

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 määrittämismenetelmistä
(EYVL L 248, 5.9.1991, s. 1)**

Muutettu:

		virallinen lehti		
		N:o	sivu	päivämäärä
► <u>M1</u>	Komission asetus (ETY) N:o 3682/91, annettu 17 päivänä joulukuuta 1991	L 349	36	18.12.1991
► <u>M2</u>	Komission asetus (ETY) N:o 1429/92, annettu 26 päivänä toukokuuta 1992	L 150	17	2.6.1992
► <u>M3</u>	Komission asetus (ETY) N:o 1683/92, annettu 29 päivänä kesäkuuta 1992	L 176	27	30.6.1992
► <u>M4</u>	Komission asetus (ETY) N:o 1996/92, annettu 15 päivänä heinäkuuta 1992	L 199	18	18.7.1992



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

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 määrittämisestä,

eri öljytyyppien erottamiseksi toisistaan kunkin tyyppin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ja neitsytöljyn aistinvaraiset ominaisuudet on syytä määritellä 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 määrittäystä ja aistinvaraista arviointia varten; siirtymäkauden aikana olisi kuitenkin sallittava jäsenvaltioissa sovellettavien muiden määrittämenetelmien käyttö ottaen kuitenkin huomioon, että jos tulokset ovat erilaisia, yhteisellä menetelmällä saadut tulokset ovat ratkaisevia,

oliiviöljyn fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien sekä määrittämenetelmien 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 moitteettoman 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 oliivilamppuöljyinä.

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 oliiviöljyinä.

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 oliiviöljyinä.

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 oliiviöljyinä.

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 oliiviöljyinä.

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 oliiviöljyinä.

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,
- erytrodioolin ja uvaolin määrittäminen liitteen VI menetelmällä,
- triglyseridin 2-asemassa olevien tyydyttyneiden rasvahappojen määrittäminen liitteen VII menetelmällä,
- trilinoleiiniipitoisuuden 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.

2 Aistinvaraiset ominaisuudet arvioi ►**M3** maistaja, joka on aistinvaraisen määrittäksen 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.

▼B

3 artikla

Edellä 2 artiklassa säädettyjen määritysmenetelmien käyttöönotto ei estä jäsenvaltioita käyttämästä muita kokeiltuja ja tieteellisesti päteviä menetelmiä 31 päivään lokakuuta 1992, 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.

4 artikla

1 Jäsenvaltioiden on muodostettava valittujen ja koulutettujen maistajien raateja aistinvaraisten ominaisuuksien arvioimiseksi liitteessä XII esitetyn menettelyn sääntöjä noudattaen.

2 Jos jäsenvaltiolla on vaikeuksia maistajien raadin muodostamisessa alueelleen, se voi käyttää toisessa jäsenvaltiossa toimivaa raatia.

5 artikla

Yhdistetyn nimikkeistön 15 ryhmän 2, 3 ja 4 lisähuomautus korvataan vastaavasti tämän asetuksen liitteessä XIV olevilla 2, 3 ja 4 lisähuomautuksella.

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 yhteenvedo edellisen vuosipuoliskon aikana tehtyjen määritysten 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.

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.

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	Alifaattisten alkoholien pitoisuuden määrittäminen kapillaarikaa- sukromatografisella menetelmällä ...
Liite V	Sterolien rakenteen ja pitoisuuden määrittäminen kapillaarikaasuk- romatografisella 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 metyyliesterien määrittäminen kaasukromatogra- fisella menetelmällä ...
Liite X B	Rasvahappojen metyyliesterien valmistaminen ...
Liite XI	Haihtuvien halogeeniliuottimien pitoisuuden määrittäminen olii- viöljystä ...
Liite XII	Neitsytoliiviöljyn aistinvarainen arviointi...
Liite XIII	Öljyn puhdistuksen toteaminen ...
Liite XIV	Yhdistetyn nimikkeistön 15 ryhmän lisähuomautukset 2, 3 ja 4...
Liite XV	Oliivijätteen öljypitoisuus ...
Liite XVI	Jodiluvun määrittäminen...

OLIIVIÖLJYN OMINAISUUDET

Luokka	Happamuus %	Peroksidiluku meq/O ₂ /kg	Halogeeni-luotinnat mg/kg (¹)	Alifaattiset alkoholit mg/kg	Triglyseridin 2-asemassa olevat tydyttyneet rasvat %	Erytrodioli + uvaoli %	Trilino-leiini %	Kolesteroli %	Brassikas-teroli %	Kampes-teroli %	Stigmas-teroli %	Beetasitos-teroli % (²)	Delta-7-stignas-teroli %	Kokonais-sterolit mg/kg
1 Ekstra-neitsytoliiviöljy	M 1,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
2 Neitsytoliiviöljy	M 2,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
3 Yleisen kauppalaadun neitsytoliiviöljy	M 3,3 > 3,3	M 20 > 20	M 0,20 > 0,20	M 300 M 400	M 1,3 M 1,3	M 4,5 M 4,5	M 0,5 M 0,5	M 0,5 M 0,5	M 0,2 M 0,2	M 4,0 M 4,0	< Kamp. —	m 93,0 m 93,0	M 0,5 M 0,5	m 1 000 m 1 000
4 Oliivilamppuöljy	M 0,5	M 10	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
5 Puhdistettu oliiviöljy	M 1,5	M 15	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
6 Oliiviöljy	m 2,0	—	—	—	M 1,8	m 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	—	m 93,0	M 0,5	m 2 500
7 Raaka utettu oliiviöljy	M 0,5	M 10	M 0,20	—	M 2,0	m 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1 800
8 Puhdistettu utettu oliiviöljy	M 1,5	M 15	M 0,20	—	M 2,0	> 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1 800
9 Utettu oliiviöljy														

M = suurin määrä, m = pienin määrä.

(¹) Elektronikaappausdetektorin havaitsemien yhdisteiden yleinen yläraja. Kunkin yksittäin havaitun yhdisteen yläraja on 0,10 mg/kg.

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

Huom.: Kun yksikin ominaisuus poikkeaa annetuista arvoista, öljyn luokitusta on muutettava tai öljy on todettava puhtaudeltaan vaatimusten vastaiseksi.

▼ M2

Luokka	Happopitoisuudet						Transoleiini-isomeerit yhteensä %	Translinoli-isomeerien + translinoleeni-isomeerit yhteensä %	K ₂₃₂	K ₂₇₀	K ₂₇₀ alumiinioksidikäsittelyn jälkeen	Delta K	Raadin arvostelu
	Myristiini %	Linoleeni %	Arakidoni %	Eikosaeeni %	Behen %	Lignoseriini %							
1 Ekstra-neitsytoliiviöljy	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,03	< 0,03	M 2,40	M 0,20	M 0,10	M 0,01	≥ 6,5
2 Neitsytoliiviöljy	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,03	< 0,03	M 2,50	M 0,25	M 0,10	M 0,01	≥ 5,5
3 Yleisen kauppalaadun neitsytoliiviöljy	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,03	< 0,03	M 2,50	M 0,25	M 0,10	M 0,01	≥ 3,5
4 Olivilamppuöljy	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,10	< 0,10	M 3,70	< 0,25	M 0,11	—	< 3,5
5 Puhdistettu oliiviöljy	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,20	< 0,30	M 3,40	M 1,20	—	M 0,16	—
6 Oliiviöljy	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,20	< 0,30	M 3,30	M 1,00	—	M 0,13	—
7 Raaka uutettu oliiviöljy	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,20	< 0,10	—	—	—	—	—
8 Puhdistettu uutettu oliiviöljy	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,40	< 0,35	M 5,50	M 2,50	—	M 0,25	—
9 Uutettu oliiviöljy	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	< 0,40	< 0,35	M 5,30	M 2,00	—	M 0,20	—



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 hyväksyttyä 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 kiehuvaaksi 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 määrittystä varten

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

1.4.2 Näytteenotto

Näyte otetaan oletetun happamuuden perusteella seuraavan taulukon mukaan:

▼B

Oletettu happoluku	Näytemäärä (g)	Näytteen punnitustark- kuus (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 dietyylieetteri/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 määrittämismenetelmän.

2 SOVELTAMISALA

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

3 MÄÄRITELMÄ

Peroksidiluku ilmaisee näytteessä olevien kaliumjodidia 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 (typellä 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

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

8 SUORITUS

Määrittäys tehdään hajapäivänvalossa tai keinovalossa. Näyte punnitaan 0,001 g:n tarkkuudella punnituslasissa (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 = määrittämiseen käytetyn normalisoidun natriumtiosulfaattiliuoksen (6.4) määrä millilitroina, korjattuna sokeakokeen tuloksilla;

T = määrittämiseen käytetyn natriumtiosulfaattiliuoksen (6.4) tarkka normalisuus;

m = näytteen massa grammoina.

Tulos on kahden määrittämisen tulosten aritmeettinen keskiarvo.



LIITE IV

ALIFAATTISTEN ALKOHOLIEN PITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN KAPILLAARIKAASUKROMATOGRAFISELLA MENETELMÄLLÄ

1 TARKOITUS

Tällä menetelmällä voidaan määrittää alifaattisten alkoholien määrä öljyissä ja rasvoissa.

2 PERIAATE

Rasva tai öljy, johon on lisätty 1-eikosanolia sisäiseksi standardiksi, saippuoidaan kaliumhydroksidin etanoliliuoksella ja saippuoitumaton osa uutetaan etyylietterillä. Alkoholifraktio erotetaan saippuoitumattomasta uutteesta kromatografian avulla emäksisellä silikageelilevyllä; silikageelistä saadut alkoholit muutetaan trimetyylisilyliettereiksi ja määritetään kapillaarikaasukromatografian avulla.

