetyt edellytykset ja jotka on perustettu sen omalle alueelle. Sen on valittava niistä yksi raati vastaamaan tarkastusmäärityksistä.

Raateja, jotka jäsenvaltiot ovat perustaneet ennen 1 päivää marraskuuta 1992 liitteen XII menetelmän edellyttämiä sääntöjä noudattaen, on pidettävä hyväksytyinä tässä artiklassa tarkoitetulla tavalla.

Kunkin jäsenvaltion on annettava tiedoksi hyväksytyjen raatien luettelo sekä komissiolle että jäsenvaltioille.

2 Jos jäsenvaltiolla on vaikeuksia maistajien raadin perustamisessa omalle alueelleen, se voi käyttää toisen jäsenvaltion hyväksyttyä maistajien raatia.

3 Kunkin jäsenvaltion on laadittava luettelo ammattijärjestöjen tai ammattien välisten järjestöjen 1 kohdan edellytysten mukaisesti perustamista maistajien raadeista ja niiden on valvottava näiden edellytysten noudattamista.

▼M6*5 artikla*

Korvataan neuvoston asetuksen (ETY) N:o 2658/87⁽¹⁾ liitteessä I olevan yhdistetyn nimikkeistön 15 ryhmän 2, 3 ja 4 lisähuomautus tämän asetuksen liitteellä XIV.

▼B*6 artikla*

1 Oliiviöljyn erottamisesta syntyneen öljykakun ja muiden yhdistetyn nimikkeistön CN-koodeihin 2306 90 11 ja 2306 90 19 kuuluvien jätteiden öljypitoisuus määritetään liitteen XV menetelmän mukaisesti.

2 Edellä 1 kohdassa tarkoitettu öljypitoisuus ilmaistaan öljyn painoprosenttina kuiva-aineesta.

7 artikla

Muiden kuin liitteessä XI tarkoitettujen haitallisten aineiden osalta sovelletaan niiden esiintymistä koskevia yhteisön säännöksiä.

8 artikla

1 Jäsenvaltioiden on ilmoitettava komissiolle tämän asetuksen soveltamiseksi toteutetut toimenpiteet.

2 Kunkin vuosipuoliskon alussa jäsenvaltioiden on toimitettava komissiolle tiedoksi yhteenveto edellisen vuosipuoliskon aikana tehtyjen määrittysten tuloksista.

Rasvojen hallintokomitea tutkii nämä tulokset asetuksen N:o 136/66/ETY 39 artiklassa säädettyä menettelyä noudattaen.

9 artikla

Kumotaan asetus (ETY) N:o 1058/77.

⁽¹⁾ EYVL N:o L 256, 7.9.1987, s.1.

▼B*10 artikla*

1 Tämä asetus tulee voimaan seuraavana päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan yhteisöjen virallisessa lehdessä*. Liitteen XII menetelmä on kuitenkin otettava käyttöön ►**M1** 1 päivästä marraskuuta 1992 ◀, interventioon liittyviä toimia lukuun ottamatta.

▼M5

Tämä menetelmä ei koske ennen 1 päivää marraskuuta 1992 pakattuja neitsytoliiviöljyjä.

▼B

2 Tämä asetus ei koske ennen tämän asetuksen voimaantuloa pakattua ja 31 päivään lokakuuta 1992 asti kaupan pidettyä oliiviöljyä tai uutettua oliiviöljyä.

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaiseen kaikissa jäsenvaltioissa.

▼B*LIITTEET***Yhteenveto**

- Liite I Oliiviöljyn ominaisuudet...
- Liite II Vapaiden rasvahappojen määrittäminen...
- Liite III Peroksidiluvun määrittäminen...
- Liite IV ►**M6** Vahapitoisuuden määrittäminen kapillaarikaasukromatografisella menetelmällä ◀ ...
- Liite V Sterolien rakenteen ja pitoisuuden määrittäminen kapillaarikaasukromatografisella menetelmällä ...
- Liite VI Erytrodioli- ja uvaolipitoisuuden määrittäminen...
- Liite VII Triglyseridin 2-asemassa olevien tyydyttyneiden rasvahappojen määrittäminen...
- Liite VIII Trilinoleiinipitoisuuden määrittäminen...
- Liite IX Spektrofotometrinen määrittäminen...
- Liite X A Rasvahappojen metyyliestereiden määrittäminen kaasukromatografisella menetelmällä ...
- Liite X B Rasvahappojen metyyliestereiden valmistaminen ...
- Liite XI Haihtuvien halogeeniliuottimien pitoisuuden määrittäminen oliiviöljystä ...
- Liite XII Neitsytoliiviöljyn aistinvarainen arviointi...
- Liite XIII ►**M6** Oliiviöljyn neutraloiminen ja värin poisto laboratoriossa ◀ ...
- Liite XIV Yhdistetyn nimikkeistön 15 ryhmän lisähuomautukset 2, 3 ja 4...
- Liite XV Oliivijätteen öljypitoisuus ...
- Liite XVI Jodiluvun määrittäminen...
- ▼M11 Liite XVII Menetelmä stigmastadieenien määrittämiseksi kasviöljyistä ...
- ▼M13 Liite XVIII: Menetelmä triglyseridien koostumuksen määrittämiseksi ECN42:na ...

LIITE I

OLIIVIÖLJYN OMINAISUUDET

Luokka	Happamuus (%) (*)	Peroksidiluku mekv 02/kg (*)	Halogeeniliuottimet mg/kg (*) (1)	Vahat mg/kg	Triglyseridin 2-asemassa olevat tyydyttyneet rasvahapot (%)	Stigmastadieni (2)	HPLC:llä määritetty ja teoreettisesti lasketun ECN42:n rasvahapot välinen ero	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	K ₂₇₀ alumiinioksidikäsittelyn jälkeen (3)	Delta-K (*)	Raadin arvostelu (*)
1. Ekstra-neitsylioliiviöljy	≤ 1,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,01	≥ 6,5
2. Neitsylioliiviöljy	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	≥ 5,5
3. Yleisen kauppalaadun neitsylioliiviöljy	≤ 3,3	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	≥ 3,5
4. Oliivilamppuöljy	> 3,3	> 20	> 0,20	≤ 350	≤ 1,3	≤ 0,50	≤ 0,3	≤ 3,70	> 0,25	≤ 0,11	—	< 3,5
5. Puhdistettu oliiviöljy	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,40	≤ 1,20	—	≤ 0,16	—
6. Oliiviöljy	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,30	≤ 1,00	—	≤ 0,13	—
7. Raaka uutettu oliiviöljy	> 0,5	—	—	—	≤ 1,8	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
8. Puhdistettu uutettu oliiviöljy	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	—	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,50	≤ 2,50	—	≤ 0,25	—
9. Uutettu oliiviöljy	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,30	≤ 2,00	—	≤ 0,20	—

(1) Elektromikaappausdetektorin havaitsemien yhdisteiden yleinen yläraja.

Kunkin yksittäin havaitun yhdisteen yläraja on 0,10 mg/kg.

(2) Sellaisten isomeerien yhteismäärä, joka voidaan (tai ei voida) erottaa kapillaarikoilonnin avulla.

(3) Jos K₂₇₀ ylittää kyseisen luokan raja-arvon, K₂₇₀ on määritettävä uudelleen alumiinioksidikäsittelyn jälkeen, jotta puhdistetun öljyn esiintymisen voidaan tarkistaa.

Huom.

Analyyysien tuloksissa on ilmoitettava sama määrä desimaaleja kuin kutakin ominaisuutta varten on säädetty.

Viimeinen luku on pyöristettävä ylempään yhdellä yksiköllä, jos seuraava luku on suurempi kuin 4.

Kun yksikin ominaisuus poikkeaa annetuista arvoista, voidaan muuttaa öljyn luokkaa tai olla hyväksymättä sen puhtausarvoa.

Tähdellä (*) merkityt ominaisuudet, jotka viittaavat öljyn laatuun, tarkoittavat että:

— oliivilamppuöljyn osalta siihen liittyviä rajoja (lukuun ottamatta K₂₃₂:ta) ei tarvitse noudattaa samanaikaisesti;

— muiden neitsylioliiviöljyjen osalta luokkaa vaihtuu, jos yhtäkään näistä rajoista ei noudateta, mutta ne kuitenkin luokitellaan neitsylioliiviöljyiksi.

▼ M13

Luokka	Happopitoisuudet						Transoleiniinierthen yhteismäärä (%)	Translinoli ja translinoliteeni-erthen yhteismäärä (%)	Kolesterooli (%)	Brassikasteroli (%)	Kapes-teroli (%)	Stigmas-teroli (%)	Beetas-teroli (°) (%)	Delta-7-Stigmas-teroli (%)	Sterolit yhteensä (mg/kg)	Erythrodo-lija uvaoli (%)
	Myristiini (%)	Linoleeni (%)	Arakidon (%)	Eiko-saeni (%)	Behen (%)	Lignoser-iini (%)										
1. Ekstra-neitsytoliiviöljy	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5	
2. Neitsytoliiviöljy	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5	
3. Yleisen kauppalaadun neitsytoliiviöljy	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5	
4. Oliivilamppuöljy	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5	
5. Puhdistettu oliiviöljy	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5	
6. Oliiviöljy	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5	
7. Raaka uutettu oliiviöljy	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2500	≥ 12	
8. Puhdistettu uutettu oliiviöljy	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1800	≥ 12	
9. Uutettu oliiviöljy	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1600	> 4,5	

(°) Delta-5,23-stigmastadienoli + klosterooli + sitosteroli + sitostanoli + delta-5-avenasteroli + delta-5,24-stigmastadienoli.

Huom.

Analyyseiden tuloksissa on ilmoitettava sama määrä desimaaleja kuin kutakin ominaisuutta varten on säädetty.

Viimeinen luku on pyöristettävä ylöspäin yhdellä yksiköllä, jos seuraava luku on suurempi kuin 4.

Kun yksikin ominaisuus poikkeaa annetuista arvoista, voidaan muuttaa öljyn luokkaa tai olla hyväksymättä sen puhtausarvoa.



LIITE II

VAPAI DEN RASVAHAPPOJEN MÄÄRITTÄMINEN

1 TARKOITUS

Vapaiden rasvahapojen määrittäminen oliiviöljyistä. Vapaiden rasvahapojen pitoisuus ilmaistaan tavanomaisesti laskettuna happamuutena.

1.1 Periaate

Näyte liuotetaan liuotinseokseen ja vapaat rasvahapot titrataan kaliumhydroksidin etanoliliuoksella.

1.2 Reagenssit

Kaikkien reagenssien on oltava määrittämiseen hyväksytyä analyysilaatua ja veden on oltava joko tislattua tai vastaavaa puhtausastetta.

1.2.1 Dietyylieetteri ja 95-prosenttinen etanoli (V/V), yhtä suuret tilavuusosat kumpaakin.

Huom.: Dietyylieetteri on helposti syttyvää ja voi muodostaa räjähtäviä peroksiedeja. Sen käytössä on oltava erittäin varovainen.

Seos, johon on lisätty 0,3 ml fenoliftaleiiniliuosta (1.2.3) 100 ml:aan, neutraloidaan juuri ennen käyttöä kaliumhydroksidiliuoksella (1.2.2),

Huom.: Jos ei voida käyttää dietyylieetteriä, voidaan käyttää etanolin ja toluenin seosta. Etanoli voidaan tarvittaessa korvata 2-propanolilla.

1.2.2 Kaliumhydroksidi titrattuna etanoliliuoksena, c(KOH) noin 0,1 mol/l tai tarvittaessa c(KOH) noin 0,5 mol/l.

Kaliumhydroksidin etanoliliuoksen tarkka väkevyys on tunnettava ja tarkistettava juuri ennen käyttöä. Käytetään liuosta, joka on valmistettu vähintään viisi vuorokautta ennen käyttöä ja dekantoitu ruskeaan lasipulloon, jossa on kumitulppa. Liuoksen on oltava väritöntä tai oljenkeltaista.

Huom.: Väritön, stabiili kaliumhydroksidiliuos voidaan valmistaa seuraavasti. Kuumennetaan kiehuvaan 1 000 ml etanolia, johon on lisätty 8 g kaliumhydroksidia ja 0,5 g alumiinilastuja, ja keitetään seosta yksi tunti palautusjäähdyttimen kanssa. Tislataan välittömästi. Tisleeseen liuotetaan tarvittava määrä kaliumhydroksidia. Annetaan seistä useita vuorokausia ja dekantoidaan kirkas neste, joka on kaliumkarbonaattisakan yläpuolella.

Liuos voidaan myös valmistaa ilman tislausta seuraavasti: lisätään 4 ml alumiinibutylaattia 1 000 ml:aan etanolia ja seoksen annetaan seistä joitakin vuorokausia. Dekantoidaan sakan yläpuolinen neste ja liuotetaan siihen tarvittava määrä kaliumhydroksidia. Liuos on käyttövalmis.

1.2.3 Fenoliftaleiini, 10 g liuotettuna litraan 95- tai 96-prosenttista etanolia (V/V) tai, jos rasva on kovin tummaa, alkalisini, 20 g liuotettuna litraan 95- tai 96-prosenttista etanolia (V/V).

1.3 Välineistö

Tavanomainen laboratoriovälineistö ja erityisesti:

1.3.1 Analyysivaaka

1.3.2 Erlenmeyerpullo, 250 ml

1.3.3 Byretti, 10 ml, mitta-asteikon jakoväli 0,05 ml.

1.4 Suoritus

1.4.1 Näytteen esikäsittely määrittämistä varten

Määrittäminen tehdään suodatetusta näytteestä. Jos veden ja epäpuhtauksien kokonaispitoisuus on pienempi kuin 1 %, voidaan määrittäminen tehdä näytteestä sellaisenaan.

1.4.2 Näytteenotto

Näyte otetaan oletetun happamuuden perusteella seuraavan taulukon mukaan:

▼B

Oletettu happoluku	Näytemäärä (g)	Näytteen punnitustarkkuus (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

Näyte punnitaan erlenmeyerpullossa (1.3.2).

1.4.3 Määrittäminen

Näyte (1.4.2) liuotetaan 50—150 ml:aan ennalta neutraloitua dietyylieteri/etanoli-seosta (1.2.1).

Titraataan, koko ajan sekoittaen, 0,1 mol/l kaliumhydroksidiliuoksella (1.2.2) (ks. Huom. 2), kunnes indikaattorin väri muuttuu (fenoliftaleiinin vaaleanpunainen väri säilyy vähintään 10 sekunnin ajan).

Huom. 1 Titratu kaliumhydroksidin etanoliliuos (1.2.2) voidaan korvata kalium- tai natriumhydroksidin vesiliuoksella, jos lisätty vesi ei aiheuta faasien erottumista.

Huom. 2 Jos 0,1 mol/l kaliumhydroksidiliuosta tarvitaan enemmän kuin 10 ml, käytetään 0,5 mol/l liuosta.

Huom. 3 Jos liuos samenee titrattaessa, liuotinseosta (1.2.1) lisätään tarpeen mukaan, kunnes liuos on kirkasta.

1.5 **Happamuus: ilmaistuna oleiinihappoprosentteina**

Happamuus painoprosentteina ilmaistuna on:

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

jossa:

V = titratun kaliumhydroksidiliuoksen tilavuus millilitroina;

c = titratun kaliumhydroksidiliuoksen tarkka pitoisuus moolia/litra;

M = tuloksen ilmaisemiseen käytetyn hapon moolimassa g/mol (= 282);

m = näytteen massa grammoina.

Tulos on kahden määrittäksen tulosten aritmeettinen keskiarvo.



LIITE III

PEROKSIDILUVUN MÄÄRITTÄMINEN

1 TARKOITUS

Tämä standardi kuvaa rasvojen ja öljyjen peroksidiluvun määrittämissä menetelmissä.

2 SOVELTAMISALA

Tämä standardi soveltuu eläin- ja kasvirasvojen sekä -öljyjen tutkimiseen.

3 MÄÄRITELMÄ

Peroksidiluku ilmaisee näytteessä olevien kaliumjodidien hapettavien aineiden määrän (ilmaistuna aktiivisen hapen milliekvivalentteina kilogrammaa kohti) tässä kuvatuissa koeolosuhteissa.

4 PERIAATE

Näyte liuotetaan etikkahapon ja kloroformin seokseen ja käsitellään kaliumjodidilla. Vapautuva jodi titrataan natriumtiosulfaattiliuoksella.

5 VÄLINEISTÖ

Käytettävien laitteiden on oltava puhtaita siten, että niissä ei ole mitään hapettavia tai pelkistäviä aineita.

Huom.: Hiottuja lasipintoja ei saa rasvata.

5.1 Punnituslasi, 3 ml.

5.2 Lasipulloja, vetoisuus noin 250 ml, hiotut suut ja tulpat, etukäteen kuivattu ja täytetty puhtaalla, kuivalla inerttikaasulla (tyypellä tai mieluummin hiilidioksidilla).

5.3 Byretti, 25 tai 50 ml, mitta-asteikon jakoväli 0,1 ml.

6 REAGENSIT

6.1 Analyysilaatuinen kloroformi, josta happi on poistettu puhtaalla, kuivalla inerttikaasuvirralla tapahtuvalla kaasuhuuhtelulla.

6.2 Analyysilaatuinen jäätikka, josta happi on poistettu puhtaalla, kuivalla inerttikaasuvirralla tapahtuvalla kaasuhuuhtelulla.

6.3 Kaliumjodidin tuore, kyllästetty vesiliuos, joka ei sisällä jodia eikä jodaatteja.

6.4 Natriumtiosulfaatin vesiliuos, 0,01 tai 0,002 N, normalisoitu huolellisesti juuri ennen käyttöä.

6.5 Tärkkelysliuos, 10 g/l vesidispersio, liukoisesta luonnon tärkkelyksestä valmistettu tuore liuos.

7 NÄYTE

Huolehditaan siitä, että näyte otetaan ja säilytetään pimeässä ja kylmässä, ja että sen lasisissa säilytysastioissa ei ole tyhjää tilaa. Astiat on suljettava ilmatiiviisti joko hiotuilla lasitulvilla tai korkilla.

8 SUORITUS

Määrittäminen tehdään hajapäivänvalossa tai keinovalossa. Näyte punnitaan 0,001 g:n tarkkuudella punnitussalasissa (5.1) tai, ellei sellaista ole, pullossa (5.2). Tarvittava näytemäärä riippuu oletetusta peroksidiluvusta seuraavan taulukon mukaan:

▼B

Oletettu peroksidiluku (meq O ₂ /kg)	Näytemäärä (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

Avataan pullo (5.2) ja asetetaan sisään punnituslasi, jossa on näyte. Lisätään 10 ml kloroformia (6.1). Liuotetaan näyte nopeasti sekoittaen. Lisätään 15 ml etikkahappoa (6.2), sitten 1 ml kaliumjodidiliuosta (6.3). Suljetaan pullo nopeasti, ravistetaan yksi minuutti ja annetaan seistä tasan viisi minuuttia pimeässä 15—25 °C:n lämpötilassa.

Lisätään noin 75 ml tislattua vettä. Vapautunut jodi titrataan natriumtiosulfaattiliuoksella (6.4) (jos oletettu peroksidiluku on alle 12, käytetään 0,002 N liuosta ja jos se on yli 12, käytetään 0,01 N liuosta) voimakkaasti sekoittaen ja indikaattorina käytetään tärkkelysluosta (6.5).

Samasta näytteestä tehdään kaksi määritystä.

Sokeakoe tehdään samanaikaisesti. Jos sen tulos on suurempi kuin 0,05 ml 0,01 N natriumtiosulfaattiliuosta (6.4), ovat reagenssit olleet epäpuhtaita ja ne on vaihdettava.

9 TULOSTEN ESITTÄMINEN

Peroksidiluku (PV), ilmaistuna aktiivisen hapen milliekvivalenteina kilogrammaa kohti, saadaan kaavasta:

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

jossa:

V = määritykseen käytetyn normalisoidun natriumtiosulfaattiliuoksen (6.4) määrä millilitroina, korjattuna sokeakokeen tuloksilla;

T = määritykseen käytetyn natriumtiosulfaattiliuoksen (6.4) tarkka normaalisuus;

m = näytteen massa grammoina.

Tulos on kahden määrityksen tulosten aritmeettinen keskiarvo.

▼M6

LIITE IV

VAHAPITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN KAPILLAARIKAASUKROMATOGRAFISELLA MENETELMÄLLÄ

1 TARKOITUS

Tällä menetelmällä määritetään koeolosuhteissa tiettyjen rasvojen vahapitoisuus.

Tätä menetelmää voidaan käyttää erityisesti erottamaan puristamalla ja uuttamalla saatu oliiviöljy.

2 PERIAATE

Rasva, johon on lisätty soveltuva sisäinen standardi, fraktioidaan kromatografisesti hydratoitua silikageeliä sisältävässä kolonnissa; koeolosuhteissa (joissa polarisuus on triglyseridien polarisuutta heikompi) ensimmäisenä eluoitunut jae otetaan talteen ja määritetään suoraan kapillaarikaasukromatografian avulla.

3 VÄLINEET

3.1 25 ml erlenmeyer-pullo.

3.2 Lasikolonne kromatografiaa varten, jonka sisähalkaisija on 15,0 mm ja pituus 30 - 40 cm.

3.3 Soveltuva kaasukromatografialaitteisto ja kapillaarikolonne, jossa on suoraan kolonniin johtava järjestelmä, jonka osat ovat:

3.3.1 termostaattisäätöinen uuni kolonnille, joka pitää halutun lämpötilan ± 1 °C:n tarkkuudella,

3.3.2 kylmäinjektor, kolonniin suoraan syöttämiseksi,

3.3.3 liekki-ionisaatiodektoori sekä muuntajavahvistin,

3.3.4 soveltuva integraattori- ja muuntajavahvistimen (3.3.3) kanssa ja jonka vastenopeus on enintään 1 sekunti ja jonka paperin nopeutta voidaan säätää,

3.3.5 lasinen tai kvartsilasinen kapillaarikolonne: pituus 10 - 15 mm, sisähalkaisija 0,25 - 0,35 mm päällystettynä sisäpuolelta SE-52 tai SE-54 - nesteellä tai vastaavalla, paksuudeltaan tasaisesti 0,10 - 0,30 μm .

3.4 Mikroruisku, kolonniin suoraan syöttämiseksi, 10 μl , jossa on kovetettu neula.

4 REAGENSIT

4.1 Silikageeli 70 - 230 mesh, art. 7754 Merck.

Silikageeli laitetaan uuniin 500 °C:n lämpötilaan 4 tunniksi. Jäähdytetään ja lisätään 2 % vettä. Sekoitetaan massan homogenoimiseksi. Säilytetään pimeässä vähintään 12 tuntia ennen käyttöä.

4.2 n-Heksaania, kromatografiaa varten.

4.3 Etyylieetteriä, kromatografiaa varten.

4.4 n-Heptaania, kromatografiaa varten.

4.5 Lauryylirakidaatin standardiliuos, 0,1 % (m/v) liuos heksaanissa (sisäinen standardi).

4.6 Kantajakaasu: puhdas vety, kaasukromatografiaa varten.

4.7 Apukaasut:

— puhdas vety, kaasukromatografiaa varten,

— puhdas ilma, kaasukromatografiaa varten.

5 MENETTELY

5.1 Vahajakeen erottaminen

5.1.1 Kromatografiakolonnin esikäsitteleminen

Suspendoidaan 15 g hydratoitua silikageeliä 2-prosenttiseen n-heksaanin ja laitetaan kolonniin.

▼M6

Annetaan tasaantua itsestään ja täydennetään tasaantumista sähkökäyttöisellä sekoittajalla, jotta saadaan homogeenisempi kromatografiakerros. Suodatetaan läpi 30 ml n-heksaania mahdollisten epäpuhtauksien poistamiseksi.

5.1.2 Kolonnikromatografia

Punnitaan tasan 500 mg näytettä 25 ml:n erlenmeyerpulloon, lisätään sopiva määrä sisäistä standardia oletetun vahapitoisuuden mukaan. Esimerkki: lisätään 0,1 mg lauryliarakidaattia, jos on kysymys oliiviöljystä ja 0,25 - 0,5 mg, jos on kyse uutetusta öljystä.

Siirretään näin valmistettu näyte kahden 2 ml:n n-heksaaniannoksen avulla 5.1.1 kohdan mukaisesti käsiteltyyn kromatografiakolonneihin.

Liuottimen annetaan valua, kunnes se on 1 mm absorboimisaineen pinnan yläpuolella. Aloitetaan kromatografinen eluutio: kerätään 140 ml n-heksaani/etyylieetteriseosta, suhde 99:1, valumisnopeuden ollessa noin 15 pisaraa 10 sekunnissa (2,1 ml minuutissa).

Tällä tavoin saatu jae kuivataan pyöröhaihduttimessa, kunnes lähes kaikki liuotin on saatu poistettua. Viimeiset 2 tai 3 ml liuotinta poistetaan heikon typpivirtauksen avulla, jonka jälkeen lisätään 10 ml n-heptaania.

5.2 Kaasukromatografinen määrittäminen

5.2.1 Esivalmistelut ja kolonnin valmistelu

5.2.1.1 Kolonni asennetaan kaasukromatografiin siten, että tulosola yhdistetään on-column -järjestelmään ja poistosola detektoriin.

Tarkistetaan kaasukromatografisten laitteiden toimivuus (kaasuliitäntöjen kunto, detektorin ja piirturijärjestelmän tehokkuus jne.).

5.2.1.2 Jos kolonnia ei ole aikaisemmin käytetty, se on ensin valmisteltava käyttöön. Kevyt kaasuvirtaus johdetaan kolonnin läpi ja käynnistetään kaasukromatografi. Lämmitetään asteittain, kunnes lämpötila on kohonnut vähintään 20 °C korkeammaksi kuin käyttölämpötila (huomautus). Tätä lämpötilaa pidetään yllä vähintään kaksi tuntia, jonka jälkeen laitteisto säädetään käyttöolosuhteisiin (kaasuvirtojen säätö, liekin sytytys, kytkeminen elektroniseen piirturiin, uunin lämpötilan säätö kolonnia varten, detektorin säätö jne.) ja signaali säädetään niin, että sen herkkyys on vähintään kaksi kertaa niin suuri kuin on arvioitu määrittämisessä tarvittavan. Saadun pohjaviivan on oltava suora, siinä ei saa olla minkäänlaisia piikkejä eikä ryömintää mihinkään suuntaan.

Jos ilmenee negatiivista suoraviivaista ryömintää, se on merkki kolonnin epätyydellisistä liitännöistä; positiivinen ryömintä johtuu kolonnin riittämättömästä valmistelusta.

Huom: Esivalmistelulämpötilan tulee aina olla vähintään 20 °C alhaisempi kuin käytetyn eluutin korkein oletettu lämpötila.

5.2.2 Käyttöolosuhteiden valinta

5.2.2.1 Yleisesti noudatettavat käyttöolosuhteet ovat seuraavat:

- kolonnin lämpötila: aluksi 80 °C, sen jälkeen lämpötilaa nostetaan 30 °C minuutissa, kunnes saavutetaan 120 °C ja ohjelmoidaan nousemaan sen jälkeen 5 °C minuutissa, kunnes saavutetaan 340 °C,
- detektorin lämpötila: 350 °C,
- kantajakaasun lineaarisuus: vedylle 20 - 35 cm/s,
- laitteen herkkyys: 4 - 16 kertaa vähimmäisvaimennus,
- piirturin herkkyys: 1 - 2 mV asteikon pohjasta,
- paperin nopeus: 30 cm/h,
- injektoidun aineen määrä: 0,5 - 1 µl liuosta.

Näitä olosuhteita voidaan muuttaa kolonnin ja kaasukromatografian ominaisuuksien perusteella (jotta saadaan seuraavat edellytykset täyttäviä kromatogrammeja: sisäisen standardin C 32 retentioaika on 25 ± 2 minuuttia ja edustavimpien vahojen piikki on 60 - 100 % asteikon pohjasta).

5.2.2.2 Piikkien integrointiparametrit asetetaan niin, että saadaan oikeat arvot huomioon otettavien piikkien pinta-aloille.

5.2.3 Määrittäminen suorittaminen

5.2.3.1 Imetään 10 µl:n mikroruiskuun 1 µl liuosta; vedetään männällä neula tyhjäksi. Työnnetään neula injektioalitteeseen ja 1 - 2 sekunnin kuluttua injektoidaan nopeasti; noin 5 sekunnin kuluttua vedetään neula hitaasti pois.

▼M6

5.2.3.2 Piirturi pidetään käynnissä, kunnes vahat ovat eluoituneet täydellisesti.

Pohjaviivan on koko ajan oltava 5.2.1.2. kohdan vaatimusten mukainen.

5.2.4 Piikkien tunnistaminen

Eri piikkien tunnistaminen suoritetaan retentioaikojen perusteella ja vertaamalla samoissa olosuhteissa määritettyihin vahojen seoksiin, joiden retentioajat tunnetaan.

Kuva 1 esittää neitsytoliiviöljyn vahojen kromatogrammia.

5.2.5 Kvantitatiivinen arviointi

5.2.5.1 Sisäisen standardin ja C 40 - C 46 alifaattisten esterien piikkien pinta-
alat lasketaan integraattorilla.

5.2.5.2 Lasketaan kunkin esterin vahapitoisuus, ilmoitettuna mg/kg rasvaa, seuraavalla kaavalla:

$$\text{esteri (mg/kg)} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot \blacktriangleright \underline{\mathbf{M9}} \ 1\ 000 \ \blacktriangleleft}{A_s \cdot m}$$

jossa:

A_x = kunkin esterin piikin pinta-ala

A_s = lauryliarakidaattipiikin pinta-ala

m_s = lisätyn lauryliarakidaatin massa milligrammoina

m = määrittystä varten otetun näytteen massa grammoina.

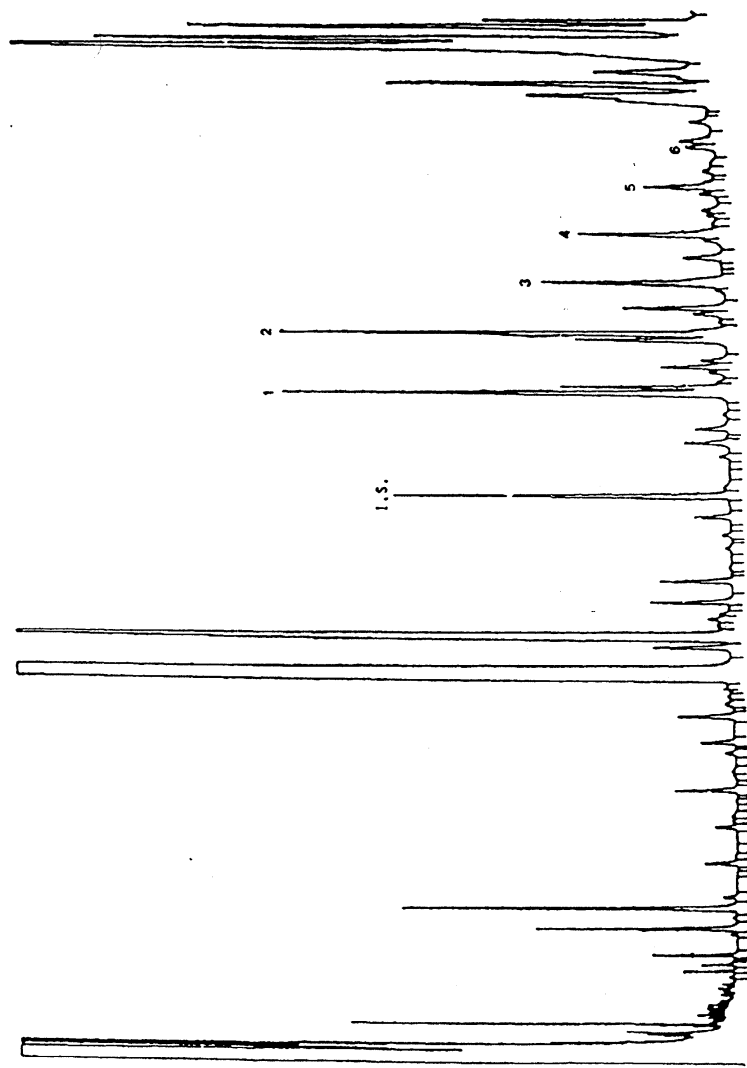
6 TULOSTEN ILMAISEMINEN

Eri vahojen pitoisuudet ja niiden summa ilmoitetaan mg: oina rasvaa kilogrammaa kohti.

▼M6*LISÄYS**Kaasun lineaaripeuden määrittäminen*

Injektoidaan 1 - 3 µl metaania (tai propaania) tavanomaisiin käyttöolosuhteisiin säädettyyn kaasukromatografialaitteistoon. Otetaan tarkka aika siitä, miten kauan kaasu kulkee kolonnin läpi, alkaen injektiohetkestä piikin muodostumiseen (tM).

Lineaaripeus, cm/s, saadaan kaavasta L/tM , jossa L on kolonnin pituus senttimetreinä ja tM on aika sekunteina sekuntikellolla mitattuna.



KUVA 1: Neisyntetisoidijyn vahojen kromatogrammi

I. S.= sisäinen standardi C32 -esteri

1 = C36 -esterit

2 = C38 -esterit

3 = C40 -esterit

4 = C42 -esterit

5 = C44 -esterit

6 = C46 -esterit

▼B

LIITE V

**STEROLIEN RAKENTEEN JA PITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN
KAPILLAARIKAASUKROMATOGRAFISELLA MENETELMÄLLÄ**

1 TARKOITUS

Tällä menetelmällä voidaan määrittää yksittäisten sterolien määrät ja niiden kokonaismäärä rasvoissa ja öljyissä.

2 PERIAATE

Rasva tai öljy, johon on lisätty a-kolestanoli sisäiseksi standardiksi, saippuoidaan kaliumhydroksidin etanoliliuksella ja saippuoitumaton aines uutetaan etyylietterillä. Sterolifraktio erotetaan saippuoitumattomasta uutteenä ohutkerroskromatografialla käyttäen emäksistä silikageelilevyä. Silikageelistä saadut sterolit muutetaan trimetyylisilyliettereiksi ja määritetään kapillaarikaasukromatografialla.

3 VÄLINEISTÖ

- 3.1 Pullo, 250 ml, jossa on hiokset ja palautusjäähdytin.
- 3.2 Erotussuppilo, 500 ml.
- 3.3 Pulloja, 250 ml.
- 3.4 Ohutkerroskromatografialaitteisto, jonka levyjen koko on 20 × 20 cm.
- 3.5 Ultraviolettilamppu, jonka aallonpituus on 366 tai 254 nm.
- 3.6 Mikroruisku, 100 µl ja 500 µl
- 3.7 Lasisinterisuodatinsuppilo, jonka huokoskoko on G 3 (15—40 µm), halkaisija noin 2 cm ja korkeus noin 5 cm ja jossa on liitäntä tyhjiösuodatusta varten sekä koirashios 12/21.
- 3.8 Tyhjiöimupullo, 50 ml, jossa on naarashios 12/21, joka sopii suodatin-suppilon (3.7).
- 3.9 Koeputki, 10 ml, jossa on kartiomainen pohja ja ilmatiivis tulppa.
- 3.10 Kaasukromatografi, johon sopii kapillaarikolonne ja johon kuuluu virtauksenjakojärjestelmä, jonka osat ovat:
 - 3.10.1 Termostaattisäätöinen kolonniuuni, joka säilyttää halutun lämpötilan noin ± 1 °C:n tarkkuudella;
 - 3.10.2 Höyrystämysyksikkö, jonka lämpötilaa voi säätää ja jonka höyrystämissä on persilanoitua lasia;
 - 3.10.3 Liekki-ionisaatiodetektor ja muuntajavahvistin;
 - 3.10.4 Integraattori-piirturi, joka sopii käytettäväksi muuntajavahvistimen kanssa.
- 3.11 Lasinen tai kvartsilasinen kapillaarikolonne, jonka pituus on 20—30 m ja sisähalkaisija 0,25—0,32 mm ja jonka sisäpinta on päällystetty nesteellä SE-52 tai SE-54 tai vastaavalla siten, että nestekerroksen paksuus on 0,10—0,30 mm.
- 3.12 Mikroruisku, jossa on karkaistu neula, kaasukromatografiaa varten, 10 µl.

4 REAGENSIT

- 4.1 Kaliumhydroksidin noin 2 N etanoliliuos: 130 g kaliumhydroksidia (vähintään 85-prosenttista) liuotetaan 200 ml:aan tislattua vettä samalla jäähdyttäen ja lisätään etanolia niin, että liuosta on yksi litra. Liuosta säilytetään tiiviisti suljetuissa, tummasta lasista valmistetuissa pulloissa (etanoli 95 % V/V).
- 4.2 Etyylieetteri, analyysilaatua.
- 4.3 Vedetön natriumsulfaatti, analyysilaatua.
- 4.4 Silikageelillä päällystetyt lasilevyt, paksuudeltaan 0,25 mm, ilman fluoroesenssi-indikaattoria (voidaan ostaa käyttövalmiina).
- 4.5 Kaliumhydroksidin 0,2 N etanoliliuos: liuotetaan 13 g kaliumhydroksidia 20 ml:aan tislattua vettä ja lisätään etanolia niin, että liuosta on yksi litra.

▼**B**

- 4.6 Bentseeni, kromatografiaa varten (5.2.2).
- 4.7 Asetoni, kromatografiaa varten (5.2.2).
- 4.8 Heksaani, kromatografiaa varten (5.2.2).
- 4.9 Etyylieetteri, kromatografiaa varten (5.2.2).
- 4.10 Puhdas kloroformi, analyysilaatua (5.2.2).
- 4.11 Ohutkerroskromatografian vertailuliuos: ► **M6** 2 prosenttinen ◀ kolesterolin tai fytosterolin kloroformiliuos.
- 4.12 2,7-dikloorifluoreseiini, 0,2-prosenttinen etanoliliuos. Liuos tehdään lievästi emäksiseksi lisäämällä muutama tippa kaliumhydroksidin 2 N alkoholiliuosta.
- 4.13 Vedetön pyridiini, kromatografiaa varten.
- 4.14 Heksametyylidisilatsaani.
- 4.15 Trimetyylikloorisilaani.
- 4.16 Sterolien trimetyylisilylieettereiden standardiliuokset. Ne valmistetaan vasta käyttöhetkellä steroleista, jotka saadaan niitä sisältävistä öljyistä.
- 4.17 α -kolestanoli 0,2-prosenttisenä (m/V) kloroformiliuoksena (sisäinen standardi).
- 4.18 Kantajakaasut: vety tai helium, kaasukromatografista laatua.
- 4.19 Apukaasut: vety tai helium, kaasukromatografista laatua.

5 MENETTELY

5.1 Saippuoitumattomien aineiden esikäsittely

- 5.1.1 250 ml:n pulloon lisätään 500 ml:n mikroruiskulla sellainen tilavuusmäärä 0,2-prosenttista α -kolestanolin kloroformiliuosta (4.17) jonka sisältämä α -kolestanolin määrä on noin 10 % sterolin määrästä siinä osanäytteessä, joka on pullossa määritettävänä. Esimerkiksi 5 gramman oliiviöljynäytteeseen lisätään 500 μ l 0,2-prosenttista α -kolestanoliuosta, ja jos näytteenä on ► **M6** ————— ◀ uutettua oliiviöljyä, lisätään 1 500 μ l α -kolestanolia.

Haihdutetaan kuiviin typpivirrassa ja punnitaan tarkalleen 5 g kuivattua, suodatettua näytettä samaan pulloon.

► **M6** ————— ◀ Öljyt, jotka sisältävät paljon kolesterolia, voivat tuottaa piikin, jonka retentioaika on sama kuin kolestanolin. Jos käy näin, sterolifraktio on määritettävä kahdesti niin, että toisella kertaa käytetään sisäistä standardia ja toisella ei ► **M6** tai käyttää kolestanolin sijasta betulinolia ◀.

- 5.1.2 Lisätään 50 ml kaliumhydroksidin 2 N etanoliliuosta, käynnistetään palautusjäähdytyn ja kuumennetaan vesihauteessa hiljalleen kiehuvaksi koko ajan voimakkaasti sekoittaen, kunnes saippuoituminen on tapahtunut (liuos kirkastuu). Kuumentamista jatketaan vielä 20 minuuttia, sitten lisätään 50 ml tislattua vettä jäähdyttimen yläpäästä, irrotetaan jäähdytyn ja jäähdytetään pullo noin 30 °C:n lämpötilaan.
- 5.1.3 Pullon sisältämä seos siirretään kvantitatiivisesti 500 ml:n erotussuppiloon käyttäen huuhteena yhteensä noin 50 ml tislattua vettä. Lisätään noin 80 ml etyylieetteriä, ravistetaan voimakkaasti noin 30 sekunnin ajan ja annetaan seistä niin, että kerrokset erottuvat (Huom. 1).

Pohjalla oleva vesifaasi siirretään toiseen erotussuppiloon. Vesifaasi uutetaan vielä kaksi kertaa samalla tavoin käyttäen 60—70 ml etyylieetteriä kummallakin kerralla.

Huom. 1 Mahdollinen emulsio voidaan hajottaa lisäämällä pieni määrä etanolia tai metanolia suihkeena.

- 5.1.4 Kaikki eetteriuutteet yhdistetään yhteen erotussuppiloon ja pestään tislattulla vedellä (50 ml kerralla), kunnes pesuvesi on neutraalia.
- Kun pesuvesi on poistettu, eetteriuutteet kuivataan vedettömällä natriumsulfaattilla, suodatetaan vedettömän natriumsulfaatin läpi etukäteen punnittuun 250 ml:n pulloon ja pestään suppilo ja suodatin pienillä määrillä etyylieetteriä.
- 5.1.5 Eetteriä haihdutetaan niin, että sitä on ainoastaan muutama millilitra, jäännös kuivataan sitten pienessä alipaineessa tai typpivirrassa ja lopuksi kuivataan lämpökaapissa, jonka lämpötila on 100 °C, noin 15 minuutin ajan, jäännös jäähdytetään eksikkaattorissa ja punnitaan.