3 VÄLINEISTÖ

- 3.1 Pullo, 250 ml, jossa on hiotut lasiliitännät sekä palautusjäähdytin.
- 3.2 Erotussuppilo, 500 ml.
- 3.3 Pulloja, 250 ml.
- 3.4 Ohutkerroskromatografialaitteisto, jonka lasilevyjen koko on 20 × 20 cm.
- 3.5 UV-valo, 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 mm), halkaisija noin 2 cm ja korkeus noin 5 cm ja jossa on liitännät tyhjiöimusuodatusta varten sekä koirashios 12/21.
- 3.8 Tyhjiöimupullo, 50 ml, jossa on suodatinsuppiloon (3.7) sopiva naara-shios 12/21.
- 3.9 Koeputki, 10 ml, jossa on ilmatiivis tulppa ja kartiomainen pohja.
- 3.10 Kaasukromatografi, jota voi käyttää kapillaarikolonnin kanssa ja johon liittyy virtauksenjakojärjestelmä, jonka osat ovat:
 - 3.10.1 Termostaattisäätoinen kolonniuuni, joka säilyttää halutun lämpötilan noin ± 1 °C:n tarkkuudella;
 - 3.10.2 Höyrystämisyksikkö, jonka lämpötilaa voi säätää ja jonka höyrystämisosa on persilanoitua lasia;
 - 3.10.3 Liekki-ionisaatiodetektor ja muuntajavahvistin;
 - 3.10.4 Integraattori-piirturi, joka toimii muuntajavahvistimen kanssa ja jonka vasteaika on enintään 1 sekunti ja jonka paperin nopeutta voidaan säätää.
- 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 µm.
- 3.12 Mikroruisku, jossa on karkaistu neula kaasukromatografiaa varten, 10 µl.

4 REAGENSIT

- 4.1 Kaliumhydroksidi, noin 2 N etanoliliuos: 130 g kaliumhydroksidia (vähintään 85-prosenttista) liuotetaan samalla jäähdyttäen 200 ml:aan tislattua vettä ja lisätään etanolia niin, että liuosta on yksi litra. Liuos säilytetään tiiviisti suljetuissa tummissa lasipulloissa.
- 4.2 Etyylieetteri, analyysilaatua.
- 4.3 Vedetön natriumsulfaatti, analyysilaatua.
- 4.4 Silikageelillä päällystetyt lasilevyt, ilman fluoresenssi-indikaattoria, paksuudeltaan 0,25 mm (voidaan ostaa käyttövalmiina).
- 4.5 Kaliumhydroksidin 0,2 N etanoliliuos: 13 g kaliumhydroksidia liuotetaan 20 ml:aan tislattua vettä ja lisätään etanolia niin, että liuosta on 1 litra.

▼B

- 4.6 Bentseeni, kromatografiaa varten. (Ks. 5.2.2).
- 4.7 Asetoni, kromatografiaa varten. (Ks. 5.2.2).
- 4.8 Heksaani, kromatografiaa varten. (Ks. 5.2.2).
- 4.9 Etyylieetteri, kromatografiaa varten. (Ks. 5.2.2).
- 4.10 Puhdas kloroformi, analyysilaatua.
- 4.11 Vertailuliuos ohutkerroskromatografiaa varten: 5-prosenttinen C_{20} — C_{28} -alkoholien kloroformiliuos.
- 4.12 2,7-dikloorifluoreseiniin 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 Alifaattisten C_{20} — C_{28} -alkoholien trimetyylisilylieettereiden standardiliuokset. Ne valmistetaan puhtaiden alkoholien seoksista juuri ennen käyttöä.
- 4.17 0,1-prosenttinen (m/V) 1-eikosanolin kloroformiliuos (sisäinen standardi).
- 4.18 Kantajakaasut: vety tai helium, kaasukromatografista laatua.
- 4.19 Apukaasut: vety tai helium, kaasukromatografista laatua.

5 MENETTELY

- 5.1 Saippuoitumattoman osan esikäsittely
 - 5.1.1 250 ml:n pulloon lisätään 500 ml:n mikroruiskulla sellainen tilavuusmäärä 0,1-prosenttista 1-eikosanolin kloroformiliuosta (4.17), jonka sisältämä 1-eikosanolin määrä on suunnilleen 10 % määritystä varten otettavan näytteen alifaattisten alkoholien määrästä. Esimerkiksi, jos näytettä on 5 g ja se on oliiviöljyä tai siemenöljyä, lisätään 250 µl 0,1-prosenttista 1-eikosanoliliuosta, ja jos se on uutettua oliiviöljyä, lisätään 1 500 ml liuosta.

Haihdutetaan liuos kuiviin typpivirrassa ja punnitaan tarkalleen 5 g kuivaa, suodatettua näytettä samaan pulloon.
 - 5.1.2 Lisätään 50 ml kaliumhydroksidin 2 N etanoliliuosta, palautusjäähdytin käynnistetään ja liuosta kuumennetaan vesihauteessa hiljalleen kiehu-vaksi koko ajan voimakkaasti sekoittaen, kunnes saippuoituminen on tapahtunut (liuos kirkastuu). Kuumentamista jatketaan vielä 20 minuutin ajan ja lisätään sitten 50 ml tislattua vettä jäähdyttimen läpi. Sen jälkeen palautusjäähdytin irrotetaan ja pullo jäähdytetään noin 30 °C:n lämpötilaan.
 - 5.1.3. Pullon sisältö siirretään kvantitatiivisesti 500 ml:n erotussuppiloon käyttämällä huuhteena yhteensä noin 50 ml tislattua vettä. Lisätään noin 80 ml etyylieetteriä, ravistetaan voimakkaasti noin 30 sekuntia ja annetaan seistä niin että kerrokset erottuvat (Huom. 1).

Pohjalla oleva vesifaasi siirretään toiseen erotussuppiloon. Vesifaasi uutetaan vielä kaksi kertaa kuten edellä, käyttäen molemmilla kerroilla 60—70 ml etyylieetteriä.

Huom. 1 Mahdollinen emulsio voidaan hajottaa lisäämällä pieni määrä etanolia tai metanolia suihkeena.
 - 5.1.4 Eetteriuutteet yhdistetään yhteen erotussuppiloon ja pestään tislattulla vedellä (50 ml kerrallaan), kunnes pesuvesi on neutraalia.

Pesuvesi heitetään pois, eetteriuutteet kuivataan vedettömällä natrium-sulfaattilla ja suodatetaan etukäteen punnittuun 250 ml:n pulloon ja pestään suppilo ja suodatin pienillä määrillä etyylieetteriä.
 - 5.1.5 Eetteriä haihdutetaan, kunnes sitä on hyvin vähän jäljellä, ja kuivataan heikossa alipaineessa tai typpivirrassa; lopuksi kuivataan lämpökaapissa 100 °C:ssa noin 15 min, jäänös jäähdytetään eksikkaattorissa ja punni-taan.
- 5.2 Alkoholifraktioiden erottaminen
 - 5.2.1 Emäksisten levyjen valmistelu: silikageelilevyt (4.4) upotetaan kokonaan kaliumhydroksidin 0,2 N etanoliliuokseen (4.5) 10 sekunniksi, minkä

▼B

jälkeen niiden annetaan kuivua vetokaapissa kahden tunnin ajan ja lopuksi yhden tunnin ajan lämpökaapissa 100 °C:ssa.

Levyt otetaan lämpökaapista ja säilytetään kalsiumkloridia sisältävässä eksikkaattorissa käyttöhetkeen asti (näin käsitellyt levyt on käytettävä kahden viikon kuluessa).

Huom. 2 Kun käytetään emäksisiä silikageelilevyjä alkoholifraktion erottamiseen, saippuoitumattomia aineita ei tarvitse käsitellä alumiinilla. Täten kaikki happamat yhdisteet (rasvahapot ja muut hapot) jäävät lähtöviivalle. Tällöin saadaan sekä alifaattisten alkoholien vyöhyke että terpeenisten alkoholien vyöhyke, jotka molemmat erottuvat selvästi sterolivyöhykkeestä.

- 5.2.2 Bentseenin ja asetonin seos, 95:5 (V/V), kaadetaan kehitysastiaan niin että sitä on noin 1 cm. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää heksaanin ja etyylietterin seosta tilavuussuhteessa 65:35. Astia suljetaan sopivalla kannella ja annetaan olla vähintään puoli tuntia suljettuna, jotta neste ja höyry saavuttavat tasapainon. Suodatinpaperisuikaleita, jotka ulottuvat eluointiaineeseen, voidaan kiinnittää astian sisäseinään. Näin kehitys aika lyhenee noin kolmanneksella ja aineosat eluoituvat tasaisemmin.

Huom. 3 Seos on vaihdettava uuteen jokaista määritystä varten, jotta eluointiolosuhteet olisivat täysin toistettavissa.

- 5.2.3 Saippuoitumattomasta osasta (5.1.5) valmistetaan noin 5-prosenttinen kloroformiliuos ja 0,3 ml liuosta levitetään mahdollisimman ohuena ja tasaisena nauhana käyttäen 100 ml:n mikroruiskua, noin 2 cm:n päähän lasilevyn alareunasta. Asetetaan yhdelle levyn reunoista 2—3 ml alifaattisten alkoholien vertailuliuosta (4.11) lähtöviivan tasalle, jotta alifaattisten alkoholien vyöhyke olisi helppo tunnistaa kehittämisen jälkeen.

- 5.2.4 Levy asetetaan kehitysastiaan, joka on valmisteltu 5.2.2 kohdan mukaisesti. Ympäristön lämpötilan on oltava 15—20 °C. Astia suljetaan kannella välittömästi, minkä jälkeen näytteen annetaan eluotua, kunnes liuotinrintama on noussut 1 cm:n päähän levyn yläreunasta. Levy otetaan kehitysastiasta ja liuotin haihdutetaan kuumassa ilmavirrassa tai levy jätetään joskin aikaa vetokaappiin.

- 5.2.5 Levyille suihkutetaan ohuelti ja tasaisesti 2,7-dikloori-fluoreseiiniliuosta. Alifaattisten alkoholien vyöhyke erottuu ultraviolettivalossa tarkasteltuna vertailuliuostäplään verrattaessa; alifaattisten alkoholien vyöhykkeen ja välittömästi sen yläpuolella olevan, terpeenialkoholeja vastaavan vyöhykkeen muodostaman kokonaisuuden ympärille piirretään viiva mustalla kynällä.

Huom. 4 Koska terpeenialkoholien vyöhyke sisältää näissä koeolosuhteissa huomattavan määrän alifaattisia alkoholeja, molemmat vyöhykkeet on kerättävä talteen yhdessä.

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

Suppiloon jäänyt aines pestään kolme kertaa noin 10 ml:lla etyylietteriä, 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, jäädytetään eksikkaattorissa ja punnitaan.

Koeputkessa oleva jäännös sisältää alkoholifraktion.

- 5.3 Trimetyylisilylietterien valmistelu

- 5.3.1 Koeputkessa olevaan alkoholifraktioon lisätään silylointireagenssi niin, että kosteutta ei pääse mukaan (Huom. 6); mainittu reagenssi on seos, jossa on tilavuussuhteessa 9:3:1 pyridiiniä, heksametyylidisilatsaania ja trimetyylikloorisilaania (Huom. 5); seosta tarvitaan 50 ml jokaista alifaattisten alkoholien milligrammaa kohti.