▼B

5.2 Sterolifraktion erottaminen

- 5.2.1 Emäksisten levyjen valmistelu: upotetaan silikageelilevyt (4.4) kokonaan kaliumhydroksidin 0,2 N etanoliliuokseen (4.5) kymmeneksi sekunniksi, minkä jälkeen niiden annetaan kuivua kaksi tuntia vetokaapissa ja lopuksi yksi tunti 100 °C:ssa lämpökaapissa.

Kun levyt on otettu lämpökaapista, niitä säilytetään kalsiumkloridia sisältävässä eksikkaattorissa käyttöhetken saakka (näin käsitellyt levyt on käytettävä 15 päivän kuluessa).

Huom. 2 Kun sterolifraktion erottamiseen käytetään emäksisiä silikageelilevyjä, ei ole tarpeen käsitellä saippuoitumattomia aineita alumiinioksidilla. Näin kaikki happamat aineet (rasvahapot ja muut hapot) jäävät lähtöviivalle. Sterolivyöhyke erottuu selvästi alifaattisten ja terpeenisten alkoholien vyöhykkeestä.

- 5.2.2 Bentseeni-asetoniseosta (95:5, V/V) kaadetaan kehitysastiaan niin, että sitä on noin 1 cm. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää heksaani-etyylieetteriseosta (65:35, V/V). Kehitysastia suljetaan sopivalla kannella ja annetaan seistä avaamatta vähintään puoli tuntia, jotta syntyy neste-höyrytasapaino. Astian sisäseinille voidaan kiinnittää suodatinpaperisui-kaleita, jotka ulottuvat eluointiaineeseen. Tämä lyhentää kehitysaikaa lähes kolmanneksella ja aineosat eluoutuvat tasaisemmin.

Huom. 3 Kehitysluos on vaihdettava uuteen ennen jokaista koetta, jotta eluointiolosuhteet olisivat täysin toistettavissa.

- 5.2.3 Saippuoitumattomista aineista (5.1.5) valmistetaan noin 5-prosenttinen kloroformiliuos, jota levitetään 0,3 ml kromatografialevyille (5.2.1) mahdollisimman ohuena ja tasaisena nauhana 100 ml:n mikroruiskulla noin 2 cm:n päähän levyn reunasta. Asetetaan 2–3 ml sterolien vertailuliuosta (4.11) lähtöviivan tasalle levyn reunaan niin että sterolivyöhyke voidaan tunnistaa kehityksen jälkeen.

- 5.2.4 Levy asetetaan kehitysastiaan, joka on valmisteltu 5.2.2 kohdan ohjeiden mukaan. Ympäristön lämpötilan on oltava 15–20 °C. Astian kansi suljetaan heti ja annetaan levyn eluoutua, kunnes liuotinrintama on siirtynyt noin 1 cm:n päähän levyn yläreunasta. Levy otetaan kehitysastiasta ja liuotin haihdutetaan kuumassa ilmavirrassa tai pane-malla levy joksikin aikaa vetokaappiin.

- 5.2.5 Levyille suihkutetaan ohuelti ja tasaisesti 2,7-dikloorifluoreseiiniliuosta. Sterolivyöhyke voidaan tunnistaa ultraviolettivalossa siitä, että se on samassa kohdassa kuin vertailuliuksen vyöhyke. Vyöhykkeen ääriviivat merkitään mustalla kynällä fluoresenssin rajoja seuraten.

- 5.2.6 Silikageelikerros raaputetaan rajatulta alueelta metallilastalla. Saatu aines hienonnetaan, siirretään suodatinsuppiloon (3.7), lisätään 10 ml kuumaa kloroformia, sekoitetaan huolellisesti metallilastalla ja suodetaan suodatinsuppiloon liitettyyn pulloon (3.8) tyhjiöllä.

Suppiloon jäänyt aines pestään kolme kertaa noin 10 ml:lla etyylieetteriä, ja suodos kerätään suodatinsuppiloon liitettyyn pulloon. Suodosta haihdutetaan, kunnes sen tilavuus on noin 4–5 ml ja jäännösluos kaadetaan etukäteen punnittuun 10 ml:n koeputkeen (3.9). Liuosta kuivataan alhaisella lämmöllä kevyessä typpivirrassa; jäännös liuotetaan muutamaa tippaan asetonia, kuivataan jälleen ja pidetään kymmenisen minuuttia 105 °C:ssa lämpökaapissa, jäähdytetään eksikkaattorissa ja punnitaan.

Koeputkessa oleva jäännös sisältää sterolifraktion.

5.3 Trimetyylisilylieettereiden valmistus

- 5.3.1 Koeputkessa olevaan sterolifraktioon lisätään silylointireagenssia, jossa on pyridiiniä, heksametyylidisilatsaania ja trimetyylikloorisilaania tilavuussuhteessa 9:3:1 (Huom. 4), 50 ml jokaista koeputkessa olevaa sterolimilligrammaa kohti niin, että kosteutta ei pääse mukaan (Huom. 5).

Huom. 4 Käyttövalmiita liuoksia on kaupallisesti saatavana; lisäksi muita silylointireagensseja, kuten esim. bistrimetyylisilylitri-fluoriasetamidi + 1 % trimetyylikloorisilaania; reagenssi laimennetaan samalla määrällä vedetöntä pyridiiniä.

- 5.3.2 Koeputki suljetaan tulpalla, ravistetaan varovasti (ei ylösalaisin), kunnes sterolit ovat täysin liuenneet. Annetaan seistä vähintään 15 minuuttia huoneenlämmössä ja sentrifugoidaan sitten muutaman minuutin ajan; kirkas liuos on nyt valmis kaasukromatografista määritystä varten.

Huom. 5 Lievä sameus on tavallista eikä ole haitaksi. Valkoiset hiuta-leet tai vaaleanpunaiseksi värjäytyminen ovat merkkejä

▼B

kosteudesta tai reagenssien muuttumisesta. Jos näitä ilmenee, koe on uusittava.

5.4 Kaasukromatografinen määrittäminen

5.4.1 Esivalmistelu ja kolonnin valmistelu

5.4.1.1 Kapillaarikolonne asennetaan kaasukromatografialaitteistoon niin, että kolonnin alkupää kiinnitetään höyrystimeen, joka on liitetty virtauksenjakojärjestelmään, ja kolonnin loppupää kiinnitetään detektoriin.

Tarkistetaan kaasukromatografisten laitteiden toiminta (kaasuliitännän tiiviys, detektorin, virtauksenjakojärjestelmän ja piirturin toimivuus, jne.)

5.4.1.2 Jos kapillaarikolonnia ei ole aikaisemmin käytetty, se on ensin valmistettava käyttöön. Pieni määrä kaasua johdetaan kolonnin läpi, käynnistetään kaasukromatografi ja aloitetaan asteittainen lämmittäminen, jota jatketaan, kunnes lämpötila on kohonnut vähintään 20 °C korkeammaksi kuin käyttölämpötila (Huom. 6). Korkeaa lämpötilaa pidetään yllä vähintään kaksi tuntia, minkä jälkeen kromatografialaitteisto saatetaan käyttövalmiiksi (kaasuvirran ja erotuksen säätö, liekinsytytys, elektronisen piirturin kytkeminen, uunin lämpötilan säätö kolonnin varten, detektorin ja injektorin säätö, jne.) ja signaalia rekisteröidään herkkyydellä, joka on vähintään kaksi kertaa niin suuri kuin määrittämisessä käytettävä. Saadun perusviivan on oltava suora, eikä siinä saa olla minkäänlaisia piikkejä eikä siirtymää mihinkään suuntaan.

Jos ilmenee negatiivista suoraviivaista siirtymää, se on merkki kolonnin liitäntöjen vuodosta, ja jos ilmenee positiivista siirtymää, se johtuu kolonnin riittämättömästä valmistelusta.

Huom. 6 Esivalmistelulämpötilan on aina oltava vähintään 20 °C alempi kuin käytetyn stationäärifaasin korkein lämpötila.

5.4.2 Toimintaolosuhteiden valinta

5.4.2.1 Käyttöolosuhteiden ohjeet ovat seuraavat:

- kolonnin lämpötila: 260 ± 5 °C,
- höyrystimen lämpötila: 280 °C,
- detektorin lämpötila: 290 °C,
- kantajakaasun lineaarinopeus: heliumille 20—35 cm/s ja vedylle 30—50 cm/s,
- jakosuhteet: 1:50 — 1:100,
- laitteiston herkkyys: 4—16 kertaa vähimmäisvaimennus,
- rekisteröintiherkkyys: 1—2 mV täydestä asteikosta,
- paperin nopeus: 30—60 cm/h,
- injektoidun aineen määrä: 0,5—1 ml TMSE-liuosta.

Näitä olosuhteita voidaan muuttaa kolonnin ja kaasukromatografian ominaisuuksien mukaan niin, että saadaan seuraavat vaatimukset täyttävä kromatogrammi:

- β-sitosterolin retentioajan on oltava 20 ± 5 minuuttia,
- kampesterolin piikki: oliiviöljylle (pitoisuus keskimäärin 3 %) 15 ± 5 % täydestä asteikosta, soijaöljylle (pitoisuus keskimäärin 20 %) 80 ± 10 % täydestä asteikosta,
- kaikki mukana olevat sterolit on voitava erottaa toisistaan. Lisäksi kunkin piikin jälkeen piirturin tulee palata perusviivalle ennen uuden piikin alkua. Tämä ei ole kuitenkaan tarpeen, jos piikki TRR 1,02:ssa pystytään mittaamaan kohtisuoraan.

5.4.3 Määrittäminen

5.4.3.1 Imetään 10 ml:n mikroruiskuun 1 ml heksaania, sitten 0,5 ml ilmaa ja tämän jälkeen 0,5 ml—1 ml näyteliuosta; lopuksi männällä vedetään vielä neula tyhjäksi. Neula työnnetään septumin läpi injektiopesään ja 1—2 sekunnin kuluttua seos injektoidaan nopeasti, odotetaan noin viisi sekuntia, jonka jälkeen neula vedetään pois hitaasti.

5.4.3.2 Rekisteröintiä jatketaan, kunnes näytteessä olevien sterolien TMSE on kokonaan eluoitunut.

Perusviivan on koko ajan oltava 5.4.1.2 kohdan vaatimusten mukainen.

5.4.4 Piikkien tunnistaminen

Yksittäiset piikit tunnistetaan niiden retentioajan perusteella sekä vertaamalla sterolien TMSE-seokseen, joka on määritetty samoissa olosuhteissa.

▼ **B**

Sterolit eluotuvat seuraavassa järjestyksessä: kolesteroli, brassikasteroli, 24-metyleenikolesteroli, kampestroli, kampestanoli, stigmasteroli, $\Delta 7$ -kampesteroli, $\Delta 5,23$ -stigmastadienoli, klerosteroli, β -sitosteroli, sitostanoli, $\Delta 5$ -avenasteroli, $\Delta 5,24$ -stigmastadienoli, $\Delta 7$ -sigmastenoli, $\Delta 7$ -avenasteroli.

Sitosterolin retentioajat SE-52- ja SE-54-kolonneille on esitetty taulukossa 1.

Kuvat 1 ja 2 esittävät eräiden öljyjen tyypillisiä kromatogrammeja.

5.4.5 Kvantitatiivinen arviointi

5.4.5.1 Lasketaan α -kolestanolin ja sterolien piikkien pinta-alat integraattorin avulla. Sellaisten aineiden piikit, jotka eivät esiinny taulukossa 1, jätetään huomiotta. α -kolestanolin vastekerroin on 1.

5.4.5.2 Lasketaan yksittäisten sterolien pitoisuus milligrammoina 100 g:ssa rasvaa tai öljyä seuraavasta kaavasta:

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

jossa:

A_x = x-sterolin piikin pinta-ala ► **M6** ————— ◄;

A_s = α -kolestanolin piikin pinta-ala ► **M6** ————— ◄;

m_s = lisätyn α -kolestanolin massa milligrammoina;

m = määritykseen käytetyn näytteen massa grammoina.

6 TULOSTEN ESITTÄMINEN

6.1 Ilmoitetaan yksittäisten sterolien pitoisuus milligrammoina 100 g:ssa rasvaa tai öljyä ja niiden pitoisuuksien summa, ”kokonaissterolimäärä”.

6.2 Lasketaan yksittäisen sterolin prosenttiosuus sitä vastaavan piikin suhteellisenä osuutena kaikkien sterolipiikkien yhteenlasketusta pinta-alasta.

$$x\text{-sterolin prosenttiosuus} = \frac{A_x}{\Sigma A} \cdot 100$$

Jossa:

A_x = x:n piikin pinta-ala;

ΣA = kaikkien sterolien piikkien yhteenlaskettu pinta-ala.



LISÄYS

Kaasun lineaarinopeuden määrittäminen

Kaasukromatografialaiteisto säädetään tavallisia käyttöolosuhteita vastaavaksi, injektoidaan 1—3 ml metaania (tai propaania) ja mitataan aika, jonka kuluessa kaasu kulkee kolonnin läpi, injektointihetkestä piikin muodostumiseen (t_M).

Lineaarinopeus cm/s saadaan kaavasta L/t_M , jossa L on kolonnin pituus senttimeleinä ja t_M on mitattu aika sekunteina.

Taulukko 1

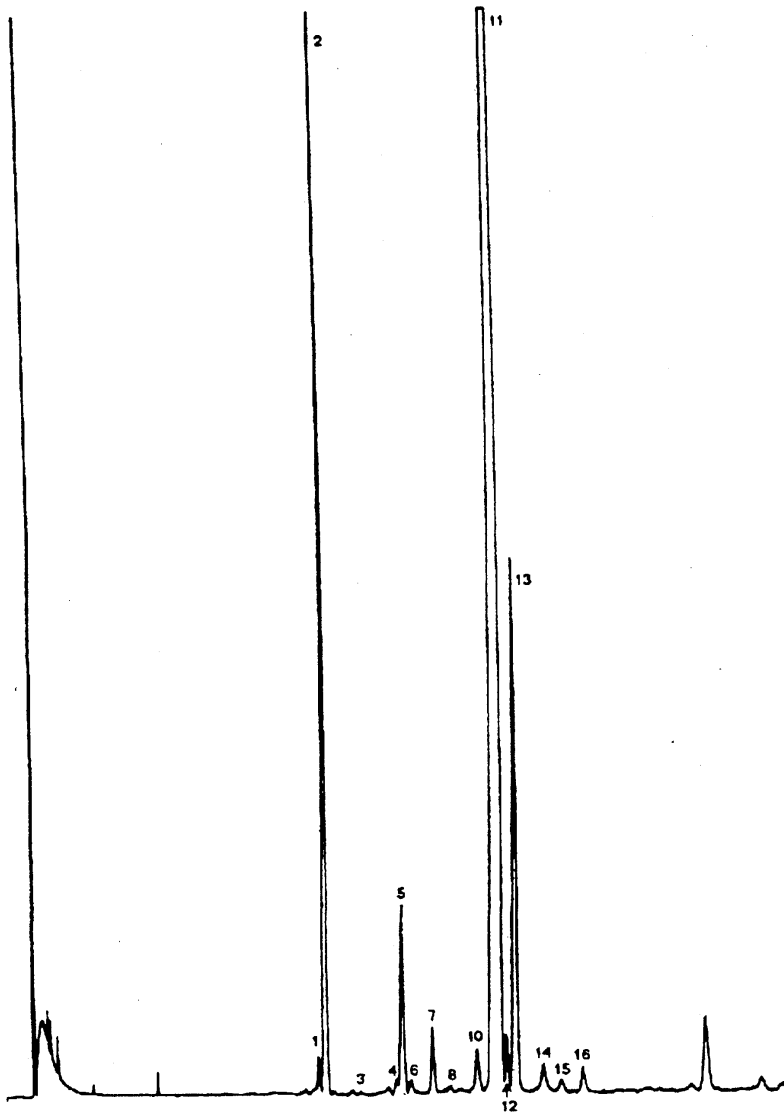
Sterolien suhteelliset retentioajat

Pi- ik- ki	Nimi		Suhteellinen retentioaika	
			Kolonne SE 54	Kolonne SE 52
1	kolesteroli	Δ -5-kolesten-3 β -oli	0,67	0,63
2	kolestanoli	5 α -kolestan-3 β -oli	0,68	0,64
3	brassikasteroli	[24S]-24-metyyli- Δ -5,22-kolestadien-3 β -oli	0,73	0,71
4	24-metyleenikolesteroli	24-metyleeni- Δ -5,24-kolestadien-3 β -oli	0,82	0,80
5	kampestroli	[24R]-24-metyyli- Δ -5-kolesten-3 β -oli	0,83	0,81
6	kampestanoli	[24R]-24-metyyli-kolestan-3 β -oli	0,85	0,82
7	stigmasteroli	[24S]-24-etyyli- Δ -5,22-kolestadien-3 β -oli	0,88	0,87
8	Δ -7-kampesteroli	[24R]-24-metyyli- Δ -7-kolesten-3 β -oli	0,93	0,92
9	Δ -5,23 stigmastadienoli	[24R,S]-24-etyyli- Δ -5,23-kolestadien-3 β -oli	0,95	0,95
10	klerosteroli	[24S]-24-etyyli- Δ -5,25-kolestadien-3 β -oli	0,96	0,96
11	β -sitosteroli	[24R]-24-etyyli- Δ -5-kolestan-3 β -oli	1,00	1,00
12	sitostanoli	24-etyyli-kolestan-3 β -oli	1,02	1,02
13	Δ -5-avenasteroli	[24Z]-24-etyylideeni-5-kolesten-3 β -oli	1,03	1,03
14	Δ -5,24-stigmastadienoli	[24R,S]-24-etyyli- Δ -5,24-kolestadien-3 β -oli	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastenoli	[24R,S]-24-etyyli- Δ -7,24-kolestadien-3 β -oli	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasteroli	[24Z]-24-etyylideeni- Δ -7-kolesten-3 β -oli	1,16	1,16

▼B

Kuva 1

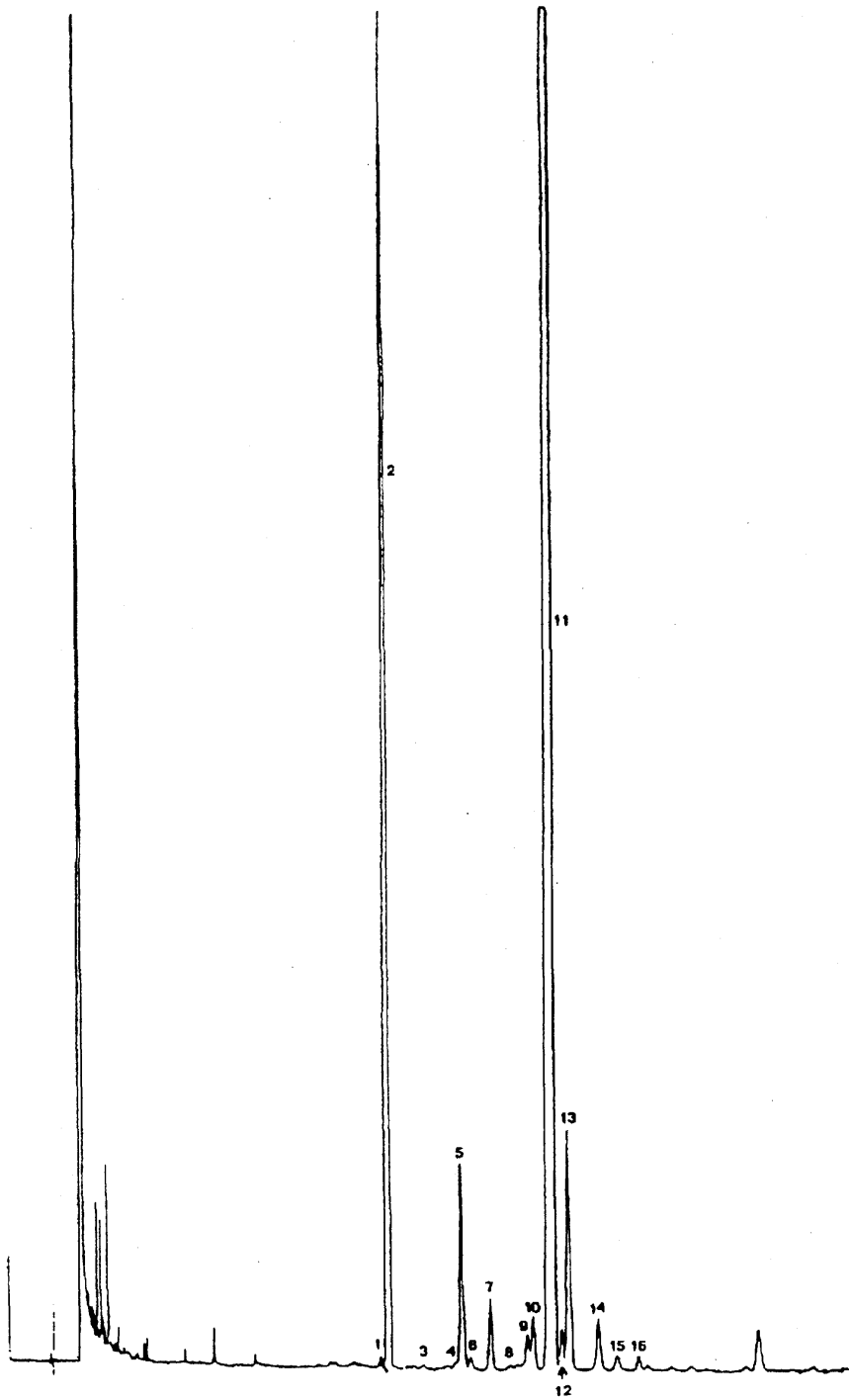
Raakaoliiviöljyn sterolifraktion kaasukromatogrammi



▼B

Kuva 2

Puhdistetun oliiviöljyn sterolifraktion kaasukromatogrammi





LIITE VI

ERYTROIOLI- JA UVAOLIPITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN

JOHDANTO

Erytrodioli, jolla yleensä tarkoitetaan dioleja erytrodioli ja uvaoli yhdessä, on joillekin rasvoille ja öljyille tyypillinen saippuoitumattoman osan aine. Sen pitoisuus on selvästi kohonnut uutetussa oliiviöljyssä; puristetussa oliiviöljyssä ja rypälesiemensöljyssä sitä on vähän, joten sen esiintyminen voi olla merkki siitä, että joukkoon on lisätty uutettua oliiviöljyä.

1 TARKOITUS

Tällä menetelmällä voidaan määrittää rasvan tai öljyn erytrodiolipitoisuus.

2 PERIAATE

Rasva tai öljy saippuoidaan kaliumhydroksidin etanoliliuksella. Saippuoitumaton osa uutetaan etyylietterillä ja puhdistetaan johtamalla se alumiinioksidikolonni läpi, minkä jälkeen saippuoitumattomat aineet erotetaan silikageelilevyillä ohutkerroskromatografialla. Tällöin steroli- ja erytrodiolifraktiovyöhykkeet erottuvat.

Levyiltä saadut sterolit ja erytrodioli muutetaan trimetyylisilylieettereiksi ja määritetään kaasukromatografialla.

Tulos ilmoitetaan erytrodiolin prosentiosuutena erytrodiolin ja sterolien seoksesta.

3 VÄLINEISTÖ

- 3.1 Sama kuin liitteessä V (Sterolien määrittäminen).

4 REAGENSIT

- 4.1 Samat kuin liitteessä V (Sterolien määrittäminen).
- 4.2 Vertailuliuksena erytrodiolin 0,5-prosenttinen kloroformiliuos.

5 SUORITUS

5.1 Saippuoitumattoman osan esikäsittely.

Kuten liitteessä V olevassa 5.1.2 kohdassa.

5.2 Erytrodiolin ja sterolien erottaminen.

- 5.2.1 Ks. menettely liitteessä V olevassa 5.2.1 kohdassa.
- 5.2.2 Ks. sama menettely liitteessä V olevassa 5.2.2 kohdassa.
- 5.2.3 Valmistetaan saippuoitumattomasta aineksestä 5-prosenttinen kloroformiliuos.

Levitetään 0,3 ml liuosta mahdollisimman ohueksi ja tasaiseksi viivaksi 0,1 ml:n mikroruiskulla noin 1,5 cm:n päähän levyn alareunasta. Asetetaan muutama mikrolitra erytrodioli- ja kolesteroliliuosta vertailua varten levyn reunaan.

- 5.2.4 Asetetaan levy kehitysastiaan, joka on esikäsitelty kuten 5.2.1 kohdassa. Ympäristön lämpötilan on oltava noin 20 °C. Astia suljetaan heti kannella ja annetaan eluotua, kunnes liuotinrintama on noussut noin 1 cm:n päähän levyn yläreunasta. Levy otetaan kehitysastiasta ja liuotin haihdutetaan kuumassa ilmavirrassa.

- 5.2.5 Levyille suihkutetaan tasaisesti 2,7-dikloorifluoreseiiniliuosta. Kun levyä tarkastellaan ultraviolettivalossa, sterolin ja erytrodiolin vyöhykkeet voidaan tunnistaa kohdistamalla ne vertailuliuksen vyöhykkeisiin. Vyöhykkeet merkitään pisteellä, joka on juuri fluoresenssialueen reunojen ulkopuolella.

- 5.2.6 Silikageeli raaputetaan levystä irti metallilastalla merkityn alueen kohdalta. Irrotettu aines pannaan 50 ml:n pulloon. Lisätään 15 ml kuumaa kloroformia, ravistetaan hyvin ja suodatetaan suppilon läpi, jossa on huokoinen suodatin, johon silikageeli jää. Pestään kolme kertaa kuumalla kloroformilla (noin 10 ml kerralla) ja kerätään suodos 100 ml:n pulloon. Suodosta haihdutetaan, kunnes sitä on 4–5 ml, siirretään se punnittuun,

▼B

kartiomaisella pohjalla varustettuun 10 ml:n sentrifugiputkeen, kuivatetaan typpivirrassa miedolla lämmöllä ja punnitaan.

5.3 Trimetyylisilylieetterien valmistus

Kuten liitteessä V olevassa 5.3 kohdassa.

5.4 Kaasukromatografinen määrittäminen

Kuten liitteessä V olevassa 5.4 kohdassa.

Kaasukromatografisen määrittäksen olosuhteiden on oltava sellaiset, että ne täyttävät sterolien määrittäsvaatimukset ja että lisäksi erytrodiolin ja uvaolin TMSE:t erottuvat.

Kun näyte on injektoitu, rekisteröintiä jatketaan, kunnes näytteessä olevat sterolit, erytrodioli ja uvaoli ovat kokonaan eluutuneet. Tämän jälkeen tunnistetaan piikit (erytrodiolin ja uvaolin retentioajat ovat noin 1,45 ja 1,55 suhteessa β-sitosteroliin) ja piikkien pinta-alat lasketaan kuten steroleille.

6 TULOSTEN ESITTÄMINEN

$$\text{Erytrodioli \%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \Sigma A_{\text{sterolit}}} \times 100$$

Jossa:

A_1 = erytrodiolin piikin pinta-ala ► **M6** ————— ◄;
 A_2 = uvaolin piikin pinta-ala ► **M6** ————— ◄;
 $\Sigma A_{\text{sterolit}}$ = sterolien piikkien yhteensumma pinta-ala
 ► **M6** ————— ◄;

Tulos ilmoitetaan yhden desimaalin tarkkuudella.



LIITE VII

**TRIGLYSERIDIN 2-ASEMASSA OLEVIEN TYYDYTTYNEIDEN
RASVAHAPPOJEN MÄÄRITTÄMINEN**

1 TARKOITUS

Tämä standardi kuvaa menetelmän, jolla määritetään sellaiset rasvojen ja öljyjen rasvahapot, jotka ovat esteröityneet glyserolin 2-hiileen (keskimäinen).

2 SOVELTAMISALA

Tätä menetelmää voidaan käyttää tutkittaessa öljyjä tai rasvoja, joiden sulamispiste on alle 45 °C, mikä johtuu haimalipaasin vaikutuksen erityispiirteistä.

Tämä menetelmä ei sovellu varauksetta sellaisten rasvojen tai öljyjen määrittämiseen, joiden rasvahapot sisältävät runsaasti enintään 12 hiiliatomia sisältäviä rasvahappoja (kookosöljy ja palmuynidinöljy, voirasva), voimakkaasti tyydyttymättömien rasvahappojen määrittämiseen (kaksoissidoksia on enemmän kuin neljä) tai rasvahappojen määrittämiseen, jotka sisältävät vähintään 20 hiiliatomia (kalojen ja merieläinten öljyt), eikä sellaisten rasvahappojen määrittämiseen, jotka sisältävät muita happipitoisia ryhmiä kuin happoryhmän.

3 PERIAATE

Rasva tai öljy neutraloidaan tarvittaessa liuottimessa. Rasva tai öljy puhdistetaan johtamalla se alumiinioksidikolonniin läpi. Triglyseridit hydrolysoidaan osittain haimalipaasin avulla määrääjassa. Muodostuneet monoglyseridit erotetaan ohutkerroskromatografialla ja esteröidään metaanolilla. Syntyneet metyyliesterit määritetään kaasunestekromatografialla.

4 VÄLINEISTÖ

- 4.1 Pullo, 100 ml.
- 4.2 Pullo, 25 ml, jossa hios.
- 4.3 Ilmajäähdytin, 1 m:n pituinen, sopii 4.2 kohdassa mainittuun pulloon.
- 4.4 Erlenmeyerpullo, 250 ml.
- 4.5 Dekanterilasi, 50 ml.
- 4.6 Erotussuppilo, 500 ml.
- 4.7 Lasikolonne kromatografiaa varten (sisähalkaisija 13 mm, pituus 400 mm), varustettuna sintterilasilevyllä ja hanalla.
- 4.8 Sentrifugiputki, 10 ml, jossa hiottu lasitulppa.
- 4.9 Byretti, 5 ml, jakoväli 0,05 ml.
- 4.10 Injektioruisku, 1 ml, jossa ohut neula.
- 4.11 Mikroruisku, josta saadaan 3—4 ml:n pisaroita.
- 4.12 Levitin ohutkerroskromatografiaa varten.
- 4.13 Lasilevyjä (20 × 20 cm) ohutkerroskromatografiaa varten.
- 4.14 Lasinen kehitysastia, johon 20 × 20 cm:n levyt mahtuvat ja jossa on hiottu lasikansi, ohutkerroskromatografiaa varten.
- 4.15 Sumutin ohutkerroskromatografiaa varten.
- 4.16 Uuni, jonka lämpötila on säädetty 103 ± 2 °C:seen.
- 4.17 Termostaatti, jota voidaan säätää 30—45 °C:seen ja jonka tarkkuus on 0,5 °C.
- 4.18 Kiertohaihdutin.
- 4.19 Sähkökäyttöinen väriävä ravistin, joka pystyy sekoittamaan voimakkaasti sentrifugiputkea.
- 4.20 Ultravioletivalo levyjen tarkastelua varten.

▼B

Lipaasin aktiivisuuden mittaamiseksi:

- 4.21 pH-mittari.
- 4.22 Spiraalisekoitin.
- 4.23 Byretti, 5 ml.
- 4.24 Sekuntikello.

Lipaasin mahdollista valmistusta varten:

- 4.25 Laboratoriosekoitin, joka soveltuu heterogeenisten aineiden dispergointiin ja sekoittamiseen.

5 REAGENSIT

- 5.1 n-heksaani tai sen puuttuessa petroleetteri (kiehumpiste 30—50 °C), kromatografista laatua.
- 5.2 2-propanoli (tai etanoli), 95 % (V/V), analyysilaatua.
- 5.3 2-propanoli (tai etanoli), 1:1 vesiliuos.
- 5.4 Dietyylieetteri, joka ei sisällä peroksideja.
- 5.5 Asetoni.
- 5.6 Muurahaishappo, vähintään 98 % (m/m).
- 5.7 Kehitysluos: n-heksaania (5.1), dietyylieetteriä (5.4) ja muurahaishappoa (5.6) suhteessa 70:30:1 (V/V/V).
- 5.8 Alumiinioksidi, aktivoitu, kromatografiaa varten, neutraalia, Brockmann I-laatua.
- 5.9 Piidioksidijauhe, jossa sidosaine, ohutkerroskromatografiaan soveltuvaa laatua.
- 5.10 Haimalipaasi, sopivaa laatua (Huomautukset 1 ja 2).
- 5.11 Natriumhydroksidi, 120 g/l vesiliuos.
- 5.12 Suolahappo, 6 N vesiliuos.
- 5.13 Kalsiumkloridi (CaCl₂), 220 g/l vesiliuos.
- 5.14 Natriumkolaatti (entsyymattista laatua), 1 g/l vesiliuos.
- 5.15 Puskuriliuos: lisätään suolahappoa (5.12) tri-hydroksimetyyliaminome-taanin 1 M vesiliuokseen, kunnes pH on 8 (tarkistetaan potentiometrillä).
- 5.16 Fenoliftaleiiniliuos (10 g/l) 95 % (V/V) etanolissa.
- 5.17 2,7-dikloorifluoreseiiniliuos (2 g/l) 95 % (V/V) etanolissa, joka tehdään lievästi emäksiseksi lisäämällä yksi tippa 1 N natriumhydroksidiliuosta 100 ml:aa kohti.

Lipaasin aktiivisuuden määrittämiseksi:

- 5.18 Neutraloitua öljyä.
- 5.19 Natriumhydroksidi, 0,1 N vesiliuos.
- 5.20 Natriumkolaatti (entsyymattista laatua), 200 g/l vesiliuos.
- 5.21 Arabikumi, 100 g/l vesiliuos.

6 NÄYTTEEN ESIKÄSITTELY

Jos näytteen happamuus on alle 3 % liitteen II mukaisesti määritettynä, näyte puhdistetaan alumiinioksidilla suoraan 6.2. kohdan mukaan.

Jos happamuus on yli 3 % liitteen II mukaisesti määritettynä, näyte neutraloidaan ensin emäksellä liuottimen kanssa 6.1. kohdan mukaisesti ja puhdistetaan sitten alumiinioksidilla 6.2. kohdan mukaisesti.

6.1 Emäksellä neutraloiminen liuottimen kanssa

Pannaan erotussuppiloon (4.6) noin 10 g käsittelemätöntä öljyä ja lisätään 100 ml heksaania (5.1), 50 ml 2-propanolia (5.2), muutama tippa fenoliftaleiiniliuosta (5.16) ja sellainen määrä natriumhydroksidiliuosta (5.11), joka vastaa öljyn vapaata happamuutta lisättynä 0,3 %:lla.

▼B

Ravistetaan voimakkaasti yhden minuutin ajan, lisätään 50 ml tislattua vettä, ravistetaan uudelleen ja annetaan seistä.

Kun erottuminen on tapahtunut, pohjalla oleva saippuoinut kerros poistetaan. Myös välikerrokset (liimamaiset ja liukenemattomat aineet) poistetaan. Neutraloidun öljyn heksaaniliuos pestään useilla peräkkäisillä 2-propanolin liuserillä (5.3) käyttäen 25—30 ml kerralla, kunnes fenolif-taleiinin vaaleanpunainen väri katoaa.

Poistetaan suurin osa heksaania höyrystämällä tyhjiössä käyttäen kierto-haihdutinta (4.18), kuivatetaan öljy tyhjiössä 30—40 °C:n lämpötilassa puhtaan typpivirran avulla, kunnes heksaani on kokonaan haihtunut.

6.2 Puhdistaminen alumiinioksidilla

Valmistetaan suspensio, jossa on 15 g aktivoitua alumiinioksidia (5.8) ja 50 ml heksaania (5.1) ja kaadetaan se koko ajan sekoittaen kromatografia-kolonneihin (4.7).

Alumiinioksidin annetaan laskeutua tasaiseksi kerrokseksi ja liuottimen annetaan valua niin, että sitä on noin 1—2 mm absorboimisaineen yläpuolella. Pylvääseen kaadetaan varovasti liuos, jossa on 5 g öljyä ja 25 ml heksaania (5.1). Kolonnista valuva neste kerätään pyöreäpohjaiseen pulloon (4.1).

7 KROMATOGRAFIALEVYJEN ESIKÄSITTELY

Lasilevyt (4.13) puhdistetaan huolellisesti etanolilla, petroleetterillä ja asetonilla, jotta pinta olisi täysin rasvaton.

Punnitaan 30 g piidioksidijauhetta (5.9) erlenmeyerpulloon (4.4). Lisätään 60 ml tislattua vettä. Suljetaan tulpalla ja ravistetaan voimakkaasti yhden minuutin ajan. Siirretään suspensio välittömästi levittimeen (4.12) ja levitetään puhtaille levyille noin 0,25 mm paksu kerros.

Levyjä kuivatetaan ilmassa 15 minuuttia ja sitten lämpökaapissa (4.16) 103 ± 2 °C:ssa tunnin ajan.

Levyt jäädytetään eksikkaattorissa huoneenlämpöiseksi ennen käyttöä.

Käyttövalmiita levyjä on myös kaupallisesti saatavana.

8 SUORITUS

8.1 Hydrolyysi haimalipaasin avulla

Punnitaan noin 0,1 g valmista näytettä sentrifugiputkeen (4.8). Jos näyte on kiinteää rasvaa, se liuotetaan 0,2 ml:aan heksaania, jota tarvittaessa lämmitetään hieman.

Putkeen lisätään 20 ml lipaasia (5.10) ja 2 ml puskuriliuosta (5.15). Ravistetaan hyvin, mutta varovaisesti, ja lisätään sitten 0,5 ml natriumkoolaattiliuosta (5.14) ja 0,2 ml kalsiumkloridiliuosta (5.13). Putki suljetaan hiotulla tulpalla, ravistetaan varovasti niin, että tulppa ei pääse kastumaan ja asetetaan putki heti termostaattiin (4.17), jonka lämpötila on $40 \pm 0,5$ °C. Ravistetaan käsin tasan yhden minuutin ajan. Putki otetaan termostaatista ja sitä ravistetaan voimakkaasti sähkökäyttöisellä ravistimella (4.19) tasan kaksi minuuttia. Jäädytetään välittömästi juoksevilla vedellä; lisätään 1 ml suolahappoa (5.12) ja 1 ml dietyylieetteriä (5.4). Suljetaan tulpalla ja ravistetaan voimakkaasti sähkökäyttöisellä ravistimella. Annetaan seistä ja poistetaan orgaaninen kerros ruiskulla (4.10) sentrifugoinnin jälkeen, jos se on tarpeen.

8.2 Monoglyseridien erottaminen ohutkerroskromatografialla

Uute asetetaan kromatografialevyille mikroruiskun (4.11) avulla mahdollisimman ohuena ja tasaisena kerroksena noin 1,5 cm:n päähän levyn alareunasta, niin kapeana viivana kuin mahdollista. Levy asetetaan kehitystastiaan (4.14), joka on hyvin kyllästetty, ja annetaan kehittyä kehitysluoksessa (5.7) noin 20 °C:ssa, kunnes rintama on noussut noin 1 cm:n päähän levyn yläreunasta.

Levy kuivatetaan ilmassa kehitystastian lämpötilassa ja sille suihkutetaan 2,7-dikloorifluoreseiiniliuosta (5.17). Monoglyseridivyoike tunnistetaan (R_f noin 0,035) ultraviolettivalossa (4.20).

▼B

8.3 Monoglyseridien määrittäminen kaasunestekromatografialla

Raaputetaan lastalla irti vyöhyke, joka erottui 8.2 kohdassa (välttämättä otamasta mukaan ainesta, joka on jäänyt lähtöviivalle), ja kerätään se metylointipulloon (4.2).

Raaputettua piidioksidia käsitellään suoraan menetelmällä, joka on kuvattu liitteessä X B olevassa 4.1 kohdassa siten, että monoglyseridit muuttuvat metyyliestereiksi; tämän jälkeen esterit tutkitaan kaasukromatografialla liitteessä X A kuvatulla tavalla.

9 TULOSTEN ESITTÄMINEN

Lasketaan 2-asemassa olevien rasvahappojen määrä yhden desimaalin tarkkuudella (Huom. 3).

10 HUOMAUTUKSIA

Huom. 1 Lipaasin aktiivisuuden tarkistaminen.

Valmistetaan öljyemulsio sekoittamalla 165 ml arabikumiliuosta (5.21), 15 g jäämurskaa ja 20 ml neutraloitua öljyä (5.18) ravistaen sopivalla sekoittimella.

Mitataan 10 ml tätä emulsiota dekanterilasiin (4.5), lisätään 0,3 ml natriumkoolaattiliuosta (5.20) ja lopuksi 20 ml tislattua vettä. Lasi asetetaan termostaattiin, jonka lämpötila on $37 \pm 0,5$ °C (Huom. 4). Upotetaan pH-mittarin (4.21) elektrodit nesteeseen ja spiraalisekoitin (4.22) käynnistetään. Sen jälkeen lisätään natriumhydroksidiliuosta (5.19) tipoitain byretin (4.23) avulla, kunnes pH on 8,5.

Lisätään sopiva määrä lipaasisuspensiota (ks. jäljempänä). Heti kun pH on 8,3, sekuntikello (4.24) käynnistetään ja aloitetaan natriumhydroksidiliuoksen (5.19) tiputtaminen sellaisella nopeudella, että pH pysyy koko ajan 8,3:ssa. Emäsluoksen kulutus luetaan joka minuutti.

Havainnot kirjataan graafisesti koordinaatistoon, jossa x-akselilla on aika ja y-akselilla on pH:n säilyttämiseen tarvittavan emäsluoksen määrä millilitroina.