Huom. 5 Käyttövalmiita liuoksia on kaupallisesti saatavana; lisäksi muita silylointireagensseja, kuten esim. bis-trimetyylisilylitri-fluoriasetamidi + 1 % trimetyylikloorisilaania; reagenssi laimennetaan samalla määrällä vedetöntä pyridiiniä.

▼B

- 5.3.2 Koeputki suljetaan tulpalla ja sitä ravistetaan varovasti (ei ylösalaisin), kunnes alifaattiset alkoholit ovat täysin liuenneet. Putken annetaan seistä vähintään 15 minuuttia huoneenlämmössä ja sen jälkeen sitä sentrifugoidaan muutaman minuutin ajan; kirkas liuos on nyt valmis kaasukromatografista määrittystä varten.

Huom. 6 Lievä sameus on tavallista eikä ole haitaksi. Valkoiset hiutalet tai vaaleanpunaiseksi värjäytyminen ovat merkkejä kosteudesta tai reagenssien muuttumisesta. Jos näitä ilmenee, koe on uusittava.

- 5.4 Kaasukromatografinen määrittäminen

- 5.4.1 Esivalmistelut 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 (kaasuliitäntänsä tiiviys, detektorin, virtauksenjakojärjestelmän ja piirturin toimivuus, jne.)

- 5.4.1.2 Jos kapillaarikolonnissa 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. 7*). 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. 7 Esivalmistelulämpötilan on aina oltava vähintään 20 °C alempi kuin käytetyn stationäärifaaasin korkein lämpötila.

- 5.4.2 Käyttöolosuhteiden valinta

- 5.4.2.1 Käyttöolosuhteiden ohjearvot ovat seuraavat:

- kolonnin lämpötila: alussa isoterminä säädetään 180 °C:seen kahdeksaksi minuutiksi ja ohjelmoidaan nousemaan sen jälkeen 5 °C minuutissa, kunnes saavutetaan 260 °C:n lämpötila, joka pidetään yllä seuraavat 15 minuuttia,
- höyrystimen lämpötila: 280 °C,
- detektorin lämpötila: 290 °C,
- kantajakaasun lineaarinopeus: heliumille 20–35 cm/s, vedylle 30–50 cm/s,
- jakosuhde: 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 µl trimetyylisilylietteriliuosta (TMSE).

Näitä olosuhteita voidaan muuttaa kolonnin ja kaasukromatografian ominaisuuksien mukaan niin, että saadaan aikaan kromatogrammeja, jotka täyttävät seuraavat vaatimukset:

- C_{26} -alkoholin retentioaika on 18 ± 5 minuuttia,
- C_{22} -alkoholin piikki on 80 ± 20 % täydestä asteikosta oliiviöljylle ja 40 ± 20 % täydestä asteikosta siemenöljylle.

- 5.4.2.2 Näiden ehtojen täyttymisen tarkistamiseksi injektoidaan useaan kertaan standardi TMSE-alkoholiseosta, ja käyttöolosuhteita säädetään niin, että saadaan parhaat mahdolliset tulokset.

- 5.4.2.3 Piikkien integrointiparametrit asetetaan niin, että saadaan oikeat arvot huomioon otettaville piikeille.

- 5.4.3 Määrittäminen

- 5.4.3.1 Imetään 10 µl:n mikroruiskuun 1 µl heksaania, sitten 0,5 µl ilmaa ja tämän jälkeen 0,5 µl — 1 µl näyteliuosta; lopuksi männällä vedetään

▼B

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 Piirturi pidetään käynnissä, kunnes näytteessä olevien alifaattisten alkoholien TMSE on eluoinut täydellisesti. Perusviivan on koko ajan oltava 5.4.1.2 kohdan vaatimusten mukainen.

5.4.4 Piikkien tunnistaminen

Yksittäiset piikit tunnistetaan retentioaikojen perusteella ja vertaamalla alifaattisten alkoholien TMSE-seokseen, joka on määritetty samoissa olosuhteissa.

Kuva 1 esittää neitsytoliiviöljyn alkoholifraktion kromatogrammia.

5.4.5 Kvantitatiivinen arviointi

- 5.4.5.1 1-eikosanolin ja C_{22} — C_{28} alifaattisten alkoholien piikkien pinta-alat lasketaan integraattorilla.

- 5.4.5.2 Lasketaan kunkin alifaattisen alkoholin pitoisuus milligrammoina 100 g:ssa rasvaa tai öljyä seuraavasti:

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

jossa:

A_x = x-alkoholin piikin pinta-ala neliömillimetreinä;

A_s = 1-eikosanolin piikin pinta-ala neliömillimetreinä;

m_s = lisätyn 1-eikosanolin massa milligrammoina;

m = näytteen massa grammoina.

6 TULOSTEN ESITTÄMINEN

Ilmoitetaan yksittäisten alifaattisten alkoholien pitoisuudet milligrammoina 100 g:ssa öljyä tai rasvaa sekä pitoisuuksien summa alifaattisten alkoholien yhteenlaskettuna määränä.

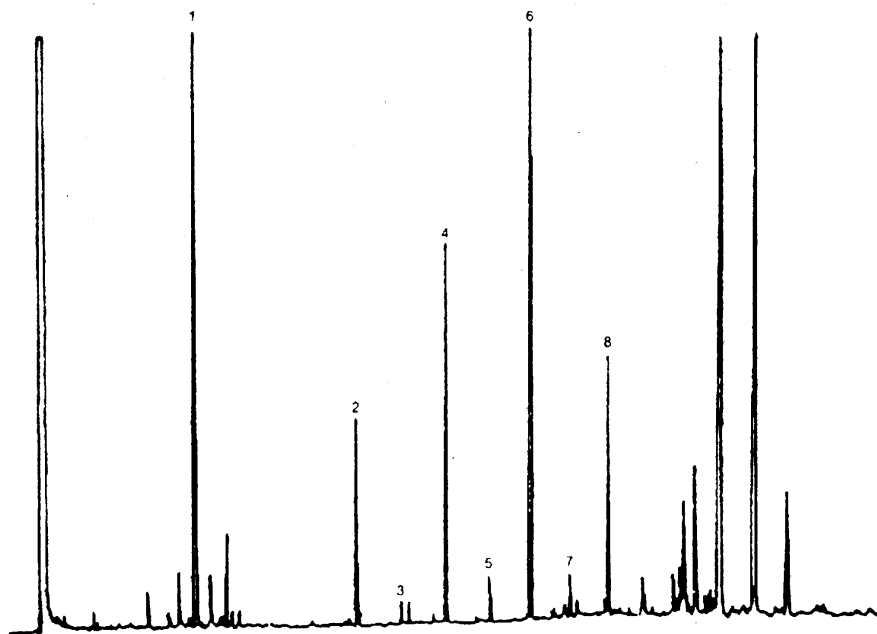
▼ B

LISÄYS

Kaasun lineaarinopeuden määrittäminen

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

Lineaarinopeus (cm/s) saadaan kaavasta L/t_M , missä L on kolonnin pituus senttimetreinä ja t_M on mitattu aika.



Kuva 1: Neitsytoliiviöljyn alkoholifraktion kromatogrammi

- 1 = eikosanoli
- 2 = dokosanoli
- 3 = trikosanoli
- 4 = tetrakosanoli
- 5 = pentakosanoli
- 6 = heksakosanoli
- 7 = heptakosanoli
- 8 = oktakosanoli



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 saippuositumaton aines uutetaan etyylietterillä. Sterolifraktio erotetaan saippuositumattomasta uutteesta ohutkerroskromatografialla käyttäen emäksistä silikageelilevyä. Silikageelistä saadut sterolit muutetaan trimetyylisilyylieettereiksi 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 Ultraviolettivalo, 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 Höyrystämisyksikkö, jonka lämpötilaa voi säätää ja jonka höyrystämisosa 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 fluoresenssi-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: 5-prosenttinen kolesterolin tai fytoosterolin 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 Heksametyyliidisilatsaani.
- 4.15 Trimetylikloorisilaani.
- 4.16 Sterolien trimetyylisilylieettereiden standardiliuokset. Ne valmistetaan vasta käyttöhetkellä steroleista, jotka saadaan niitä sisältävistä öljyistä.
- 4.17 α -kolestanoli 0,2-prosenttisena (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 % sterolien määrästä siinä osanäytteessä, joka on pullossa määritettävänä. Esimerkiksi 5 gramman oliiviöljynäytteen lisätään 500 μ l 0,2-prosenttista α -kolestanoliliuosta, ja jos näytteenä on siemenöljyä tai uutettua oliiviöljyä, lisätään 1 500 μ l α -kolestanolia.

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

Eläin- tai kasvirasvat ja -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.

- 5.1.2 Lisätään 50 ml kaliumhydroksidin 2 N etanoliliuosta, käynnistetään palautusjäähdytin ja kuumennetaan vesihauteessa hiljalleen kiehuvaan koko ajan voimakkaasti sekoittaen, kunnes saippuoituminen on tapahtunut (liuos kirkastuu). Kuumentamista jatketaan vielä 20 minuuttia, sitten lisätään 50 ml tislattua vettä jäähdyttimen yläpäästä, irrotetaan jäähdytin 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 lämpökaapist, 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 nestehöyrytasapaino. Astian sisäseinille voidaan kiinnittää suodatinpaperisuikeleita, 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 reunan 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 ilmvirrassa tai paneamalla 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 vertailuliuoksen vyöhyke. Vyöhykkeen ääriviivat merkitään mustalla kynällä fluoresenssin rajoja seuraten.

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

Suppilon jäänyt aines pestään kolme kertaa noin 10 ml:lla etyylietteriä, ja suodos kerätään suodatuspulloon 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, jäädytetään eksikkaattorissa ja punnitaan.

Koeputkessa oleva jäännös sisältää sterolifraktion.

5.3 Trimetyylisilyliettereiden valmistus

- 5.3.1 Koeputkessa olevaan sterolifraktoon 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. bistrimetyylisilyylitrifluoriasetamidi + 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 määrittystä varten.