Tuloksena pitäisi olla suora.

Edellä mainittu lipaasisuspensio on 1:1 000 (m/m) suspensio vedessä. Jokaista koetta varten olisi käytettävä sellainen määrä tätä suspensiota, että emäsluosta kuluu noin 1 ml 4—5 minuutissa.

Tavallisesti tarvitaan noin 1—5 mg jauhetta.

Lipaasiyksikkö on se määrä entsyymiä, joka tarvitaan vapauttamaan 10 mikroekvivalenttia happoa minuutissa. Näin saadaan käytetyn jauheen aktiivisuus A, lipaasiyksikköinä mg:aa kohti, kaavasta:

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

jossa:

V = natriumhydroksidiliuoksen (5.19) kulutus minuutissa suoralta laskettuna

m = jauhenäytteen massa milligrammoina.

Huom. 2 Lipaasin valmistus.

Lipaaseja, joiden aktiivisuus on tyydyttävä, voidaan ostaa valmiina. On myös mahdollista valmistaa niitä laboratorioissa seuraavasti:

Jäähdytetään 5 kg tuoretta sian haimaa 0 °C:seen, poistetaan ympäröivä kiintorasva ja kalvot ja jauhetaan sekoittimessa niin, että syntyy tahnamainen neste. Tahnaan lisätään 2,5 l vedetöntä asetonia ja sekoitetaan sekoittimella (4.25) 4—6 tuntia, minkä jälkeen liuos sentrifugoidaan. Jäännöstä uutetaan vielä kolme kertaa samalla tilavuusmäärällä asetonia, sitten kaksi kertaa asetonin ja dietyylieetterin seoksella 1:1 (V/V) ja kaksi kertaa dietyylieetterillä.

Jäännös kuivataan tyhjiössä 48 tuntia, jotta saadaan stabiili jauhe, jota on säilytettävä jääkaapissa.

▼B

Huom. 3 Kaikissa tapauksissa on suositeltavaa, että samasta näytteestä määritetään aina rasvahappojen kokonaismäärä, koska tulosten tulkintaa helpottaa, kun 2-asemassa olevien happojen määrää voidaan verrata rasvahappojen kokonaismäärään.

Huom. 4 Kun käytetään nestemäistä öljyä, hydrolyysin lämpötilaksi säädetään 37 °C. Kun tutkitaan näytettä, se säädetään kuitenkin 40 °C:seen, jotta voitaisiin tutkia kaikkia rasvoja, joiden sulamispiste on enintään 45 °C.



LIITE VIII

TRILINOLEIINIPIITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN

1 TARKOITUS

Nestemäisten kasviöljyjen triglyseridien koostumuksen määrittäminen niiden ekvivalenttisen hiililuvun mukaan suuren erotuskyvyn nestekromatografialla.

Tämä standardi kuvaa menetelmän, jolla voidaan erottaa ja määrittää kvantitatiivisesti triglyseridit kasviöljyistä niiden moolimassan ja tyydyttymättömyysasteen muodossa niiden ekvivalenttisen hiililuvun funktiona (ks. huom. 1).

2 SOVELTAMISALA

Tämä standardi soveltuu kaikkien pitkäketjuisten rasvahappojen triglyseridejä sisältävien kasviöljyjen määrittämiseen. Menetelmä sopii erityisen hyvin käytettäväksi, kun on löydettävä pieniä määriä puoliksi kuivuvia öljyjä (joissa on paljon linolihappoa) kasviöljyistä, joissa oleiinihappo (öljyhappo) on hallitseva tyydyttymätön rasvahappo (kuten oliiviöljyssä).

3 PERIAATE

Triglyseridit erotetaan ekvivalenttisen hiililuvun perusteella suuren erotuskyvyn nestekromatografian (käänteisfaasin) avulla ja kromatogrammeja tulkitsamalla.

4 VÄLINEISTÖ

- 4.1 Suuren erotuskyvyn nestekromatografialaitteisto, jonka kolonnin lämpötilaa voidaan säätää.
- 4.2 Ruisku 10 ml:n injektioihin.
- 4.3 Detektori: differentiaalirefraktometri, jolla voidaan määrittää taitekerroin 10^{-4} yksikön tarkkuudella.
- 4.4 Kolonni: putki ruostumatonta terästä, pituus 250 mm, sisähalkaisija 4,5 mm, jossa täyteenä halkaisijaltaan 5 mm:n piidioksidihukkasia, joissa on 22—23 % hiiltä oktadekyyilisilaanin muodossa (Huom. 2).
- 4.5 Piirturi ja/tai integraattori.

5 REAGENSIT

Reagenssien on oltava analyysipuhtaita ja eluointiliuottimien kaasuttomia (niitä voidaan käyttää useita kertoja ilman että se vaikuttaa erottumiseen).

- 5.1 Kloroformi.
- 5.2 Asetoni.
- 5.3 Asetonitriili.
- 5.4 Eluointiliuotin: asetonitriili + asetoni (aloitetaan sekoitussuhteella 50:50, suhdetta muutetaan halutun erottumisen aikaansaamiseksi).
- 5.5 Liuotin: asetoni tai asetonin ja kloroformin seos (1:1).
- 5.6 Vertailutriglyseridit: joko valmiina saatavat triglyseridit, kuten tripalmitiini, trioleiini, jne. (retentioajat voidaan tällöin määrittää graafisesti ekvivalenttisen hiililuvun mukaan), tai käytetään soijaöljystä saatua vertailukromatogrammia (ks. huom. 3 ja 4 ja kuvat 1 ja 2).

6 NÄYTTEIDEN VALMISTELU

Näytteestä valmistetaan 5-prosenttinen liuos punnitsemalla $0,5 \pm 0,001$ g näytettä 10 ml:n mittapulloon ja lisäämällä liuotinta (5.5) niin, että liuosta on 10 ml.

7 SUORITUS

- 7.1 Kromatografialaitteisto asetetaan käyttökuntoon. Ruiskutetaan eluointiliuotinta (5.4) 1,5 ml/mm laitteiston puhdistamiseksi. Odotetaan, kunnes piirturin antama perusviiva on suora.

Injektoidaan 10 µl 6 kohdan mukaisesti valmisteltua näytettä.

▼B

8 TULOSTEN LASKEMINEN JA ESITTÄMINEN

Käytetään sisäisen normalisoinnin menetelmää, toisin sanoin oletetaan, että eri triglyseridien piikkien pinta-alojen summa on 100 %.

Lasketaan jokaisen triglyseridin suhteellinen osuus yhden desimaalin tarkkuudella kaavasta:

$$\text{Triglyseridi \%} = \frac{\text{piikin pinta-ala}}{\text{piikkien yhteenlaskettu pinta-ala}} \times 100$$

Huom. 1 Eluotumisjärjestys voidaan määrittää laskemalla ekvivalenttinen hiililuku, joka usein määritellään kaavalla $ECN = CN - 2n$, jossa CN on hiililuku ja n on kaksoissidosten määrä.

Laskelmaa voidaan tarkentaa ottamalla huomioon kaksoissidosten alkuperä.

Jos n_o , n_l ja n_n ovat oleiinihapon, linolihapon ja linoleenihapon kaksoissidosten määrät, ekvivalenttinen hiililuku voidaan laskea kaavasta:

$$ECN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_n n_n,$$

jossa olevat kertoimet d_o , d_l ja d_n voidaan laskea vertailutriglyseridien avulla. Tässä menetelmässä käytetyissä olosuhteissa kaavasta tulee suunnilleen seuraava:

$$ECN = CN - [2,60 n_o] - [2,35 n_l] - [2,17 n_n]$$

Huom. 2 Esimerkiksi: Lichrosorb (Merck) RP 18 Art 50333;

Lichrosphere (Merck) 100 CH18 Art 50377 tai vastaava.

Huom. 3 On myös mahdollista laskea erotuskyky trioleiinin suhteen usean vertailutriglyseridin avulla,

$$\alpha = RT'/RT'_{\text{oleiini}}$$

käyttämällä korjattua retentioaikaa $RT' = RT - RT_{\text{liuotin}}$.

Log α :n kuvaajasta f:n funktiona (f on kaksoissidosten lukumäärä) voidaan määrittää kaikkien vertailutriglyseridien sisältämien rasvahappojen triglyseridien retentioindeksit (ks. kuva 2).

Huom. 4 Kolonnin on oltava niin tehokas, että trilinoleiinin piikki (LLL) erottuu selvästi niiden triglyseridien piikeistä, joiden retentioajat ovat lähes samat.

▼M11

Huom. 5 Jotta trilinoleiini-piikki saadaan erottumaan selvästi läheisistä piikeistä tai mahdollisesti häiriöitä aiheuttavista aineista, oliivilamppuöljyt ja jalostamattomat uutetut oliiviöljyt on puhdistettava ennalta seuraavan menetelmän mukaisesti:

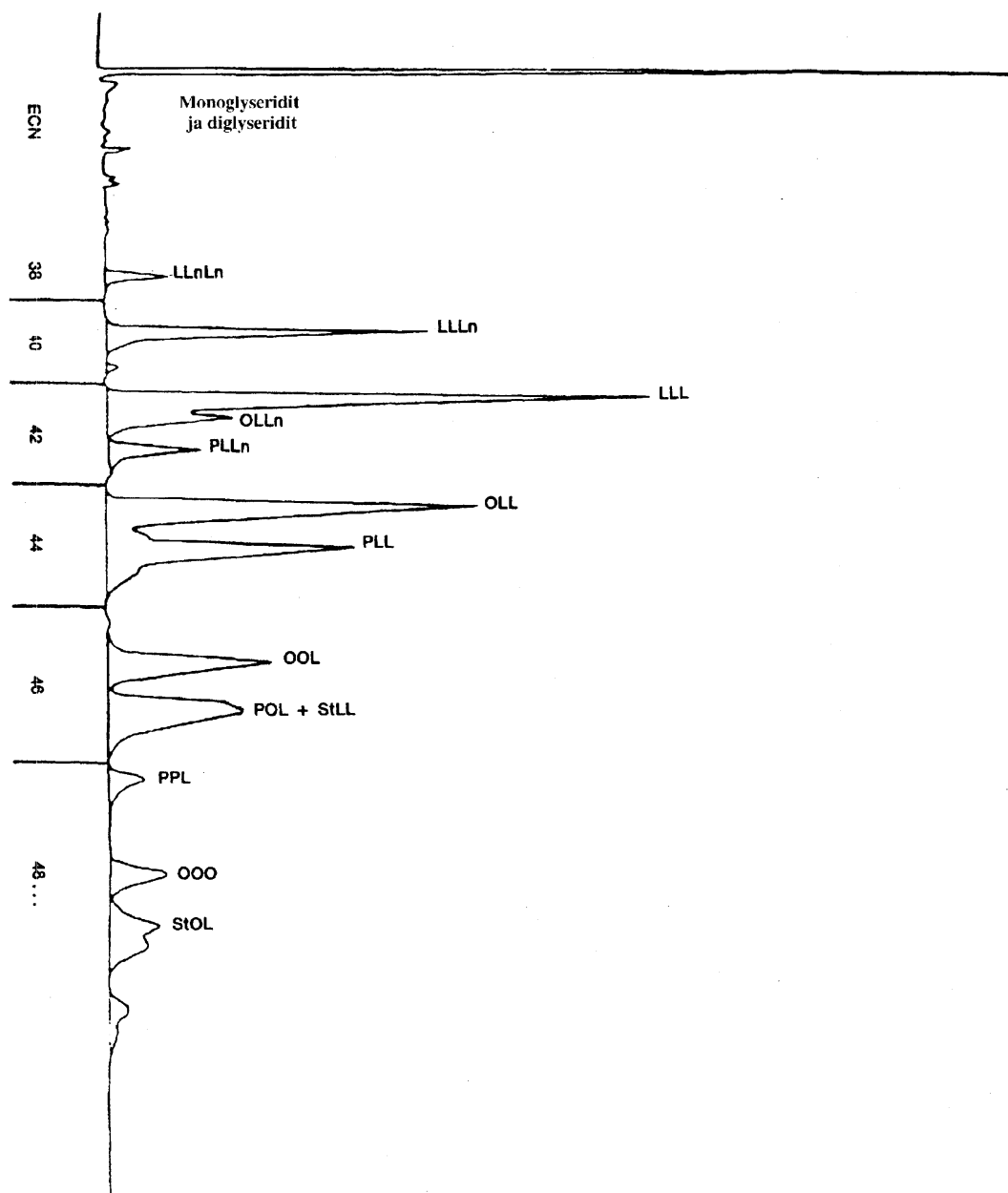
Absorboidaan 200 μ l öljyä laimentamatta pieneen neste/kiinteä - uuttoon varten tarkoitettuun piidioksidikoloniin (tyyppi SEP PAK silica cartridge-waters part. n. 51 900).

Triglyseridit eluoidaan 20 ml:lla HPLC-laatuista vedetöntä heksaania, enintään 20 sekuntia.

Eluoi tuote kuivataan typpivirassa ja liuotetaan isopropanoliin tai asetoniin (5 ml). Injektoidaan suuren erotuskyvyn nestekromatografiin (HPLC) 10–20 μ l. On tarkkailtava, että öljyn rasvahappokoostumus on sama ennen puhdistusta ja sen jälkeen, käytetyn määritysmenetelmän virherajoissa.

▼B

Kuva 1

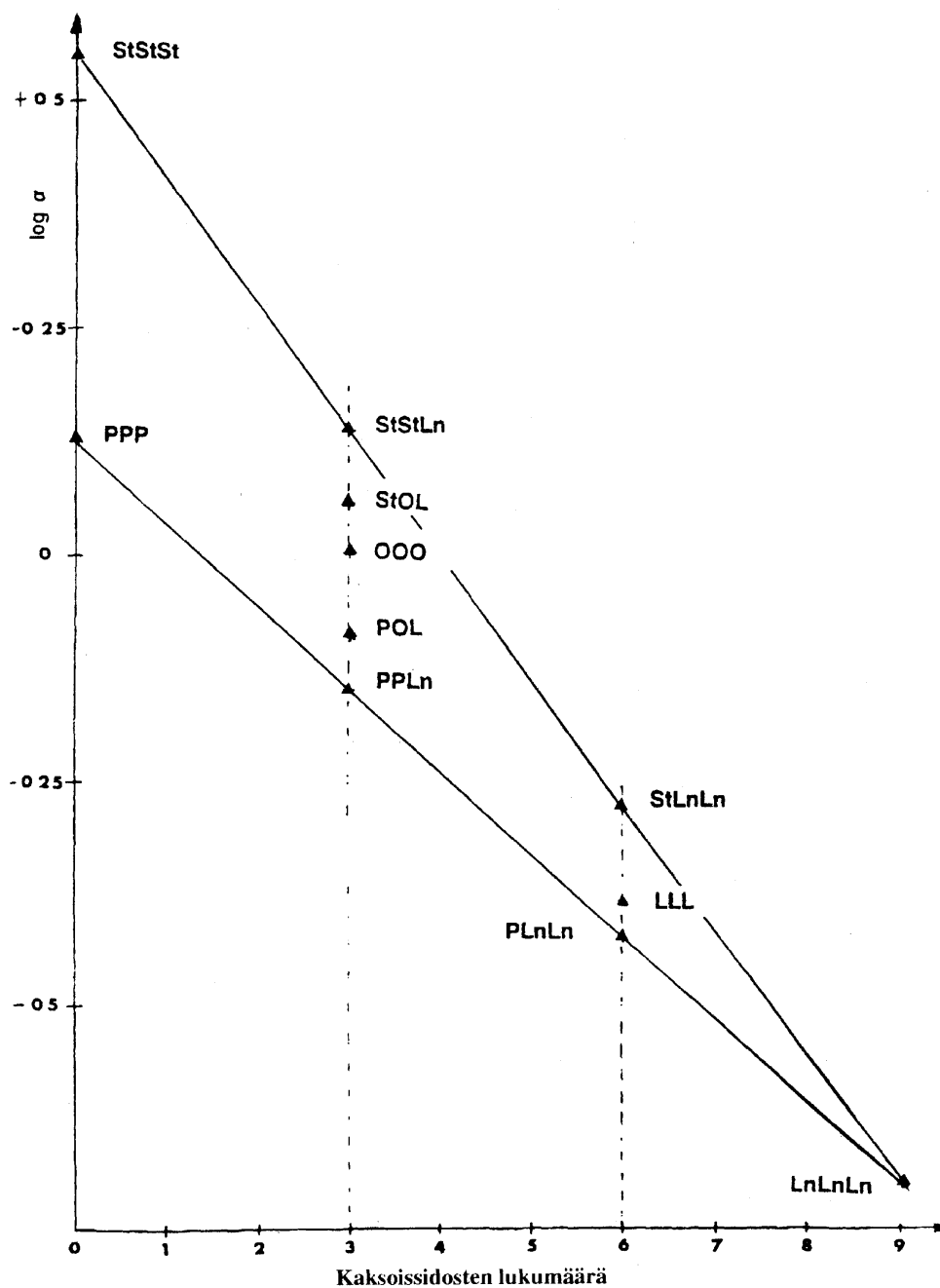
Soijaöljynäytteen kromatogrammi

P = palmitiinihappo St = steariinihappo O = oleiinihappo (öljyhappo) L =
linolihappo Ln = linoleeni-happo

▼B

Kuva 2

log a:n muuttuminen f:n funktiona (f = kaksoissidosten lukumäärä)



La = lauriinihappo My = myristiinihappo P = palmitiinihappo St = steariinihappo O = oleiinihappo L = linolihappo Ln = linoleeni-happo

▼B

LIITE IX

SPEKTROFOTOMETRINEN MÄÄRITYS

JOHDANTO

Spektrofotometrinen määrittäminen ultraviolettivalossa antaa tietoa rasvan laadusta, sen säilymisestä ja muutoksista, joita käsittelyt ovat siinä aiheuttaneet.

Tässä menetelmässä käytetyillä aallonpituuksilla tapahtuva absorptio johtuu konjugoiduista dieeni- ja trieenijärjestelmistä. Nämä absorptiot ilmaistaan ominaisekstinktiona (ekstinktio, joka tapahtuu tiettyyn liuottimeen valmistetun 1-prosenttisen rasvaliuoksen 1 cm:n paksuisessa kerroksessa), josta tavallisesti käytetään merkkiä K (nimitetään myös ”ekstinktiokertoimeksi”).

1 TARKOITUS

Tällä menetelmällä voidaan tutkia rasvoja spektrofotometrisesti ultraviolettivalossa.

2 PERIAATE

Rasva liuotetaan määrättyyn liuottimeen ja liuoksen ekstinktio mitataan tietyllä aallonpituudella käyttäen vertailuliuksena puhdasta liuotinta. Yksittäiset ekstinktiot lasketaan spektrofotometrin lukemista.

3 VÄLINEISTÖ

- 3.1 Spektrofotometri, joka mittaa ekstinktion ultraviolettivalossa aallonpituuksilla 220—360 nm, yhden nanometrin tarkkuudella.
- 3.2 Suorakaiteen muotoisia kvartsikyvettejä kansineen, optinen väli 1 cm. Vedellä tai muulla sopivalla liuottimella täytettynä kyvettien antamien lukemien ero saa olla enintään 0,01 ekstinktiyksikköä.
- 3.3 Mittapulloja, 25 ml.

▼M6

- 3.4 Kromatografiakolonne, jonka yläosan pituus on 270 mm ja halkaisija 35 mm ja jonka alaosan pituus on 270 mm ja halkaisija 10 mm.

▼B

4 REAGENSIT

- 4.1 Iso-oktaani (2,2,4—trimetyylipentaani), spektrofotometristä laatua: verrattuna tislattuun veteen sen läpäisyosuuden on oltava vähintään 60 % aallonpituudella 220 nm ja vähintään 95 % aallonpituudella 250 nm, tai
— sykloheksaani, spektrofotometristä laatua: tislattuun veteen verrattuna sen läpäisyosuuden on oltava vähintään 40 % 220 nm:ssä ja vähintään 95 % 250 nm:ssä.

▼M6**▼B**

- 4.2 Emäksistä alumiinioksidia kromatografiakolonia varten; esikäsittely ja tarkistus kuvataan lisäyksessä 1.
- 4.3 n-heksaani, kromatografiaa varten.

5 MENETTELY

- 5.1 Näytteen tulee olla täysin homogeenista eikä siinä saa olla suspendoituneita epäpuhtauksia. Öljyt, jotka ovat huoneenlämmössä nestemäisiä, suodatetaan paperin läpi noin 30 °C:ssa, kiinteät rasvat homogenoidaan ja suodatetaan lämpötilassa, joka ei saa olla yli 10 °C korkeampi kuin niiden sulamispiste.
- 5.2 Punnitetaan noin 0,25 g näytettä, joka on esikäsitelty edellä kuvatulla tavalla, 25 ml:n mittapulloon, joka täytetään liuottimella ja homogenoidaan. Syntyvän liuoksen on oltava täysin kirkasta. Jos ilmenee sameutta tai sakkaa, liuos suodatetaan nopeasti paperin läpi.
- 5.3 Kyvetiä täytetään saadulla liuoksella ja ekstinktiot mitataan sopivalla aallonpituudella 232—276 nm; käytetty liuotin toimii vertailuliuksena.

▼B

Saatujen ekstinktioarvojen on oltava 0,1—0,8; jollei tällaisia tuloksia saada, koe on uusittava käyttäen vahvempia tai laimeampia liuoksia tarpeen mukaan.

- 5.4 Kun on tarpeen määrittää ominaisekstinktio alumiinioksidilla tapahtuvan puhdistamisen jälkeen, toimitaan seuraavasti: kromatografiakolonnein pannaan 30 g emäksistä alumiinioksidia heksaaniin suspendoituna, adsorbentin annetaan laskeutua ja ylimääräinen heksaani poistetaan niin, että sitä on noin 1 cm alumiinioksidin päällä.

Liutetaan 10 g rasvaa homogenoituna ja suodatettuna 5.1 kohdan mukaisesti 100 ml:aan heksaania ja kaadetaan liuos kolonnein. Eluaatti kerätään talteen ja liuotin haihdutetaan tyhjiössä alle 25 °C:ssa.

Näin saatu rasva käsitellään välittömästi 5.2 kohdan mukaisesti.

6 TULOSTEN ESITTÄMINEN

- 6.1 Lasketaan ominaisekstinktiot (ekstinktiokertoimet) eri aallonpituuksilla seuraavasta kaavasta:

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

jossa:

K_{λ} = ominaisekstinktio aallonpituudella λ ;

E_{λ} = aallonpituudella λ mitattu ekstinktio;

c = liuksen väkevyyys g/100 ml;

s = kyvetin paksuus, cm

Tulokset ilmoitetaan kahden desimaalin tarkkuudella.

- 6.2 Oliiviöljyn spektrofotometrinen määrittäminen virallisissa asetuksissa tarkoitetun virallisen menetelmän mukaan vaatii ominaisekstinktion määrittämisen iso-oktaaniliuoksessa aallonpituuksilla 232 ja 270 nm ja ΔK :n laskemisen kaavasta:

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

jossa K_m on ominaisekstinktio aallonpituudella m , maksimaalisen absorptioon aallonpituudella noin 270 nm.



LISÄYS I

Alumiinioksidin esikäsitteily ja sen aktiivisuuden tarkistus

A.1.1 Alumiinioksidin esikäsitteily

Etukäteen 380—400 °C uunissa kolmen tunnin ajan kuivattu alumiinioksidi asetetaan ilmatiiviiseen astiaan. Tislattua vettä lisätään suhteessa 5 ml/100 g alumiinioksidia, astia suljetaan välittömästi, sitä ravistetaan useita kertoja ja annetaan sitten seistä vähintään 12 tuntia ennen käyttöä.

A.1.2 Alumiinioksidin aktiivisuuden tarkistaminen

Esikäsitellään kromatografiakolonne 30 g:lla alumiinioksidia. Seurataan 5.4 kohdan ohjeita ja johdetaan kolonnin läpi seos, jossa on:

- 95 % neitsytoliiviöljyä, jonka ominaisekstinktio on alle 0,18 aallonpituudella 268 nm,
- 5 % maapähkinäöljyä, joka on käsitelty valkaisumaalla sen puhdistuksen aikana ja jonka ominaisekstinktio on vähintään 4 aallonpituudella 268 nm.

Seos johdetaan kolonnin läpi ja jos sen ominaisekstinktio on yli 0,11 aallonpituudella 268 nm, alumiinioksidi on kelvollista; muutoin sen hydrataatioastetta on lisättävä.

▼B*LISÄYS II**Spektrofotometrin kalibrointi*

- A.2 Laitteisto tulee tarkistaa säännöllisesti (vähintään puolen vuoden välein), sekä aallonpituuksien vastaavuuden että lukematarkkuuden suhteen.
- A.2.1 Aallonpituuslukema voidaan tarkistaa joko elohopeahöyrylampulla tai sopivien suodattimien avulla.
- A.2.2 Valokennon ja valomonistimen antamat lukemat voidaan tarkistaa seuraavasti: punnitaan 0,2 g spektrofotometrisesti puhdasta kaliumkromaattia ja liuotetaan se 0,05 N kaliumhydroksidiliuokseen 1 000 ml:n mittapulloon niin, että liuosta on 1 000 ml. Mitataan tasan 25 ml tätä liuosta 500 ml:n mittapulloon ja täytetään pullo kaliumhydroksidiliuoksella.
- Näin saadun liuoksen ekstinktio mitataan aallonpituudella 275 nm ja käytetään kaliumhydroksidiliuosta vertailuliuksena. Mitatun ekstinktion on oltava $0,200 \pm 0,005$, kun käytetään 1 cm:n optista kyvettä.

▼B

LIITE X A

RASVAHAPPOJEN METYYLIESTEREIDEN MÄÄRITTÄMINEN
KAASUKROMATOGRAFISELLA MENETELMÄLLÄ

1 SOVELTAMISALA

Tämä menetelmä antaa yleisohjeita kaasukromatografian käyttöön, kun tarkoituksena on määrittää liitteessä X B kuvatulla menetelmällä saadun rasvahappojen metyyliestereiden seoksen koostumus kvalitatiivisesti ja kvantitatiivisesti.

Menetelmä ei sovellu polymeroitujen rasvahappojen tutkimiseen.

2 REAGENSIT

2.1 Kantajakaasu

Inertti kaasu (typpi, helium, argon, vety, jne.), huolellisesti kuivattu; ei saa sisältää happea yli 10 mg/kg.

Huom. 1 Vety, jota voidaan käyttää kantajakaasuna ainoastaan kapillaarikolonneissa, kaksinkertaistaa määrittämisnopeuden, mutta sen käyttö on vaarallista. Turvalaitteita on kuitenkin saatavana.

2.2 Apukaasut

2.2.1 Vety (puhtaus $\geq 99,9\%$), ei saa sisältää orgaanisia epäpuhtauksia.

2.2.2 Ilmaa tai happea, ei saa sisältää orgaanisia epäpuhtauksia.

2.3 Vertailustandardi

Rasvahappojen puhtaiden metyyliestereiden seos tai sellaisen tunnetun rasvan metyyliestereitä, jotka ovat mahdollisimman samanlaisia kuin tutkittava rasva.

Monitydyttymättömien rasvahappojen hapettumista on vältettävä.

3 VÄLINEISTÖ

Tässä annetut ohjeet koskevat tavallista kaasukromatografista laitteistoa, joko täytetyllä kolonnilla tai kapillaarikolonnilla varustettua, sekä liekki-ionisaatiodektooria. Muutkin laitteistot, jotka ovat yhtä tehokkaita ja joiden erotuskyky on 4.1.2. kohdan mukainen, ovat sopivia.

3.1 Kaasukromatografi

Kaasukromatografissa on oltava seuraavat osat.

3.1.1 Injektiojärjestelmä

Käytetään injektiojärjestelmää, joka sopii:

- a) täytettyyn kolonniin, jonka kuollut tilavuus on mahdollisimman pieni (tässä tapauksessa injektiojärjestelmää tulee voida kuumentaa 20—50 °C kolonnin korkeampaan lämpötilaan); tai
- b) kapillaarikolonnin, jolloin sen on oltava erityisesti tähän käyttöön suunniteltu. Järjestelmä voi olla jakajatyypin tai jakajaton, kolonniin liitetty (on-column) injektori.

Huom. 2 Jos näytteessä on ainoastaan sellaisia rasvahappoja, joissa on vähintään 16 hiiliatomia, voidaan käyttää liikkuvaa neulainjektoria.

3.1.2 Uuni

Uunin tulee pystyä lämmittämään kolonni vähintään 260 °C:n lämpötilaan ja pitämään se valitussa lämpötilassa 1 °C:n tarkkuudella, jos kyse on täytetystä kolonnista, ja 0,1 °C:n tarkkuudella, jos kyse on kapillaarikolonnista. Viimeksimainittu vaatimus on erittäin tärkeä, jos käytetään kvartsilasiputkea.

Lämpötilaohjelmoidun laitteen käyttöä suositellaan kaikissa tapauksissa ja erityisesti rasvahapoille, joissa on alle 16 hiiliatomia.

3.1.3 Täytetty kolonni

▼B

3.1.3.1 Kolonni on valmistettu aineesta, joka ei reagoi tutkittavien aineiden kanssa (esim. lasi tai ruostumaton teräs); kolonnin mitat ovat seuraavat:

- a) pituus: 1—3 m. Pitkäketjuisten rasvahappojen ($> C_{20}$) tutkimiseen käytetään suhteellisen lyhyttä kolonnia. Tutkittaessa happoja, joissa on 4—6 hiiliatomia, suositeltava kolonnin pituus on 2 m;
- b) sisähalkaisija: 2—4 mm.

Huom. 3 Jos tutkittavana on monityydyttymättömiä happoja, joissa on enemmän kuin kolme kaksoissidosta, ne saattavat hajota kolonnissa, joka on ruostumatonta terästä.

Huom. 4 Voidaan myös käyttää järjestelmää, jossa on täytetty kaksoiskolonni.

3.1.3.2 Täyte, joka koostuu seuraavista aineista:

- a) tukiaine: happopestyä ja silanoitua piimaata tai muuta sopivaa, inerttiä tukiainetta, jonka raekokojakauma on kapea (25 mm:n vaihtelu 125 ja 200 mm:n välillä) niin, että keskimääräinen raekoko on suhteessa kolonnin pituuteen ja sisähalkaisijaan;
- b) stationääriifaasi: polyesterityyppinen polaarinen neste (esim. dietyleeniglykolipolysukkinaatti, butaanidiolipolysukkinaatti, etyleeniglykolipolyadipaatti jne.), syanosilikonit tai jokin muu neste, joka saa aikaan kromatografisen erottumisen (ks. kohta 4). Stationääriifaasin osuuden on oltava 5—20 % (m/m) täytteestä. Joissakin erotteluissa voidaan käyttää polaaritonta stationääriifaasia.

3.1.3.3 Kolonnin valmistelu

Kun kolonni on irrotettu detektorista, uuni kuumennetaan vähitellen 185 °C:seen ja inerttikaasua johdetaan 20—60 ml minuutissa juuri täytetyn kolonnin läpi, vähintään 16 tunnin ajan tässä lämpötilassa ja sitten vielä kaksi tuntia 195 °C:ssa.

3.1.4 Kapillaarikolonni

3.1.4.1 Putki, joka on valmistettu analysoitaville aineille inertistä aineesta (tavallisesti lasista tai kvartsilasista). Sisähalkaisijan on oltava 0,2—0,8 mm. Sisäpinta on käsiteltävä sopivalla menetelmällä (esim. pintakäsittely, inaktivointi) ennen kuin se päällystetään stationääriifaasi-kerroksella. Useimmissa tapauksissa riittävä pituus on 25 m.

3.1.4.2 Stationääriifaasi, pääasiassa polyglykolityyppejä [poly(etyleeniglykoli) 20 000], polyesterityyppejä (butaanidiolipolysukkinaatti) tai polaarista polysiloksaanityyppejä (syanosilikonit). Kytkeytetyt kolonnit (kolonniverkot) ovat myös sopivia.

Huom. 5 On olemassa vaara, että polaariset polysiloksaanit vaikeuttavat linoleenihapon ja C_{20} -happojen erottumista ja tunnistamista.

Päällysteen on oltava ohut, 0,1 — 0,2 mm.

3.1.4.3 Kolonnin kokoaminen ja esivalmistelut

Tavanomaisia varotoimenpiteitä on noudatettava kapillaarikolonniin kokoamisessa, ts. kolonnin sijoittelu uuniin (tukirakenteet), liitosten valinta ja asennus (tiiviyys), kolonnin päiden liittämisen injektiojärjestelmään ja detektoriin (mahdollisimman vähän kuollutta tilaa). Kantajakaasuvirta johdetaan kolonnin läpi (esimerkiksi 0,3 baaria, 30 kPa, 25 m pitkään kolonniin, jonka sisähalkaisija on 0,3 mm).

Kolonni esilämmitetään ohjelmoimalla uuni niin, että lämpötila nousee 3 °C minuutissa huoneenlämmöstä sellaiseen lämpötilaan, joka on 10 °C alhaisempi kuin stationääriifaasin hajoamislämpötila. Uuni pidetään tässä lämpötilassa yhden tunnin ajan, kunnes perusviiva on tasoittunut. Lämpötila palautetaan 180 °C:seen ja työskentelyä jatketaan vakio­lämpötilassa.

Huom. 6 Esivalmisteltuja kolonneja voi myös ostaa.

3.1.5 Detektori, joka kestää korkeampaa lämpötilaa kuin kolonni.

▼ **B**3.2 **Ruisku**

Ruiskun enimmäistilavuuden on oltava 10 ml ja jakovälin 0,1 ml.

3.3 **Piirturi**

Kun piirturin käyrää käytetään määritettävän seoksen koostumuksen laskemiseen, tarvitaan elektroninen, erittäin tarkka piirturi, joka sopii yhteen muun laitteiston kanssa. Piirturilla on oltava seuraavat ominaisuudet:

- a) vasteaika alle 1,5 s, mieluummin 1 s (vasteaika on aika, joka kuluu, kun piirturin kärki siirtyy nolasta 90 %:iin, kun yhtäkkiä annetaan 100 %:n signaali);
- b) paperin leveys vähintään 20 cm;
- c) paperin nopeutta on voitava säätää 0,4:stä 2,5 cm:iin minuutissa.

3.4 **Integraattori tai laskin (valinnainen)**

Elektronisen integraattorin tai laskimen avulla tulos voidaan laskea nopeasti ja tarkasti. Sen on annettava lineaarinen vaste riittävällä herkkyydellä ja perusviivan poikkeaman korjauksen tulee olla riittävä.

4 **SUORITUS**

Toimenpiteet alakohdissa 4.1—4.3 koskevat liekki-ionisaatiodektoirin käyttöä.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kaasukromatografista laitetta, jossa on lämmönjohtokyvyn ilmaisin (katarometri). Koeolosuhteita on tällöin muutettava 6 kohdan mukaan.

4.1 **Koeolosuhteet**

4.1.1 Ihanteellisten koeolosuhteiden valinta

4.1.1.1 Täytetty kolonni

Seuraavat muuttujat on otettava huomioon olosuhteita valittaessa:

- a) kolonnin pituus ja halkaisija;
- b) stationäärifaasin ominaisuudet ja määrä;
- c) kolonnin lämpötila;
- d) kantajakaasuvirta;
- e) tarvittava erotuskyky;
- f) näytteen määrä, joka on valittava siten, että detektori ja elektrometri yhdessä antavat lineaarisen vasteen;
- g) määrittämisen kesto.

Taulukoissa 1 ja 2 annetut arvot johtavat yleensä haluttuihin tuloksiin, eli vähintään 2 000 teoreettista pohjaa yhtä kolonnimetriä kohti metyylisteraatilla, kun se eluoidaan noin 15 minuutissa.

Injektorin lämpötilan tulisi olla noin 200 °C ja detektorin lämpötilan tulisi olla vähintään yhtä suuri kuin kolonnin, jos laitteisto antaa siihen mahdollisuuden.

Liekki-ionisaatiodektooriin johdetun vedyn virtausnopeuden suhde kantajakaasun nopeuteen on yleensä 1:2 — 1:1 kolonnin halkaisijan mukaan. Hapen virtaus on noin 5—10 kertaa suurempi kuin vedyn.

Taulukko 1

Kolonnin sisähalkaisija (mm)	Kantajakaasun virtausnopeus (ml/min)
2	15—25
3	20—40
4	40—60

▼ **B**

Taulukko 2

Stationäärifaasin pitoisuus % (m/m)	Kolonnin lämpötila °C
5	175
10	180
15	185
20	185

4.1.1.2 Kapillaarikolonne

Kapillaarikolonien tehokkuus- ja permeabiliteettiominaisuuksien vuoksi aineosien erottuminen ja määrityksen kesto riippuvat voimakkaasti kantajakaasun virtausnopeudesta kolonnissa. Tämän vuoksi toimintaolosuhteet on valittava tätä parametria (eli kolonnin täytehäviötä) muuttamalla sen mukaan, halutaanko parantaa erotuskykyä vai saada tulos nopeasti.

4.1.2 Teoreettisten pohjien määrän (tehokkuuden) ja erotuskyvyn määrittäminen (ks. kuva 1)

Määritys tehdään metyylistearaatin ja metyylioleaatin seoksesta, jossa on suunnilleen yhtä paljon molempia (esim. kaakaovoin metyyliestereistä).

Näytteen määrä, kolonnin lämpötila ja kantajakaasun virtaus valitaan niin, että mahdollisimman suuri osa metyylistearaatin piikistä piirtyy noin 15 minuuttia liuottimen piikin jälkeen ja että metyylistearaattiikki täyttää noin kolme neljännestä koko asteikosta.

Teoreettisten pohjien määrä n lasketaan kaavasta:

$$n = 16 \left[\frac{dr_1}{W_1} \right]^2$$

ja erotuskyky R kaavasta:

$$R = \frac{2\Delta}{W_1 + W_2}$$

jossa:

dr_1 on retentioetäisyys millimetreinä, alkaen kromatogrammin alusta metyylistearaattiikin huippuun;

W_1 ja W_2 ovat metyylistearaatin ja metyylioleaatin piikkien leveydet millimetreinä, mitattuina kohdista, joissa piikkikäyrän käännepisteisiin piirretyt tangentit leikkaavat perusviivan;

Δ metyylistearaatin ja metyylioleaatin piikkien huippujen väli millimetreinä;

▼ **M2**

ja resoluutioluku I_r , kaavalla

$$\frac{a}{b}$$

jossa:

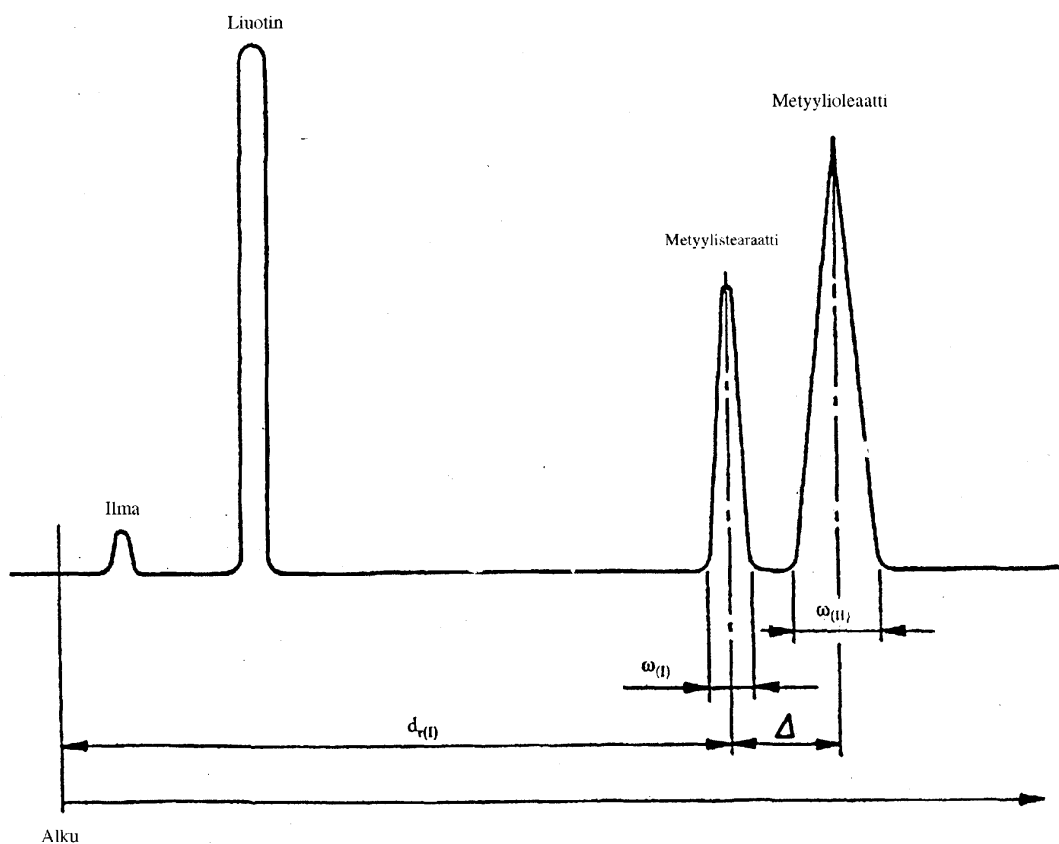
a = pienimmän piikin korkeus, mitattuna suhteessa perusviivaan,

b = kahden vierekkäisen piikin muodostaman laakson alimman pisteen korkeus, mitattuna suhteessa perusviivaan.

▼B

Kuva 1

Kromatogrammi teoreettisten pohjien lukumäärän (tehokkuuden) ja erotuskyvyn määrittämiseksi



Koelosuhteet on valittava siten, että saadaan vähintään 2 000 teoreettista pohjaa kolonnimetriä kohti metyylisteraatille ja että erotuskyky on vähintään 1,25.