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

▼B

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

5.4 Kaasukromatografinen määrittäminen

5.4.1 Esivalmistelut 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 ohjearvot ovat seuraavat:

- kolonnin lämpötila: 260 ± 5 °C,
- höyrystimen lämpötila: 280 °C,
- detektorin lämpötila: 290 °C,
- kantajakaasun lineaarinen nopeus: heliumille 20–35 cm/s ja vedylle 30–50 cm/s,
- jakosuhde: 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 eluokituvat seuraavassa järjestyksessä: kolesteroli, brassikasteroli, 24-metyleenikolesteroli, kampestroli, kampestanoli, stigmasteroli, Δ^7 -kampesteroli, $\Delta^{5,23}$ -stigmastadienoli, klerosteroli, β -sitosteroli, sitostanoli, Δ^5 -avenasteroli, $\Delta^{5,24}$ -stigmastadienoli, Δ^7 -sigmastenoli, Δ^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 neliömillimetreinä;

A_s = α -kolestanolin piikin pinta-ala neliömillimetreinä;

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

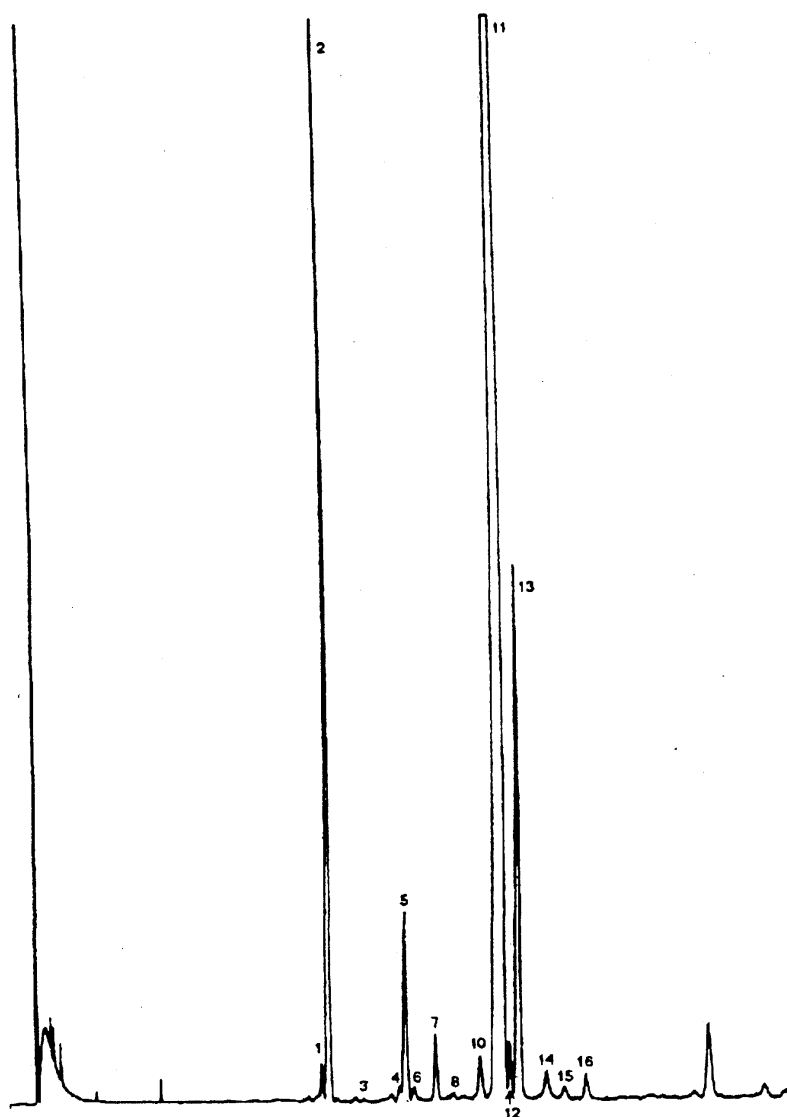
Kaasukromatografialaitteisto säädetään tavallisia käyttöolosuhteita vastaavaksi, injektoidaan 1—3 ml metaania (tai propaania) ja mitataan aika, jonka kuluessa kaasu kulkee kolonnin läpi, injektointihetkestä piikin muodostumiseen (t_M).

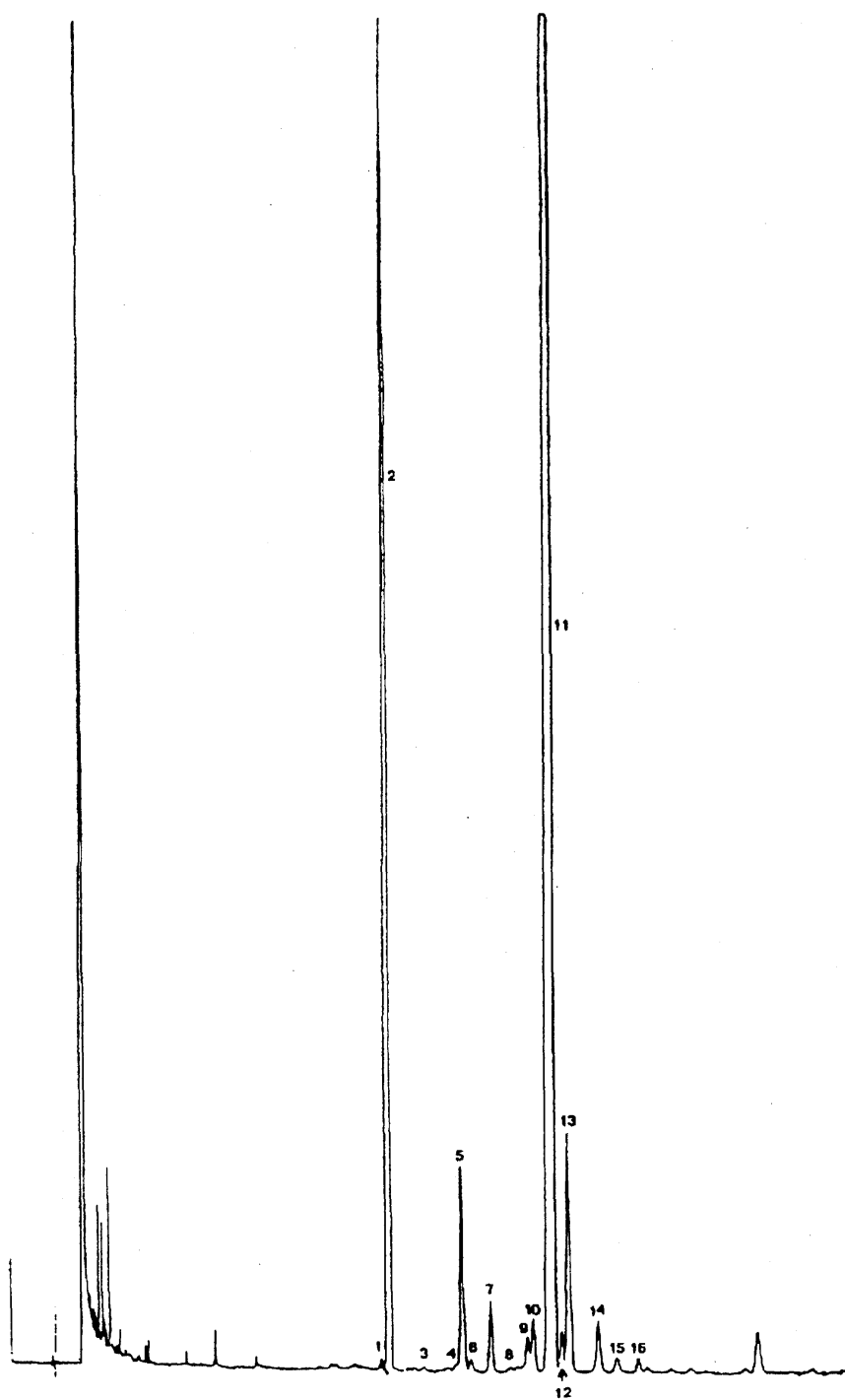
Lineaarinopeus cm/s saadaan kaavasta L/t_M , jossa L on kolonnin pituus senttimeleinä ja t_M on mitattu aika sekunteina.

Taulukko 1

Sterolien suhteelliset retentioajat

Piikki	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

ERYTRODIOLI- 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 rypälesiemenöljyssä 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 etanoliliuoksella. Saippuoitumaton osa uutetaan etyylietterillä ja puhdistetaan johtamalla se alumiinioksidikolonnin 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 prosenttiosuutena 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 Vertailuliuoksena 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 aineksesta 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-dikloorifluoreseiniiliuosta. Kun levyä tarkastellaan ultraviolettivalossa, sterolin ja erytrodiolin vyöhykkeet voidaan tunnistaa kohdistamalla ne vertailuliuoksen 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 määrittämyksen olosuhteiden on oltava sellaiset, että ne täyttävät sterolien määrittämysvaatimukset ja että lisäksi erytrodiolin ja uvaolin TMSE:t erottuvat.

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

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 neliömillimetreinä;

A_2 = uvaolin piikin pinta-ala neliömillimetreinä;

$\Sigma A_{\text{sterolit}}$ = sterolien piikkien yhteenlaskettu pinta-ala neliömillimetreinä;

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 alumiinioksidikolonnin läpi. Triglyseridit hydrolysoidaan osittain haimalipaasin avulla määrääjassa. Muodostuneet monoglyseridit erotetaan ohutkerroskromatografialla ja esteröidään metanolilla. 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 värisevä ravistin, joka pystyy sekoittamaan voimakkaasti sentrifugiputkea.
- 4.20 Ultraviolettilalo 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 (kiehumispiste 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 peroksiedeja.
- 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 Piidioksidi jauhe, 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 (entsymaattista 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 Fenoliftaleiiniiliuos (10 g/l) 95 % (V/V) etanolissa.
- 5.17 2,7-dikloorifluoreseiiniiliuos (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 (entsymaattista 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 neutra-loidaan 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 fenolifta-leiiniiliuosta (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 saippuoitunut kerros poistetaan. Myös välikerrokset (liimamaiset ja liukenemattomat aineet) poistetaan. Neutraloidun öljyn heksaaniliuos pestään useilla peräkkäisillä 2-propanolin liuoserillä (5.3) käyttäen 25—30 ml kerralla, kunnes fenolif-taleiinin vaaleanpunainen väri katoaa.

Poistetaan suurin osa heksaania höyryttämällä 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 yläpuo-lella. 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 levi-tetään 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 jäähdytetään 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). Ravis-tetaan hyvin, mutta varovaisesti, ja lisätään sitten 0,5 ml natriumkolaattiliuosta (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 ravisti-mella (4.19) tasan kaksi minuuttia. Jäähdytetään välittömästi juoksevalle vedellä; lisätään 1 ml suolahappoa (5.12) ja 1 ml dietyylieetteriä (5.4). Suljetaan tulpalla ja ravistetaan voimakkaasti sähkökäyttöisellä ravisti-mella. 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 mahdolli-simman ohuena ja tasaisena kerroksena noin 1,5 cm:n päähän levyn alareunasta, niin kapeana viivana kuin mahdollista. Levy asetetaan kehity-sastiaan (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 kehitysastian lämpötilassa ja sille suihkutetaan 2,7-dikloorifluoreseiiniliuosta (5.17). Monoglyseridivöhyke 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 metyyliesteriksi; 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 natriumkolaattiliuosta (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 tulkitsemalla.

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 piidioksidihiuksia, 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 soijäöljystä 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 sanoen 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_{in} ovat oleiinihapon, linolihapon ja linoleenihapon kaksoissidosten määrät, ekvivalenttinen hiililuku voidaan laskea kaavasta:

$$ECN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{in} n_{in},$$

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

$$ECN = CN - [2,60 n_o] - [2,35 n_l] - [2,17 n_{in}]$$

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.

▼M4

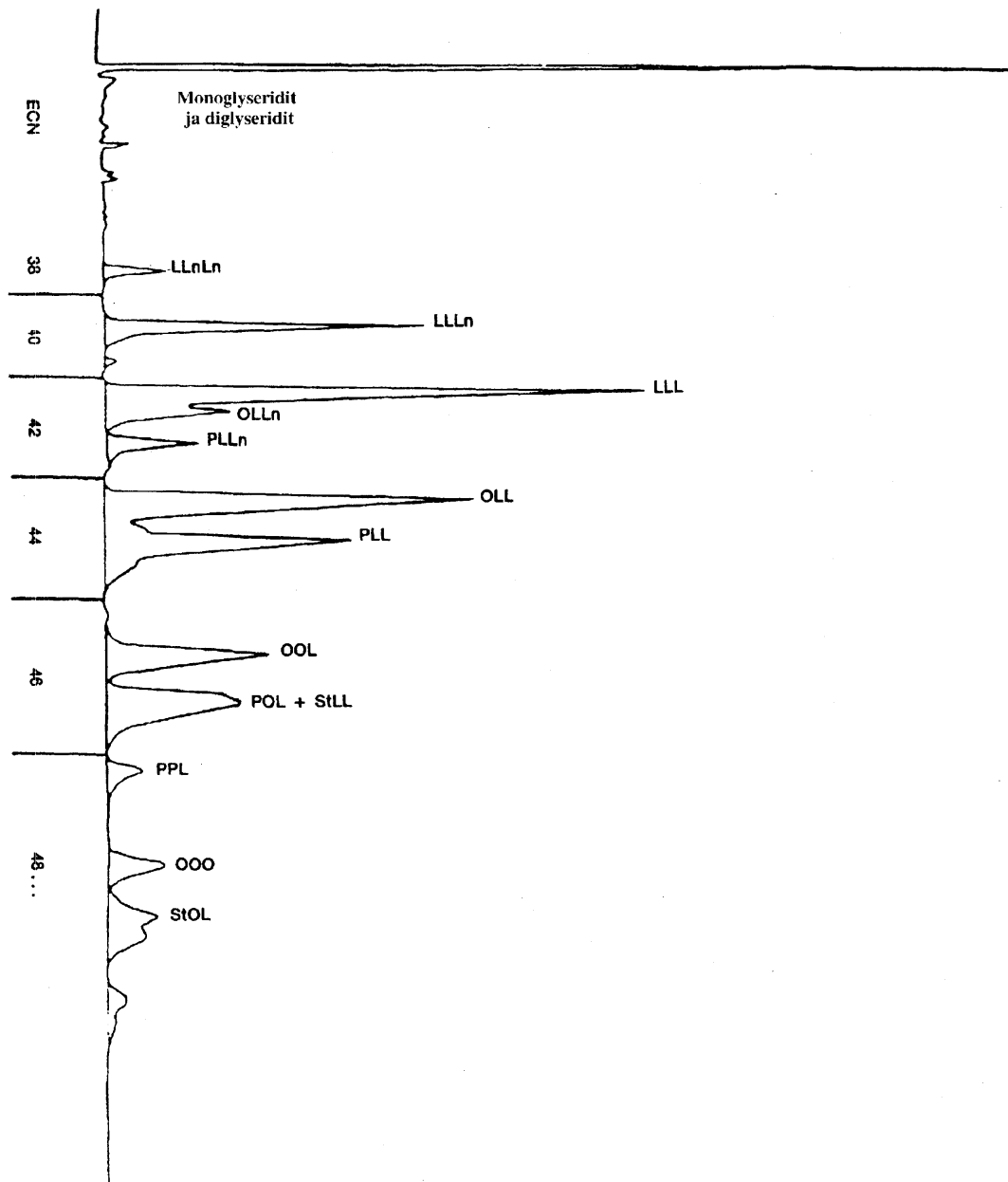
Huom. 5: Jotta trilinoleiini piikki erottuisi selvästi viereisistä piikeistä, puhdistamaton uutettu oliiviöljy on etukäteen puhdistettava liitteessä VII olevan 6.2 kohdan mukaisesti tai vaihtoehtoisesti 200 µl laimentamatonta öljyä absorboidaan silikakolonniin nesteen erottamiseksi kiintoaineesta (tyyppi SEP PAK silika cartridge-waters port. n:o 51900).

Triglyseridit eluoidaan 20 ml:lla vedetöntä heksaania nestekromatografiaa varten.

Eluoitu tuote kuivatetaan typpivirrassa ja pannaan isopropanoliin tai asetoniin (5 ml). 10–20 µl ruiskutetaan nestekromatografiailaitteistoon. Käytettäessä näitä kahta puhdistusmenetelmää on tarkistettava, että öljyn rasvahappokoostumus on sama ennen puhdistusta ja sen jälkeen. Jos koostumus ei ole sama, käytetyn absorboimisaineen laatua on asteittain vähennettävä.

▼B

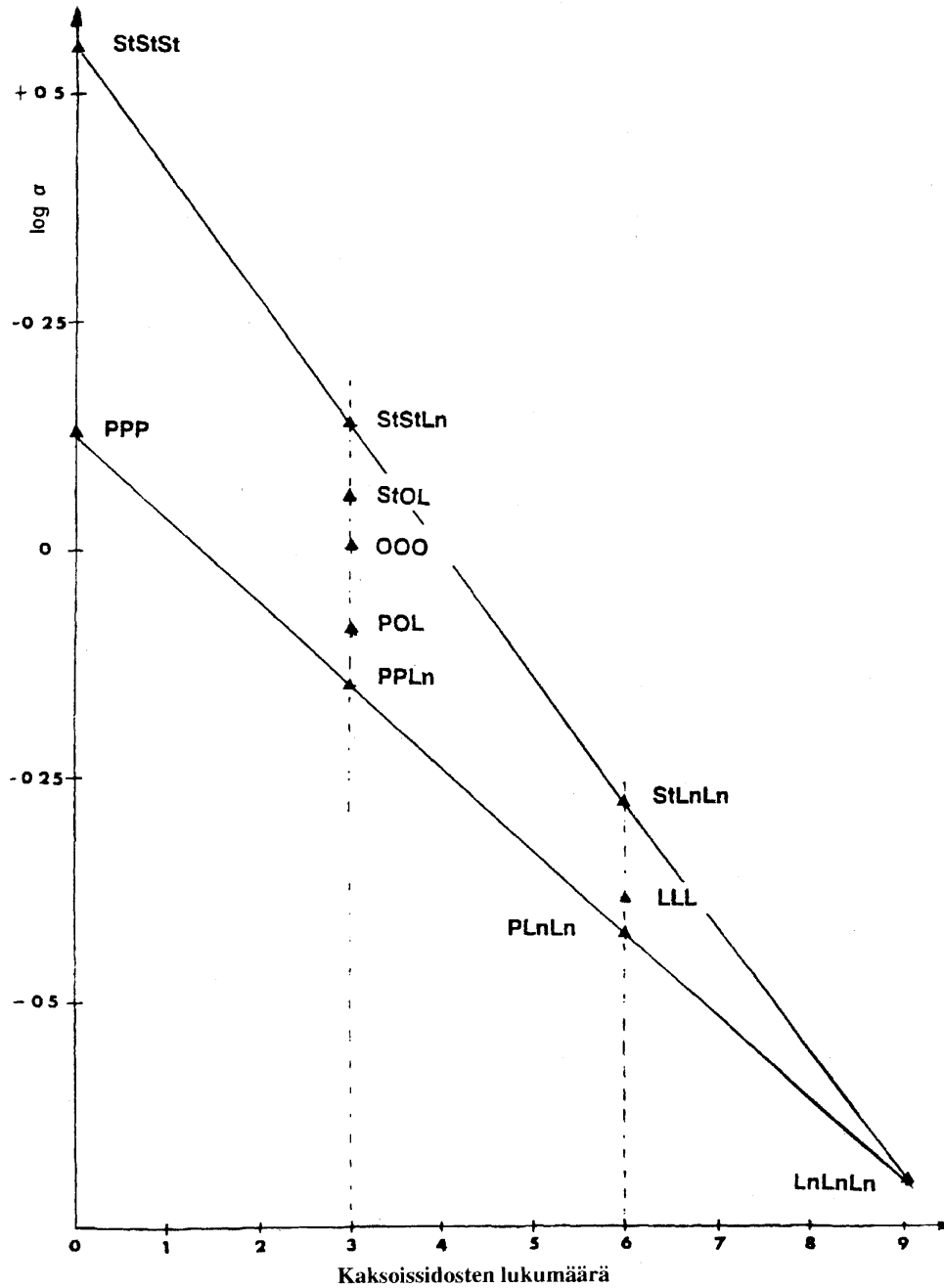
Kuva 1

Soijaöljynäytteen kromatogrammi

P = palmitiinihappo St = steariinihappo O = oleiinihappo (öljyhappo) L = linolihappo Ln = linoleenihappo

▼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 = linoleenihappo



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.
- 3.4 Kromatografiakolonni, joka on 450 mm pitkä ja jonka halkaisija on 35 mm ja jonka poistoputken halkaisija on noin 10 mm.