4.2 Näytteenotto

Injektoidaan ruiskulla (3.2) kolonniin 0,1 — 2 ml metyyliesterien liuosta, joka on valmistettu liitteessä X B esitetyn menetelmän mukaan.

Jos estereissä ei ole liuottimia, valmistetaan noin 100 mg/ml:n liuos heptaaniin (kaasukromatografista laatua) ja injektoidaan 0,1 — 1 ml tätä liuosta.

Jos määritetään aineosia, joita on vähän, näytteen määrää voidaan suurentaa (enintään kymmenkertaiseksi).

4.3 Määrittäminen

Koelosuhteiden tulee yleensä olla kohdan 4.1.1 mukaiset.

Alhaisempien kolonnilämpötilojen käyttö on kuitenkin mahdollista, kun määritetään rasvahappoja, joissa on alle 12 hiiliatomia, tai voidaan käyttää korkeampia lämpötiloja, jos rasvahapoissa on yli 20 hiiliatomia.

Näissä tapauksissa voidaan käyttää lämpötilan ohjelmointia. Esimerkiksi jos näytteessä on rasvahappojen metyyliestereitä, joissa on alle 12 hiiliatomia, näyte voidaan injektoida 100 °C:ssa (tai 50—60 °C:ssa, jos mukana on voihappoa) ja ohjelmoida lämpötila nousemaan 4—8 °C/min, kunnes saavutetaan optimilämpötila. Joissakin tapauksissa menetelmät voidaan yhdistää.

Ohjelmoidun lämmityksen jälkeen eluointia jatketaan vakio­lämpötilassa, kunnes kaikki aineosat ovat eluotuneet. Jos laitteen lämpötilaa ei voida ohjelmoida, käytetään kahta lämpötilaa, jotka ovat 100—195 °C.

On suositeltavaa tehdä määrittäminen tarvittaessa kahdessa polaarisuudeltaan erilaisessa faasissa, jotta varmistetaan siitä, että mukana ei ole toisen

▼B

piikin alle jääviä piikkejä, esimerkiksi jos näytteessä on yhtä aikaa $C_{18:3}$ ja $C_{20:0}$ tai $C_{18:3}$ ja $C_{18:2}$ konjugoituneina.

4.4 Vertailukromatogrammin ja -kuvaajan valmistaminen

Määritetään vertailustandardiseos (2.3) käyttäen samoja koeolosuhteita kuin näytettä määritettäessä, ja mitataan rasvahappojen retentioajat tai -etäisyydet. Puolilogaritimpaperille piirretään jokaista tyydyttymättömyysastetta varten kuvaaja, jossa on retentioajan tai -etäisyyden logaritmi hiiliatomien määrän funktiona; suoraketjuisten ja tyydyttymättömyysasteeltaan samojen estereiden kuvaajien tulisi olla suoria vakiolämpötilassa. Suorien tulisi olla suunnilleen yhdensuuntaiset.

On vältettävä olosuhteita, joissa piikki jää toisen alle, ts. erotuskyky ei riitä erottamaan kahta aineosaa.

5 TULOSTEN ESITTÄMINEN

5.1 Kvalitatiivinen määrittäminen

Näytteen metyyliesteripiikit tunnistetaan 4.4 alakohdassa mainittujen käyrien avulla, tarvittaessa interpoloimalla.

5.2 Kvantitatiivinen määrittäminen

5.2.1 Koostumuksen määrittäminen

Joitakin poikkeuksia lukuun ottamatta voidaan käyttää sisäisen normalisoinnin menetelmää, jossa oletetaan että kromatogrammi kuvaa näytteen kaikkia aineosia, eli että piikkien yhteenlaskettu pinta-ala vastaa aineosia sataprosenttisesti (täydellinen eluoitus).

Jos laitteistoon kuuluu integraattori, käytetään sen antamia tuloksia. Muussa tapauksessa jokaisen piikin pinta-ala lasketaan kertomalla sen korkeus leveydellä piikin puolivälistä mitattuna ja ottaen huomioon piirurissa mahdollisesti käytetyt vaimennukset.

5.2.2 Laskentamenetelmät

5.2.2.1 Yleinen tapaus

Lasketaan tietyssä aineosassa olevien metyyliesterien pitoisuus massaprosentteina määrittämällä piikin pinta-alan suhteellinen osuus kaikkien piikkien yhteenlasketusta pinta-alasta seuraavan kaavan avulla:

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

jossa:

A_i on aineen i piikin pinta-ala;

ΣA on kaikkien piikkien yhteenlaskettu pinta-ala.

Tulos annetaan yhden desimaalin tarkkuudella.

Huom. 7 Tässä yleisessä tapauksessa laskun tuloksen katsotaan perustuvan siihen, että suhteelliset pinta-alat vastaavat massojen prosentuaalisia suhteita. Tapauksissa, joissa näin ei voida olettaa, menetellään 5.2.2.2 alakohdan mukaan.

5.2.2.2 Korjauskertoimien käyttö

Tapauksissa, joissa rasvahapossa esimerkiksi on vähemmän kuin kahdeksan hiiliatomia tai hapossa on sekundaarisia ryhmiä, taikka kun käytetään lämmön johtumiseen perustuvaa detektoria tai kun tulosten on oltava mahdollisimman tarkkoja, on käytettävä korjauskertoimia muutettaessa piikkien pinta-alojen prosenttiosuuksia aineosien massaprosenteiksi.

Korjauskertoimet määritetään kromatogrammista, joka saadaan tarkoin tunnettujen metyyliestereiden vertailuseoksesta samoissa olosuhteissa, joissa näyte määritettiin.

Vertailuseoksen aineen i prosentuaalinen massaosuus saadaan kaavasta:

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

jossa:

m_i on vertailuseoksen aineen i massa;

▼B

S_m on vertailuseoksen eri aineosien massojen summa.

Lasketaan aineen i prosentuaalinen pinta-alaosuus vertailuseoksen (4.4) kromatogrammista:

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

jossa:

A_i on aineen i piikin pinta-ala;

ΣA on kaikkien piikkien pinta-alojen summa.

Korjauskerroin saadaan kaavasta:

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

Yleensä korjauskertoimet ilmoitetaan suhteessa $K_{C_{16}}$:een; tällöin suhteelliset kertoimet ovat:

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

Näytteen jokaisen aineen i määrä prosentiosuutena metyyliestereiden massasta on:

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

Tulos annetaan yhden desimaalin tarkkuudella.

5.2.2.3 Sisäisen standardin käyttö

Tietyissä määrityksissä (esimerkiksi jos kaikkien rasvahappojen määriä ei tunneta, kuten silloin kun 16 ja 18 hiiliatomia sisältävien rasvahappojen ohella esiintyy neljä ja kuusi hiiliatomia sisältäviä happoja tai kun on tarpeen määrittää näytteessä olevien rasvahappojen absoluuttinen määrä) on tarpeen käyttää sisäistä standardia. Usein käytetään rasvahappoja, joissa on 5, 15 tai 17 hiiliatomia. Sisäisen standardin korjauskerroin on määritettävä tarvittaessa.

Aineen i prosentuaalinen massaosuus metyyliestereinä ilmaistuna saadaan kaavasta:

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

jossa:

A_i on aineen i piikin pinta-ala;

A_s on sisäisen standardin piikin pinta-ala;

K'_i on aineen i korjauskerroin (suhteessa $K_{C_{16}}$:een);

K'_s on sisäisen standardin korjauskerroin (suhteessa $K_{C_{16}}$:een);

m on näytteen massa milligrammoina;

m_s on sisäisen standardin massa milligrammoina.

Tulos annetaan yhden desimaalin tarkkuudella.

▼M2

6 TRANS-ISOMEERIEN MÄÄRITYKSEN ERITYISTAPAUSET

Rasvahappojen, joiden hiiliatomien lukumäärä on 10-24, trans-isomeerien pitoisuus voidaan määrittää erottamalla metyyliesterit käyttäen kapillaarikromatografisia kolonneja, joilla on tietty polaarisuus.

- 6.1 Piioksidista tehty kapillaarikolonne, sisähalkaisija 0,25-0,32 mm ja pituus 50 m, varustettu syanopropysilikonipinnoitteella, jonka paksuus on 0,1-0,3 μm (tyyppi SP 2340, tyyppi SP 2380, C. P. sil 88, Silor 10 ja vastaavat tyypit).
- 6.2 Metyyliesterit esikäsitellään liitteessä X B esitetyn menetelmän B mukaisesti. Rasva-aineet, joiden vapaa happoisuus on yli 3 %, on ensin neutraloitava liitteessä VII olevan 6.1 kohdan mukaisesti.

▼ M2

6.3 Työskentelyolosuhteet kaasukromatografiaa varten ovat kokonaisuudessaan seuraavat:

- kolonnin lämpötila: ohjelmoitu 150 °C:n ja 230 °C:n välille (esimerkiksi 165 °C 15 minuutin ajan, minkä jälkeen lämpötilaa nostetaan 5 °C minuutissa, kunnes lämpötila on 200 °C),
- injektorin lämpötila: 250 °C, jos käytetään jakajainjektorijärjestelmää, tai sama kuin kolonnin alkulämpötila, jos käytetään *on column* -järjestelmää.
- detektorin lämpötila: 260 °C,
- kantajakaasun (heliumia ja vetyä) virtausnopeus: 1,2 ml/min.

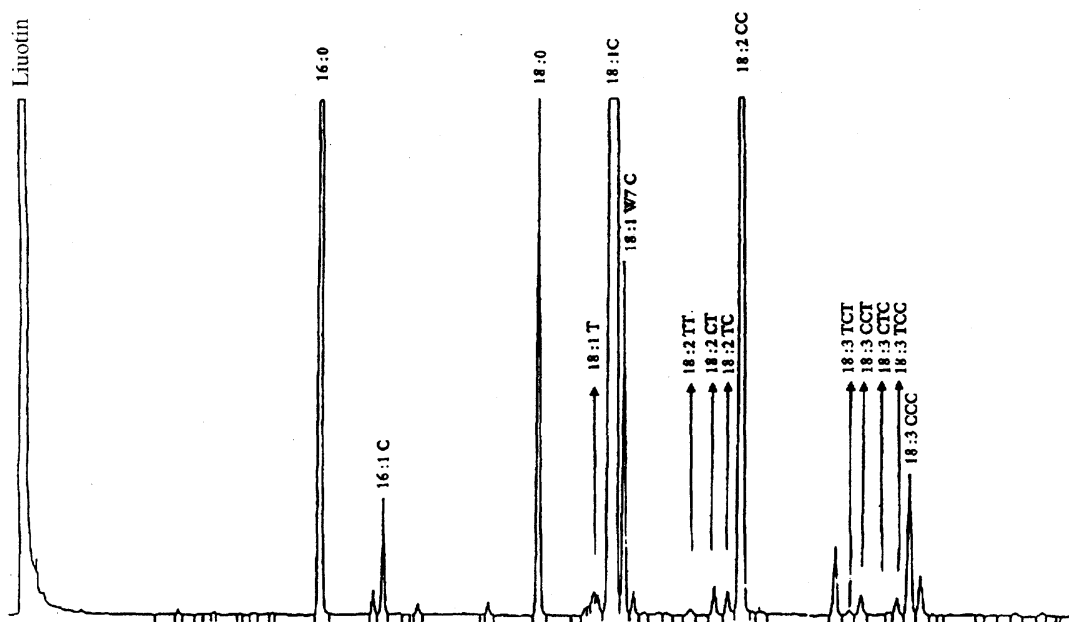
Ruiskutetun määrän on oltava sellainen, että käytetyissä herkkyysolosuhteissa arakidonihapon metyyliesteriä vastaavan piikin korkeus on vähintään 20 % asteikon alarajasta.

6.4 Eri metyyliesterit tunnistetaan retentioaikojen perusteella: metyyliesterien retentioaikoja verrataan vertailuseosten vastaaviin retentioaikoihin (kuten 2.3 kohdassa esitetään).

”Trans”-rasvahappojen esterit eluoidaan ennen vastaavia ”cis”-isomeerejä. Kuvassa 2 on esimerkki kromatogrammista.

Kuva 2

Kaasukromatogrammi, joka kuvaa rasvahappojen trans-isomeerien määrittystä kapillaarikolonin avulla



6.5 Kolonnin 4.1.2 kohdan mukaisesti määritetyn tehokkuuden on oltava sellainen, että se sallii tiettyjen kriittisten parien erottamisen, esimerkiksi parin, joka muodostuu oleiinihapon piikistä ja transoleiinihappojen massiivista, trans C 18:1/cis C 18:1, siten, että resoluutioluku on suurempi kuin 2.

6.6 Eri ”trans”-rasvahappojen prosenttiosuus lasketaan niihin liittyvän piikin pinta-alan ja kaikkien mukana olevien piikkien yhteenlasketun pinta-alan välisen suhteen perusteella.

Seuraavien rasvahappojen prosenttiosuudet on otettava huomioon:

- 18-atomiset ”trans”-hapot (T 18:1), jotka sisältyvät tämän asetuksen liitteessä I transoleiini-isomeerien yhteismäärään,
- oktadekadieeniset ”cis-trans”- ja ”trans-cis” -hapot [(CT/TC) 18:2], jotka sisältyvät tämän asetuksen liitteessä I translinoli-isomeerien yhteismäärään.
- oktadekatrieeniset ”trans-cis-trans”-, ”cis-cis-trans”-, ”cis-trans-cis” ja ”trans-cis-cis” -hapot [(TCT + CCT + CTC + TCC) 18:3], jotka sisältyvät tämän asetuksen liitteessä I translinoleeni-isomeerien yhteismäärään.

Huom. 8: Tämän menetelmän erityisominaisuudet huomioon ottaen tulokset annetaan kahden desimaalin tarkkuudella.

▼ **B**► **M2** 7 ◀ ERIKOISTAPAUS — KATAROMETRIDETEKTORIN KÄYTTÖ
(PERUSTUU LÄMMÖNJOHTOKYVYN MUUTOKSIIN)

Rasvahappojen metyyliestereiden seoksen kvantitatiiviseen ja kvalitatiiviseen määrittämiseen voidaan käyttää myös kaasukromatografia, jonka detektorin toiminta perustuu lämmönjohtokyvyn muutoksiin (katarometri). Sellaista käytettäessä on 3 ja 4 kohdassa kuvattuja olosuhteita muutettava taulukossa 3 esitetyllä tavalla.

Kvantitatiivista määrittystä varten käytetään 5.2.2.2 kohdan mukaisia korjauskertoimia.

Taulukko 3

Muuttuja	Arvo tai vaatimus
Kolonnei	Pituus: 2—4 m Sisähalkaisija: 4 mm
Tukiaine	Raekoko 160—200 mm
Stationäärifaasin määrä	15—25 % (m/m)
Kantajakaasu	Helium tai vety, mahdollisimman vähän happea
Apukaasut	Ei käytetä
Injektorin lämpötila	40—60 °C korkeampi kuin kolonnin
Kolonnin lämpötila	180—200 °C
Kantajakaasun virtausnopeus	Tavallisesti 60—80 ml/min
Injektoitu määrä	Tavallisesti 0,5—2 µl

► **M2** 8 ◀ KOESELOSTE

Koeselosteessa on ilmoitettava metyyliestereiden valmistusmenetelmät, käytetty kaasukromatografinen menetelmä sekä saadut tulokset. Siinä on myös mainittava kaikki menettelylliset yksityiskohdat, joista ei määrätä tässä kansainvälisessä standardissa, tai joita pidetään valinnaisina, sekä kaikki tapahtumat, jotka ovat voineet vaikuttaa tuloksiin.

Koeselosteessa on oltava kaikki tarpeelliset tiedot, jotka tarvitaan näytteen täydelliseen tunnistamiseen.



LIITE X B

**RASVAHAPPOJEN METYYLIESTEREIDEN VALMISTAMINEN
ASETUKSEN (ETY) N:O 72/77 LIITTEESSÄ VI OLEVASSA I JA II
KOHDASSA TAI TÄSSÄ KUVATULLA VAIHTOEHTOISELLA MENE-
TELMÄLLÄ**

JOHDANTO

Menetelmän valinta riippuu rasvahappokoostumuksesta, tutkittavan rasvan tai öljyn happamuudesta sekä suoritettavasta kaasukromatografisesta määrytyksestä.

Täsmennyksiä:

- rasvoille ja öljyille, joiden rasvahapoissa on vähemmän kuin 12 hiiliatomia, soveltuvat ainoastaan menetelmät, joissa käytetään ilmatiiviisti suljettua pulloa tai dimetyylisulfaattia,
- rasvoille ja öljyille, joiden happamuus on yli 3 %, soveltuvat ainoastaan menetelmät, joissa käytetään metanolia, suolahappoa tai dimetyylisulfaattia,
- trans-isomeerien kaasukromatografisiin määrytyksiin soveltuvat ainoastaan menetelmät, joissa käytetään natriummetylaattia tai dimetyylisulfaattia,
- kun valmistetaan metyyliestereitä pienistä määristä rasvoja tai öljyjä, jotka on eroteltu ohutkerroskromatografialla, on käytettävä metanoliheksaani-rikkihappomenetelmää.

Saippuoitumattomat osat voidaan jättää huomiotta, ellei niitä ole yli 3 %; muussa tapauksessa metyyliesterit on valmistettava rasvahapoista.

1 TARKOITUS

Seuraavassa kuvataan viisi menetelmää rasvojen ja öljyjen metyyliesterien valmistamiseksi:

- a) natriummetylaatilla;
- b) suljetussa pullossa natriummetylaatilla;
- c) suljetussa pullossa vetykloridin metanoliliuoksella;
- d) dimetyylisulfaatilla;
- e) metanolilla, heksaanilla ja rikkihapolla.

Menetelmä A

2 PERIAATE

Määritettävää rasvaa tai öljyä kuumennetaan metanolissa ja natriummetylaattissa käyttäen palautusjäähdytintä. Saadut metyyliesterit uutetaan etyylietterillä.

3 VÄLINEISTÖ

- 3.1 100 ml:n pullo ja palautusjäähdytin, jonka päähän on liitetty natronkalkkiputki; lasihiokset.
- 3.2 50 ml:n mittakoeputkia.
- 3.3 5 ml:n mittapipetti, jakoväli 0,1 ml.
- 3.4 250 ml:n erotussuppiloita.
- 3.5 200 ml:n pullo.

4 REAGENSIT

- 4.1 Vedetön metanoli.
- 4.2 Natriummetylaatin noin 1-prosenttinen metanoliliuos; valmistetaan liuottamalla 0,34 g metallista natriumia 100 ml:aan vedetöntä metanolia.
- 4.3 Etyylieetteri.
- 4.4 10-prosenttinen natriumkloridiliuos.
- 4.5 40—60 °C:n lämpöistä petrolieetteriä.

▼B**5 SUORITUS**

- 5.1 Ennalta natriumsulfaatilla kuivattua ja suodatettua rasvaa tai öljyä punnitaan 2 g 100 ml:n pulloon. Lisätään 35 ml metanolia, asennetaan jäädytin ja keitetään muutama minuutti käyttäen palautusjäähdytintä.
- 5.2 Lämmittäminen lopetetaan, jäädytin poistetaan ja lisätään nopeasti 3,5 ml natriummetylaattiliuosta; asennetaan jäädytin taas paikalleen ja keitetään palautusjäähdytintä käyttäen vähintään kolme tuntia. Metylaatio on täydellinen, kun kaikki rasva on sulanut liuokseen ja reaktioseos on aivan kirkas huoneenlämmössä.
- 5.3 Jäähdytetään ja kaadetaan seos 250 ml:n erotussuppiloon, lisätään 35—40 ml etyylietteriä, 100 ml vettä ja 5—6 ml 10-prosenttista natriumkloridiliuosta. Ravistetaan ja annetaan kerrosten erottua; siirretään vesifaasi toiseen erotussuppiloon ja uutetaan uudelleen 25 ml:lla etyylietteriä.

Eetteriuutteet yhdistetään ja lisätään 50 ml petroleetteriä, jonka lämpötila on 40—60 °C; vesi erottuu ja voidaan poistaa.

Eetterifaasi pestään kolme kertaa 10—15 ml:n vesierillä, kuivataan natriumsulfaatilla, suodatetaan paperin läpi ja kerätään suodos 200 ml:n pulloon.

Liutin haihdutetaan pois vesihauteessa puhtaassa typpivirrassa.

Menetelmä B**2 PERIAATE**

Määritettävä rasva tai öljy käsitellään suljetussa pullossa natriummetylaatin metanoliliuoksessa 85—90 °C:ssa.

3 VÄLINEISTÖ

- 3.1 Vahvaseinäinen lasipullo, tilavuus noin 5 ml (korkeus 40—45 mm, halkaisija 14—16 mm).
- 3.2 1 ml:n mittapipetti, jakoväli 0,1 ml.

4 REAGENSsit

- 4.1 Natriummetylaatin noin 1,5-prosenttinen metanoliliuos. Valmistetaan liuottamalla 0,50 g metallista natriumia 100 ml:aan vedetöntä metanolia.

5 SUORITUS

- 5.1 Ennalta natriumsulfaatilla kuivattua ja suodatettua rasvaa tai öljyä punnitaan 2 g lasipulloon. Lisätään 0,3 g (noin 0,4 ml) natriummetylaattiliuosta, minkä jälkeen pullo suljetaan sulattamalla se liekissä.
- 5.2 Pulloa kuumennetaan vesihauteessa pinnan alla kaksi tuntia 85—90 °C:ssa ja ravistetaan silloin tällöin; esteröityminen on täydellinen, kun pullon sisältö on kirkas sen jälkeen kun glyseriini ja reagenssien jäännökset ovat laskeutuneet.
- 5.3 Jäähdytetään huoneenlämmössä. Pullo avataan vasta, kun metyyliestereitä aiotaan käyttää. Niitä ei tarvitse käsitellä muulla tavoin ennen kaasukromatografialaitteistoon saattamista.

Menetelmä C**2 PERIAATE**

Määritettävä rasva tai öljy käsitellään suljetussa pullossa metanolilla ja suolahapolla 100 °C:ssa.

3 VÄLINEISTÖ

- 3.1 Vahvaseinäinen lasipullo, jonka tilavuus on noin 5 ml (korkeus 40—45 mm, halkaisija 14—16 mm).
- 3.2 1 ml:n ja 2 ml:n mittapipetit.

4 REAGENSsit

- 4.1 Vetykloridin 2-prosenttinen metanoliliuos. Valmistetaan vetykloridikaasusta ja vedettömästä metanolista (Huom. 1).
- 4.2 Heksaania kaasukromatografiaa varten.

▼B**5 SUORITUS**

- 5.1 Ennalta natriumsulfaatilla kuivattua ja suodatettua rasvaa tai öljyä punnitaan 0,2 g lasipulloon ja lisätään 2 ml vetykloridin metanoliliuosta. Pullo suljetaan liekillä.
- 5.2 Pulloa kuumennetaan vesihauteessa pinnan alla 40 minuuttia 100 °C:ssa.
- 5.3 Pullo jäähdytetään juoksevalla vedellä, avataan, lisätään 2 ml tislattua vettä ja 1 ml heksaania. Sentrifugoidaan ja poistetaan heksaanifaasi, joka on valmis käytettäväksi.

Menetelmä D**2 PERIAATE**

Määritettävä rasva tai öljy saippuoidaan kaliumhydroksidin metanoliliuoksella ja käsitellään sitten dimetyylisulfaatilla. Kun lisätään suolahappoa, muodostuneet metyyliesterit erottuvat heti. Kun niitä käsitellään alumiinioksidilla sen jälkeen, saadaan erittäin puhtaita metyyliestereitä.

3 VÄLINEISTÖ

- 3.1 Vahvaseinäinen lasinen koeputki, tilavuus noin 20 ml, hiottu lasitulppa 10/19 ja varmuussalpa.
- 3.2 Viisipalloisia palautusjäähdyttimiä, 10/19 hiosliitäntä.
- 3.3 Lasisuodattimia, joissa sintrattu levy, G 2 -kokoa, halkaisija 20 mm.
- 3.4 Kartiopohjaisia lasisia koeputkia, tilavuus noin 10 ml.
- 3.5 1 ml:n ja 5 ml:n ruiskut.

4 REAGENSIT

- 4.1 Kaliumhydroksidin 10-prosenttinen metanoliliuos kaasukromatografiaa varten.
- 4.2 Vihreän bromokresoli-indikaattorin 0,05-prosenttinen metanoliliuos.
- 4.3 Dimetyylisulfaatti (15 °C:ssa $d = 1,335$).
- 4.4 Väkevää suolahappoa ($d = 1,19$), laimennettu 1:1 kaasukromatografiaan tarkoitettulla metanolilla.
- 4.5 Brockmannin standardoitua alumiinioksidia adsorptiokromatografiaa varten.

5 SUORITUS

- 5.1 Natriumsulfaatilla kuivattua ja suodatettua rasvaa tai öljyä mitataan 2,2 ml 20 ml:n koeputkeen. Lisätään 5 ml kaliumhydroksidiliuosta ja pari kvartsikiviä kiehumisen hillitsemiseksi. Asennetaan palautusjäähdytin ja kuumennetaan pienellä liekillä viisi minuuttia ravistellen; saippuoituminen on täydellinen, kun liuos on kirkas. Jäähdytetään lopuksi juoksevalla vedellä ja irrotetaan jäähdytin.
- 5.2 Lisätään kaksi tippaa indikaattoria ja hitaasti, käyttäen ruiskua, 1 ml dimetyylisulfaattia. Koeputki suljetaan ilmatiiviisti ja ravistetaan 2—3 minuuttia upottaen usein putken pohja kiehuvaan vesihauteeseen; reaktio on täydellinen, kun indikaattorin väri muuttuu sinisestä keltaiseksi. Koeputki jäähdytetään lopuksi juoksevalla vedellä, avataan ja lisätään 5 ml suolahapon metanoliliuosta.
- 5.3 Ravistellaan muutama sekunti, minkä jälkeen putkea pidetään kaltevassa asennossa ja koputetaan sitä kevyesti. Tällöin metyyliesterit nousevat helpommin pintaan öljymäiseksi kerrokseksi (Huom. A).

Metyyliesterit imetään ruiskulla, pannaan alaspäin suippenevaan koeputkeen, lisätään alumiinioksidia noin 1/4 metyyliesterien tilavuudesta, ravistetaan ja suodatetaan paperin läpi.

Huom. A Jos metyyliesterit eivät erotu itsestään, koeputkeen lisätään 5 ml vettä ja ravistetaan.

▼B

Menetelmä E

2 PERIAATE

Määritettävää rasvaa tai öljyä kuumennetaan palautusjäähdyttimellä varustetussa koeputkessa metanolin, heksaanin ja rikkihapon kanssa. Syntyneet metyyliesterit uutetaan petrolieetterillä.

3 VÄLINEISTÖ

- 3.1 Tilavuudeltaan noin 20 ml:n koeputki, varustettuna noin 1 m:n pituisella ilmapalautusjäähdyttimellä, jossa on lasihiokset.
- 3.2 Mittapipetti, 5 ml.
- 3.3 Erotussuppilo, 50 ml.
- 3.4 Mittalaseja, 10 ml ja 25 ml.
- 3.5 Kartiopohjainen koeputki, 15 ml.

4 REAGENSIT

- 4.1 Metylointireagenssi: vedettömän metanolin, heksaanin ja väkevän rikkihapon ($d = 1,84$) seos 75:25:1 (v/v/v).
- 4.2 Petrolieetteri, lämpötila 40—60 °C.
- 4.3 Vedetön natriumsulfaatti.

5 SUORITUS

- 5.1 Levyltä raaputettu aines pannaan 20 ml:n koeputkeen ja lisätään 5 ml metylointireagenssia.
- 5.2 Palautusjäähdytin asennetaan paikoilleen ja koeputkea kuumennetaan 30 minuuttia kiehuvaan vesihauteeseen (Huom. 2).
- 5.3 Seos siirretään 50 ml:n erotussuppiloon käyttäen 10 ml tislattua vettä ja 10 ml petrolieetteriä. Ravistetaan voimakkaasti, annetaan faasien erottua, poistetaan vesikerros ja pestään eetterikerros kahdesti 20 ml:lla tislattua vettä. Erotussuppiloon lisätään pieni määrä vedetöntä natriumsulfaattia, ravistetaan, annetaan laskeutua muutama minuutti ja suodatetaan. Suodos kerätään 15 ml:n kartiopohjaiseen koeputkeen.

Liutin haihdutetaan vesihauteessa typpivirrassa.

Huom. 1 Pieniä määriä vetykloridikaasua voidaan helposti valmistaa laboratoriossa lisäämällä kaupalliseen suolahappoon ($r = 1,18$) muutama tippa väkevää rikkihappoa ($r = 1,84$). Vapautuva kaasu on helppo kuivata johtamalla se kuplina väkevän rikkihapon läpi. Metanoli absorboi vetykloridihappoa hyvin nopeasti, minkä vuoksi se on liuotettava varovasti, esimerkiksi johtamalla kaasu pieneen, ylösalaisin olevaan pulloon, jonka suu koskettaa nestepintaa. Vetykloridin metanoliliuosta voidaan valmistaa suuria määriä etukäteen, sillä se säilyy pimeässä erittäin hyvin lasitulpallisissa pulloissa.

Huom. 2 Kiehumisen hillitsemiseksi koeputkeen asetetaan lasisauva ja estetään vesihautteen lämpötilaa nousemasta yli 90 °C:n.



LIITE XI

**HAIHTUVIEN HALOGEENILIUOTTIMIEN PITOISUUDEN
MÄÄRITTÄMINEN OLIIVIÖLJYSTÄ**

1 PERIAATE

Kaasukromatografinen määrittäminen kaasutilatekniikalla (*head space*).

2 VÄLINEISTÖ

- 2.1 Kaasukromatografialaitteisto, johon kuuluu elektronikaappausdetektor (ECD).
- 2.2 Kaasutilalaitteisto (*head space*).
- 2.3 Kaasukromatografialaitteisto, lasinen, pituus 2 m, halkaisija 2 mm, stationääri-faasi.
OV101 10 % tai vastaava, kalsinoituun, happopestyyn ja silanoituun piimaahan imeytettynä, hiukkaskoko 80—100 mesh.
- 2.4 Kantaja- ja apukaasu: kaasukromatografiaan tarkoitettua tyyppiä, joka soveltuu elektronikaappausdetektorille.
- 2.5 Teflonpinnoitettuja lasipulloja, 10—15 ml, varustettu alumiinitulpalla, jossa on sovitettu näytteenottoruiskua varten.
- 2.6 Ilmatiiiviisti sulkevat puristimet
- 2.7 Kaasuruisku, 0,5—2 ml.

3 REAGENSIT

Standardi: kaasukromatografista laatua olevia haihtuvia halogeeniliuottimia.

4 SUORITUS

- 4.1 Punnitaan tarkasti noin 3 g öljyä lasipulloon, jota ei enää käytetä uudestaan; suljetaan se ilmatiiiviisti. Pullo asetetaan termostaattiin 70 °C:seen yhdeksi tunniksi. Imetään ruiskulla varovasti 0,2—0,5 ml kaasutilaa. Injektoidaan tämä näyte kaasukromatografialaitteiston kolonniin, joka on säädetty seuraavasti:
 - injektorin lämpötila: 150 °C,
 - kolonnin lämpötila: 70—80 °C,
 - detektorin lämpötila: 200—250 °C.
- 4.2 Vertailuliuokset. Valmistetaan standardiliuoksia puhdistetusta oliiviöljystä, jossa ei ole lainkaan liuottimia, pitoisuudeltaan 0,05 — 1 ppm (mg/kg), jotka vastaavat näytteen oletettua pitoisuutta. Halogeeniliuottimia voidaan tarvittaessa laimentaa pentaanilla.
- 4.3 Kvantitatiivinen määrittäminen. Verrataan toisiinsa näytteen piikkien korkeuksia tai pinta-aloja sekä sen standardiliuoksen piikkien korkeuksia ja pinta-aloja, jonka pitoisuuden oletetaan olevan lähinnä näytteen pitoisuutta. Jos suhteellinen poikkeama on suurempi kuin 10 %, määrittäminen on tehtävä uudestaan käyttämällä eri standardiliuosta, kunnes suhteellinen poikkeama on alle 10 %. Määrä lasketaan yksittäisten injektioiden keskiarvon perusteella.
- 4.4 Tulosten esittäminen: ppm (mg/kg). Toteamisraja tässä menetelmässä on 0,01 mg/kg.

▼ **B**

LIITE XII

NEITSYTOLIIVIÖLJYN AISTINVARAINEN ARVIOINTI

1 TARKOITUS

Tämän menetelmän tarkoituksena on vahvistaa neitsytoliiviöljyn makuominaisuuksien arviointiperusteet sekä kehittää siihen tarvittavia menetelmiä.

2 SOVELTAMISALA

Tässä kuvattu menetelmä soveltuu ainoastaan suoraan kulutukseen tarkoitettun neitsytoliiviöljyn aistinvaraiseen arviointiin ja luokitteluun. Se luokittelee neitsytöljyn numeerisella asteikolla, joka on suhteessa sen maun aikaansaamaan aistihavaintoon, valikoitujen maistajien muodostaman raadin arvion mukaan.

3 AISTINVARAISEN ARVIOINNIN PERUSSANASTO

Ks. luku ”Aistinvarainen arviointi: yleinen perussanasto”.

▼ **M3**

4 OLIIVIÖLJYN ERIKOISSANASTOA

4.1 Miellyttävät aistimukset, jotka syntyvät neitsytoliiviöljyn tyypillisistä laatuominaisuuksista:

Hedelmäinen: maku, joka muistuttaa hyvälaatuisten, tuoreiden ja sopivan kypsinä poimittujen hedelmien makua ja tuoksua samalla kertaa.

Kypsan hedelmäinen: oliiviöljyn maku, kun se on valmistettu kypsistä oliiveista; yleensä melko mieto tuoksu ja makea maku.

Vihreän hedelmäinen: oliiviöljyn maku, kun se on valmistettu vielä vihreistä hedelmistä.

4.2 Aistimukset, jotka voivat olla jossain määrin miellyttäviä riippuen maun voimakkuudesta ja joita ei voi pitää virheellisinä mutta jotka kuitenkin rikkovat maun hedelmäisyyden kokonaisvaikutelmaa:

Omena: oliiviöljyn maku, joka muistuttaa omenaa.

Makea: miellyttävä maku, ei selvästi sokerinen; karvaat, suutasupistavat ja pistävät maut eivät ole hallitsevia.

Ruohomainen: joidenkin öljyjen tyypillinen maku, joka muistuttaa juuri leikatun ruohon hajua.

Vihreät lehdet (karvas): öljyn maku, joka johtuu liian vihreistä oliiveista tai siitä, että oliivien mukana on murskattu lehtiä ja oksia.

Kirpeä: vihreiden tai vielä kypsyvien oliivien öljylle antama maku. Voi olla miellyttävä tai epämiellyttävä, maun voimakkuuden mukaan.

Jumoava: joidenkin öljyjen aiheuttama jumoava, suutasupistava limakalvoaistimus.

Pistävä: pistelevä makuaiustus, joka on tyypillinen satovuoden alussa, pääasiassa vielä vihreistä oliiveista valmistetuille oliiviöljyille. Aistimus johtuu fenolien vaikutuksesta kolmoishermon päihin, jotka ulottuvat koko suuontelon alueelle.

Manteli: tämä maku saattaa esiintyä kahdessa muodossa: tuoreiden mantelien tyypillisenä makuna tai hyvälaatuisten kuivattujen mantelien tyypillisenä makuna, jota voi erehtyä luulemaan alkavaksi eltaantumiseksi. Maku huomataan selvästi erikoisena jälkimakuna, kun öljy jää kosketuksiin kielen ja kitalaen kanssa. Maku yhdistetään makeisiin, miedontuoksuisiin öljyihin.

Lattea tai pehmeä: oliiviöljyn aistinvaraiset ominaisuudet ovat tuskin havaittavia niiden aromaattisten aineiden haihtumisen vuoksi.

Heinä: joidenkin öljyjen maku muistuttaa kuivaa heinää.

4.3 Aistimukset, jotka ovat aina epämiellyttäviä, vaikka maku olisi voimakkuudeltaan tuskin havaittava, ja joita on pidettävä aistinvaraisina virheinä:

Espartoheinä: uusien espartomattojen läpi puristetun öljyn maku. Maku vaihtelee sen mukaan, onko mattojen esparto vihreää vai kuivattua.

▼ **M3**

Maa: maahanpudonneiden, mutaisten ja pesemättömien oliivien öljylle antama maku. Joskus siihen liittyy homeinen maku.

Vanha tai sulkeutunut: tyypillinen maku, joka syntyy kun öljyä säilytetään liian kauan varastointiastioissa. Maku voi syntyä myös öljyyn, joka on liian kauan pakattuna.

Toukkainen: tyypillinen öljylle, joka on saatu oliivikärpäsen (*Dacus oleae*) toukkien pilaamista oliiveista.

Metallinen: maku, joka muistuttaa metallia. Tyypillinen öljyille, jotka ovat joutuneet pitkäaikaiseen kosketukseen metallipintojen tai muiden elintarvikkeiden kanssa epäsuotuisissa olosuhteissa murskauksen, sekoituksen, puristuksen tai varastoinnin aikana.

Homeinen, kostea: tyypillinen öljylle, joka on saatu oliiveista, joita on säilytetty monta päivää kosteissa olosuhteissa kasoissa, jolloin niihin on päässyt kasvamaan sienirihmasto ja hometta.

Eltaantunut: kaikille öljyille ja rasvoille tyypillinen ja yhteinen maku, joka syntyy kun ne hapettuvat ollessaan kauan kosketuksissa ilman kanssa. Maku on epämiellyttävä eikä sitä voi korjata.

Tunkkainen: oliiviöljylle tyypillinen maku, kun öljy on saatu kasoina varastoiduista oliiveista, joissa käyminen on edistynyt pitkälle.

Suolavesi: suolaliemessä säilötyistä oliiveista puristetun öljyn maku.

Puristusjäte: maku, joka muistuttaa oliivin puristusjätettä.

Saippuainen: haju- ja makuaistimus, joka muistuttaa vihersaippuaa.

Kasvisneste: maku, joka syntyy kun öljy on huonosti dekantoitu ja ollut kauan kosketuksissa kasvisnesteeseen kanssa.

Viinimäinen-etikkainen: joidenkin öljyjen maku muistuttaa viiniä tai etikkaa. Maku johtuu pääasiassa etikkahapon, etyyliasetaanin ja etanolin epätavallisen runsaasta muodostumisesta ja sekoittumisesta oliiviöljyn aromiin.

Kurkku: maku, joka syntyy, kun öljyä säilytetään ilmativiissä peltiastioissa liian kauan. Maku johtuu 2,6-nonadienaalin muodostumisesta.

Paistunut tai palanut: öljyjen maku, joka johtuu liiallisesta kuumentamisesta valmistuksen aikana, varsinkin kun tahnaa sekoitetaan ja kuumennetaan samanaikaisesti ja se tehdään sopimattomissa olosuhteissa.

Sakkainen: tyypillinen maku öljylle, joka on saatu dekantoimalla maanalaisten sammioiden pohjasakasta.

Puristumatto: maku, joka johtuu siitä, että öljy on puristettu puhdistamattoman maton läpi, johon on jäänyt käynnyttä jätettä.

Rasvainen: oliiviöljyn haju, joka johtuu tehtaalla puristus- tai uuttolaitteista öljyyn joutuneesta petrolista, rasvasta ja mineraaliöljystä.

Karkea: öljyä maistettaessa suuhun jää paksu, tahmea tuntu.

▼ **B**

5 LASI ÖLJYN MAISTAMISTA VARTEN

Ks. luku ”Lasi öljyn maistamista varten”.

6 MAISTAMISHUONE

Ks. luku ”Maistamishuoneen suunnittelu”.

7 VÄLINEISTÖ

Seuraavien välineiden, joita maistaja tarvitsee voidakseen suoriutua tehtävästään, on oltava jokaisessa arvostelukopissa käden ulottuvilla:

- laseja (standardoituja), joissa on näytteet merkittynä tunnuksella, joka koostuu kahdesta satunnaisesta numerosta tai numeroista ja kirjaimista. Merkinnät on tehtävä hajuttomalla kynällä ja niiden on oltava pysyviä,
- lasien kansiksi kellolaseja, joissa on samat tunnuksat,
- arviointilomake (ks. kuva 2) käyttöohjeineen,
- lyijykynä tai kuulakärkikynä,
- pieniä tarjottimia, joilla omenalohkoja,
- lasillinen huoneenlämpöistä vettä.

▼B

8 MENETELMÄ

Tässä luvussa esitetään ne tiedot, jotka maistajalla on oltava, jotta hän voi suorittaa neitsytoliiviöljyn aistinvaraisen arvostelun ja jotta voitaisiin standardoida maistajien tehtävät ja toiminta. Heidän on oltava tietoisia oliiviöljyn maistamisen sekä yleisistä että erityisistä suosituksista.

8.1 Raadin (maistajien ryhmän) kokoajan tai vastuuhenkilön tehtävät

Raadin kokoajalla on oltava vankka koulutus ja asiantuntemus ja hänen on tunnettava perusteellisesti kaikki käytetyt öljyt. Hän on raadin tärkein henkilö ja on vastuussa sen järjestämisestä ja toiminnasta. Hänen tulee kutsua raadin jäsenet kokoon riittävän ajoissa ja hänen on selvitettävä maistajille heidän tehtävänsä, mutta hän ei saa tuoda esiin mitään näytettä koskevaa mielipidettä.

Vastuuhenkilön on varmistettava välineiden riittävyys ja puhtaus, näytteiden valmistelu ja merkintä, sekä tarjottava ne maistajille kokeen toteutussääntöjen edellyttämällä tavalla. Hänen tehtävänä on myös tietojen keruu ja niiden tilastollinen käsittely niin, että saadaan mahdollisimman hyvä tulos pienellä vaivalla.

Raadin vastuuhenkilön on oltava taitava maistaja, tarkka kokeiden valmistelujen ja huolellinen kokeiden suoritusten suhteen ja hänen on oltava taitava ja kärsivällinen kokeiden suunnittelussa ja suorittamisessa. Raadin vastuuhenkilön tehtävänä on myös luoda jäsenten keskuudessa sellainen henki, että kaikki kiinnostuvat ja innostuvat maistamisesta sekä haluavat suoriutua mahdollisimman hyvin. Hänen tulee varmistua siitä, että kukaan ei tiedä hänen mielipidettään näytteestä, sekä estää ketään raadin jäsentä vaikuttamasta toisten mielipiteisiin. Hän myös valitsee, kouluttaa ja valvoo maistajia, jotta näiden soveltuvuus tehtäväänsä säilyy riittävän hyvänä.

8.2 Koeolosuhteet

8.2.1 Näytemäärä

Jokaisessa näytelasissa tulee olla 15 ml öljyä.

8.2.2 Maistamislämpötila

Öljynäytteiden lämpötilan tulee olla $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Tämä lämpötila on valittu siksi, että siinä on helpoin havaita aistinvaraisia eroja normaaliämpötilassa, kun öljyä käytetään ruoan makua parantavana lisänä. Toinen syy tämän lämpötilan valintaan on, että kylmemmässä öljyn aromaattiset aineet tuskin pääsevät haihtumaan ja korkeammassa lämpötilassa haihtuu aineita, jotka ovat ominaisia kuumennetulle öljylle.

8.2.3 Kokeen ajankohta

Aamupäivä on parasta aikaa maistaa öljyjä: on todettu, että päivän aikana on jaksoja, jolloin maku- ja hajuaistimukset havaitaan parhaiten.

Maku- ja hajuerkkyys kohoavat ennen aterioita ja vähenevät aterioiden jälkeen.

Tätä seikkaa ei saa kuitenkaan korostaa liikaa niin, että maistajat kärsivät nälän tunteesta, joka häiritsee heitä ja vaikuttaa erottelukykyn sekä paremmuus- ja hyväksymiskriteereihin.

9 MAISTAJAT

Henkilöt, joita käytetään oliiviöljyn maistajina aistinvaraisissa kokeissa, täytyy kouluttaa ja valita sen perusteella, miten hyviä he ovat erottamaan samantyyppisiä näytteitä toisistaan; on pidettävä mielessä, että maistajan tarkkuus paranee koulutuksen myötä (ks. asianomainen luku).

Kokeen suorittamiseen vaaditaan 8 — 12 maistajaa, mutta aina olisi pidettävä varalla muutamia ylimääräisiä, jotka voivat korvata poisjääneet.

9.1 Yleisiä suosituksia maistajille ja ehdokkaille

Nämä suositukset koskevat ehdokkaiden ja maistajien toimintaa heidän työaikanaan.

Kun raadin vastuuhenkilö pyytää maistajaa osallistumaan aistinvaraiseen arvosteluun, tämän on saavuttava paikalle sovittuna aikana ja noudatettava seuraavia ohjeita:

9.1.1 Hän ei saa tupakoida vähintään puoleen tuntiin ennen maistamista.

▼B

- 9.1.2 Hän ei saa käyttää hajuvettä eikä muita kosmetiikkatuotteita, joiden tuoksu saattaisi viipyä maistamiseen asti. Hänen on pestävä kätensä hajuttomalla tai lähes hajuttomalla saippualla ja sen jälkeen huuhdeltava ja kuivattava ne niin monta kertaa kuin on tarpeen kaikkien ylimääräisten hajujen poistamiseksi.
- 9.1.3 Hän ei saa syödä mitään ainakaan tuntiin ennen maistamista.
- 9.1.4 Jos hän tuntee itsensä sairaaksi, varsinkin sellaisella tavalla, joka vaikuttaa haju- ja makuaistiin, tai jos henkinen paine estää häntä keskittymästä työhön, maistajan ilmoitettava tästä raadin vastuuhenkilölle, jotta tämä voi päättää maistajan osallistumisesta tai muusta suotavasta menettelystä, ottaen huomioon, että kyseinen maistaja voi poiketa muiden maistajien keskiarvosta.
- 9.1.5 Kun edellisten kohtien vaatimukset on täytetty, maistajan on mentävä hänelle osoitettuun koppiin mahdollisimman rauhallisesti ja hiljaa.
- 9.1.6 Kun maistaja on istunut, hänen tulee tarkastaa, että kaikki tarpeellinen on hyvin järjestetty ja paikoillaan ja että jokaisen näytelasin tunnus on sama kuin sitä peittävässä kellolasissa oleva tunnus.
- 9.1.7 Maistajan on luettava huolellisesti arvostelulomakkeen ohjeet eikä hän saa alkaa tarkastella näytettä ennen kuin on täysin selvillä siitä, mitä on määrä tehdä. Jos hän on jostain epävarma, hänen on käännettävä raadin järjestäjän puoleen ja keskusteltava tämän kanssa kahden esiin tulleista ongelmista.

- 9.1.8 Maistaja ottaa lasin käteensä, kun kansi on vielä paikoillaan, ja kallistaa ja kiertää sitä niin, että öljy kastelee lasin sisäpintaa mahdollisimman paljon. Tämän vaiheen jälkeen hän ottaa kannen pois ja haistaa näytettä vetämällä henkeä tasaisesti, syvään ja hitaasti, kunnes hän on muodostanut käsityksen tutkittavanaolevasta näytteestä. Haistaminen ei saa kestää yli 30 sekuntia. Ellei hän ole ehtinyt päätyä mihinkään tulokseen tässä ajassa, hänen on odotettava hetki ennen kuin yrittää uudestaan. Kun haistamiskoe on suoritettu, voidaan siirtyä maun arviointiin (sisältää haju-, maku- ja tuntoaistimuksen). Tätä varten maistaja ottaa suuhunsa noin 3 ml öljyä. On tärkeätä, että öljy leviää kaikkialle suuhun, suun etuosasta ja kielen kärjestä sivuja pitkin suun takaosaan ja kitapurjeeseen, sillä kitalaen ja kielen eri osat ovat tunnetusti eri tavoin herkkiä neljälle perusmaulle makea, suolainen, hapan ja karvas.

On hyvin tärkeää antaa riittävän määrän öljyä levitä hyvin hitaasti kielen yli kitapurjeeseen ja nieluun saakka, samalla kun maistaja keskittyy siihen, missä järjestyksessä karvas ja pistävä aistimus tuntuvat; jos näin ei tehdä, molemmat aistimukset saattavat jäädä huomaamatta joissakin öljyissä ja toisaalta karvas maku saattaa jäädä pistävän maun peittämäksi.

Lyhyiden, peräkkäisten, suun kautta tapahtuvien sisäänhenkäisyjen avulla maistaja saa näytteen leviämään kaikkialle suuhun ja voi aistia haihtuvia, aromaattisia aineita nenän takaosassa.

Suutuntuma-aistimukset on myös otettava huomioon. Juoksevuus, tahmeus ja terävyys tai pistävyys merkitään havaittaessa muistiin, ja jos kokeeseen kuuluu näiden ominaisuuksien voimakkuuden arviointi, se tehdään.

- 9.1.9 Kun neitsytoliiviöljyä arvioidaan aistinvaraisesti, yhdellä maistamiskerralla arvioidaan ainoastaan yhtä näytettä, sillä muiden näytteiden välitön arviointi saattaisi aiheuttaa kontrastivaikutuksen.

Koska peräkkäiset maistamiset aiheuttavat väsymistä ja aistiherkkyys vähenee, on tärkeää käyttää jotakin tuotetta, joka poistaa öljyn suusta ennen seuraavaa maistamista.

On suositeltavaa käyttää pientä omenapalaa (noin 15 g), jota pureskellaan ja joka syljetään sitten sylkykuppiin. Sen jälkeen suu huuhdellaan pienellä määrällä huoneenlämpöistä vettä. Maistamisten välillä pidetään vähintään 15 minuutin tauko.

9.2 Ehdokkaiden valinta

Valinnan tekee raadin vastuuhenkilö, jonka on henkilökohtaisesti haasteltava ehdokkaita tutustuakseen heihin ja heidän oloihinsa. Maistajien ruumiillisia ja henkisiä ominaisuuksia koskevat vaatimukset eivät ole kovinkaan tiukat, sillä periaatteessa kuka tahansa normaali ihminen soveltuu maistajaksi. Sellaiset tekijät kuin ikä, sukupuoli, tietyt tavat (esimerkiksi tupakointi) ovat jääneet taka-alalle ja nykyään kiinnitetään huomiota mm. terveyteen, henkilökohtaiseen kiinnostukseen sekä mahdollisuuteen käyttää aikaa tällaiseen työhön.

Raadin vastuuhenkilön on haastattelun aikana selitettävä ehdokkaalle tämän tuleva toimenkuva ja kerrottava, kuinka paljon aikaa tehtävä vaatii.

▼B

Sitten hän merkitsee muistiin haastateltavalta saamia tietoja siitä, miten kiinnostunut ja motivoitunut tämä on ja kuinka paljon tällä on tehtävään aikaa käytettävissä. Seuraavaa kyselylomaketta voidaan käyttää apuna.

KYSELYLOMAKE

Ole hyvä ja vastaa seuraaviin kysymyksiin:

- | | Kyllä | Ei |
|---|--------------------------|--------------------------|
| 1 Oletko kiinnostunut osallistumaan tähän työhön? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2 Voisiko maistajan työ mielestäsi vaikuttaa elintarvikkeiden laadun paranemiseen kotimaassa ja ulkomailla? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3 Jos vastasit kyllä, kerro miksi ⁽¹⁾
.....
..... | Kyllä | Ei |
| 4 Maistajan tulee olla valmis maistamaan öljyä, kun raati kutsutaan kokoon. Oletko valmis tähän? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5 Oletko kiinnostunut vertailemaan haju- ja makuaistiesi tarkkuutta muiden maistajien kykyihin? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

⁽¹⁾ Kerro, mitä hyötyä jonkin elintarvikkeen, tai oliiviöljyn, aistinvaraisesta arvioinnista voi mielestäsi olla.

- | | | |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 6 Onko sinulla aikaa? Voitko järjestää päivittäisen ajankäyttösi itsenäisesti? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 7 Jos olet työssäsi toisen alainen, saisitko luvan olla poissa töistä enintään puoli tuntia kerrallaan useita eri kertoja useana peräkkäisenä päivänä? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 8 Voisitko korvata maistajan työn takia menetetyn työajan tekemällä työn muulloin? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 9 Pitäisikö maistajan työstä mielestäsi saada jokin korvaus? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 10 Millainen korvaus olisi mielestäsi sopiva? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Raadin vastuhenkilö käyttää näin kerättyjä tietoja maistajaehdokkaiden karsintaan. Ehdokkaat, jotka osoittavat vähäistä kiinnostusta tämänkaltaiseen työhön, joilla on vain vähän aikaa käytettävissään tai jotka eivät pysty ilmaisemaan itseään selvästi, karsiutuvat.

9.3 Ryhmän ”keskimääräisen kynnyksen” määrittäminen ”tyypillisille ominaisuuksille”

Valitaan huolellisesti neljä öljyä, joista jokainen edustaa mahdollisimman voimakkaasti ja selvästi yhtä seuraavista ominaisuuksista: tunkkainen, viinimäinen, eltaantunut ja karvas.

Valmistetaan mainituista öljyistä asteittain laimeneva näytesarja käyttäen laimennukseen soveltuvaa kantaja-ainetta siten, että kunkin näytteen pitoisuus on puolet edellisen näytteen pitoisuudesta ja että kahta tai kolmea laimeinta näytettä ei enää voi erottaa puhtaasta kantaja-aineesta. Viimeisenä parina on oltava kaksi lasia kantaja-ainetta.

▼B

Sarja täydennetään laseilla, joissa on korkeammat pitoisuudet, kunnes sarjassa on kahdeksan lasia.

Näytteitä valmistetaan riittävät määrät eri pitoisuuksin siten, että jokaiselle ehdokkaalle voidaan antaa kutakin ominaisuutta edustava täysi sarja.

”Keskimääräisen kynnyksen” määrittämiseksi jokaista öljyn ominaisuutta varten annetaan jokaiselle ehdokkaalle yksi lasi, jossa on 15 ml mitä pitoisuutta tahansa, ja toinen lasi, jossa on 15 ml pelkkää kantaja-ainetta. Kokeen jälkeen ehdokkaan on ilmoitettava, ovatko näytteet erilaisia vai samanlaisia.

Sama koe on toistettava muillakin saman ominaisuuden pitoisuuksilla.

Jokaista pitoisuutta koskevien oikeiden vastausten määrä merkitään muistiin ja ilmoitetaan tämä luku prosentteina kaikista suoritetuista kokeista.

Sitten merkitään havainnot koordinaatistoon siten, että kokeessa käytetyt pitoisuudet ovat x-akselilla ja oikeiden vastausten prosenttiosuus y-akselilla.

Kuvassa 1 on esimerkki kuvaajasta. Erotuskynnys on se x-akselin piste, joka vastaa y-akseliin (oikeat vastaukset) lukemaa 75 %.

Tämä kynnyspitoisuus voi olla erilainen eri öljyille, koska se riippuu ominaisuuden voimakkuudesta; erotuskynnyksen on kuitenkin oltava samanlainen eri raatien ehdokasryhmille, sillä se ei liity mihinkään tapaan tai makutottumukseen. Tämän vuoksi se on vertailupiste, joka on sama kaikille normaaliin ihmisten ryhmille, ja sitä voidaan käyttää eri raatien yhtenäistämiseksi niiden haju- ja makuaistiherkkyden perusteella.

Kun ryhmälle on näin saatu kynnyspitoisuus, tehdään seuraavaa:

Valmistetaan sarja laimennoksia kynnyspitoisuudesta laimeampaan ja väkevämpään suuntaan niin, että kynnyspitoisuus on kymmenes tällä asteikolla. Silloin pitoisuudet 11 ja 12 ovat laimeammat ja niistä on siten hyvin vaikea erottaa mukana olevan tietyn ominaisuuden omaavaa öljyä.

Kun otetaan pitoisuus C_{10} lähtökohdaksi, voidaan muut laimennokset valmistaa seuraavan kaavan avulla:

$C_{10} \times a^n$, jossa a on vakio, jonka arvo on 1,5, ja n on eksponentti, jonka arvo on -2—9.

Esimerkki: oletetaan, että eltaantuneen öljyn erotuskynnys on 0,32; silloin $C_{10} = 0,32$ ja $a = 1,5$, jolloin laimennussarjan pitoisuudet ovat seuraavat:

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

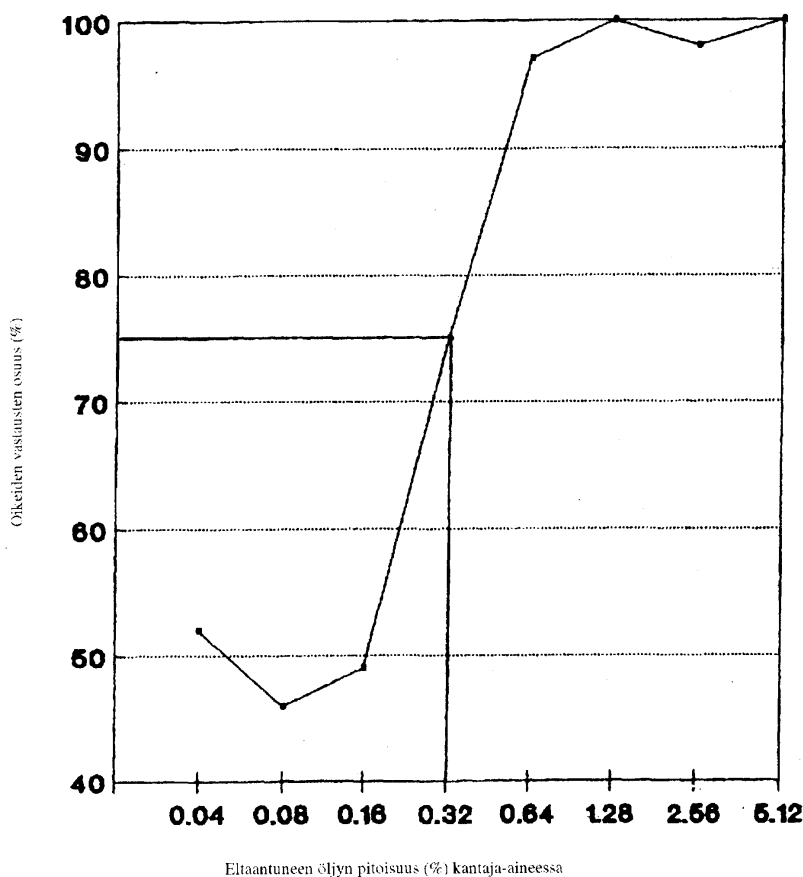
Kun sama menettely toistetaan muille kolmelle öljyn ominaisuudelle ja lähtökohdaksi otetaan niille saadut kynnyspitoisuudet, saadaan jokaiselle öljyn ominaisuudelle samanlainen asteikko, joka vastaa kaikissa laboratorioissa samaa ominaisuuden vahvuutta, vaikka lähtöaineena käytettyjen öljyjen makuvirheet olisivatkin eri vahvuisia.

9.4 Maistajien valinta voimakkuudenarviointimenetelmällä

Valintaan on otettava kaksi tai kolme kertaa enemmän ehdokkaita kuin maistajia arvioidaan raatiin tarvittavan, jotta voidaan valita ne henkilöt, joilla on paras herkkyys ja erotuskyky. On suositeltavaa käyttää aina samaa tuotetta kuin se, jota on myöhemmin tarkoitus maistaa, tässä tapauksessa oliiviöljyä.

▼B

Kuva 1



Menetelmän valinnassa on kiinnitettävä huomiota menetelmän tehokkuuteen ja taloudellisuuteen: käytetyn öljyn määrään, tarvittaviin näytemääriin ja valintaan kuluvaan aikaan. Valintamenetelmän tehokkuus riippuu siitä, miten hyvät arvot se tuottaa kaikille kolmelle toisistaan riippuvalle tekijälle: a) kustannukset, jotka riippuvat kokeiden määrästä; b) aiheettomasti hylättyjen pätevien ehdokkaiden suhteellinen osuus; c) aiheettomasti hyväksytyjen soveltumattomien ehdokkaiden suhteellinen osuus;

Voimakkuudenarviointimenetelmä on esitelty ASTM:n (American Society for Testing and Materials) julkaisussa STP (Special Technical Publication) No 440, sivu 53. Valintamenetelmää on muutettu neljällä tavalla seuraavasti:

- 1 sarjan näytemäärää on vähennetty;
- 2 aistiärsykkeiden valikoimaa on laajennettu tarkoituksena lisätä valintaperusteina olevien hajuihin ja makuvihteiden määrää niin, että ne vastaisivat öljyssä tavallisimmin ilmeneviä makuvirheitä;
- 3 sarjojen pitoisuussuhteita on vaihdeltu;
- 4 tulosten tilastollista käsittelyä on muutettu.

Tarvittavat välineet

- pulloja tai kolveja, 1 500 ml,
- tummasta lasista valmistettuja maistamislaseja,
- koeputkia ja mittalaseja 10, 15, 1 000 ja 1 500 ml.

Tarvittavat aineet

- Merck-parafiinia (viite 7 160, DAB 8, USP XX) tai öljyinen kantaja-aine, joka on mauton ja hajuton (juuri puhdistettua oliiviöljyä tai vastaavaa öljyä),
- öljyjä: tunkkainen, viinimäinen, eltaantunut ja karvas.

▼B

9.4.1 Suoritus

Laimennosten valmistamisen jälkeen siirrytään valintamenettelyyn 25 ehdokkaan kanssa toistamalla seuraavat vaiheet jokaiselle maulle:

- 1 Valmistetaan yksi sarja jokaiselle ehdokkaalle, jokaiselle 12 maistamislasiä, jotka on merkitty tunnuksella. Kaadetaan jokaiseen maistamislasiin 15 ml jokaista laimennosta, jotka on valmistettu kaavan $C_{10} \times a^n$ mukaan.
- 2 Kun näytelasit on täytetty, niiden annetaan olla kannen alla maistamishuoneessa huoneenlämmössä 20—22 °C:ssa vähintään tunti ennen maistamisen alkamista, jotta öljy saavuttaa huoneen lämpötilan.
- 3 Kokeen vastuuhenkilö järjestää jokaisen sarjan 12 maistamislasiä riviin vahvimasta laimeimpaan.

Tämän jälkeen ehdokkaita pyydetään suorittamaan koe yksin seuraavien ohjeiden mukaan:

9.4.2 Ehdokkaille annettavat ohjeet

Ehdokkaiden edessä olevat 12 lasia sisältävät laimennoksia kustakin neljästä ominaisuudesta: tunkkainen, viinimäinen, eltaantunut tai karvas. Lasien sisällöt eroavat toisistaan tietyn tuoksun voimakkuuden perusteella; voimakkain haju on vasemmanpuolimmaisessa lasissa ja oikealle siirryttäessä haju laimenee. Viimeisessä lasissa oikealla on niin heikko haju, että sen havaitseminen voi olla mahdotonta.

Tee näin: tutustu sarjan jokaisen lasin hajuun. Aloita oikeanpuolimmaisesta (N:o 12) ja yritä todeta jokaisen hajun voimakkuus väsyttämättä itseäsi liikaa.

Kun tunnet tottuneesi eri laseista lähtevien hajujen voimakkuuksien eroihin, voit poistua huoneesta.

Sillä aikaa kokeen järjestäjä ottaa yhden maistamislasin sarjasta ja asettaa sen oikeanpuolimmaisesta (N:o 12) lasin kohdalle ja siirtää kaikkia muita laseja niin, että rivi on taas aukoton. Maistaja palaa huoneeseen ja koe jatkuu.

Koe on seuraavanlainen:

Siirretty lasi on pantava takaisin oikealle paikalleen laimennosten sarjassa. Sitä varten lasia saa haistella ja verrata sitä kaikkiin muihin näytteisiin niin monesti kuin on tarpeen. Kun haluat asettaa lasin takaisin oikealle paikalleen sarjaan, muista, että sen hajun on oltava voimakkaampi kuin sen oikealla puolella olevan lasin ja heikompi kuin sen vasemmalla puolella olevan lasin. Tämä koe toistetaan siirtämällä vielä kolme muuta lasia.

Edellä olevien ohjeiden lisäksi jokaisella maistajalla on oltava seuraavanlainen lomake, joka helpottaa kokeen suoritusta ja tulosten keruuta.

EHDOKKAIDEN VALINTA

Koe N:o Ominaisuus

Lasi, joka otettiin pois sarjasta, kuuluu paikalle N:o

Päivämäärä Nimi

9.4.3 Tulosten kokoaminen

Raadin vastuuhenkilö kerää tulokset kaikilta ehdokkailta seuraavaan taulukkoon helpottaakseen heiltä saatujen tietojen järjestämistä:

Ehdokkaan nimi	Tutkittu ominaisuus	Annettu järjestysnumero (K')	Oikea järjestysnumero (K)	Arvosana (K' - K) ²
.....
.....

▼B

9.4.4 Tilastollinen arvostelu

Tässä valintatilanteessa oikeille paikoilleen asetettavat lasit ovat samat kaikille ehdokkaille. Tätä varten tehtävien tilastollisten laskutoimitusten mukaan niiden on kuuluttava seuraaville paikoille kunkin ominaisuuden sarjassa:

Tunkkainen (Tu)	Viinimäinen (Vi)	Eltaantunut (El)	Karvas (Ka)
Lasit N:o (10, 5, 7, 2)	Lasit N:o (11, 3, 8, 6)	Lasit N:o (7, 4, 10, 2)	Lasit N:o (6, 3, 11, 9)

Lasin paikan sarjassa osoittavia lukuja ei saa muuttaa, sillä tilastollisissa laskelmissa tätä koetta varten otetaan huomioon todennäköisyys, jolla ehdokas asettaa lasin oikealle paikalle sattumalta.

Jotta ehdokkaiden olisi mahdollisimman vaikea saada tietoja toisiltaan, raadin vastuuhenkilön on varmistettava, että:

- 1 ehdokkaat eivät voi olla yhteydessä keskenään. Eri ehdokkaiden lasien tunnuksot ovat erilaiset;
- 2 ehdokkaat eivät voi mitenkään saada selville, mitkä lasit on siirretty;
- 3 vaikka siirrettävät lasit ovat eri ehdokkaille samat, lasien siirtämistäjärjestys on eri ehdokkaille erilainen.

Jokaisen ehdokkaan suoritus arvostellaan seuraavasti:

Olkoon $e_1^i, e_2^i, \dots, e_{12}^i$ kaksitoista lasia, joissa on 12 laimennosta ominaisuudesta i (i voi olla mikä tahansa neljästä ominaisuudesta: tunkkainen, viinimäinen, eltaantunut ja karvas) heikkenevässä järjestyksessä.

Olkoon e_k^i yksi siirretty lasi ja K' ehdokkaan sille antama paikka sarjassa. Arvot K ja K' ovat siis kokonaislukuja 1—12, jotka vastaavat poistetun lasin todellista paikkaa ja ehdokkaan sille antamaa paikkaa.

Olkoon T (suurin sallittu poikkeama)arvo, joka vahvistetaan etukäteen ja joka tässä tapauksessa on 3. Jos $K' - K$ on suurempi kuin T , ehdokas hylätään ilman harkintaa⁽¹⁾.

Jos taas $K' - K$ on pienempi tai yhtä suuri kuin T , ehdokas hyväksytään ja hän saa jatkaa kokeita, koska hän on näin osoittanut pystyvänsä sijoittamaan tutkittavan ominaisuuden takaisin tarkasti oikealle paikalleen tai ainakin sitä lähellä oleva paikalle.

Tässä tapauksessa ehdokkaalle, joka on arvostellut yhden tietyn ominaisuuden (pitoisuuden), esimerkiksi ominaisuudesta tunkkainen (Tu), annetaan arvosana, joka on lasin oikean paikan ja ehdokkaan sille antaman paikan erotuksen neliö. Toisin sanoen

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

Koska jokainen ehdokas suorittaa kokeen neljällä eri pitoisuudella jokaista ominaisuutta kohti, ominaisuuden (tunkkainen) antama osittainen arvosana on:

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

Seuraavat esimerkit havainnollistavat menettelyä.

Esimerkki 1:

Oletetaan, että ehdokas A on antanut seuraavat paikkanumerot sarjasta poistettujen lasien neljälle pitoisuudelle ominaisuudesta i:

Lasin oikea paikka sarjassa (K)	Ehdokkaan antama lasin paikka (K')	Poikkeama oikeasta paikasta (K' - K)
7	7	7 - 7 = 0
4	5	4 - 5 = -1
10	6	10 - 6 = 4 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Raadin vastuuhenkilön on ohjattava ehdokasta niin, että koe etenee järkevästi eli ettei ehdokas menetä herkkyyttään hajuaistin väsymisen takia.

▼B

Lasin oikea paikka sarjassa (K)	Ehdokkaan antama lasin paikka (K')	Poikkeama oikeasta paikasta (K' - K)
2	4	2 - 4 = -2

(¹) Tämä ehdokas hylätään tuloksen T 3 perusteella.

Esimerkki 2:

Oletetaan, että toinen ehdokas järjestää lasit tietyn ominaisuuden neljän eri pitoisuuden suhteen seuraavasti:

Lasin oikea paikka sarjassa (K)	Ehdokkaan antama lasin paikka (K')	Poikkeama oikeasta paikasta (K' - K)
7	7	7 - 7 = 0
4	4	4 - 4 = 0
10	7	10 - 7 = 3
2	3	2 - 3 = -1

Tätä ehdokasta ei hylätä. Hänen tätä ominaisuutta koskevaksi arvosanakseen tulee:

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

Ehdokkaan lopullinen arvosana, jonka perusteella hänet valitaan maistajaksi, riippuu kaikille neljälle ominaisuudelle annetuista vastauksista ja voidaan laskea seuraavasti:

$$\begin{aligned} P_h^{Tu} + P_j^{Tu} + P_l^{Tu} + P_m^{Tu} &= Z^{Tu} \\ P_h^{Vi} + P_j^{Vi} + P_l^{Vi} + P_m^{Vi} &= Z^{Vi} \\ P_h^{El} + P_j^{El} + P_l^{El} + P_m^{El} &= Z^{El} \\ P_h^{Ka} + P_j^{Ka} + P_l^{Ka} + P_m^{Ka} &= Z^{Ka} \end{aligned}$$

$$Z \text{ lopullinen} = Z^{Tu} + \dots + Z^{Ka}$$

jossa:

Tu = tunkkainen

Vi = viinimäinen

El = eltaantunut

Ka = karvas

Seuraavaksi on ratkaistava kysymys siitä, kuinka korkea Z-arvo ehdokkaalla saa olla, jotta hänen aistiherkkyyttään, hajumuistiaan ja järjestelmällisyyttään voidaan vielä pitää riittävänä neljän ominaisuuden osalta. On selvää, että Z on aina ei-negatiivinen luku ja että Z = 0 tarkoittaa, että ehdokas on sijoittanut jokaisen lasin oikealle paikalle ja siis määrittänyt kaikki 16 voimakkuutta oikein (neljä jokaista ominaisuutta kohti). Jos Z-arvo ei ole nolla, ehdokas on löytänyt voimakkuuksille oikean suuruusluokan, mutta ei ole kyennyt sijoittamaan sitä juuri oikealle paikalle, koska hänen erotuskykynsä on kokeessa käytetyllä asteikolla riittämätön yhden tai useamman ominaisuuden suhteen.

Tämän vuoksi kriittinen arvo (Z) on syytä asettaa sellaiseksi, että jos ehdokas olisi sijoittanut lasit sattumalta lähes oikein, todennäköisyys (a) saada lopulliseksi arvosanaksi Z-arvo, joka on pienempi kuin kriittinen arvo Z_k , on riittävän pieni ja voidaan asettaa etukäteen. Toisin sanoen on varmistettava, että tätä menetelmää käyttäen todennäköisyys valita raatiin maistaja, jolla ei ole riittävää kykyä erottaa aistimusten voimakkuutta, on pienempi kuin α .

Kun α :n arvo on vahvistettu (tässä tapauksessa 0,05), Z_k saadaan muuttujan Z todennäköisyysjakaumasta, joka taas riippuu muuttujan p (K') todennäköisyysjakaumasta.

Kun tarvittavat tilastolliset laskutoimitukset on tehty, saadaan kriittiseksi arvoksi $Z_k = 34$.

▼B

Kun kaikkien ehdokkaiden Z-arvo on laskettu, ehdokkaat, joiden Z-arvo on suurempi kuin 34, on hylättävä.

Edellisen esimerkin ehdokkaiden A ja B saamat arvosanat olivat seuraavat:

Ominaisuus	Ehdokas A	Ehdokas B
Tunkkainen (Tu)	$Z^{Tu} = 10$	$Z^{Tu} = 12$
Viinimäinen (Vi)	$Z^{Vi} = 10$	$Z^{Vi} = 11$
Eltaantunut (El)	$Z^{El} = 10$	$Z^{El} = 15$
Karvas (Ka)	$Z^{Ka} = 4$	$Z^{Ka} = 0$
	$\Sigma = 34$	$\Sigma = 38$

Koska ehdokkailla on Z-arvot 34 ja 38, ehdokas A hyväksytään ja ehdokas B hylätään. Kun kaikki ehdokkaat, joiden Z-arvo on yli 34, on hylätty, asetetaan jäljelle jääneet paremmuusjärjestykseen ja 12 parasta valitaan.

9.5 Koulutus

Koulutusvaiheen tärkeimmät tavoitteet ovat:

- tutustuttaa maistajat neitsytoliiviöljyn moniin haju-, maku- ja suutuntumaominaisuuksiin;
- opettaa maistajille aistinvaraisen arvostelun menetelmiä;
- parantaa maistajien kykyä erottaa, tunnistaa ja arvioida aistinvaraisia ominaisuuksia;
- parantaa herkkyyttä ja muistia niin, että arviointien tulos on kaikkien ominaisuuksien suhteen mahdollisimman tarkka ja yhdenmukainen.

Koulutukseen kuuluu yleensä useampia opetustilaisuuksia maistajien mahdollisuuksien ja opettavien asioiden mukaan; tilaisuuksien aikana maistajat tutustuvat öljyihin itsenäisesti, keskustelevat kohtaamistaan ongelmista vastuuhenkilön kanssa, sekä keskustelevat arvostelusta, jotta päästäisiin mahdollisimman yhtenäisiin arvioihin ja mielipiteisiin.

Taso, jolle koulutuksessa päästään tietyn oppituntimäärän jälkeen, arvioidaan oikeiden vastausten prosenttiosuuden kasvun avulla — jos halutaan käyttää karsintakokeita — tai analysoimalla raadin jäsenten arvosanojen keskiarvon vaihtelua, kun käytetään kokeita, joissa on asteikko.

Koulutusvaiheen käytännön merkityksestä on keskusteltu paljon, mutta tällä hetkellä sitä pidetään erittäin tehokkaana ja jopa välttämättömänä, jos halutaan täsmällistä ja oikeaa aistinvaraista tietoa.

9.6 Suorituskyvyn seuranta

Kokeneiden maistajien raadit osallistuvat säännöllisesti maistajaisiin, joissa aistinvaraiset arvioinnit vaativat heiltä paljon. Monet tärkeät tekniset ja taloudelliset ratkaisut perustuvat heidän arvioihinsa; tämän vuoksi valinnan ja koulutuksen jälkeen maistajien suorituksia on seurattava, jotta varmistetaan heidän tulostensa tarkkuus.

Sen jälkeen kun raadit on muodostettu ja ne ovat suoriutuneet rutiinikoikeista, niiden taso on tarkistettava sopivin ja säännöllisin väliajoin.

10 NEITSYTOLIIVIÖLJYN AISTINVARAISEN ARVIOINNIN MENETELMÄ

Kun edellä esitetyt vaatimukset on täytetty, tarpeelliset tilat ja välineet ovat käytettävissä ja raati valittu, jokaisen maistajan tulee haistaa ja maistaa⁽¹⁾ määritettävän öljyn näytettä, joka hänelle maistamislasiassa tarjotaan; maistajan on määritettävä haju-, maku-, suutuntuma- ja kineesteettiset ominaisuudet ja käytettävä niiden tunnistamisen ja voimakkuusarvion merkitsemiseen lomaketta, jonka malli on kuvassa 2. Seuraavana tehtävänä on arvioida öljyn laatu.

⁽¹⁾ Maistaja voi kieltäytyä maistamasta, jos hänen mielestään näytteen hajussa on jokin erittäin vastenmielinen ominaisuus; tästä poikkeuksellisesta tapahtumasta on tehtävä merkintä arviointilomakkeeseen.

▼B**10.1 Kuvan 2 mukaisen lomakkeen käyttö** (maun kuvaaminen ja laadun arviointi).

Lomakkeen vasemmalla puolella on lueteltu oliiviöljyissä usein esiintyviä tyyppillisiä aistein havaittavia ominaisuuksia, jotka kuvaavat niiden makua. Jos maistaja huomaa jonkin aistihavainnon, joka ei vastaa lomakkeessa mainittuja laatusanoja, hänen tulee tehdä niistä merkintä kohtaan ”muut” käyttäen mahdollisimman täsmällisesti kuvaavia sanoja.

Havaittavat aistiärsykkeet arvioidaan niiden suhteellisen voimakkuuden mukaan merkitsemällä + -merki oikeaan sarakkeeseen seuraavien määreiden mukaan:

- 1: tuskin havaittava,
- 2: heikko,
- 3: kohtalainen,
- 4: voimakas
- 5: erittäin voimakas.

Lomakkeen oikealla puolella on asteikko 1 — 9 (9 tarkoittaa poikkeuksellisen hyvää laatua, 1 on huonoin laatu), johon maistaja merkitsee kokonaisarvionsa tutkittavan öljyn laadusta yhdellä arvosanalla. Tämän arvion on oltava sopusoinnussa samassa öljyissä havaittujen hyvien ja huonojen ominaisuuksien kanssa, joiden arviot on merkitty vasempaan reunaan.

Ensimmäinen sarake (virheet) on jaettu viiteen osaan. Öljyjen luokittelun tulee perustua ennen kaikkea näiden makuvirheiden puuttumiseen tai havaitsemiseen, sekä siihen, kuinka voimakkaita tai heikkoja nämä makuvirheet ovat. Koska asteikko kuitenkin ulottuu 9 pisteeseen asti, on syytä ottaa huomioon tiettyjä vivahteita ja ominaisuuksia, jotka on kuvattu toisessa sarakkeessa (ominaisuudet) ja jotka auttavat pääsemään lopulliseen ratkaisuun laadullisessa kokonaisarvioinnissa.

10.2 Lopullinen arviointi

Raadin vastuuhenkilö kerää jokaisen maistajan täyttämät lomakkeet ja tarkistaa, että aistinvaraiset ominaisuudet ja niistä profiililomakkeessa annettu voimakkuusarvio ovat sopusoinnussa arviointilomakkeessa esitetyn arvion kanssa. Jos nämä arviot poikkeavat huomattavasti toisistaan, järjestäjä pyytää maistajaa tarkistamaan arviointilomakkeensa.

Maistajan tulee tarvittaessa uusia koe.

Lopuksi raadin vastuuhenkilö tekee taulukon, johon tulevat koko raadin antamat arvioinnit, ja laskee niiden aritmeettisen keskiarvon ja sen virheen.

Jos mainittu virhe on menetelmän virhettä suurempi, koe on uusittava koko ryhmän osalta.

Ainoastaan jos kyse on tarkistuspöytäkirjasta, ryhmän on toistettava koe niin monta kertaa, että jokaisesta näytteestä saadaan kolme arviota. Lopullinen arvio on näiden arvioiden keskiarvo yhden desimaalin tarkkuudella.

Jos karvouden ja/tai pistävyyden voimakkuusarvioiden keskiarvo on yli 2,5, öljy on merkittävä sen mukaisesti ja arviointeihin on lisättävä, että öljy on erityisen karvasta ja/tai pistävää.

▼M12

Tulosten esittäminen: paneelin vastuuhenkilö määrää pisteiden keskiarvon perusteella luokan, johon näyte luokitellaan liitteessä I määrättyjen raja-arvojen mukaisesti. Tätä varten paneelin vastuuhenkilö soveltaa:

- markkinointivuoden 1992/93 aikana poikkeamaa + 1,5,
- markkinointivuodesta 1993/94 alkaen poikkeamaa + 1,

jos pisteiden keskiarvo on viisi tai enemmän.

▼M9

Sallittuja poikkeamia ei kuitenkaan sovelleta öljyihin, joita koskevat interventioon liittyvät toimenpiteet

▼M5

Määrittäytuloksen ja säädetyn raja-arvon välinen tilastollinen ero menetelmän toistettavuus- ja uusittavuusarvoissa sisältyy edellä olevissa alakohdissa tarkoitettuihin sallittuihin poikkeamiin.

Kun asianomainen luokittelee öljyjä edellä mainittuina markkinointivuosina soveltamatta säädettyjä poikkeamarajoja, hän voi merkitä

▼ **M5**

pakkauksen päälle tuotteen aistinvaraisen vähimmäisarvosanan, jota voidaan tarkistaa kaupanpitämisaajan kuluessa.

Maistajien radin vastuuhenkilön on merkittävä määrityskertomukseen ainoastaan luokka, johon näyte on luokiteltu. Kun maistaja suorittaa kokeen 2 artiklan 2 kohdan ensimmäisen alakohdan mukaisesti, hänen on sovellettava luokan määrityksessä samaa menetystä.

▼ **B**

Huom.: Näytteet on säilytettävä jääkaapissa kannen alla, kunnes ne on määritetty, ja ne on pantava takaisin jääkaappiin jokaisen kokeen jälkeen, kunnes kaikki kolme koetta on tehty.

▼ **M3****Kuva 2****Neitsytoliiviöljy**

Profiililomake
Hajun, maun ja suutuntuman arviot

	Havainnon voimakkuus ⁽¹⁾					
	0	1	2	3	4	5
Oliivihedelmäinen (kypsä ja vihreä) ⁽²⁾						
Omena						
Muu(t) kypsä(t) hedelmä(t)						
Vihreä (lehdet, ruoho)						
Karvas						
Pistävä						
Makea						
Muu sallittu ominaisuus Mikä tai mitkä?						
.....						
Hapan/viinimäinen/etikkainen/- happoinen ⁽²⁾						
Karkea						
Metallinen						
Homeinen						
Sakkainen						
Tunkkainen						
Eltaantunut						
Muu kielletty ominaisuus Mikä tai mitkä?						
.....						

Arvostelutaulukko

Virhe	Ominaisuus	Yleisarvio: pisteet
Ei virheitä	Oliivihedelmäisyys, oliivihedelmäisyys ja muu tuore hedel- mäisyys	9 8 7
Tuskin havaittava	Mikä tahansa hedel- mäisyys	6
Heikosti havaittava	Melko epätäydellinen hedelmäisyys, poik- keava haju ja maku	5
Havaittava, voimakkuu- deltaan keskinkertainen	Selvästi epätäydellinen, epämiellyttävä haju ja maku	4
Selvästi havaittava, ääri- mmäisen voimakas	Kulutukseen täysin soveltumaton haju ja maku	3 2 1

Huomautuksia:

Maistajan nimi:

Näytteen tunnus:

Päiväys:

⁽¹⁾ Havainnon voimakkuus:

0 = puuttu kokonaan⁽³⁾,

1 = tuskin havaittava,

2 = heikko,

3 = keskinkertainen,

4 = voimakas,

5 = erittäin voimakas.