4 REAGENSIT

- 4.1 Iso-oktaani (2,2,4—trimetyylipentaani), spektrofotometristä laatua: verrattuna tislattuun veteen sen läpäisysuhteen on oltava vähintään 60 % aallonpituudella 220 nm ja vähintään 95 % aallonpituudella 250 nm, tai
 - sykloheksaani, spektrofotometristä laatua: tislattuun veteen verrattuna sen läpäisysuhteen on oltava vähintään 40 % 220 nm:ssä ja vähintään 95 % 250 nm:ssä, tai
 - jokin muu sopiva liuotin, johon rasva liukenee täydellisesti (esim. etanoli risiiniöljyä varten).
- 4.2 Emäksistä alumiinioksidia kromatografiakolonnia 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 Punnitaan 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 liuksella ja ekstinktiot mitataan sopivalla aallonpituudella 232—276 nm; käytetty liuotin toimii vertailuliuksena.

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: kromatografiakoloniin

▼B

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 kolonniin. 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 = liuoksen väkevyys g/100 ml;

s = kyvetin paksuus, cm

Tulokset ilmoitetaan kahden desimaalin tarkkuudella.

- 6.2 Oliiviöljyn spektrofotometrinen määrittäminen ETY:n 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 aallonpituuden ollessa noin 270 nm.



LISÄYS I

Alumiinioksidin esikäsitteleminen ja sen aktiivisuuden tarkistus

A.1.1 Alumiinioksidin esikäsitteleminen

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.



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-ionisaatiodektoria. 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:

- täytettyyn kolonniin, jonka kuollut tilavuus on mahdollisimman pieni (tässä tapauksessa injektiojärjestelmää tulee voida kuumentaa 20—50 °C kolonnin korkeampaan lämpötilaan); tai
- 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) stationäärifaasi: polyesterityyppinen polaarinen neste (esim. dietyleeniglykolipolysukkinaatti, butaanidiolipolysukkinaatti, etyleeniglykolipolyadipaatti jne.), syanosilikonit tai jokin muu neste, joka saa aikaan kromatografisen erottumisen (ks. kohta 4). Stationäärifaasin osuuden on oltava 5—20 % (m/m) täytteestä. Joissakin erotteluissa voidaan käyttää polaaritonta stationäärifaasia.

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 stationäärifaasikerroksella. Useimmissa tapauksissa riittävä pituus on 25 m.

3.1.4.2 Stationäärifaasi, pääasiassa polyglykolityyppejä [poly(etyleeniglykoli) 20 000], polyesterityyppejä (butaanidiolipolysukkinaatti) tai polaarista polysiloksaanityyppejä (syanosilikonit). Kytkeytyvät 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 (tiiviys), kolonnin päiden liittäminen 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 stationäärifaasin 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.

3.2 **Ruisku**

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

3.3 **Piirturi**

Kun piirturin käyrää käytetään määrittettävän seoksen koostumuksen laskemiseen, tarvitaan elektroninen, erittäin tarkka piirturi, joka sopii

▼B

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-ionisaatiodektrorin 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) määrittäksen kesto.

Taulukoissa 1 ja 2 annetut arvot johtavat yleensä haluttuihin tuloksiin, eli vähintään 2 000 teoreettista pohjaa yhtä kolonnimetriä kohti metyylisteraattilla, 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-ionisaatiodektroriin 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

Taulukko 2

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

▼B

4.1.1.2 Kapillaarikolonne

Kapillaarikolonien tehokkuus- ja permeabiliteettiominaisuuksien vuoksi aineosien erottuminen ja määrittelyn 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)

Määrittely tehdään metyylisteraatin 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 metyylisteraatin piikistä piirtyy noin 15 minuuttia liuottimen piikin jälkeen ja että metyylisteraatti piikki täyttää noin kolme neljänestä 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 metyylisteraatti piikkiin huippuun;

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

Δ metyylisteraatin ja metyylioleaatin piikkien huippujen väli millimetreinä;

▼M2

ja resoluutioluku I_r , kaavalla

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

jossa:

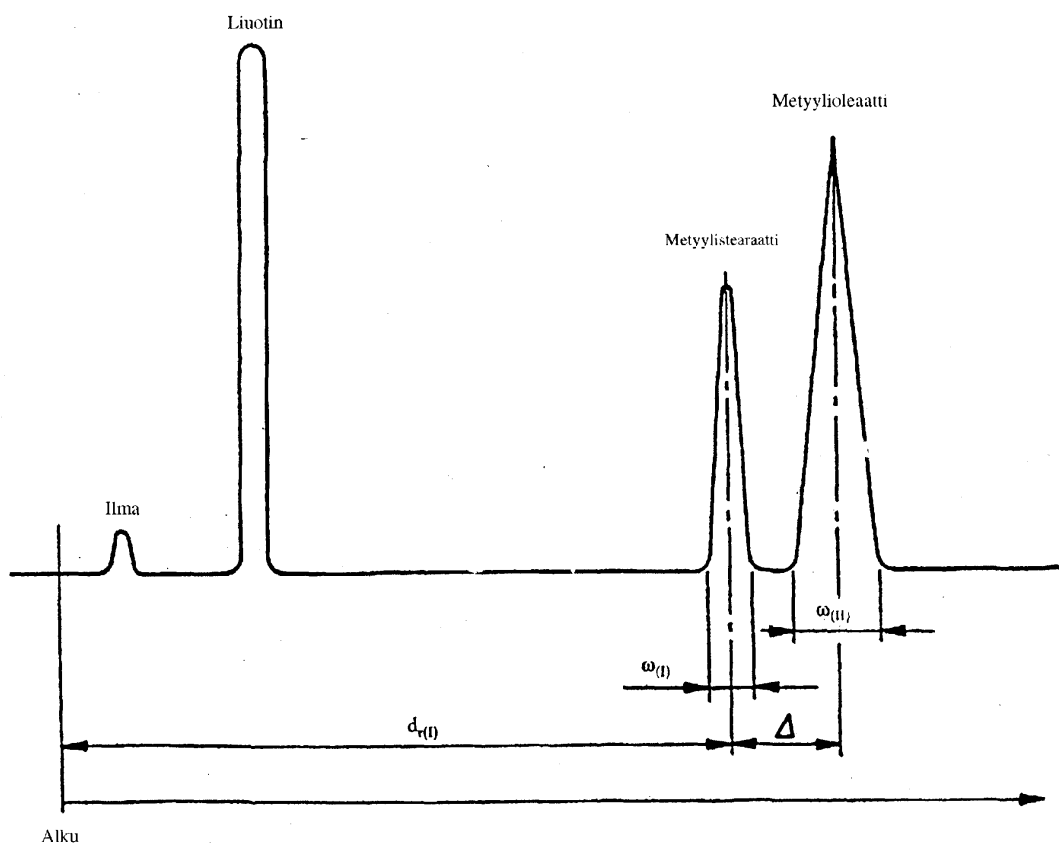
a = pienimmän piikin korkeus, mitattuna suhteessa perusviivaan,

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

▼ B

Kuva 1

Kromatogrammi teoreettisten pohjien lukumäärän (tehokkuuden) ja erotuskyvyn määrittämiseksi



Koeolosuhteet on valittava siten, että saadaan vähintään 2 000 teoreettista pohjaa kolonnimetriä kohti metyylistearaatile 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 heptaanisiin (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

Koeolosuhteiden 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 voihiappoa) 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 varmistutaan 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. Puolilogaritmipaperille 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 massapro-senteiksi.

Korjauskertoimet määritetään kromatogrammista, joka saadaan tarkoin tunnettujen metyyliesterien 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:

$$K_i = \frac{m_i \times SA}{A_i \times S_m}$$

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 prosenttiosuutena 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 määrittelyissä (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.

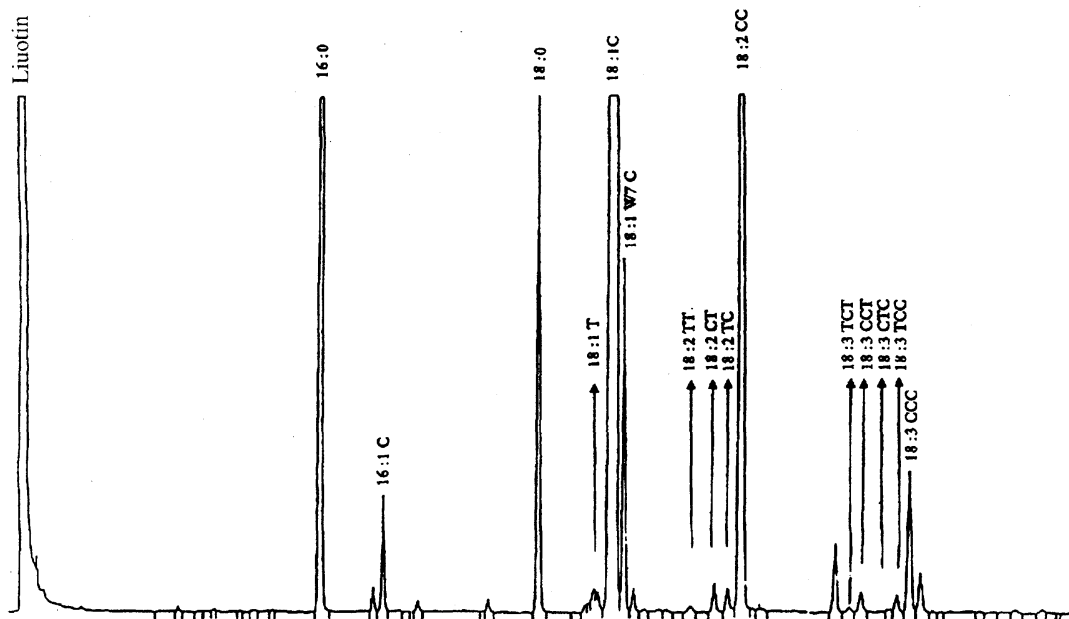
Ruiskutetun määrän on oltava sellainen, että käytetyissä herkkyysolosuhteissa arakidonihapon metyyliesteriä vastaavan piikin korkeus on vähintään 20 % asteikon alarajasta.

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 kapillaarikolonnin 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,
- oktadekadieniset ”cis-trans”- ja ”trans-cis” -hapot [(CT/TC) 18:2], jotka sisältyvät tämän asetuksen liitteessä I translinoli-isomeerien yhteismäärään.
- oktadekatrieniset ”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 ◀ ERIKOISTAPPAUS — KATAROMETRIDETEKTORIN KÄYTTÖ
(PERUSTUU LÄMMÖNJOHTOKYVYN MUUTOKSIIN)

Rasvahappojen metyyliestereiden seoksen kvantitatiiviseen ja kvalitatiiviseen määrittämiseen voidaan käyttää myös kaasukromatografia, jonka detektorin toiminta perustuu lämmönjohtokyvyn muutokseen (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
Kolonne	Pituus: 2—4 m Sisähalkaisija: 4 mm
Tukiaaine	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 ◀ KOESELÖSTE

Koeselösteessä 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.