⁽²⁾ Tarpeeton yliviivataan.

⁽³⁾ Vastaavan aistihavainnon puuttuminen on merkittävä ruutuun rastilla

▼ **B****AISTINVARAINEN ARVIOINTI: YLEINEN PERUSSANASTO**

1 TARKOITUS

Tämän standardin tarkoitus on koota aistinvaraisessa arvioinnissa käytetyt yleisimmät sanat ja niiden määritelmät.

2 SANASTO

2.1 Yleistä sanastoa

Aistinvarainen arviointi (substantiivi):

tuotteen aistinvaraisten ominaisuuksien tutkiminen aistielinten avulla.

Havainto (substantiivi):

ulkoisten esineiden ja tapahtumien saattaminen tietoisuuteen aistien avulla.

Aistinvarainen (adjektiivi) (ominaisuus):

kuvailee aistein havaittavaa tuotteen ominaisuutta.

Asiantuntija (substantiivi):

(aistinvaraisten ominaisuuksien tutkimisessa)

maistaja, joka on erikoistunut tietyn tuotteen aistinvaraiseen arviointiin ja tuntee tuotteen valmistuksen sekä kuluttajien tottumukset.

Maistaja (substantiivi):

havaitsemiskykyinen, herkkä, koulutettu henkilö, joka on valittu arvioimaan elintarvikkeen aistein havaittavia ominaisuuksia.

Raati:

ryhmä maistajia, jotka on valittu ja koulutettu ja jotka kokoontuvat suorittamaan tietyn elintarvikkeen aistinvaraista arviointia valvotuissa olosuhteissa.

Aistimus (substantiivi):

subjektiivinen ilmiö, joka on seuraus aistihermojen ärsytyksestä. Tämän ilmiön aistielin voi subjektiivisesti erottaa tai objektiivisesti määrittellä, ärsykkeen luonteen tai laadun ja voimakkuuden mukaan.

Herkkyyys (substantiivi):

aistielinten kyky määrällisesti tai laadullisesti havaita heikkoja ärsykeitä tai pieniä eroja ärsykkeiden välillä.

Maistaminen (substantiivi):

tehtävä, johon kuuluu elintarvikkeen aistinvaraisten ominaisuuksien, lähinnä hajun, maun, suutuntuman ja kinesteettisten ominaisuuksien havaitseminen, määrittely ja arviointi.

Hyväksyminen (substantiivi):

Yksilön tai ryhmän myönteinen suhtautuminen tuotteeseen.

Sopuointuisuus (substantiivi):

tuotteen ominaisuus, joka tarkoittaa miellyttävää kokonaisuustimusta. Tämän aistimuksen saa aikaan tuotteen haju-, maku-, suutuntuma- ja kinesteettisten ärsykkeiden esiintyminen sopivissa voimakkuussuhteissa.

Hyväksyttävyyys (substantiivi):

asema, jonka tuote on saavuttanut, kun henkilö tai ryhmä on suhtautunut myönteisesti sen aistinvaraisiin ominaisuuksiin.

Erottaminen (substantiivi):

kahden tai useamman ärsykkeen laadullinen ja/tai määrällinen erottaminen.

Kompensaatio (substantiivi):

ärsykkeiden yhteisvaikutus, jonka tuloksena kukin ärsyke havaitaan heikompana kuin jos se esiintyisi yksin.

Ulkonäkö (substantiivi):

▼B

näköaistilla havaittavat aistinvaraiset ominaisuudet: koko, muoto, väri, rakenne, sameus, kirkkaus, juoksevuus, vaahtoaminen ja kuohunta.

Ominaisuus (substantiivi):

aistein havaittava piirre.

2.2 **Fysiologiset termit**

Ärsyke (substantiivi):

fysikaalinen tai kemiallinen vaikutte, joka saa aikaan tietyn reaktion sisäisissä tai ulkoisissa aistireseptoreissa.

Makuaisti (substantiivi):

Aisti, jonka reseptorit sijaitsevat suussa, erityisesti kielessä; nämä reseptorit aistivat erilaisia liukoisia aineita.

Maku (substantiivi):

kuvaa tuotteen ominaisuutta, joka ärsyttää makuhermoja saaden aikaan aistimuksen, joka liittyy yhteen tai useampaan neljästä perusmausta: makea, suolainen, hapan ja karvas.

Reseptori (substantiivi):

Aistielimen erikoistunutta kudosta, jota voidaan ärsyttää ja joka pystyy ottamaan ärsykkeen vastaan ja muuttamaan sen hermoimpulsiksi.

Huom.: Reseptorit luokitellaan ärsykkeen energiamuodon perusteella (valo, lämpö, ääni, ym.).

Hajuaisti (substantiivi):

hajuelinten kyky havaita ja erotella molekyylejä, jotka tulevat nenään kaasuna ympäristöstä joko suoraan tai epäsuorasti.

Voimakkuus (substantiivi):

ominaisuuden vaikutuksen suuruus, joka voidaan mitata määrällisesti asteikolla sen mukaan, miten selvästi aistimus ylittää havaintokynnyksen.

Mukautuminen (substantiivi):

ärsykkeen havaitsemisen herkkyyden hetkellinen muutos, joka johtuu saman tai samantapaisen ärsykkeen jatkuvasta esiintymisestä.

Estyminen (substantiivi):

aistinelimen tai sen osan kyvyttömyys reagoida ärsykkeeseen, joka on sopiva ja voimakkuudeltaan ärsytyskynnyksen ylittävä.

Vaste, reaktio (substantiivi):

toiminta, joka aistisoluihin tapahtuu, kun yksi tai useampi ärsyke vaikuttaa siihen.

Vartalo (substantiivi):

suutuntuma, joka kuvailee elintarvikkeen tiheyttä, viskositeettia, kiinteyttä ja tiiviyttä.

Tuoksu (substantiivi):

raikas, miellyttävä, herkullinen hajuominaisuus.

Haistaa (verbi):

toiminta, jolla hankitaan hajuhavainto.

Objektiivinen (adjektiivi):

- a) kohteen todenmukainen ja todennettavissa oleva tulkinta, jossa inhimillisten tekijöiden osuus on mahdollisimman pieni (esim. tottumus, tapa, mieltymys).
- b) kuvailee menetelmää, jossa aistiteknisesti tai laitteiden avulla vähennetään itse aiheutettuja virheitä mahdollisimman tehokkaasti.

Huom.: Ilmaisua ”instrumentaalinen” ei suositella käytettäväksi synonyyminä.

Subjekttiivinen (adjektiivi):

kuvailee mielikuvaa, johon vaikuttavat aistihavainnon lisäksi aistijan tunteet ja ajatukset.

▼ **B***Kinesteettinen aistimus:*

paineaistimus, joka syntyy, kun näytettä liikutetaan suuontelossa tai kosketaan sitä sormin (esim. juustopalan puristaminen sormien välissä).

*Kynnys (substantiivi):**Absoluuttinen kynnys:*

aistiärsykkeen pienin arvo, joka saa aikaan:

- aistihavainnon (ärsytyskynnys tai havaintokynnys), tai
- aistihavainnon tunnistamisen (tunnistamiskynnys).

Erotuskynnys:

pienin aistiärsykkeen voimakkuuden muutos, joka voidaan havaita.

Lopullinen kynnys:

ärsykkeen voimakkuus, jonka yläpuolella ei enää havaita voimakkuuseroja.

Preferenssikynnys:

pienin mahdollinen kynnyksen ylittävä ärsykkeen voimakkuus, joka aiheuttaa miellyttävän tai torjuvan reaktion suhteessa neutraaliin ärsykkeeseen, esimerkiksi jouduttaessa valitsemaan veden ja sokeriliuoksen välillä.

Huom: Absoluuttinen preferenssikynnys on eri asia kuin differentiaalinen preferenssikynnys.

Kynnyksen alittava (adjektiivi):

absoluuttista kynnysarvoa heikompi.

Kynnyksen ylittävä (adjektiivi):

absoluuttista kynnysarvoa voimakkaampi.

Aistiväsymys:

aistien mukautumisen muoto, jossa herkkyys vähenee.

Kompensaatio (substantiivi):

ärsykkeiden yhteisvaikutus, jonka tuloksena kukin ärsyke havaitaan heikompana kuin jos se esiintyisi yksin.

Synerginen (adjektiivi):

tiettyjen aineiden yhteisvaikutus on suurempi kuin niiden vaikutusten summa.

Kontrastivaikutus:

kahden samanaikaisen tai peräkkäisen ärsykkeen eron herkempi havaitseminen.

Konvergenssin vastakohta.

Konvergenssivaikutus:

kahden samanaikaisen tai peräkkäisen ärsykkeen eron vaikeampi havaitseminen.

Kontrastivaikutuksen vastakohta.

2.3 **Aistinvaraisiin ominaisuuksiin liittyviä termejä***Happoinen (adjektiivi):*

- a) kuvaa useimpien happamien aineiden laimeiden liuosten pääasiallisinta makua (esim. sitruunahappo, maitohappo, viinihappo);
- b) kuvaa sellaisten puhtaiden aineiden tai niiden seosten ominaisuutta, joissa esiintyy tämä maku.

Vastaava substantiivi on happoisuus.

Hapan (adjektiivi):

Kuvaa haju- ja makuaihimusta, joka etupäässä koostuu yleensä käymisessä syntyneestä haposta, ja elintarvikkeita, jotka aikaansaavat tämän aistimuksen.

Jotkin happamuutta aiheuttavat tekijät liittyvät elintarvikkeen käymiseen, kuten maitohappo- tai etikkahappokäymiseen.

▼B

Karvas (adjektiivi):

- a) kuvaa sellaisten aineiden kuten kiniinin, kofeiinin ja tiettyjen alkaloidien laimeiden vesiliuosten perusmakua;
- b) kuvaa sellaisten puhtaiden aineiden tai niiden seosten ominaisuutta, joissa esiintyy tämä maku.

Vastaava substantiivi on karvaus.

Suolainen (adjektiivi):

- a) tyyppillinen makuaistihavainto, jonka tavallisin aiheuttaja on natriumkloridiliuos;
- b) kuvaa sellaisten puhtaiden aineiden tai niiden seosten ominaisuutta, joissa esiintyy tämä maku.

Vastaava substantiivi on suolaisuus.

Makea (adjektiivi):

- a) kuvaa aistihavaintoa, jonka pääasiallinen maku tulee sakkaroosin ja vastaavien aineiden vesiliuoksista;
- b) kuvaa sellaisten puhtaiden aineiden tai niiden seosten ominaisuutta, joissa esiintyy tämä maku.

Vastaava substantiivi on makeus.

Supistava, jumoava (adjektiivi):

- a) kuvaa monipuolista suuaistimusta, jonka aiheuttavat tiettyjen tanniinien (esimerkiksi khakihedelmän ja oratuomen tanniinit) vesiliuokset;
- b) kuvaa sellaisten puhtaiden aineiden tai niiden seosten ominaisuutta, joissa esiintyy tämä maku.

Vastaava substantiivi on supistavuus tai jumoavuus.

Maku (substantiivi):

maku-, haju-, suutuntuma- ja kinesteettisten aistimusten kokonaisuus, joiden avulla koehenkilö voi tunnistaa elintarvikkeen ja asettaa perusteet, joiden mukaan tuote koetaan miellyttäväksi tai epämiellyttäväksi.

Maku (substantiivi):

- a) aistimus, joka syntyy kun makunystyrä saa ärsykkeen jostain liukoisesta aineesta;
- b) aistimuksen ominaisuus, jonka tällaiset aineet saavat aikaan.

Perusmaku (substantiivi):

jokin neljästä tunnetusta perusmausta: makea, suolainen, hapan ja karvas.

Haju (substantiivi):

- a) hajuaistin havaitsema aistimusten yhdistelmä, joka on saatu hengittämällä sisään tiettyjä haihtuvia aineita;
- b) aistimuksen ominaisuus, jonka mainitut aineet saavat aikaan.

Aromi (substantiivi):

- a) hajuaistielinten epäsuorasti aistima miellyttävä aistimus elintarviketta maistettaessa;
- b) tavallisessa kielenkäytössä ja hajuvesistä puhuttaessa tätä termiä käytetään joissakin kielissä myös silloin, kun aistimus saadaan suoraan nenän kautta.

Jälkimaku (substantiivi):

aistimusten yhdistelmä, joka havaitaan sen jälkeen, kun ärsyke on hävinnyt suusta, ja joka on erilainen kuin aikaisemmat aistimukset.

Aromaattinen (adjektiivi):

- a) kuvaa puhtaiden aineiden tai seosten ominaisuutta silloin, kun niitä maistettaessa syntyy aromiaistimus;
- b) kuvaa tuotteita, jotka suoraan hajuaistin avulla tutkittuina ovat hyviltä ja raikkailta tuoksuvia.

Rakenne (substantiivi):

elintarvikkeen kiinteän tai juoksevan olomuodon ominaisuuksia, joiden yhdistelmä voi maistamisen yhteydessä olla ärsykkeenä erityisesti suussa sijaitseville mekaanisille reseptoreille.

▼B

Huom.: Tämä termi viittaa yksinomaan objektiivisiin ominaisuuksiin, ei aistimuksiin, joiden syntymistä kuvataan yleistermeillä kuten kiinteys, kuitumaisuus, rasvaisuus jne.

Purskuttaa (verbi):

elintarvikkeen liikuttelu kaikkialla suuontelossa niin, että se joutuu kosketuksiin kaikkien aistiherkkien alueiden kanssa, jotta kaikki syntyvät suuaistimukset havaitaan.

Huom.: Tätä sanastoa voi laajentaa tutkimalla ISO-standardia 5492, osat I—V ja muita julkaisuja, kuten J. L. Magnenin kirjoittamaa *Les cahiers techniques du Centre national de coordination des études et recherches sur la nutrition et l'alimentation*, jne.

ÖLJYNMAISTAMISLASI

1 TARKOITUS

Tämän standardin tarkoituksena on kuvata ruokaöljyjen aistivaraiseen määritykseen (haju, maku) tarkoitettujen lasien ominaisuuksia.

Lisäksi kuvataan lämmitysjärjestelmä, joka tarvitaan riittävän lämpötilan saavuttamiseksi ja ylläpitämiseksi määritystä varten.

2 LASIN KUVAUS

Kuvassa 1 näkyvät lasin muoto ja mittasuhteet, jotka on suunniteltu niin, että:

- a) lasi on mahdollisimman vakaa, jotta se ei kaatuisi ja öljy läikkyisi;
- b) lasin pohja sopii lämmityslaitteen syvennykseen niin, että lasin pohja lämpenee tasaisesti;
- c) lasin suussa on kavennus, jotta hajut keskittyisivät ja niiden tunnistaminen helpottuisi;
- d) lasi on valmistettu tummasta lasista, jotta maistaja ei voi erottaa öljyn väriä, joka saattaisi vaikuttaa arvosteluun ja haitata määrittelyn puolueettomuutta.

2.1 Mitat

Lasin mitat ovat seuraavat (kuva 1):

— kokonaistilavuus	130 ml ± 10 ml,
— kokonaiskorkeus	60 mm ± 1 mm,
— suun halkaisija	50 mm ± 1 mm,
— leveimmän kohdan halkaisija	70 mm ± 1 mm,
— pohjan halkaisija	35 mm ± 1 mm,
— sivuseinämien paksuus	1,5 mm ± 0,2 mm,
— pohjan paksuus	5 mm ± 1 mm.

Jokaisella lasilla tulee olla kantena kellolasi, jonka halkaisijan on oltava noin 10 mm suurempi kuin lasin suun halkaisija. Kannen tarkoitus on estää aromia haihtumasta pois ja pölyä laskeutumasta lasiin.

2.2 Lasin tekniset ominaisuudet

Lasin on oltava vahvaa, ja väriltään tummaa niin, että sisällön väriä ei voi erottaa, eikä lasissa saa olla naarmuja tai kuplia.

Reunan on oltava sileä, tasainen ja ulospäin taivutettu.

Lasin on oltava lämpökäsitelty niin, että se kestää kokeen aikana esiintyvät lämpötilan muutokset.

2.3 Käyttöohje

Lasit pestään hajuttomalla pesuaineella ja huuhdellaan useaan kertaan, kunnes pesuaine on saatu kokonaan pois. Lopuksi lasit huuhdellaan tislattulla vedellä, minkä jälkeen lasit saavat valua hetken ja lopuksi ne kuivataan eksikkaattoriuunissa.

Väkeviä happoja tai kromihappoa sisältäviä seoksia ei saa käyttää.

▼B

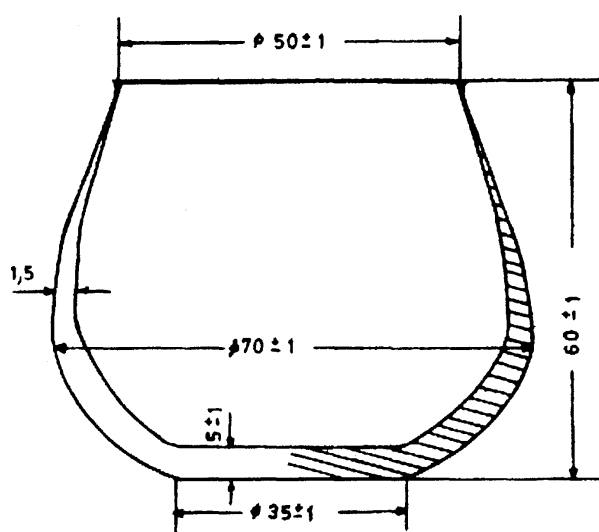
Laseja säilytetään uunissa, kunnes niitä tarvitaan, tai kaapissa, jossa ne on suojattu niin, ettei niihin tartu hajuja.

Ennen käyttöä jokaisen lasin hajuttomuus tarkistetaan haistamalla. Kokeeseen valmistauduttaessa jokaiseen lasiin merkitään tunnus ja muistiinpanoihin merkitään jokaista tunnusta vastaava öljy. Ainoastaan kokeen järjestäjä saa tietää, mitkä tunnukset vastaavat mitäkin öljyjä.

3 NÄYTTEIDEN LÄMMITYSLAITE

Aistinvaraisesti arvosteltavan näytteen on oltava tietyssä lämpötilassa, joka ruokaöljyille on 28 ± 2 °C. Tätä varten maistamiskopissa on oltava lämmityslaitte jokaisen maistajan käden ulottuvilla (kuva 2). Se koostuu alumiinilevystä, joka on vesihauteessa, jonka lämpötila pidetään termostaattilla tasaisena. Levyssä on sarja syvennyksiä, joihin lasien pohjat sopivat. Lämmityslaitteen ja eri levyjen syvennyksissä olevien lasien öljyn lämpötilaero ei saa olla yli ± 2 °C.

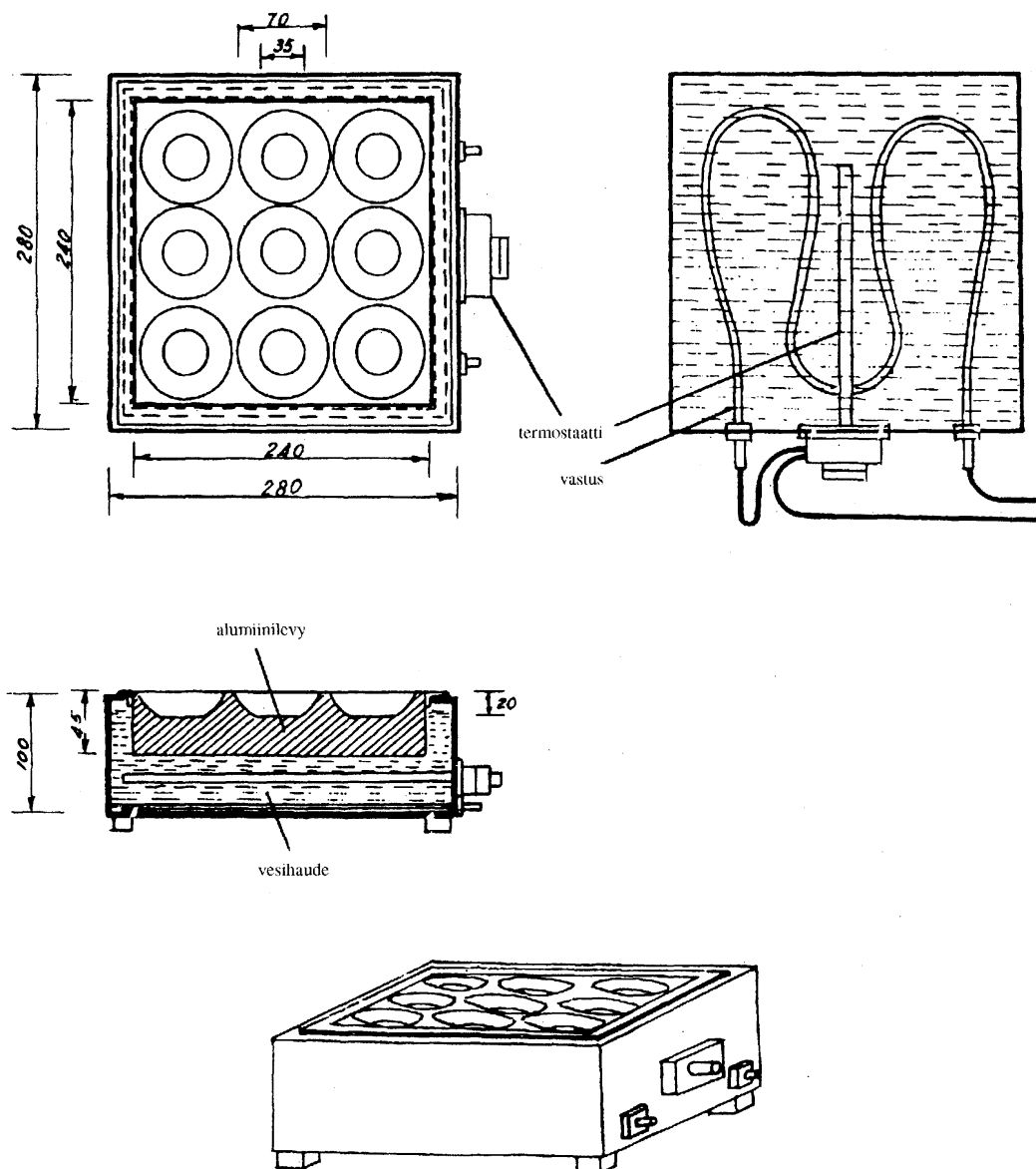
Kuva 1 - Maistamislasi



(Mitat millimetreinä)

▼B

Kuva 2 - Näytteiden lämmityslaite (mitat millimetreinä)



MAISTAMISHUONEEN SUUNNITTELU

1 JOHDANTO

Maistamishuoneen tarkoituksena on luoda maistajille sopiva, mukava ja yhtenäinen ympäristö, joka edistää työskentelyä ja varmistaa sen, että jokainen koe voidaan toistaa ja uusia samanlaisissa olosuhteissa.

2 TARKOITUS

Tämän standardin tarkoituksena on määrittää vaatimukset, joita on noudatettava maistamishuonetta suunniteltaessa.

3 YLEISIÄ VAATIMUKSIA SUUNNITTELUJA JA TOTEUTTAMISTA VARTEN

Suuruudesta riippumatta (ks. 3.1 kohta) tilojen on oltava seuraavien vaatimusten mukaiset:

▼B

Tilojen tulee olla miellyttävät ja sopivasti valaistut (ks. 3.2 kohta), mutta kuitenkin hillityt. Tämän vuoksi on suotavaa, että seinät ovat vaaleat ja rauhoittavat, jotta syntyisi vapautunut tunnelma⁽¹⁾.

Tilojen on oltava helposti siivottavat ja mielellään äänieristetyt. Niissä on oltava hyvä ilmanvaihto eikä niihin saa tulla vieraita hajuja mistään. Jos sisälämpötila vaihtelee tuntuvasti, huoneen on oltava ilmastoitu, jotta lämpötila pysyy 20—22 °C:ssa.

3.1 Tilan tarve

Laboratorioiden ja yritysten tilankäyttö määrää usein maistamistilojen koon. Tilaa on kuitenkin oltava niin paljon, että saadaan järjestettyä noin 10 koppia maistajille ja paikka, jossa näytteet voidaan valmistaa.

Tätä vähimmäiskokoa suuremmat tilat ovat suotavat, sillä tarvitaan tiloja, joissa voi pestä näyttelaseja, järjestellä elintarvikkeita maistamista varten ja järjestää avoimia keskustelutilaisuuksia koko raadille.

3.2 Valaistus

Yleisvalaistuksen, päivänvalon tai lamppujen (esim. loisteputkien) valon on oltava tasaisesti jakautunutta hajavaloa, joka on säädettävissä.

3.3 Lämpötila ja kosteus

Tilojen on oltava koko ajan miellyttävän lämpöiset ja ilman on oltava sopivan kosteaa. Elleivät erityiset syyt muuta edellytä, suositellaan, että ilman lämpötila on 20—22 °C ja suhteellinen kosteus 60—70 %.

4 MAISTAMISKOPIT**4.1 Yleisiä ominaisuuksia**

Maistamiskopit sijoitetaan rinnakkain riviin.

Niiden on oltava samanlaiset ja väliseinien on oltava niin korkeat ja leveät, että ne erottavat maistajat kokonaan toisistaan, kun nämä istuvat paikoillaan.

Kopit voidaan rakentaa mistä tahansa sopivasta materiaalista, joka on helppo pitää puhtaana (esimerkiksi puusta, lasitetusta vanerista, laminaattilevyistä, jne.). Jos pintoja maalataan, niiden on oltava täysin hajuttomia, kun maali on kuivunut.

Istuinten on oltava mukavat ja niiden korkeutta on voitava säätää.

Jokaisessa kopissa on oltava oma kohdevalaisin, jonka voimakkuutta ja suuntaa voidaan säätää.

On suotavaa, että jokaisella maistajalla on käden ulottuvilla painonappi, jota painettaessa kopin ulkopuolella syttyy valo, joka ilmoittaa muita maistajia häiritsemättä vastuuhenkilölle, että maistaja on valmis, tarvitsee lisää näytteitä, haluaa kysyä jotain, haluaa jonkin puuttuvan välineen tai on havainnut jotakin poikkeavaa, jne.

4.2 Mittasuhteet

Koppien on oltava riittävän suuria ja mukavia. Yleensä ne ovat seuraavankokoisia:

- leveys:
 - 0,75 m (ilman pesuallasta),
 - 0,85 m (pesualtaan kera),
- pituus:
 - 0,50 m (pöytä),
 - 0,20 m (lisätilaa väliseinää varten),
- väliseinien korkeus:
 - vähintään 0,60 m pöydän pinnasta,
- pöydän korkeus:
 - 0,75 m.

⁽¹⁾ Huoneen värit ja valaistus voivat vaikuttaa aistinvaraisten arviointien tuloksiin.

▼B**4.3 Tilojen järjestely**

Pöytien pintojen on oltava helposti puhdistettavia.

Osa pöydän pinta-alasta varataan pesualtaalle, johon kuuluvasta hanasta saa juoksevaa juomavettä. Jos se ei ole käytännössä mahdollista, tilaan voi sijoittaa sylkymaljan, pesuvadin tms.

Koska näytteet on kokeen aikana säilytettävä tasaisessa lämpötilassa, joka on alhaisempi tai korkeampi kuin huoneenlämpö, on suositeltavaa, että sitä varten hankitaan sopivat laitteet (vesihaude, kuumennuslevy, jne.)

Erilaisia tarvikkeita (laseja ja muita pieniä esineitä) varten voidaan myös kiinnittää hylly noin 1,10 m:n korkeudelle lattiasta.

Jos koppien sijoitus huoneessa on sopiva, on suotavaa asentaa luukku, josta näytteet annetaan maistajalle. Luukku voi olla liukuva (kuva 1), pyörivä, joka sopii erityisen hyvin korkeille näytelaseille tai -kupeille (kuva 2) tai vaakatasossa saranoitu ovi, jos näytteet ovat matalissa astioissa (kuva 3). Tärkeintä on, että näytteet mahtuvat astioissaan tarjottimella aukosta sisään.

5 MUUT TILAT

Jos tilaa riittää, on suotavaa järjestää erillinen huone näytteiden valmistamista varten (ruuanlaittoon liittyvistä tai muista syistä), lasien ja laitteiden käsittelyä varten sekä raadin yhteisiä keskusteluja varten ennen kokeiden suoritusta tai niiden jälkeen. Jos tällaiset tilat on käytettävissä, niiden on oltava puhtaat, eikä niistä saa kantautua maistajia häiritseviä ääniä tai hajuja maistamishuoneeseen.

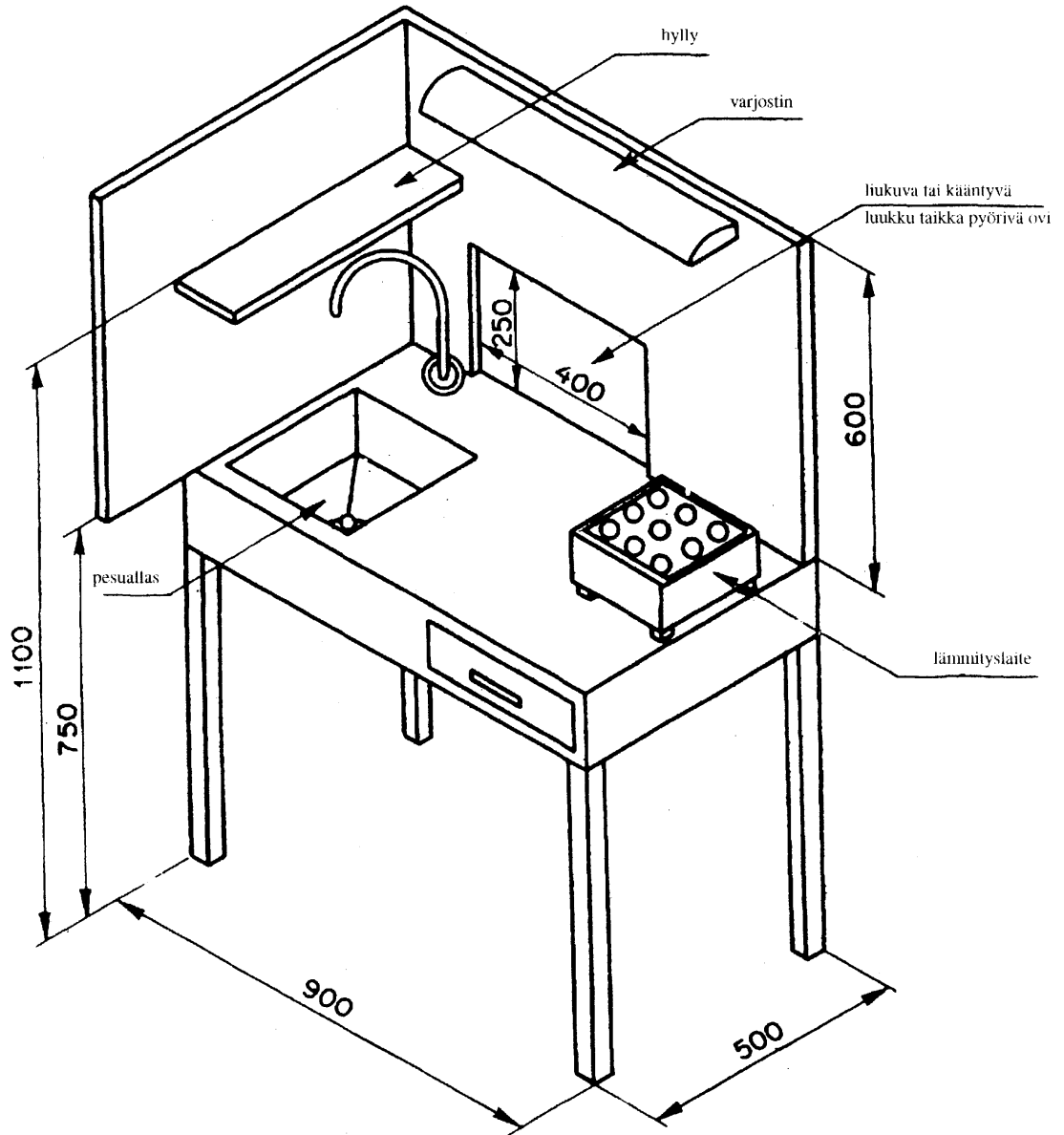
Kuvassa 4 on esimerkki maistamishuoneen järjestelystä ja muista tiloista.

Huom: Edellä on kuvattu ihanteelliset olosuhteet. Jos ei ole mahdollista järjestää huonetta yksinomaan aistinvaraisen arvioinnin käyttöön, voidaan kokeita järjestää tiloissa, jotka muuten täyttävät vähimmäisvaatimukset valaistuksen, äänieristyksen, lämpötilan ja hajuttomuuden suhteen, ja rakentaa niihin koottavat ja purettavat kopit, joiden tarkoitus on vain erottaa maistajat toisistaan.

▼B

MAISTAMISKOPIN MITAT JA JÄRJESTELY

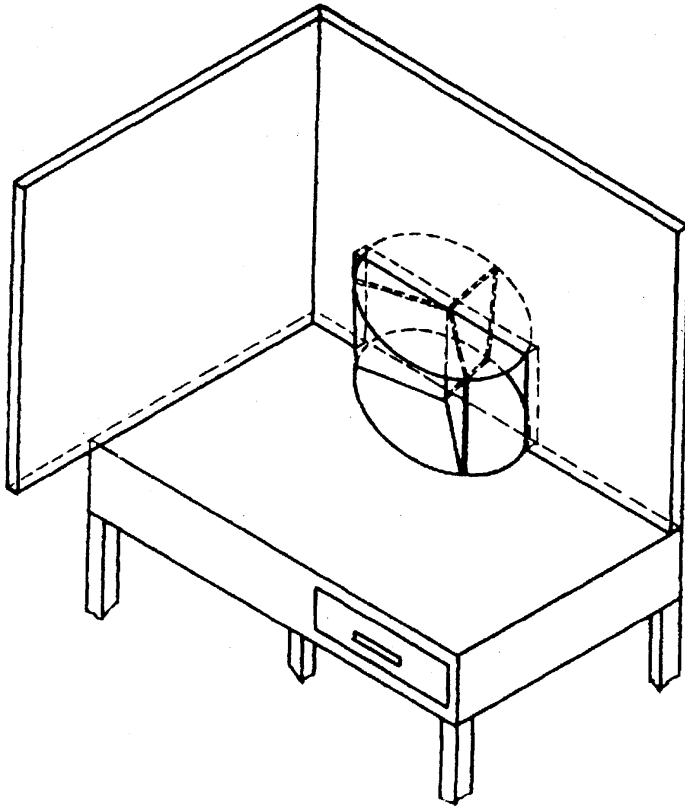
Kuva 1



▼B

PYÖRIVÄ OVI, JOSTA NÄYTTEET VOIDAAN ANTAA

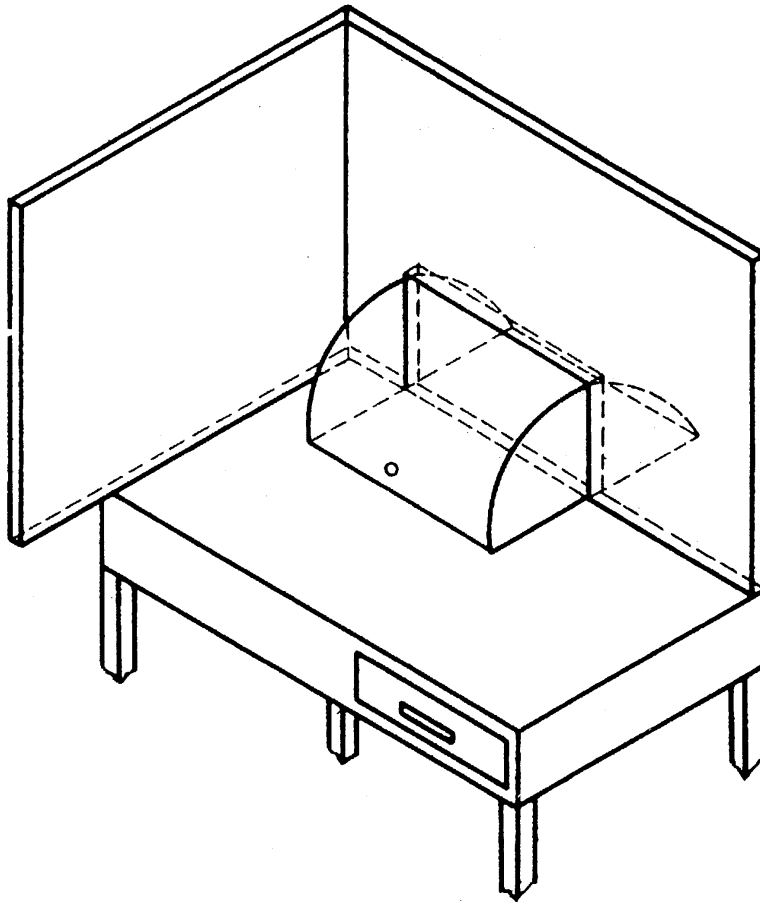
Kuva 2



▼B

VAAKATASOSSA SARANOITU LUUKKU, JOSTA NÄYTTEET VOIDAAN
ANTAA

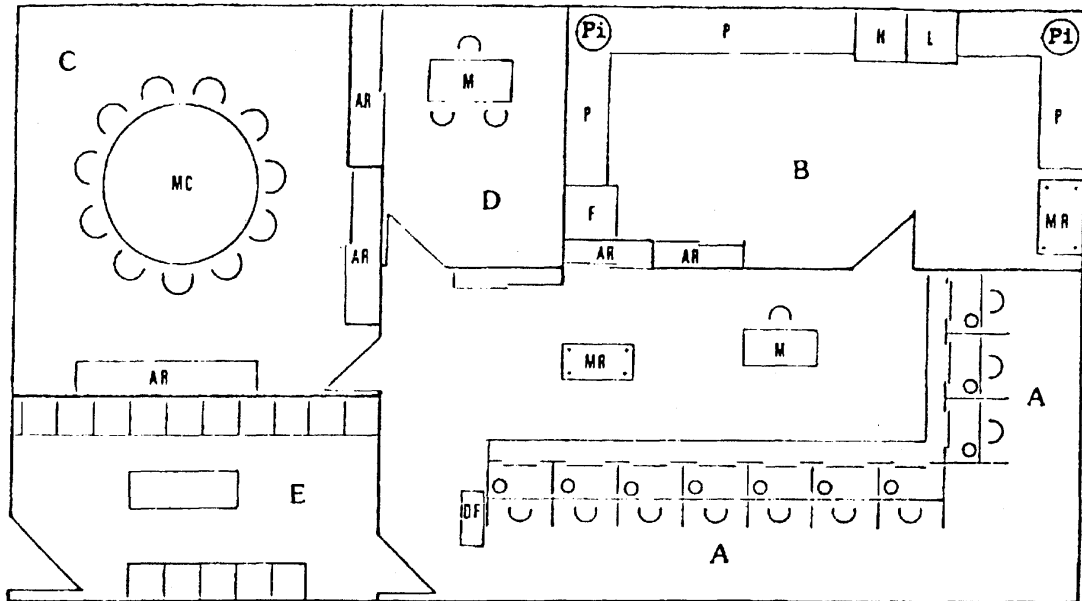
Kuva 3



▼B

AISTINVARAISEN ARVIOINNIN LABORATORIO

Kuva 4 — Esimerkki maistamishuoneesta



- A: maistamiskoppi
- B: huone näytteiden valmistelua ja astioiden puhdistusta varten
- C: ryhmäkeskusteluhuone
- D: toimisto
- E: odotushuone
- F: jääkaappi
- H: uuni
- L: astianpesukone
- Pi: allas
- AR: kaappi
- MR: pyörällä kulkeva apupöytä
- DF: lomaakkeiden jako
- MC: pyöreä pöytä
- M: pöytä
- P: työtaso

▼B

LIITE XIII

▼M6

OLIIVIÖLJYN NEUTRALOIMINEN JA VÄRIN POISTO LABORATORIOSSA

▼B

1 OLIIVIÖLJYN NEUTRALOINTI JA VÄRIN POISTO LABORATORIOSSA

1.1 Öljyn neutralointi

1.1.1 Välineistö

- korkea dekantterilasi, 300 ml
- sentrifugi, jossa 100 ml:n koeputkia,
- dekantterilasi, 250 ml,
- pyöreäpohjaisia pulloja, 100 ml,
- erotussuppilo, 1 l.

1.1.2 Reagenssit

- 12-prosenttinen natriumhydroksidin vesiliuos,
- 1-prosenttinen fenoliftaleiinin etanoliliuos,
- puhdasta heksaania, analyysilaatua,
- puhdasta isopropanolia, analyysilaatua.

1.1.3 Suoritus

a) *Öljyt, joiden happoisuus oleiinihappona ilmaistuna on alle 30 %*

Lämmitetään 65 °C vesihautteessa korkeassa 300 ml:n dekantterilasissa 50 g käsittelemätöntä öljyä. Lisätään 12-prosenttista natriumhydroksidiliuosta määrä, joka vastaa öljyn vapaiden rasvahappojen määrää lisätynä 5 prosentilla, ja sekoitetaan hiljaa koko ajan. Sekoittamista jatketaan 65 °C:ssa viiden minuutin ajan.

Seos siirretään 100 ml:n koeputkiin ja saippuoitunut osa erotetaan sentrifugoimalla. Dekantoitu öljy kaadetaan 250 ml:n dekantterilasiin ja pestään käyttäen 50—60 ml kiehuvaa tislattua vettä, joka poistetaan lapon avulla. Pesut toistetaan niin monta kertaa, että kaikki saippuoitunut aines on poistunut (ja fenoliftaleiinin vaaleanpunainen väri on hävinnyt).