Koeselösteessä 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 määrittämisestä.

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 määrittäksiin soveltuvat ainoastaan menetelmät, joissa käytetään natriummetylaattia tai dimetyylisulfaattia,
- kun valmistetaan metyyliesteriä pienistä määristä rasvoja tai öljyjä, jotka on eroteltu ohutkerroskromatografialla, on käytettävä metanoli-heksaani-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 Etyylietteri.
- 4.4 10-prosenttinen natriumkloridiliuos.
- 4.5 40—60 °C:n lämpöistä petrolietteriä.

▼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 petrolietteriä, 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 liuotamalla 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 tarkoitetulla 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 kvartsikiveä 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 dime-tyylisulfaattia. 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 petroleetterillä.

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 Petroleetteri, 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 petroleetteriä. 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 vesihauteen 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 elektronikaappausdetektori (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 Teflonpinnoitteisia lasipulloja, 10—15 ml, varustettu alumiinitulpalla, jossa on sovitus näytteenottoruiskua varten.

2.6 Ilmatiiviisti 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 ilmatiiviisti. 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, miedontuoksuihin 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 oliivikärpäsien (*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 sienirihmastoja ja homeita.

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 kasvisnesteiden kanssa.

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

Kurkku: maku, joka syntyy, kun öljyä säilytetään ilmatiiviissä 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.

Puristusmatto: 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 Koelosuhteet

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 normaali-lämpötilassa, 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 ateroiden jälkeen.

Tätä seikkaa ei saa kuitenkaan korostaa liikaa niin, että maistajat kärsivät nälän tunteesta, joka häiritsee heitä ja vaikuttaa erottelukykynsä 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 tärkeää, 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 on 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 haastatettava 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? | ☐ | ☐ |
| | Kyllä | Ei |
| 2 Voisiko maistajan työ mielestäsi vaikuttaa elintarvikkeiden laadun paranemiseen kotimaassa ja ulkomailla? | ☐ | ☐ |
| 3 Jos vastasit kyllä, kerro miksi ⁽¹⁾ | | |
| | | |
| | | |
| | Kyllä | Ei |
| 4 Maistajan tulee olla valmis maistamaan öljyä, kun raati kutsutaan kokoon. Oletko valmis tähän? | ☐ | ☐ |
| | Kyllä | Ei |
| 5 Oletko kiinnostunut vertailemaan haju- ja makuaistiesi tarkkuutta muiden maistajien kykyihin? | ☐ | ☐ |

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

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

Raadin vastuuhenkilö 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 lasella, 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-akselin (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

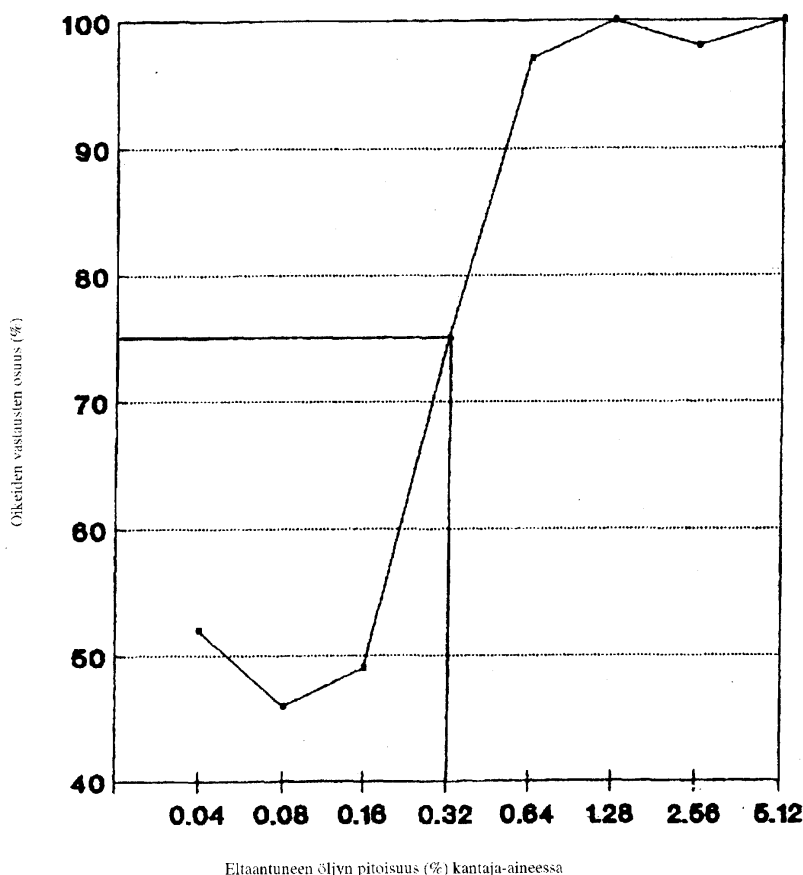
Kun sama menettely toistetaan muille kolmelle öljyn ominaisuudelle ja lähtökohdaksi otetaan niille saadut kynnyspitoisuudet, saadaan jokaiselle öljyn ominaisuudelle samanlainen asteikko, joka vastaa kaikissa laboratorioissa samaa ominaisuuden vahvuutta, vaikka lähtöaineena käytettyjen öljyjen makuvirheet 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 riippuvalla tekijällä: a) kustannukset, jotka riippuvat kokeiden määrästä; b) aiheuttomasti hylättyjen pätevien ehdokkaiden suhteellinen osuus; c) aiheuttomasti 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 haju- ja makuvivahteiden 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),
- öljyä: 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 lasista 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 lasia 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 siirtämisjärjestys 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 aistiherkkyytään, hajumuistiaan ja järjestelmällisyytään 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 suutuntu-maominaisuuksiin;
- 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 rutiiniko-keista, 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 tyypillisiä 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 öljyssä havaittujen hyvien ja huonojen ominaisuuksien kanssa, joiden arviot on merkitty vasempaan reunaan.

Ensimmäinen sarakke (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 profililomakkeessa 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 tarkistusmäärityksestä, 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.

Tulosten esittäminen: raadin vastuuhenkilö määrittää arvioiden keskiarvon perusteella, mihin luokkaan näyte luokitellaan liitteen I arvojen mukaisesti. ► **M3** Tätä varten raadin vastuuhenkilön on sovellettava 31 päivään lokakuuta 1993 asti + 0,5:n poikkeamaa, jos keskimääräinen luokittelu on vähintään 5 pistettä. Hänen on merkittävä määritysselosteen ainoastaan luokka, johon näyte on luokiteltu. Kun määritys tehdään tämän asetuksen 2 artiklan 2 kohdan ensimmäisen alakohdan mukaisesti, määrityksen tekijän on sovellettava luokan määrityksessä samaa menettelyä. ◀

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/-happoin ⁽²⁾						
Karkea						
Metallinen						
Homeinen						
Sakkainen						
Tunkkainen						
Eltaantunut						
Muu kielletty ominaisuus						
Mikä tai mitkä?						
.....						

⁽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

Arvostelutaulukko

Virhe	Ominaisuus	Yleisarvio: pisteet
Ei virheitä	Oliivihedelmäisyys, oliivihedelmäisyys ja muu tuore hedelmäisyys	9 8 7
Tuskin havaittava	Mikä tahansa hedelmäisyys	6
Heikosti havaittava	Melko epätäydellinen hedelmäisyys, poikkeava haju ja maku	5
Havaittava, voimakkuudeltaan keskinkertainen	Selvästi epätäydellinen, epämiellyttävä haju ja maku	4
Selvästi havaittava, äärimmäisen voimakas	Kulutukseen täysin soveltumaton haju ja maku	3 2 1

Huomautuksia:

.....

Maistajan nimi:

.....

Näytteen tunnus:

Päiväys:

▼ 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.

▼ **B**

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, määrittäminen ja arviointi.

Hyväksyminen (substantiivi):

Yksilön tai ryhmän myönteinen suhtautuminen tuotteeseen.

Sopuisuus (substantiivi):

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

Hyväksyttävyys (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.

Kompensatio (substantiivi):

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

Ulkonäkö (substantiivi):

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 vaikutus, joka saa aikaan tietyn reaktion sisäisissä tai ulkoisissa aistireseptoreissa.

Makuaisti (substantiivi):

▼B

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

Maku (substantiivi):

kuvaa tuotteen ominaisuutta, joka ärsyttää makuermoja 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 aistisoluissa tapahtuu, kun yksi tai useampi ärsyke vaikuttaa siihen.

Vartalo (substantiivi):

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

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.

Subjektiivinen (adjektiivi):

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

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.

▼B

Lopullinen kynnyks:

ärsykkeen voimakkuus, jonka yläpuolella ei enää havaita voimakkuuseroja.

Preferenssikynnyks:

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

Huom: Absoluuttinen preferenssikynnyks on eri asia kuin differentiaalinen preferenssikynnyks.

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):

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

Vastaava substantiivi on happoisuus.

Hapan (adjektiivi):

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

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

Karvas (adjektiivi):

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

Vastaava substantiivi on karvaus.

Suolainen (adjektiivi):

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

▼B

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.

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.

▼B

ÖLJYNMAISTAMISLASI

1 TARKOITUS

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

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

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.