Öljy sentrifugoidaan, jotta kaikki vesi saadaan pois.

b) *Öljyt, joiden happoisuus oleiinihappona ilmaistuna on yli 30 %*

Sekoitetaan yhden litran erotussuppilossa 50 g käsittelemätöntä öljyä, 200 ml heksaania, 100 ml isopropanolia ja sellainen määrä 12-prosenttista natriumhydroksidia, joka vastaa öljyn vapaiden rasvahappojen määrää lisätynä 0,3 prosentilla. Ravistetaan voimakkaasti yhden minuutin ajan. Lisätään 100 ml tislattua vettä, ravistetaan uudelleen ja annetaan seistä.

Kun kerrokset ovat erottuneet, lasketaan pohjalla oleva saippuoitunut kerros pois. Kerrosten väliin muodostuu usein limainen liukenemattomien aineiden välikerros vesiliukoisen faasin päälle ja öljyfaasin alle; myös tämä välikerros on poistettava.

Seuraavaksi neutraalin öljyn heksaaniliuos pestään isopropanolin ja tislattun veden liuoksella, 50—60 ml, suhteessa 1:1 (V/V), kunnes fenoliftaleiinin vaaleanpunainen väri on hävinnyt. Heksaani poistetaan sen jälkeen kokonaan haihduttamalla tyhjiössä (esimerkiksi kiertohaihduttimessa).

1.2 Neutraloidun öljyn värin poistaminen

1.2.1 Välineistö

- pyöreäpohjainen kolvi, 250 ml, jossa kolme lasihioskaulaa, joihin yhdistetään:
 - a) lämpömittari, joka näyttää yhden asteen tarkkuudella 90 °C:seen saakka;
 - b) mekaaninen sekoitin, joka pyörii 250—300 kierrosta minuutissa ja joka sopii käytettäväksi tyhjiössä;

▼B

c) tyhjiöpumppuliitäntä,

— tyhjiöpumppu, jossa on manometri, joka kykenee mittaamaan 15—30 millibaarin jäännöspaineen.

1.2.2 Suoritus

Punnitaan noin 100 g neutraloitua öljyä kolmikaulaiseen pulloon. Lämpömittari ja sekoitin asennetaan paikalleen, liitetään tyhjiöpumppu ja lämmitetään 90 °C:seen koko ajan sekoittaen.

Lämpötila pidetään samana ja jatketaan sekoittamista, kunnes määritettävä öljy on täysin vedetön (noin 30 minuuttia).

Avataan ja annetaan tyhjiön täyttyä ja lisätään 2—3 g aktivoitua valkaisu-savea. Kytetään tyhjiöpumppu uudelleen niin, että jäännöspaine on 15—30 millibaaria ja lämpötila pidetään 90 °C:ssa samalla sekoittaen noin 250 kierrosta minuutissa 30 minuutin ajan.

Suodatetaan kuumana termostaattisäätöisessä lämpökaapissa 50—60 °C:ssa.

▼M6

LIITE XIV

YHDISTETYN NIMIKKEISTÖN 15 RYHMÄN LISÄHUOMAUTUKSET
2, 3 JA 4

2. A. Numeroihin 1509 - 1510 kuuluvat ainoastaan öljyt, jotka on saatu yksinomaan oliiveja käsittelemällä ja joiden rasvahappo- ja steroliosuuksiin liittyvät analyttiset ominaisuudet ovat seuraavat:

Taulukko I — Rasvahappojen osuus prosentteina kokonaisrasvahapoista	Taulukko II — Sterolien osuus prosentteina kokonaissteroleista
Myristiinihappo M 0,1	Kolesteroli M 0,5
Linoleenihappo M 0,9	Brassikasteroli M 0,2
Arakiinihappo M 0,7	Kampesteroli M 4,0
Eikosaanihappo M 0,5	Stigmasteroli ⁽¹⁾ < Kampesteroli
Beheenihappo M 0,3	Beeta-sitosteroli ⁽²⁾ m 93,0
Lignoseriinihappo M 0,5	Delta-7-stigmasteroli M 0,5

m = minimi
M = maksimi

⁽¹⁾ Ei koske oliivilamppuöljyjä (alanimike 1509 10 10) ja jalostamattomia uutettuja oliiviöljyjä (alanimike 1510 00 10).

⁽²⁾ Delta-5-23-stigmastadienoli + klerosteroli + beeta-sitosteroli + sitostanoli + delta-5-avenasteroli + delta-5-24-stigmastadienoli

Numeroihin 1509 - 1510 eivät kuulu kemiallisesti modifioituneet oliiviöljyt (erityisesti uudelleen esteröidyt öljyt) ja muiden öljyjen kanssa sekoitetut oliiviöljyt. Uudelleen esteröidyn oliiviöljyn tai muiden kuin oliiviöljyjen esiintyminen todetaan asetuksen (ETY) N:o 2568/91 liitteissä V, VII, X A ja X B kuvattujen menetelmien avulla.

- B. Alanimikkeeseen 1509 10 kuuluvat ainoastaan jäljempänä I ja II alakohdassa luetellut oliiviöljyt, jotka on saatu käyttäen ainoastaan mekaanisia tai muunlaisia fysikaalisia menetelmiä sellaisissa olosuhteissa, varsinkin lämpötilan suhteen, jotka eivät aiheuta öljyn pilaantumista, ja joita ei ole käsitelty muuten kuin pesemällä, dekantoimalla, sentrifugoimalla tai suodattamalla. Liuottimilla oliiveista saadut öljyt kuuluvat nimikkeeseen 1510.
- I. Alanimikkeen 1509 10 10 ”oliivilamppuöljy”, happamuudesta riippumatta, tarkoittaa oliiviöljyä, jossa on:
- ▶M9 vahoja ◀ enintään ▶M9 350 ◀ mg/kg;
 - erytrodiolia ja uvaolia enintään 4,5 %;
 - triglyseridien 2-asemassa olevia tyydyttyneitä rasvahappoja enintään 1,3 %;
 - öljyhapon trans-isomeerien summa pienempi kuin 0,10 % ja linoli- ja linoleenihappojen transisomeerien summa pienempi kuin 0,10 %; ja jolla on
 - yksi tai useampi seuraavista ominaisuuksista:
 - peroksidiluku, joka on suurempi kuin 20 mEq aktiivista happea/kg;
 - haihtuvien halogenoitujen liuottimien määrä yhteensä suurempi kuin 0,2 mg/kg tai niistä vähintään yhden määrä suurempi kuin 0,1 mg/kg;
 - K270 -ekstinktiokerroin on suurempi kuin 0,25 ja aktivoitulla alumiinioksidilla tapahtuvan käsittelyn jälkeen enintään 0,11; tietyillä öljyillä, joiden öljyhappona ilmoitettujen vapaiden rasvahappojen määrä on suurempi kuin 3,3 g/100 g, voi asetuksen (ETY) N:o 2568/91 liitteen IX menetelmällä tehdyn aktivoitulla alumiinioksidilla tapahtuvan käsittelyn jälkeen olla K270-ekstinktiokerroin, joka on suurempi kuin 0,10; tällaisissa tapauksissa niillä on oltava seuraavat ominaisuudet sen jälkeen, kun ne edellä mainitun asetuksen liitteen XIII mukaisesti neutraloitu ja tehty värättömiksi laboratoriossa:
 - K270-ekstinktiokerroin enintään 1,20;

▼ **M6**

— ekstinktiokertoimen poikkeama (ΔK) alueella 270 nm saolla suurempi kuin 0,01 mutta enintään 0,16 eli:

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

K_m on ekstinktiokerroin absorptiokäyrän huipun aallonpituudella alueella 270 nm.

K_{m-4} ja K_{m+4} ovat ekstinktiokertoimet aallonpituuksilla, jotka ovat 4 nm alaisemmat ja korkeammat kuin K_m :n aallonpituus;

4) aistinvaraisia ominaisuuksia, joihin kuuluu hyväksyttävyyssrajan ylittäviä havaittavia virheitä ja asetuksen (ETY) N:o 2568/91 liitteen XII mukainen paneelin antama koetulos on pienempi kuin 3,5.

II. Alanimikkeen 1509 10 90 ”muu neitsytoliiviöljy” tarkoittaa oliiviöljyä, jolla on seuraavat ominaisuudet:

- a) happosisältö öljyhappona ilmaistuna enintään 3,3 g/100 g;
- b) peroksidiluku enintään 20 mEq aktiivista happea/kg;
- c) ► **M9** vahojen ◀ määrä enintään ► **M9** 250 ◀ mg/kg;
- d) haihtuvien halogenoitujen liuottimien määrä yhteensä enintään 0,2 mg/kg ja yhden määrä enintään 0,1 mg/kg;
- e) K270-ekstinktiokerroin enintään 0,25 ja aktivoitulla alumiinioksidilla tapahtuvan käsittelyn jälkeen enintään 0,1;
- f) ekstinktiokertoimen poikkeama (ΔK) alueella 270 nm enintään 0,01;
- g) aistinvaraisia ominaisuuksia, joihin voi kuulua hyväksyttävyyssrajan alittavia havaittavia virheitä ja asetuksen (ETY) N:o 2568/91 liitteen XII mukainen paneelin antama koetulos on vähintään 3,5;
- h) erytrodiolin ja uvaolin määrä enintään 4,5 %;
- i) triglyseridien 2-asemassa olevien tyydyttyneiden rasvahappojen määrä enintään 1,3 %;
- j) öljyhapon trans-isomeerien summa pienempi kuin 0,03 % ja linoli- ja linoleenihapon transisomeerien summa pienempi kuin 0,03 %.

C. Alanimikkeeseen 1509 90 00 kuuluu oliiviöljy, joka on saatu käsittelemällä alanimikkeeseen 1509 10 10 ja/tai 1509 10 90 kuuluvia öljyjä, riippumatta siitä, onko niihin sekoitettu neitsytoliiviöljyä, ja jolla on seuraavat ominaisuudet:

- a) happosisältö öljyhappona ilmaistuna enintään 3,3 g/100 g;
- b) ► **M9** vahojen ◀ määrä enintään 350 mg/kg;

▼ **M9**

- c) K270 ekstinktiokerroin enintään 1,20;
- d) ekstinktiokertoimen vaihtelu (ΔK) alueella 270 nm enintään 0,16;

▼ **M6**

- e) erytrodiolin ja uvaolin määrä enintään 4,5 %;
- f) triglyseridien 2-asemassa olevien tyydyttyneiden rasvahappojen määrä enintään 1,5 %;
- g) öljyhapon trans-isomeerien summa pienempi kuin 0,20 % ja linoli- ja linoleenihapon transisomeerien summa pienempi kuin 0,30 %.

D. Alanimikkeessä 1510 00 10 ”jalostamaton öljy” tarkoittaa erityisesti uutettua oliiviöljyä, jolla on seuraavat ominaisuudet:

- a) happosisältö öljyhappona ilmaistuna vähintään 2 g/100 g;
- b) erytrodiolin ja uvaolin määrä vähintään 12 %;
- c) triglyseridien 2-asemassa olevien tyydyttyneiden rasvahappojen määrä enintään 1,8 %;
- d) öljyhapon trans-isomeerien summa pienempi kuin 0,20 % ja linoli- ja linoleenihapon transisomeerien summa pienempi kuin 0,10 %.

E. Alanimikkeeseen 1510 00 90 kuuluvat öljyt, jotka on saatu käsittelemällä alanimikkeeseen 1510 00 10 kuuluvia öljyjä, riippumatta siitä, onko niihin sekoitettu neitsytoliiviöljyä, sekä öljyt joilla ei ole lisähuomautuksissa 2 B, 2 C ja 2 D tarkoitettuja ominaisuuksia. Tähän alanimikkeeseen kuuluvien öljyjen triglyseridien 2-asemassa olevien tyydyttyneiden rasvahappojen määrän on oltava enintään 2 %, öljyhapon transisomeerien summan pienempi kuin 0,40 % ja linoli- ja linoleenihapon transisomeerien summan pienempi kuin 0,35 %.

▼M6

- 3 Alanimikkeisiin 1522 00 31 ja 1522 00 39 eivät kuulu:
- a) jäännökset, jotka on saatu käsittelemällä öljyä sisältäviä rasvoja, joiden asetuksen (ETY) N:o 2568/91 liitteen XVI menetelmällä määritetty jodiluku on pienempi kuin 70 tai suurempi kuin 100;
 - b) jäännökset, jotka on saatu käsittelemällä öljyä sisältäviä rasvoja, joiden jodiluku on välillä 70 - 100, mutta joiden beeta-sitosterolin⁽¹⁾ retentioaikaa kuvaavan piikin pinta-ala asetuksen (ETY) N:o 2568/91 liitteen V mukaan määritettynä on pienempi kuin 93 % sterolien piikkien kokonaispinta-alasta.
- 4 Edellä mainittujen tuotteiden ominaisuuksien määrittämiseen käytetyt määrittämenetelmät kuvataan asetuksen (ETY) N:o 2568/91 liitteissä.

⁽¹⁾ Delta-5-23-stigmastadienoli + klerosteroli + beeta-sitosteroli + sitostanoli + delta-5-avenasteroli + delta-5-24-stigmastadienoli

▼B

LIITE XV

1 OLIIVIJÄTTEEN ÖLJYPITOISUUS

1.1 Välineistö

- sopiva uuttolaitteisto, johon voidaan liittää pyöreäpohjainen pullo, 200—250 ml,
- sähköllä lämmitettävä vesihaude, hiekkahaude tai levy,
- analyysivaaka,
- lämpökaappi, jonka voi säätää enintään 80 °C:seen,
- sähköuuni jossa termostaatti, jonka voi säätää 103 ± 2 °C:seen ja johon voi puhaltaa ilmaa tai jossa voi käyttää alipainetta,
- mekaaninen jauhin, joka on helppo puhdistaa ja jossa oliivijäännös voidaan jauhaa ilman lämpötilan nousua tai mainittavaa vesi- tai öljypitoisuuden alenemista,
- uuttohylsy ja hydrofiilistä pumpulia tai suodatinpaperia, josta on poistettu heksaaniin uuttuvat aineet,
- eksikkaattori,
- seula, jonka reikien halkaisija on 1 mm,
- kuivattuja hohkakiven palasia.

1.2 Reagenssi

Teknistä n-heksaania, josta jää täydellisesti haihdutettuna alle 0,002 g jäännöstä/100 ml.

2 SUORITUS

2.1 Näytteen esikäsittely

Käytetään tarvittaessa mekaanista jauhinta näytteen jauhamiseksi niin hienoksi, että se menee kokonaan seulan läpi; jauhin on ensin hyvin puhdistettava.

Näytteestä käytetään noin 1/20 jauhatuslaitteen puhdistamiseen, heitetään pois syntynyt jauhos, jauhetaan loput näytteestä ja kerätään se, sekoitetaan huolellisesti ja määritetään viipymättä.

2.2 Näytteenotto

Heti kun jauhaminen on päättynyt, punnitaan noin 10 g näytettä 0,01 g:n tarkkuudella koetta varten.

2.3 Uuttohylsyn esikäsittely

Näyte pannaan uuttohylsyyn, joka suljetaan hydrofiilisellä pumpulitupolla. Jos käytetään suodatinpaperia, jauhettu näyte kääritään siihen.

2.4 Esikuivaus

Jos oliivijäännös on hyvin kosteata (ts. kosteutta ja haihtuvia aineita on yli 10 %), näyte kuivataan asettamalla täytetty uuttohylsy (tai paperiin kääritty näyte) lämpökaappiin sopivaksi ajaksi korkeintaan 80 °C:seen, jotta kosteus ja haihtuvat aineet vähensivät alle 10 %:iin.

2.5 Pyöreäpohjaisen pullon esikäsittely

Punnitaan 1 mg:n tarkkuudella pullo, jossa on pari hohkakivikappaletta. Hohkakivi kuivataan ensin uunissa 103 ± 2 °C:ssa ja jäädytetään eksikkaattorissa vähintään tunnin ajan.

2.6 Ensimmäinen uutto

Uuttohylsy näytteeseen (tai paperiin kääritty näyte) sijoitetaan uuttolaitteistoon. Pulloon kaadetaan tarpeellinen määrä heksaania. Pullo liitetään uuttolaitteistoon ja asetetaan kokonaisuus sähkökäyttöiseen lämpöhauteeseen. Lämpö säädetään niin, että refluksointinopeus on vähintään kolme tippaa sekunnissa (kohtalainen, ei kova kiehuminen).

Neljän tunnin uuton jälkeen annetaan jäähtyä. Hylsy irrotetaan uuttolaitteistosta ja pannaan ilmavirtaan, jotta suurin osa imeytyneestä liuottimesta haihtuisi.

▼B**2.7 Toinen uutto**

Hylsyn sisältö siirretään mikrojuuhatuslaitteeseen ja jauhetaan niin hienoksi kuin mahdollista. Jauhettu näyte kootaan tarkoin ja pannaan takaisin hylsyyn, joka liitetään taas uuttolaitteistoon.

Jatketaan uuttoa vielä kaksi tuntia käyttäen samaa pyöreäpohjaista pulloa, jossa on ensimmäinen uute.

Uuttopulloon kertyvän liuoksen on oltava kirkasta. Ellei näin ole, se suodatetaan paperin läpi ja pullo ja suodatinpaperi pestään useaan kertaan heksaanilla. Suodos ja pesuliutin kerätään toiseen kuivattuun 1 mg:n tarkkuudella taarattuun pulloon.

2.8 Liuottimen poistaminen ja uutteen punnitseminen

Tislataan pois ensin osa liuottimesta haihuttamalla sähkökäyttöisessä hauteessa. Liuottimen jäänteet poistetaan kuumentamalla pulloa 20 minuuttia uunissa 103 ± 2 °C:ssa. Liuottimen haihtumista voidaan edistää puhaltamalla ajoittain uuniin ilmaa tai mieluummin inerttiä kaasua tai käyttämällä alipainetta.

Pullo asetetaan eksikkaattoriin jäähtymään vähintään tunniksi ja punnitaan 1 mg:n tarkkuudella.

Kuumennetaan uudestaan samoissa olosuhteissa 10 minuuttia, jäädytetään eksikkaattorissa ja punnitaan uudelleen.

Näiden kahden punnitustuloksen ero saa olla enintään 10 mg. Ellei tähän päästä, kuumennetaan jälleen 10 minuuttia, jäädytetään ja punnitaan, kunnes massan ero edelliseen on enintään 10 mg. Viimeisen punnituksen tulos merkitään muistiin.

Samasta näytteestä tehdään kaksi eri määritystä.

3 TULOSTEN ESITTÄMINEN**3.1 Laskutapa ja kaava**

a) Uutteen määrä ilmaistuna painoprosenteina saadusta tuotteesta on:

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

jossa:

S = saadun tuotteen uutteen painoprosentti,

m_0 = näytteen paino grammoina,

m_1 = kuivatun uutteen paino grammoina.

Tulos on kahden rinnakkaiskokeen aritmeettinen keskiarvo, jos kokeen toistettavuusehdot täyttyvät.

Tulos ilmoitetaan yhden desimaalin tarkkuudella.

b) Uute ilmaistaan kuiva-aineena seuraavalla kaavalla:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{uutteen öljyprosentti kuivasta näytteestä}$$

jossa:

S = saadun tuotteen uutteen painoprosenttiosuus [ks. a)],

U = kosteus ja haihtuvat aineet näytteessä.

3.2 Toistettavuus

Samanaikaisen tekijän peräkkäisten tai samanaikaisten rinnakkaiskokeiden tulosten välinen ero ei saa olla yli 0,2 g heksaanuutetta/100 g näytettä.

Jos tämä ehto ei täyty, koe toistetaan kahdella uudella näytteellä. Jos ero on yhä suurempi kuin 0,2 g, tulos on tehdyn neljän määrittelyn aritmeettinen keskiarvo.



LIITE XVI

JODILUVUN MÄÄRITTÄMINEN

1 TARKOITUS

Tämä kansainvälinen standardi kuvaa menetelmän jodiluvun määrittämiseksi eläin- ja kasvirasvoista sekä -öljyistä, joihin tästedes viitataan sanalla rasva.

2 MÄÄRITELMÄ

Tätä kansainvälistä standardia varten määritellään seuraavat käsitteet:

2.1 Jodiluku. u:näytteen absorboiman jodin massa tässä kansainvälisessä standardissa määrättyissä olosuhteissa.

Jodiluku ilmoitetaan grammoina jodia/100 g näytettä.

3 PERIAATE

Näyte liuotetaan liuottimeen ja lisätään Wijsin reagenssia. Tietyn ajan kuluttua lisätään kaliumjodidin vesiliuosta ja vapautunut jodi titrataan natriumtiosulfaattiliuoksella.

4 REAGENSIT

Kaikkien reagenssien on oltava hyväksytyä analyysilaatua.

4.1 *Kaliumjodidiliuos*, 100 g/l, ei saa sisältää jodaatteja eikä vapaata jodia.4.2 **Tärkkelysliuos.**

Lisätään 5 g liukoista tärkkelystä 30 ml:aan vettä, lisätään tämä seos 1 000 ml:aan kiehuva vettä; annetaan kiehua kolme minuuttia ja jäähdytetään.

4.3 *Natriumtiosulfaatti*, standardi titrausliuos $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$, standardoitu enintään seitsemän päivää ennen käyttöä.4.4 *Liuotin*, valmistettu sekoittamalla yhtä suuret tilavuudet sykloheksaania ja etikkahappoa.4.5 *Wijsin reagenssi*, joka sisältää jodimonokloridia etikkahapossa. On käytettävä valmiina saatavaa Wijsin reagenssia.

Huom. Reagenssi sisältää 9 g ICI_3 :a ja 9 g I:a etikkahapossa.

5 VÄLINEISTÖ

Tavallinen laboratoriovälineistö ja erityisesti seuraavat:

5.1 *Punnituslaseja*, jotka sopivat näytemäärän punnitsemiseen ja pulloon (5.2) siirtämiseen.5.2 *Erlenmeyerpulloja*, 500 ml, hiotut lasitulpat, täysin kuivia.

6 NÄYTTEEN VALMISTAMINEN

Homogenoitu näyte kuivatetaan natriumsulfaatilla ja suodatetaan.

7 SUORITUS

7.1 Näytteenotto

Näytemäärä määräytyy oletetun jodiluvun perusteella taulukon 1 mukaisesti.

Taulukko 1

Oletettu jodiluku	Näytteen määrä (g)
alle 5	3,00
5—20	1,00
21—50	0,40
51—100	0,20
101—150	0,13

▼B

Oletettu jodiluku	Näytteen määrä (g)
151—200	0,10

Näytemäärä punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella punnituslasissa (5.1).

7.2 Määrittäminen

Näyte pannaan 500 ml:n pulloon (5.2). Lisätään 20 ml liuotinta (4.5) rasvan liuottamiseksi. Lisätään tasan 25 ml Wijsin reagenssia (4.6), suljetaan tulpalla, ravistetaan ja jätetään pullo pimeään. Wijsin reagenssin kanssa ei saa käyttää suupipettä.

Sokeakoe valmistellaan samalla tavalla käyttäen liuotinta ja reagenssia ilman näytettä.

Pullot jätetään pimeään tunniksi, jos näytteen oletettu jodiluku on alle 150; jos oletettu jodiluku on yli 150 tai tuote on polymeroitunut tai hyvin hapettunut, pullot jätetään pimeään kahdeksi tunniksi.

Ajan päätyttyä lisätään 20 ml kaliumjodidiliuosta (4.2) ja 150 ml vettä (4.1) kuhunkin pulloon.

Titraataan standardilla natriumtiosulfaatin titrausliuksella (4.4), kunnes jodin aiheuttama keltainen väri on melkein hävinnyt. Lisätään pari tippaa tarkkelysliuosta (4.3) ja jatketaan titraamista, kunnes sininen väri juuri katoaa liuosta voimakkaasti ravistettaessa.

Huom. Myös potentiometrinen titrauksen loppupisteen määrittäminen on sallittua.

7.3 Määrittysten lukumäärä

Samasta näytteestä tehdään kaksi määrittystä.

8 TULOSTEN ESITTÄMINEN

Jodiluku saadaan kaavasta

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

jossa:

c = käytetyn natriumtiosulfaattiliuoksen (4.4) tarkka pitoisuus, moolia/litra;

V₁ = sokeakokeeseen käytetyn natriumtiosulfaattiliuoksen (4.4) tilavuus millilitroina;

V₂ = määrittämiseen käytetyn natriumtiosulfaattiliuoksen (4.4) tilavuus millilitroina;

m = näytemäärä (7.1) grammoina.

Tulos on kahden määrittäksen tulosten aritmeettinen keskiarvo sillä ehdolla, että toistettavuusehto täyttyy.

▼ **M11***LIITE XVII***MENETELMÄ STIGMASTADIEENIEN MÄÄRITTÄMISEKSI
KASVIÖLJYISTÄ**

1. TARKOITUS

Stigmastadieenien määrittäminen kasviöljyistä, joissa näiden hiilivetyjen pitoisuudet ovat pieniä, kuten neitsytoliiviöljystä ja oliivin puristusjätteestä saadusta raakaöljystä.

2. SOVELTAMISALA

Tätä standardia voidaan soveltaa kaikkiin kasviöljyihin; mittaustulokset ovat kuitenkin luotettavia ainoastaan, jos näiden hiilivetyjen pitoisuus on 0,01—4,0 mg/kg. Menetelmä soveltuu erityisesti puhdistettujen kasviöljyjen (oliivi, oliivin puristusjäte, auringonkukka, palmu tms.) toteamiseen neitsytoliiviöljystä, sillä puhdistetut öljyt sisältävät stigmastadieeneja, mutta neitsytöljyt eivät sisällä niitä.

3. PERIAATE

Saippuositumattoman aineksen erottaminen. Steroidihiilivetyfraktion erottaminen pylväskromatografian avulla käyttäen silikageeliä ja kapillaarikaasukromatografista määrittäystä.

4. LAITTEISTO

- 4.1 250 ml:n pulloja, joita voi käyttää palautusjäähdyttimen kanssa.
- 4.2 Erotussuppiloita, joiden vetoisuus on 500 ml.
- 4.3 Pyöreäpohjaisia 100 ml:n pulloja.
- 4.4 Pyöröhaidutin ("rotavapori").
- 4.5 Lasinen kromatografiakolonne (sisähalkaisija 1,5—2,0 cm, pituus 50 cm), jossa on teflonhana ja jonka pohjalla on lasivillatulppa tai lasisinterievy. Silikageelikolonne valmistetaan kaatamalla kromatografiakolonnein n. 5 cm kerros heksaania ja täyttämällä sen jälkeen kolonne silikageelin heksaaniliitteellä (15 g en 40 ml:ssa) käyttäen apuna heksaanianoksia. Annetaan seistä ja viimeistellään asettuminen kevyellä tärytyksellä. Lisätään vedetöntä natriumsulfaattia noin 0,5 cm:n kerros ja eluoidaan lopuksi liika heksaani.
- 4.6 Kaasukromatografi, jossa on liekki-ionisaatiotektori, jakajatyypinen tai kylmä kolonnein liittyvä (on-column) injektori sekä uuni, joka on ohjelmoitavissa ± 1 celsiusasteen tarkkuudella.
- 4.7 Kaasukromatografinen kvartsilasikapillaarikolonne (sisähalkaisija 0,25 tai 0,32 mm, pituus 25 m), joka on pinnoitettu 5-prosenttisellä fenyyliimetyylisilikonifaasilla, jonka kerrospaksuus on 0,25 μm .

Huomautus 1:

Voidaan käyttää myös muita kolonneja, joiden polaarisuus on sama tai pienempi.

- 4.8 Tallentava integraattori, jolla voidaan integroida pohjasta pohjaan.
- 4.9 Liimatulla neulalla varustettu 5—10 μl :n mikroisku kaasukromatografiaa varten.
- 4.10 Sähköinen kuumennusvaippa tai lämpölevy.

5. REAGENSIT

Kaikkien reagenssien tulee olla analyysilaatua, ellei toisin määrätä. Käytettävän veden tulee olla tislattua vettä tai puhtaudeltaan vähintään vastaavaa.

- 5.1 Heksaania tai alkaaniseos, jonka aineosien kiehumispisteet ovat 65—70° C ja joka on tislattu rektifioimiskolonnilla.

Huomautus 2:

Liutin on tislattava epäpuhtauksien poistamiseksi.

- 5.2 96-prosenttista (v/v) etanolia.
- 5.3 Vedetöntä natriumsulfaattia.

▼ **M11**

- 5.4 Kaliumhydroksidin 10-prosenttista alkoholiliuosta. Lisätään 10 ml vettä 50 g:aan kaliumhydroksidia, sekoitetaan ja liuotetaan seos 500 ml:aan etanolia.

Huomautus 3:

Kalilipeän alkoholiliuos muuttuu seistessään ruskeaksi. Liuos on valmistettava uudelleen joka päivä ja pidettävä hyvin suljetuissa ruskeissa lasipulloissa.

- 5.5 Silikageeliä 60 kaasukromatografiaa varten, 70—230 mesh (Merck ref. 7734 tai samanlainen).

Huomautus 4:

Silikageeli voidaan yleensä ottaa käyttöön suoraan pakkauksesta ilman mitään käsittelyä. Joissakin valmistuserissä esiintyy kuitenkin alhaista aktiivisuutta, joka johtaa huonoon kromatografiseen erottumiseen. Tällöin silikageeli on käsiteltävä seuraavasti: Silikageeli aktivoidaan kuumentamalla sitä vähintään neljä tuntia 550° C:n lämpötilassa. Kuumentamisen jälkeen silikageelin annetaan jäähtyä eksikkaattorissa ja pannaan sitten tulpalla suljettuun pulloon. Lisätään 2 % vettä ja ravistetaan, kunnes paakkuja ei näy ja jauhe virtaa vapaasti.

Jos silikageelin valmistuserä on sellainen, että se aiheuttaa kromatogrammiin toisiaan häiritseviä huipuja, silikageeli on käsiteltävä edellä esitetyllä tavalla. Vaihtoehtoinen tapa on käyttää erikoispuhdasta silikageeliä 60 (Merck, ref. 7754).

- 5.6 Kolesta-3,5-dieenin (Sigma, 99-prosenttinen puhtaus) varastoliuos (200 ppm) heksaanissa (10 mg 50 ml:ssa).
- 5.7 Kolesta-3,5-dieenin standardiliuos heksaanissa, pitoisuus 20 ppm, saadaan laimentamalla edellä mainitusta liuksesta.

Huomautus 5:

5.6 ja 5.7 kohdassa tarkoitetut liukset säilyvät huononematta vähintään neljä kuukautta, jos niitä säilytetään alle 4° C:n lämpötilassa.

- 5.8 n-nonakosaanin heksaaniliuos, pitoisuus n. 100 ppm.
- 5.9 Kantajakaasu kromatografiaa varten: helium tai vety, puhtaus 99,9990 %.
- 5.10 Apukaasut liekki-ionisaatiodetektoria varten: vety, jonka puhtaus on 99,9990 %, ja puhdistettu ilma.

6. MENETTELY

6.1 **Saippuositumattoman aineksen valmistelu:**

- 6.1.1 Punnitaan $20 \pm 0,1$ g öljyä 250 ml:n pulloon (4.1), lisätään 1 ml kolesta-3,5-dieenin (20 µg) standardiliuosta ja 75 ml kalilipeän 10-prosenttista alkoholiliuosta, kiinnitetään palautusjäähdytin ja keitetään hiljalleen 30 minuuttia. Otetaan näytteen sisältävä pullo pois lämpölähteestä ja annetaan liuoksen jäähtyä hieman (liuos ei saa jäähtyä kokonaan, sillä tällöin näyte erottuu). Lisätään 100 ml vettä ja siirretään lios erotussuppiloon (4.2) 100 ml:lla heksaania. Seosta ravistetaan voimakkaasti 30 sekuntia, minkä jälkeen sen annetaan erottua kerroksiksi.

huomautus 6:

Jos muodostuu emulsio, joka ei häviä nopeasti, lisätään hieman etanolia.

- 6.1.2 Pohjalle jäävä vesifaasi siirretään toiseen erotussuppiloon ja uutetaan uudelleen 100 ml:lla heksaania. Pohjalle jäävä osa juoksetetaan taas pois ja heksaaniuute (yhdistettynä toisen erotussuppilon ainekseen) pestään kolme kertaa 100 ml:lla etanoli-vesiseoksella (1:1), kunnes pH on neutraali.
- 6.1.3 Heksaaniliuos johdetaan vedettömän natriumsulfaatin (50 g) läpi, pestään 20 ml:lla heksaania ja haihdutetaan kuivaksi pyöröhaihduttimessa 30° C:n lämpötilassa matalassa paineessa.

6.2 **Steroidihilivetyjakeen erottaminen:**

- 6.2.1 Jäännös siirretään fraktiointikoloonniin käyttäen kahta yhden millilitran heksaaniannosta, näyte johdetaan koloonniin antaan liuoksen pinnan vajota natriumsulfaattikerroksen pinnan tasalle ja aloitetaan kromatografinen eluointi heksaanilla käyttäen virtausnopeutta, joka on n. 1 ml/min. Eluaatin ensimmäiset 20—30 ml heitetään pois ja seuraava 40 ml:n jae otetaan talteen. Talteen otettu jae siirretään 100 ml:n pyöreäpohjaiseen pulloon (4.3).

▼ **M11***Huomautus 7:*

Ensimmäinen jae sisältää tyydyttyneitä hiilivetyjä (kuva 1a) ja toinen jae steroidihiilivetyjä. Lisäeluointi tuottaa skvaleenia ja vastaavia yhdisteitä. Jotta saavutetaan tyydyttyneiden ja steroidihiilivetyjen tarkka erottuminen, jakeiden tilavuudet on määritettävä ihanteellisiksi. Tätä varten ensimmäisen jakeen tilavuus on valittava siten, että toista jaetta määritettäessä tyydyttyneiden hiilivetyjen huippu on matala (ks. kuva 1c); jos niitä ei ilmene ja standardihuippu on heikko, tilavuutta on pienennettävä. Joka tapauksessa on tarpeetonta erottaa täysin ensimmäisen ja toisen jakeen osia, sillä kaasukromatografisessa määrittämisessä ei esiinny päällekkäisiä huippuja, jos kaasukromatografiaolosuhteet säädetään 6.3.1 kohdan mukaisesti. Toisen jakeen ihannetilavuutta ei yleensä tarvitse etsiä, sillä myöhemmät osat erottuvat hyvin. Jos kuitenkin esiintyy suuri huippu, jonka retentioaika on n. 1,5 minuuttia lyhyempi kuin standardin, tämä johtuu skvaleenista ja osoittaa huonoa erotuskykyä.

- 6.2.2 Toinen jae haihdutetaan kuivaksi haihduttimessa 30° C lämpötilassa matalassa paineessa, ja jäännös liuotetaan välittömästi 0,2 ml:aan heksaania. Liuos säilytetään jääkaapissa määrittämiseen asti.

Huomautus 8:

6.1.3 ja 6.2.2 kohdassa tarkoitettuja jakeita ei pidä säilyttää kuivana eikä huoneenlämpötilassa. Liuotin on lisättävä heti kun jäännös on saatu, ja liuoksia on tämän jälkeen säilytettävä jääkaapissa.

6.3 Kaasukromatografia

- 6.3.1 Työskentelyolosuhteet jakajakatyyppistä injektoria varten:

- Injektorin lämpötila: 300° C.
- Detektorin lämpötila: 320° C.
- Tallentava intergraattori: integrointiparametrit on valittava siten, että pinta-alat arvioidaan oikein. Integrointi pohjasta pohjaan on suositeltavaa.
- Herkkyys: noin 16 kertaa vähimmäisvaimennus.
- Injektoitava liuosmäärä: 1µl.
- Uunin lämpötilaohjelma: alussa 235° C 6 minuutin ajan, sen jälkeen lämpötilaa kohotetaan 2° C/min, kunnes lämpötila on 285° C.
- Injektori, jossa on virtauksenjakaja 1:15.
- Kantajakaasu: helium tai vety, paine n. 120 kPa.

Näitä olosuhteita voidaan muuttaa kromatografian ja kolonnin ominaisuuksien mukaan, jotta saavutetaan seuraavien vaatimusten mukainen kromatogrammi: sisäisen standardin huippu n. 5 minuutin tarkkuudella 6.3.2 kohdassa tarkoitettussa ajassa; sisäisen standardin huipun on oltava vähintään 80 prosenttia täydestä asteikosta.

Kaasukromatografijärjestelmä on tarkistettava ruiskuttamalla kolesta-dieenin (5.6) varastoliuoksen ja n-nonakosaaniliuoksen (5.8) seosta. Kolesta-3,5-dieenin huippu tulee esiintyä ennen n-notakosaanin huipua (kuva1c); jos näin ei käy, voidaan menetellä kahdella tavalla: alentaa uunin lämpötilaa ja/tai käyttää polaarisuudeltaan pienempää kolonnia.

- 6.3.2 Huipun tunnistaminen

Sisäisen standardin huippu esiintyy n. 19 minuutin kuluttua ja stigmasta-3,5-dieenin huippu suhteellisella retentioajalla, joka on n. 1,29 (ks. kuva 1b). Stigmasta-3,5-dieenin mukana kulkee pieni määrä isomeeria, ja yleensä molemmat sisältyvät samaan huippuun. Jos kolonni on kuitenkin liian polaarinen tai sen erotuskyky on suuri, isomeerin huippu saattaa näkyä erillisenä pienenä stigmasta-3,5-dieenihiippua välittömästi edeltävänä huippuna (kuva 2). Jotta voidaan varmistaa, että eluoituvat stigmastadieenit muodostavat vain yhden huipun, on suotavaa vaihtaa kolonnin tilalle vähemmän polaarinen tai sisähalkaisijaltaan suurempi kolonni.

Huomautus 9:

Stigmastadieeneja voidaan saada kromatografista vertailua varten määrittämällä puhdistettua kasviöljyä ja käyttämällä pinempää näytettä (1—2 g). Stigmastadieenit tuottavat voimakkaan ja helposti tunnistettava huipun.

- 6.3.3 Kvantitatiivinen määrittäminen

Stigmastadieenipitoisuus määritetään seuraavan kaavan avulla:

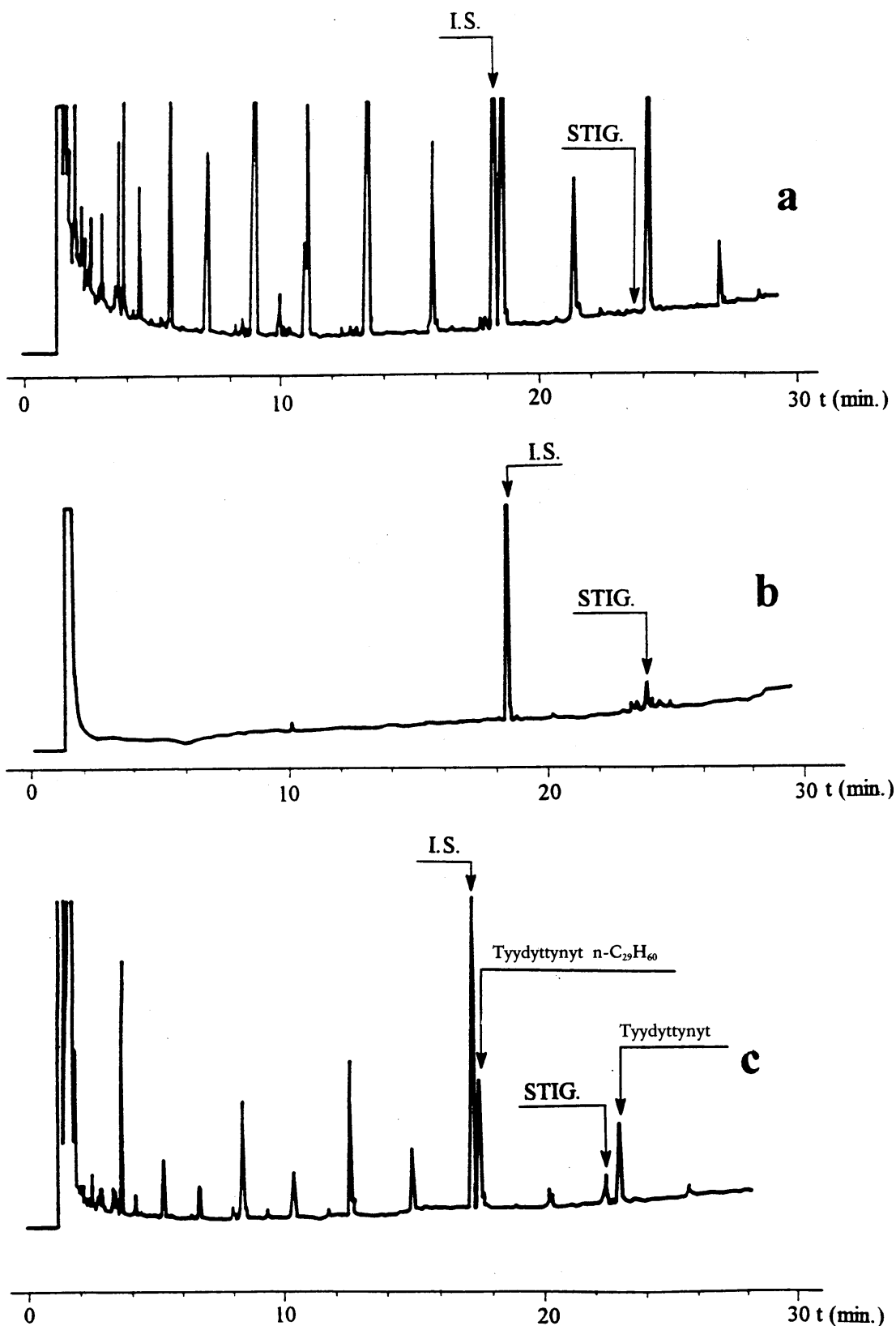
$$\text{stigmastadieenipitoisuus mg/kg} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

▼M11

- jossa A_s = stigmastadieenien huipun pinta-ala (jos huippu jakaantuu kahden isomeerin huipuksi, näiden kahden huipun pinta-alojen summa)
- A_c = sisäisen standardin (kolestadieeni) huipun pinta-ala
- M_c = lisätyn standardin massa mikrogrammoina
- M_o = öljyn massa grammoina

Toteamisraja: noin 0,01 mg/kg.

▼M11

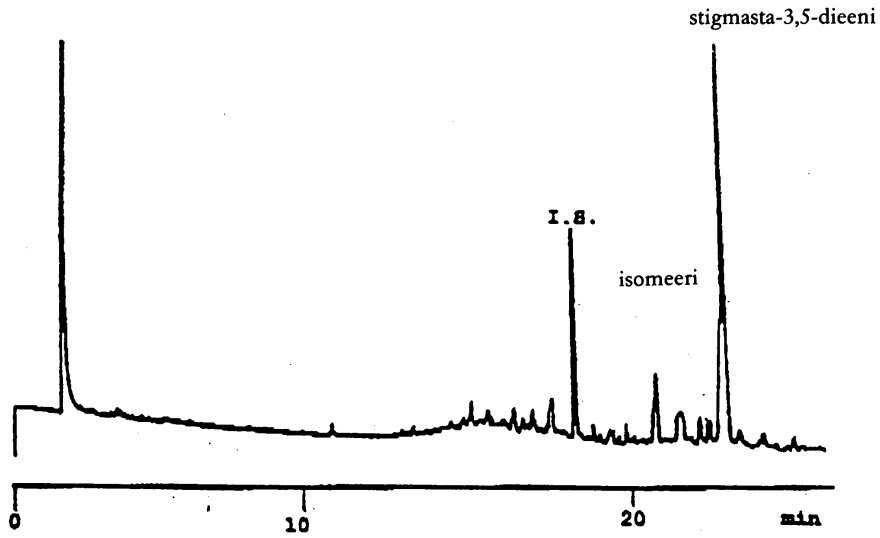


Kuva 1

Kaasukromatogrammi, joka on saatu oliiviöljynäytteistä, jotka on määritetty kvartsilasikapillaarikolonnissa (sisähalkaisija 0,25, pituus 25 m); kolonne on pinnoitettu 5-prosenttisellä fenyyli-metyylisilikonilla, kerrospaksuus 0,25 µm.

- Neitsytöljyn ensimmäinen jae (30 ml), jossa näkyy standardin huippu.
- Oliiviöljyn toinen jae (40 ml); öljy sisältää 0,10 mg/kg stigmastadieeneja.
- Toinen jae (40 ml), joka sisältää pienen osuuden ensimmäistä jaetta.

▼M11



Kuva 2

Kaasukromatogrammi, joka on saatu DB-5-kolonnilla määritetystä puhdistetun oliiviöljyn näytteestä; kromatogrammissa näkyy stigmasta-3,5-dieenin isomeeri.

▼ **M13***LIITE XVIII***C₄₂:TA SISÄLTÄVIEN TRIGLYSERIDIEN MÄÄRITYS (TEOREETTISEN KOOSTUMUKSEN JA TODELLISEN KOOSTUMUKSEN VÄLINEN ERO)****1. Tarkoitus**

Oliiviöljyjen triasyyliglyserolien (TAG:n) koostumuksen määrittäminen ekvivalenttihiililukuina perustuen HPLC:llä (korkean suorituskyvyn nestekromatografia) saatujen määritystulosten ja rasvahappokoostumuksen perusteella lasketun teoreettisen koostumuksen välisiin eroihin.

2. Soveltamisala

Standardia sovelletaan oliiviöljyihin. Menetelmä soveltuu pienten siemenöljymäärien (joissa on paljon linoleiinihappoa) osoittamiseen kaikissa oliiviöljyissä.

3. Periaate

C₄₂-triasyyliglyserolien HPLC-analyysillä määritetty ja C₄₂-triasyyliglyserolien teoreettinen koostumus (joka lasketaan rasvahappokoostumuksen GLC-määrityksen perusteella) vastaavat tietyissä rajoissa toisiaan puhtaiden öljyjen osalta. Jos erotus on suurempi kuin asetuksessa kunkin öljytyypin osalta ilmoitetut arvot, on öljyssä todennäköisesti siemenöljyä.

4. Menetelmä

Menetelmä C₄₂-triglyseridien teoreettisen koostumuksen laskemiseksi sekä sen ja HPLC:llä saadun pitoisuuden välisen eron laskemiseksi tapahtuu olennaisesti vertaamalla muilla menetelmillä saatuja määritystuloksia; tässä voidaan erottaa kolme vaihetta: rasvahappokoostumuksen määrittäminen lasikapillaarikromatografialla, C₄₂-triasyyliglyserolien teoreettisen koostumuksen laskeminen ja C₄₂-triasyyliglyserolien HPLC-määrittäminen.

4.1 Laitteisto

- 4.1.1 Pyörökolveja, 250 ml ja 500 ml
- 4.1.2 Dekanterilaseja, 100 ml
- 4.1.3 Lasinen kromatografiapylväs, sisähalkaisija 21 mm, pituus 450 mm, jossa on tulppa ja standardoitu naaraspuolinen hiös yläpäässä
- 4.1.4 Erotussuppiloita, 250 ml, joissa on standardoitu koiraspuolinen hiös alapäässä ja joka voidaan liittää pylvään yläpäähän
- 4.1.5 Lasisauva, pituus 600 mm
- 4.1.6 Lasisuppilo, halkaisija 80 mm
- 4.1.7 Mittapulloja, 50 ml
- 4.1.8 Mittapulloja, 20 ml
- 4.1.9 Pyöröhaihduttaja
- 4.1.10 Korkean suorituskyvyn nestekromatografi, jonka pylväs voidaan termostoida
- 4.1.11 Injektiolaite, jolla voidaan injisoida 10 µl
- 4.1.12 Ilmaisin: differentiaalirefraktometri. Koko asteikon herkkyuden pitäisi olla vähintään 10⁻⁴ taitekerroinyksikköä.
- 4.1.13 Pylväs: Ruostumatonta terästä, pituus 250 mm ja sisähalkaisija 4,5 mm, johon pakattu 5 µm:n piihappo- (silika-)partikkeleja, jotka sisältävät 22 — 23 % hiiltä oktadekyylisilaanin muodossa (huomautus 2).
- 4.1.14 Tulostin ja/tai integraattori

4.2 Reagenssit

Reagenssien pitäisi olla analyysipuhtausluokkaa. Eluointiliuottimista pitää poistaa kaasut, ja niitä voi käyttää useaan kertaan ilman että se vaikuttaa erotuksiin.

▼ **M13**

- 4.2.1 Petrolieetteri 40 — 60 °C, kromatografialaataua
- 4.2.2 Etyylieetteri, peroksidivapaa, tislattu juuri ennen käyttöä
- 4.2.3 Lasikromatografian eluutioliuos: petrolieetterin ja etyylieetterin seos 87/13 (v/v)
- 4.2.4 Piihappogeeli, 70 — 230 mesh, tyyppiä Merck 7734, jonka vesipitoisuus on standardoitu 5 prosenttiin (w/w)
- 4.2.5 Lasivillaa
- 4.2.6 Asetoni
- 4.2.7 Asetonitriili
- 4.2.8 Eluotiliuotin: asetonitriili + asetoni (kunkin osuus säädetään siten että saadaan haluttu erotus; aloitetaan 50:50 -seoksella)
- 4.2.9 Liuottamisluiotin: asetoni
- 4.2.10 Vertailutriglyseridit: joko käytetään kaupallisia triglyseridejä (tripalmiittiini, trioleiini jne.) ja kuvataan retentioajat ekvivalenttihiililuvun funktiona tai tehdään vertailukromatogrammit soijaöljy-oliiviöljyseoksella suhteessa 30:70 ja puhtaalla oliiviöljyllä (katso huomautukset 3 ja 4 sekä kuvat 1, 2, 3 ja 4).

4.3 Näytteiden valmistus

Koska monista aineista voi tulla vääriä positiivisia tuloksia, näyte on aina puhdistettava hapettuneissa öljyissä esiintyvien polaaristen aineiden määrittämiseen tarkoitetun IUPAC-menetelmän 2.507 mukaan.

4.3.1 Kromatografiapylvään valmistelu

Pylväs (4.1.3) täytetään noin 30 ml:lla eluutioliuosta (4.2.3), siihen pannaan hiukan lasivillaa (4.2.5), joka työnnetään pylvään pohjaan lasisauvalla (4.1.5).

Suspendoidaan 100 ml:n dekanterilasiin 25 g piihappogeeliä (4.2.4) 80 ml:ssa eluutioliuosseosta (4.2.3), joka lisätään pylvääseen lasisuppilon (4.1.6) avulla.

Jotta piihappogeeli saadaan kokonaan siirretyksi pylvääseen, dekanterilasia pestään eluutioliuksella ja pesunesteet lisätään pylvääseen.

Tulppa avataan ja liuottimen annetaan tulla pylväästä, kunnes sen pinta on noin 1 cm piihappogeeelin pinnan yläpuolella.

4.3.2 Pylväskromatografia

Punnitaan 0,001 g:n tarkkuudella $2,5 \pm 0,1$ g öljyä, joka on etukäteen suodatettu, homogenoitu ja josta on tarvittaessa poistettu vesi, 50 ml:n mittapulloon (4.1.7). Öljy liuotetaan noin 20 ml:aan eluutioliutinta (4.2.3). Lämmitetään tarvittaessa liuottamisen helpottamiseksi. Annetaan jäähtyä huoneenlämpötilaan, ja tilavuus säädetään merkkiin eluutioliuotimella.

20 ml tätä liuosta siirretään volymetrisellä pipetillä kohdan 4.3.1 mukaisesti valmistettuun pylvääseen. Tulppa aukaistaan ja liuottimen annetaan valua piihappogeeelin pinnan tasolle.

Eluoidaan 150 ml:lla eluutioliutinta (4.2.3). Eluutionopeus noin 2 ml/min (150 ml menee pylvään läpi noin 60 — 70 minuutissa).

Eluaatti kerätään 250 ml:n pyörökolviin (4.1.1), joka on taarattu uunissa ja punnittu tarkasti. Liuotin haihdutetaan alipaineessa (Rotavapor) ja jäännös punnitaan. Siitä tehdään HPLC-analyysiin ja metyyliesterin valmistukseen käytettävä liuos.

Pylväästä on saatava talteen vähintään 90 % näytteestä, kun on kyseessä ekstraneitsyt-, neitsyt-, tavallinen puhdistettu ja oliiviöljylokat, ja vähintään 80 %, kun on kyseessä lamppu- ja jäännösoliiviöljyt.

4.4 HPLC-analyysi**4.4.1 Näytteiden valmistus kromatografiaan**

Analysoitavasta näytteestä valmistetaan 5-prosenttinen liuos punnitsemalla $0,5 \pm 0,001$ g näytettä 10 ml:n asteikolliseen pulloon ja täyttämällä 10 ml:ksi liuottamisluiottimella (4.2.9).

▼ **M13**

4.4.2 Menetelmä

Kootaan kromatografialaitteisto. Eluutioliuotinta (4.2.8) pumpataan nopeudella 1,5 ml/min laitteiston puhdistamiseksi. Odotetaan, kunnes perusviiva on tasainen. Injisoidaan 10 µl näytettä, joka on valmistettu kuten kohdassa 4.3 selostetaan.

4.4.3 Laskeminen ja tulosten ilmoittaminen

Käytetään sisäisen standardin menetelmää, ts. oletetaan, että triglyseridien (C_{42} -triglyserideistä C_{52} -triglyserideihin) piikkien yhteenlasketut pinta-alat ovat 100 %. Kunkin triglyseridin suhteellinen prosenttiosuus lasketaan kaavalla:

$$\% \text{ triglyseridiä} = \text{piikin pinta-ala} \times 100 / \text{piikkien pinta-alojen summa}$$

Tulokset ilmoitetaan vähintään kahden desimaalin tarkkuudella.

Huomautus 1: Eluutiojärjestys voidaan määrittää laskemalla ekvivalenttihililuvut, jotka määräytyvät usein yhtälön $ECN = CN - 2n$ perusteella, jossa CN on hiililuku ja n on kaksoissidosten määrä; se voidaan laskea tarkemmin ottamalla huomioon kaksoissidoksen alkuperä. Jos n_o , n_1 ja n_m ovat öljyhapon, linoleiinihapon ja linoleeni-hapon kaksoissidokset, ekvivalenttihililuku voidaan laskea yhtälöstä

$$ECN = CN - d_o n_o - d_1 n_1 - d_m n_m,$$

jossa kertoimet d_o , d_1 ja d_m voidaan laskea vertailutriglyseridien avulla. Tässä menetelmässä eritellyissä oloissa suhde on lähellä seuraavaa:

$$ECN = CN - (2,60 n_o) - (2,35 n_1) - (2,17 n_m)$$

Huomautus 2: Esimerkkejä: Lichrosorb (Merck) RP18 Art 50333

Lichrosphere tai vastaava (Merck) 100
CH18 Art 50377

Huomautus 3: Usean triglyseridin avulla voi myös laskea erotuskyvyn trioleiinin suhteen:

$$\alpha = RT'/RT \text{ (trioleiini)}$$

käyttämällä redusoitua retentioaika $RT' = RT - RT \text{ liuotin}$.

Log α :aa f:n funktiona (jossa f on kaksoissidosten määrä) esittävän kuvaajan avulla voidaan määrittää retentioarvot kaikille vertailutriglyserideihin sisältyvien rasvahappojen triglyserideille — katso kuva 2.

Huomautus 4: Pylvään pitäisi olla niin tehokas, että trilinoleiiniপিikki erottuu selvästi niiden triglyseridien piikeistä, joiden retentioajat ovat sitä lähellä. Eluutiota jatketaan aina C_{52} :een asti.

Huomautus 5: Jotta saataisiin sellainen kromatogrammi, että kaikkien tärkeiden piikkien pinta-alat voidaan mitata luotettavasti, on C_{50} -triglyseridiä vastaavan toisen piikin korkeuden oltava 50 % koko asteikosta.

4.5 **Triasyyliglyseridien koostumuksen laskeminen (mooliprosentteina) rasvahappojen GLC-tuloksista**

4.5.1 Rasvahappokoostumuksen määrittäminen

Rasvahappokoostumus määritetään asetuksen (ETY) N:o 2568/91 liitteessä X A esitetyllä ETY:n kaasukromatografimenetelmällä lasipylväällä. Metyyliesterit valmistetaan liitteen X B mukaan (natrium-metylaattialkoholiliuos).

4.5.2 Laskemisessa huomioon otettavat rasvahapot

Glyseridit ryhmitellään niiden ekvivalenttihililuvun (ECN) mukaan ottaen huomioon seuraavat vastaavuudet ECN:n ja rasvahappojen välillä. Huomioon otetaan ainoastaan 16 ja 18 hiiliatomia sisältävät rasvahapot, koska niillä on merkitystä oliiviöljylle.

Rasvahappo (FA)	Lyhennys	Molekyylipaino (MW)	ECN
Palmitiinihappo	P	256,4	16
Palmitoleiinihappo	Po	254,4	14
Steariinihappo	S	284,5	18
Öljyhappo	O	282,5	16

▼ M13

Rasvahappo (FA)	Lyhennys	Molekyyli- paino (MW)	ECN
Linoleiinihappo	L	280,4	14
Linoleenihappo	Ln	278,4	12

4.5.3 Rasvahappojen mooliprosentin laskeminen pinta-alaprosenteista

$$\begin{array}{l}
 \left. \begin{array}{l}
 \text{moolia } P = \frac{\text{pinta-ala-}\% P}{\text{MW } P} \quad \text{moolia } S = \frac{\text{pinta-ala-}\% S}{\text{MW } S} \quad \text{moolia } Po = \frac{\text{pinta-ala-}\% Po}{\text{MW } Po} \\
 \text{moolia } O = \frac{\text{pinta-ala-}\% O}{\text{MW } O} \quad \text{moolia } L = \frac{\text{pinta-ala-}\% L}{\text{MW } L} \quad \text{moolia } Ln = \frac{\text{pinta-ala-}\% Ln}{\text{MW } Ln}
 \end{array} \right\} (1)
 \end{array}$$

4.5.4 Rasvahappojen muuntaminen mooliprosenteiksi

$$\begin{array}{l}
 \left. \begin{array}{l}
 \text{mooli-}\% P (1,2,3) = \frac{\text{moolia } P * 100}{\text{moolia } (P + S + Po + O + L + Ln)} \\
 \text{mooli-}\% S (1,2,3) = \frac{\text{moolia } S * 100}{\text{moolia } (P + S + Po + O + L + Ln)} \\
 \text{mooli-}\% Po (1,2,3) = \frac{\text{moolia } Po * 100}{\text{moolia } (P + S + Po + O + L + Ln)} \\
 \text{mooli-}\% O (1,2,3) = \frac{\text{moolia } O * 100}{\text{moolia } (P + S + Po + O + L + Ln)} \\
 \text{mooli-}\% L (1,2,3) = \frac{\text{moolia } L * 100}{\text{moolia } (P + S + Po + O + L + Ln)} \\
 \text{mooli-}\% Ln (1,2,3) = \frac{\text{moolia } Ln * 100}{\text{moolia } (P + S + Po + O + L + Ln)}
 \end{array} \right\} (2)
 \end{array}$$

Tulos ilmoittaa kunkin rasvahapon prosenttiosuuden mooliprosenteina TAG:n 1,2,3-asemassa.

Sitten lasketaan tyydyttyneiden rasvahappojen P ja S (SFA) ja tyydyttömien rasvahappojen Po, O, L ja Ln (UFA) summa:

$$\begin{array}{l}
 \left. \begin{array}{l}
 \text{mooli-}\% \text{ SFA} = \text{mooli-}\% P + \text{mooli-}\% S \\
 \text{mooli-}\% \text{ UFA} = 100 - \text{mooli-}\% \text{ SFA}
 \end{array} \right\} (3)
 \end{array}$$

4.5.5 Rasvahappokoostumuksen laskeminen TAG:n 2- sekä 1,3- asemissa

Rasvahapot jakautuvat kolmeen ryhmään seuraavasti: kaksi samanlaista 1- ja 3-asemien osalta ja yksi 2-aseman osalta siten, että tyydyttyneillä (P ja S) ja tyydyttömällä hapoilla (Po, O, L ja Ln) on eri kertoimet.

4.5.5.1 2-asemassa tyydyttyneet rasvahapot [P(2) ja S(2)]

$$\begin{array}{l}
 \left. \begin{array}{l}
 \text{mooli-}\% P(2) = \text{mooli-}\% P (1,2,3) * 0,06 \\
 \text{mooli-}\% S(2) = \text{mooli-}\% S (1,2,3) * 0,06
 \end{array} \right\} (4)
 \end{array}$$

▼ **M13**

4.5.5.2 2-asemassa tyydyttymättömät rasvahapot [Po(2), O(2), L(2) ja Ln(2)]:

$$\begin{aligned}
 \text{mooli - \% Po(2)} &= \frac{\text{mooli - \% Po(1,2,3)}}{\text{mooli - \% UFA}} * [100 - \text{mooli - \% P(2)} - \text{mooli - \% S(2)}] \\
 \text{mooli - \% O(2)} &= \frac{\text{mooli - \% O(1,2,3)}}{\text{mooli - \% UFA}} * [100 - \text{mooli - \% P(2)} - \text{mooli - \% S(2)}] \\
 \text{mooli - \% L(2)} &= \frac{\text{mooli - \% L(1,2,3)}}{\text{mooli - \% UFA}} * [100 - \text{mooli - \% P(2)} - \text{mooli - \% S(2)}] \\
 \text{mooli - \% Ln(2)} &= \frac{\text{mooli - \% Ln(1,2,3)}}{\text{mooli - \% UFA}} * [100 - \text{mooli - \% P(2)} - \text{mooli - \% S(2)}]
 \end{aligned}
 \tag{5}$$

4.5.5.3 Rasvahapot 1,3-asemassa [P(1,3), S(1,3), Po(1,3) O(1,3), L(1,3) ja Ln(1,3)]:

$$\begin{aligned}
 \text{mooli - \% P(1,3)} &= \frac{\text{mooli - \% P(1,2,3)} - \text{mooli - \% P(2)}}{2} + \text{mooli - \% P(1,2,3)} \\
 \text{mooli - \% S(1,3)} &= \frac{\text{mooli - \% S(1,2,3)} - \text{mooli - \% S(2)}}{2} + \text{mooli - \% S(1,2,3)} \\
 \text{mooli - \% Po(1,3)} &= \frac{\text{mooli - \% Po(1,2,3)} - \text{mooli - \% Po(2)}}{2} + \text{mooli - \% Po(1,2,3)} \\
 \text{mooli - \% O(1,3)} &= \frac{\text{mooli - \% O(1,2,3)} - \text{mooli - \% O(2)}}{2} + \text{mooli - \% O(1,2,3)} \\
 \text{mooli - \% L(1,3)} &= \frac{\text{mooli - \% L(1,2,3)} - \text{mooli - \% L(2)}}{2} + \text{mooli - \% L(1,2,3)} \\
 \text{mooli - \% Ln(1,3)} &= \frac{\text{mooli - \% Ln(1,2,3)} - \text{mooli - \% Ln(2)}}{2} + \text{mooli - \% Ln(1,2,3)}
 \end{aligned}
 \tag{6}$$

4.5.6 Triglyseridien laskeminen

4.5.6.1 TAG:t, joissa on yksi rasvahappo (AAA, tässä LLL, PoPoPo)

$$\text{mooli - \% AAA} = \frac{\text{mooli - \% A(1,3)} * \text{mooli - \% A(2)} * \text{mooli - \% A(1,3)}}{10\,000}
 \tag{7}$$

4.5.6.2 TAG:t, joissa on kaksi rasvahappoa (AAB, tässä PoPoL, PoLL)

$$\begin{aligned}
 \text{mooli - \% AAB} &= \frac{\text{mooli - \% A(1,3)} * \text{mooli - \% A(2)} * \text{mooli - \% B(1,3)} * 2}{10\,000} \\
 \text{mooli - \% ABA} &= \frac{\text{mooli - \% A(1,3)} * \text{mooli - \% B(2)} * \text{mooli - \% A(1,3)}}{10\,000}
 \end{aligned}
 \tag{8}$$

▼ **M13**

4.5.6.3 TAG:t, joissa on kolme eri rasvahappoa (ABC, tässä OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln)

$$\left. \begin{aligned} \text{mooli - \% ABC} &= \frac{\text{mooli - \% A(1,3)} * \text{mooli - \% B(2)} * \text{mooli - \% C(1,3)} * 2}{10\,000} \\ \text{mooli - \% BCA} &= \frac{\text{mooli - \% B(1,3)} * \text{mooli - \% C(2)} * \text{mooli - \% A(1,3)} * 2}{10\,000} \\ \text{mooli - \% CAB} &= \frac{\text{mooli - \% C(1,3)} * \text{mooli - \% A(2)} * \text{mooli - \% B(1,3)} * 2}{10\,000} \end{aligned} \right\} (9)$$

4.5.6.4 Triasyyliglyseridit, joissa on C₄₂:ta

Seuraavat triglyseridit, joissa on C₄₂:ta, on laskettu yhtälöistä 7, 8 ja 9 HPLC:ssä odotetussa eluointijärjestyksessä (tavallisesti vain kolme piikkiä).

LLL

PoLL ja LPoL:n asemisomeeri

OLLn ja OLnL:n sekä LnOL:n asemisomeerit

PoPoL ja PoLPo:n asemisomeeri

PoOLn ja OPoLn:n sekä OLnPo:n asemisomeerit

PLLn ja LLnP:n sekä LnPL:n asemisomeerit

PoPoPo

SLnLn ja LnSLn:n asemisomeeri

PoLn ja PLnPo:n sekä PoPLn:n asemisomeerit

C₄₂:ta sisältävät triasyyliglyseridit saadaan näiden yhdeksän triasyyliglyserolin ja niiden asemisomeerien summana. Tulokset on ilmoitettava vähintään kahden desimaalin tarkkuudella.

5. Tulosten arviointi

Laskemalla saatua teoreettista koostumusta ja HPLC:llä määritettyä koostumusta verrataan. Jos HPLC-tulosten ja teoreettisten tulosten välinen erotus on suurempi kuin asetuksessa kyseiselle öljyluokalle ilmoitetut arvot, näyte sisältää siemenöljyä.

Huom. Tulokset annetaan yhdellä desimaalilla.

6. Esimerkki (numerot viittaavat menetelmää selostavan tekstin osiin)

4.5.1 Rasvahappojen mooliprosenttien laskeminen GLC-tuloksista (pinta-ala-%)

GLC:llä saadaan seuraavat tulokset rasvahappokoostumukselle:

FA MW	P 256,4	S 284,5	Po 254,4	O 282,5	L 280,4	Ln 278,4
pinta-ala-%	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

4.5.3 Pinta-alaprocenttien muuntaminen mooleiksi kaikille rasvahapoille:

$$\text{moolia P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moolia P} \quad \text{Katso kaava (1)}$$

$$\text{moolia S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moolia S} \quad \text{Katso kaava (1)}$$

$$\text{moolia Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moolia Po} \quad \text{Katso kaava (1)}$$

▼ **M13**

$$\text{moolia O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moolia O} \quad \text{Katso kaava (1)}$$

$$\text{moolia L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moolia L} \quad \text{Katso kaava (1)}$$

$$\text{moolia Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,003594 \text{ moolia Ln} \quad \text{Katso kaava (1)}$$

$$\text{Summa} = 0,35822 \text{ moolia TAG:tä}$$

4.5.4 Rasvahappojen muuntaminen prosenteiksi

$$\text{mooli - \% P(1, 2, 3)} = \frac{0,03900 \text{ moolia P} * 100}{0,35822 \text{ moolia}} = 10,888 \% \quad \text{Katso kaava (2)}$$

$$\text{mooli - \% S(1, 2, 3)} = \frac{0,01054 \text{ moolia S} * 100}{0,35822 \text{ moolia}} = 2,944 \% \quad \text{Katso kaava (2)}$$

$$\text{mooli - \% Po(1, 2, 3)} = \frac{0,00393 \text{ moolia Po} * 100}{0,35822 \text{ moolia}} = 1,097 \% \quad \text{Katso kaava (2)}$$

$$\text{mooli - \% O(1, 2, 3)} = \frac{0,26549 \text{ moolia O} * 100}{0,35822 \text{ moolia}} = 74,113 \% \quad \text{Katso kaava (2)}$$

$$\text{mooli - \% L(1, 2, 3)} = \frac{0,03566 \text{ moolia L} * 100}{0,35822 \text{ moolia}} = 9,956 \% \quad \text{Katso kaava (2)}$$

$$\text{mooli - \% Ln(1, 2, 3)} = \frac{0,00359 \text{ moolia Ln} * 100}{0,35822 \text{ moolia}} = 1,003 \% \quad \text{Katso kaava (2)}$$

$$\text{Kokonaismooli-\%} = 100,0 \%$$

Tyydyttyneiden ja tyydyttymättömien rasvahappojen summa TAG:n 1,2,3-asemassa:

$$\text{mooli-\% SFA} = 10,888 \% + 2,944 \% = 13,831 \% \quad \text{Vgl. Formel (3)}$$

$$\text{mooli-\% UFA} = 100,000 \% - 13,831 \% = 86,169 \% \quad \text{Katso kaava (3)}$$

4.5.5 Rasvahappokoostumuksen laskeminen TAG:n 2- ja 1,3-asemassa

4.5.5.1 Tyydyttyneet rasvahapot 2-asemassa [P(2) ja S(2)]

$$\text{mooli-\% P(2)} = 10,888 \% * 0,06 = 0,653 \text{ mooli-\%} \quad \text{Katso kaava (4)}$$

$$\text{mooli-\% S(2)} = 2,944 \% * 0,06 = 0,177 \text{ mooli-\%} \quad \text{Katso kaava (4)}$$

4.5.5.2 Tyydyttymättömät rasvahapot 1,3-asemassa [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) ja Ln(1,3)]

$$\text{mooli - \% Po(2)} = \frac{1,097 \%}{86,169 \%} * (100 - -0,659 - 0,177) = 1,263 \text{ mooli - \%} \quad \text{Katso kaava (5)}$$

$$\text{mooli - \% O(2)} = \frac{74,113 \%}{86,169 \%} * (100 - -0,659 - 0,177) = 85,295 \text{ mooli - \%} \quad \text{Katso kaava (5)}$$

$$\text{mooli - \% L(2)} = \frac{9,956 \%}{86,169 \%} * (100 - -0,659 - 0,177) = 11,458 \text{ mooli - \%} \quad \text{Katso kaava (5)}$$

$$\text{mooli - \% Ln(2)} = \frac{1,003 \%}{86,169 \%} * (100 - -0,659 - 0,177) = 1,154 \text{ mooli - \%} \quad \text{Katso kaava (5)}$$

▼ M13

4.5.5.3 Rasvahapot 1,3-asemassa [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) ja Ln(1,3)]

$$\text{mooli - \% P(1,3)} = \frac{10,888 - 0,659}{2} \quad 10,888 = 16,005 \text{ mooli - \%} \quad \text{Katso kaava (6)}$$

$$\text{mooli - \% S(1,3)} = \frac{2,944 - 0,177}{2} \quad 2,944 = 4,327 \text{ mooli - \%} \quad \text{Katso kaava (6)}$$

$$\text{mooli - \% Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,263}{2} \quad 1,097 = 1,015 \text{ mooli - \%} \quad \text{Katso kaava (6)}$$

$$\text{mooli - \% O(1,3)} = \frac{74,113 - 85,295}{2} \quad 74,113 = 68,522 \text{ mooli - \%} \quad \text{Katso kaava (6)}$$

$$\text{mooli - \% L(1,3)} = \frac{9,956 - 11,458}{2} \quad 9,956 = 9,205 \text{ mooli - \%} \quad \text{Katso kaava (6)}$$

$$\text{mooli - \% Ln(1,3)} = \frac{1,003 - 1,154}{2} \quad 1,003 = 0,927 \text{ mooli - \%} \quad \text{Katso kaava (6)}$$

4.5.6 Triasyyliglyserolien laskeminen

Lasketusta rasvahappokoostumuksesta sn-2 ja sn-1,3-asemissa (katso edellä):

FA seuraavissa:	1,3-as.	2-as.
P	16,005 %	0,653 %
S	4,327 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,263 %
O	68,522 %	85,295 %
L	9,205 %	11,458 %
Ln	0,927 %	1,154 %
Summa	100,0 %	100,0 %

lasketaan seuraavat triasyyliglyserolit:

LLL

PoPoPo

PoLL ja 1 asemaisomeeri

SLnLn ja 1 asemaisomeeri

PoPoL ja 1 asemaisomeeri

PPoLn ja 2 asemaisomeeriä

OLLn ja 2 asemaisomeeriä

PLLn ja 2 asemaisomeeriä

PoOLn ja 2 asemaisomeeriä

4.5.6.1 TAG:t, joissa on yksi rasvahappo (LLL, PoPoPo) Katso kaava (7)

$$\text{mooli - \% LLL} = \frac{9,205 \% * 11,458 \% * 9,205 \%}{10\,000} = 0,09708 \text{ moolia LLL}$$

$$\% \text{ mooli - \% PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 1,015 \%}{10\,000} = 0,00013 \text{ moolia PoPoPo}$$

4.5.6.2 TAG:t, joissa on kaksi rasvahappoa (PoLL, SLnLn, PoPoL) Katso kaava (8)

$$\text{mooli - \% PoLL + LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} = 0,02141$$

▼ **M13**

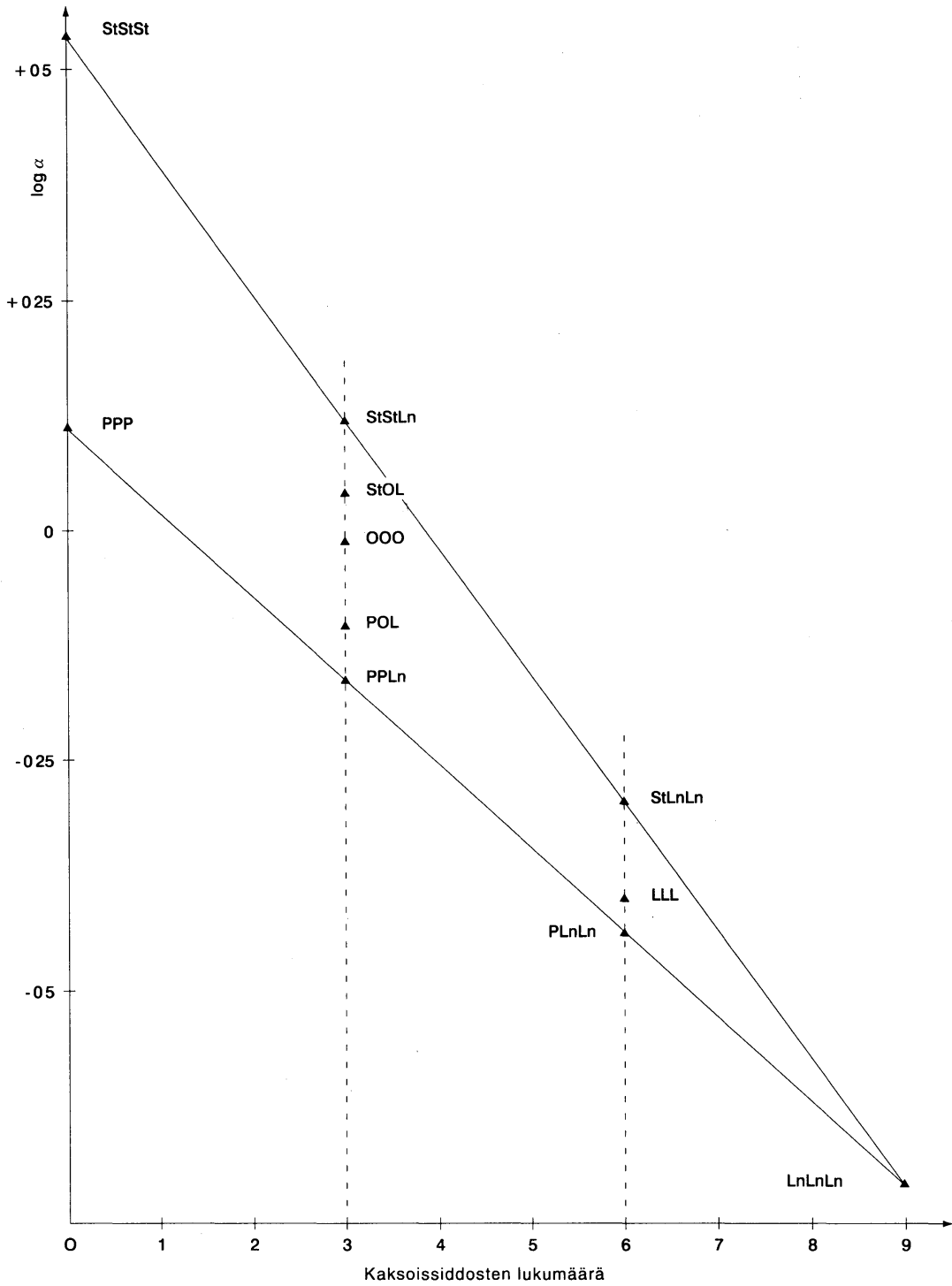
$$\begin{aligned} \text{mooli} - \% \text{LPoL} &= \frac{9,205 \% * 1,263 \% * 9,205 \%}{10\,000} = 0,01070 \\ &0,03211 \text{ moolia PoLL} \\ \text{mooli} - \% \text{SLnLn} + \text{LnLnS} &= \frac{4,327 \% * 1,154 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,00093 \\ \text{mooli} - \% \text{LnSLn} &= \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10\,000} = 0,00002 \\ &0,00095 \text{ moolia} \\ &\text{SLnLn} \\ \text{mooli} - \% \text{PoPoL} + \text{LPoPo} &= \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} = 0,00236 \\ \text{mooli} - \% \text{PoLPo} &= \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 1,015 \%}{10\,000} = 0,00118 \\ &0,00354 \text{ moolia} \\ &\text{PoPoL} \end{aligned}$$

4.5.6.3 TAG:t, joissa on kolme eri rasvahappoa (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn)
Katso kaava (9)

$$\begin{aligned} \text{mooli} - \% \text{PPoLn} &= \frac{16,005 \% * 1,263 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,00375 \\ \text{mooli} - \% \text{LnPPo} &= \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10\,000} = 0,00012 \\ \text{mooli} - \% \text{PoLnP} &= \frac{1,015 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10\,000} = 0,00375 \\ &0,00762 \text{ moolia PPOLn} \\ \text{mooli} - \% \text{OLLn} &= \frac{68,522 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,14577 \\ \text{mooli} - \% \text{LnOL} &= \frac{0,927 \% * 85,295 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} = 0,14577 \\ \text{mooli} - \% \text{LLnO} &= \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 68,522 \% * 2}{10\,000} = 0,14577 \\ &0,43671 \text{ moolia OLLn} \\ \text{mooli} - \% \text{PLLn} &= \frac{16,005 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,03400 \\ \text{mooli} - \% \text{LnPL} &= \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} = 0,00111 \\ \text{mooli} - \% \text{LLnP} &= \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10\,000} = 0,03400 \\ &0,06911 \text{ moolia PLLn} \\ \text{mooli} - \% \text{PoOLn} &= \frac{1,015 \% * 85,295 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,01605 \\ \text{mooli} - \% \text{LnPoO} &= \frac{0,927 \% * 1,263 \% * 68,522 \% * 2}{10\,000} = 0,01605 \\ \text{mooli} - \% \text{OLnP} &= \frac{68,522 \% * 1,154 \% * 1,015 \% * 2}{10\,000} = 0,01605 \\ &0,04815 \text{ moolia PoOLn} \\ &\text{ECN42} = 0,69540 \text{ moolia TAG:a} \end{aligned}$$

▼ M14

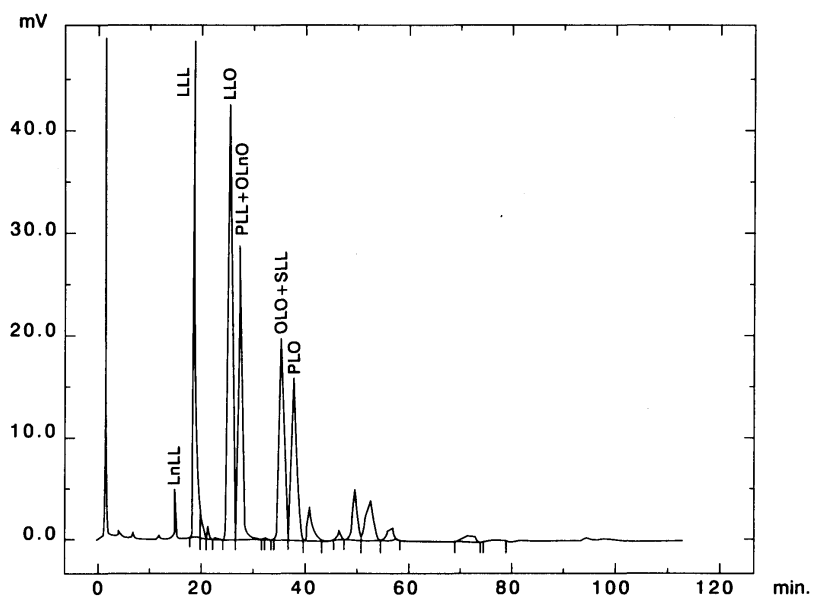
Kuva 1: $\log \alpha$:n muuttuminen f :n funktiona (f = kaksoissidosten lukumäärä)



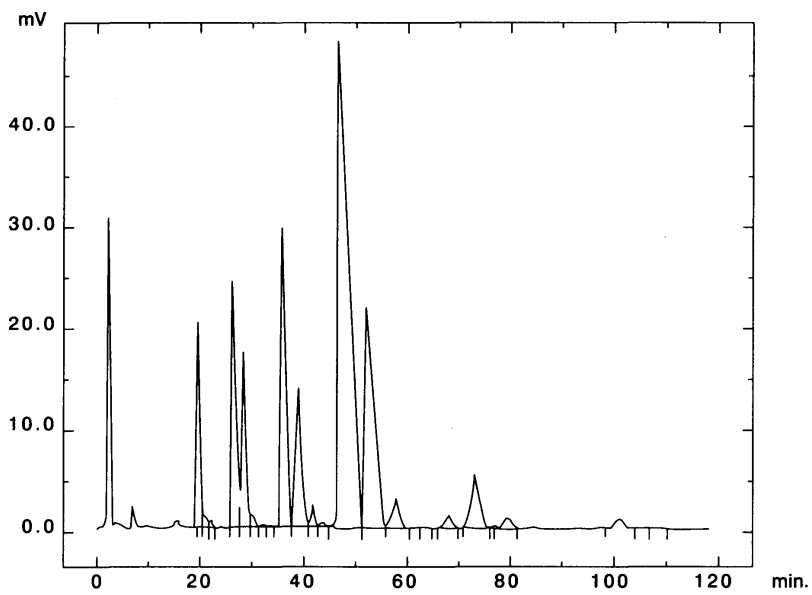
Huom: La = lauriinihappo My = myristiinihappo P = palmitiinihappo St = steariinihappo O = oleiinihappo L = linolihappo Ln = linoleehappo.

▼M14

Kuva 2: Soijaöljy



Kuva 3: Soijaöljy / oliiviöljy 30/70



▼ **M14****Kuva 4: Oliiviöljy**