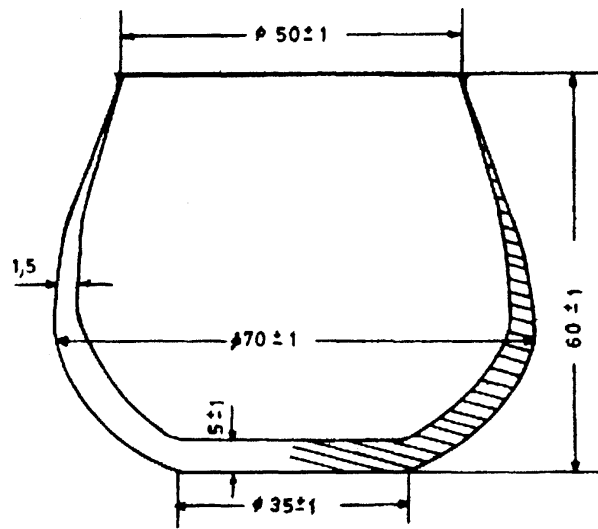
3 NÄYTTEIDEN LÄMMITYSLAITE

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 vesihautessa, jonka lämpötila pidetään termos- taatilla tasaisena. Levyssä on sarja syvennyksiä, joihin lasien pohjat

▼B

sopivat. Lämmityslaitteen ja eri levyjen syvennyksissä olevien lasien öljyn lämpötilaero ei saa olla yli $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

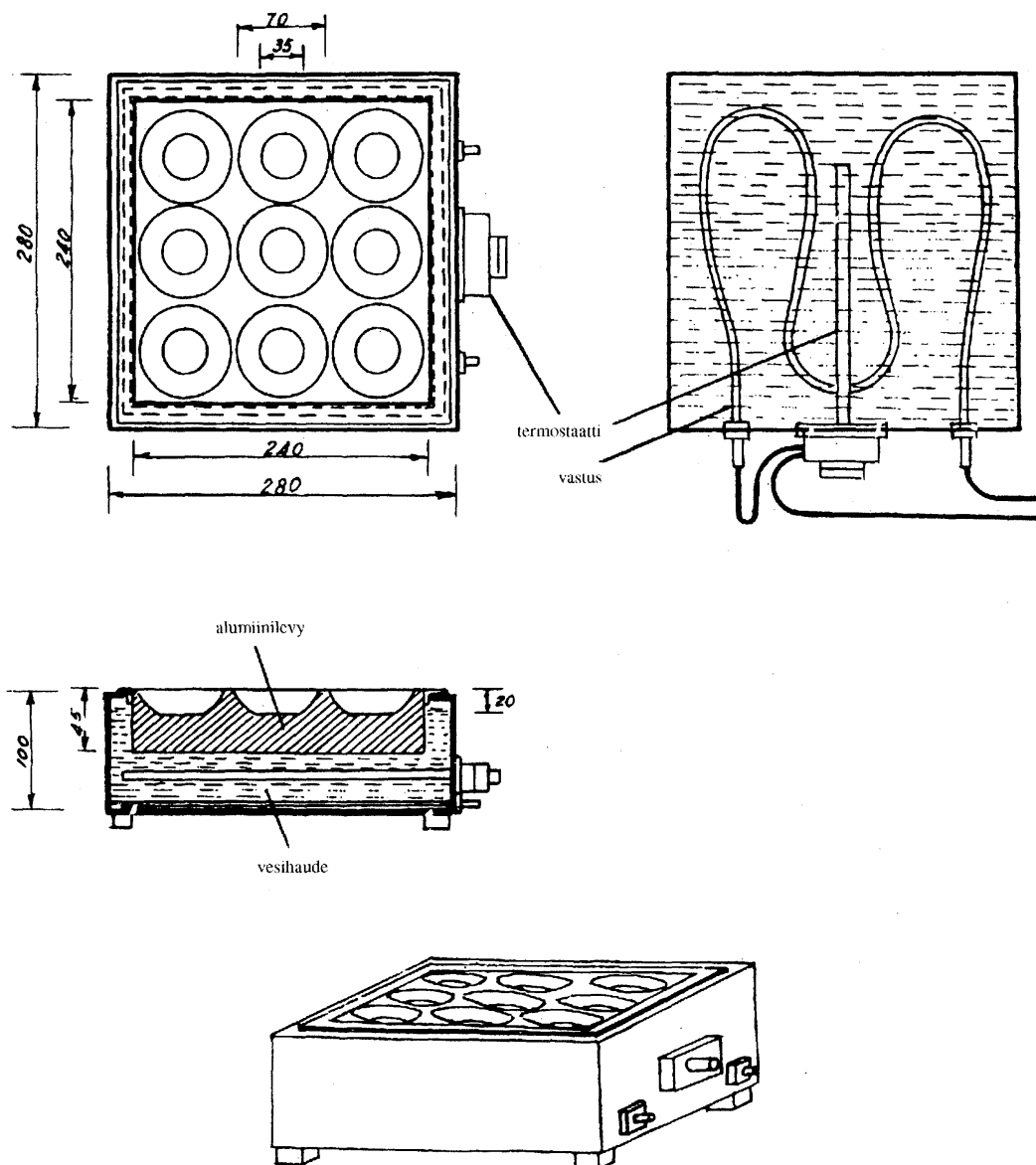
Kuva 1 - Maistamislasi



(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 uusien samantyyppisten olosuhteissa.

2 TARKOITUS

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

3 YLEISIÄ VAATIMUKSIA SUUNNITTELUA 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 näytelaseja, 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 valmistamiseksi 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.

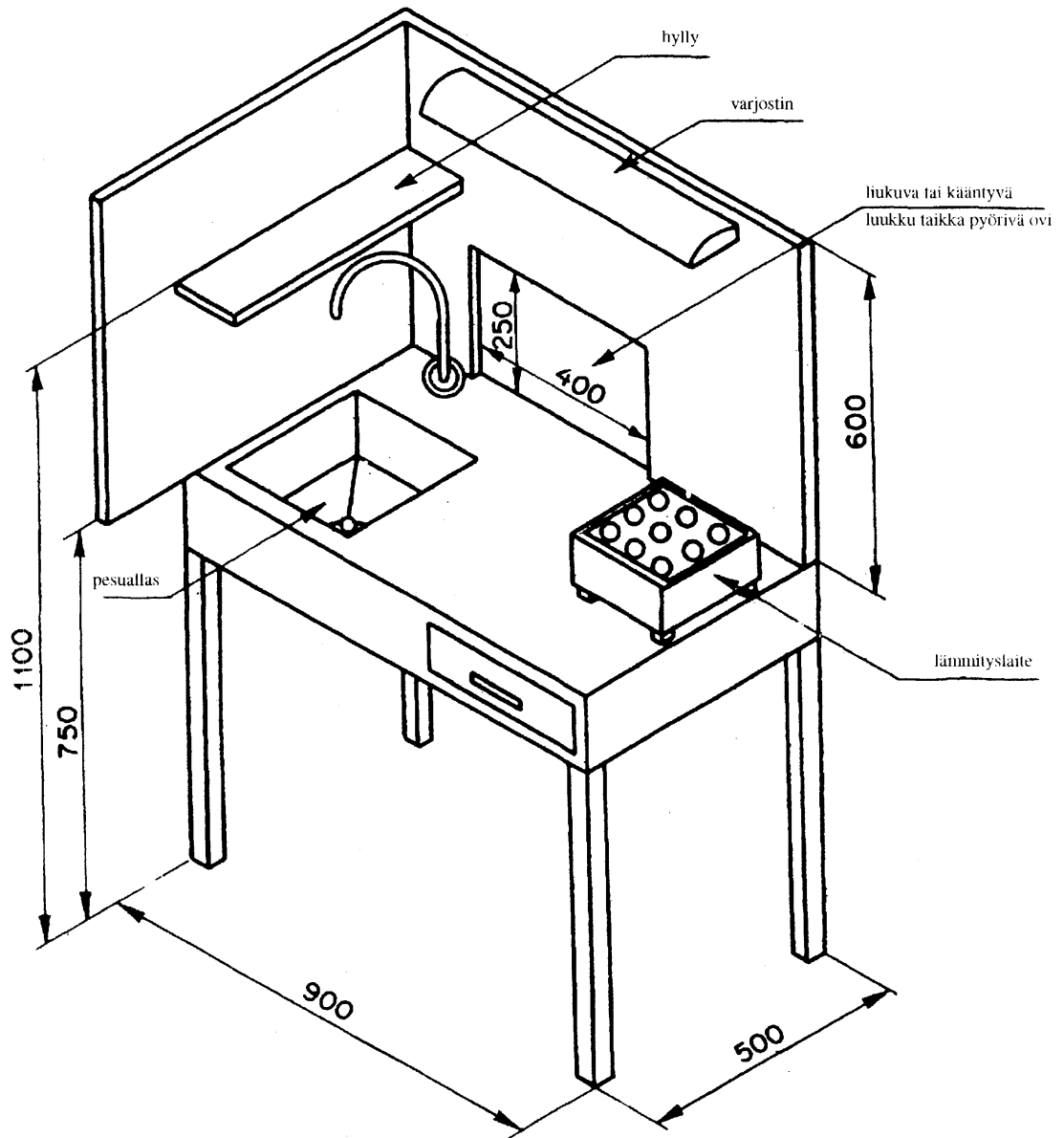
Kuvassa 4 on esimerkki maistamishuoneen järjestelystä ja muista tiloista.

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

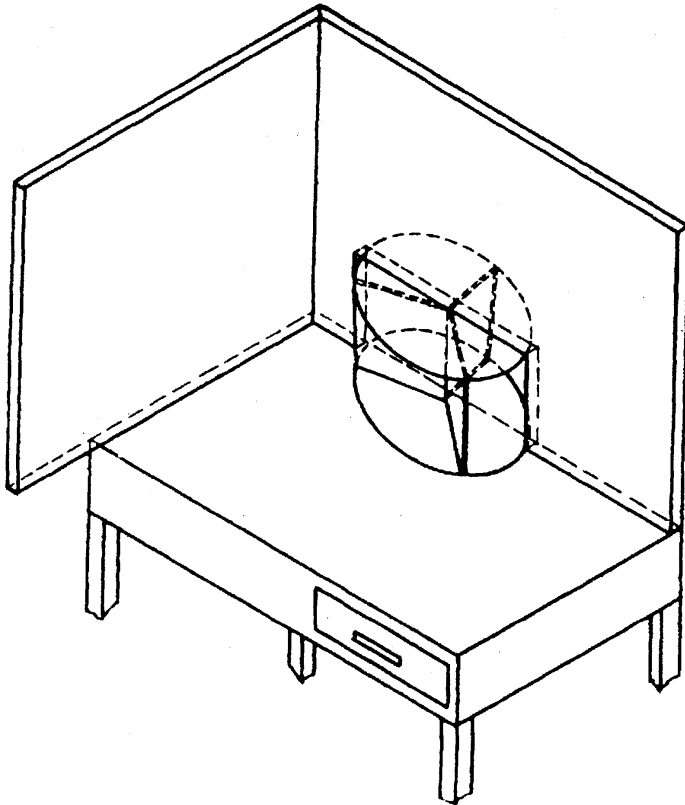
Kuva 1



▼B

PYÖRIVÄ OVI, JOSTA NÄYTTEET VOIDAAN ANTAA

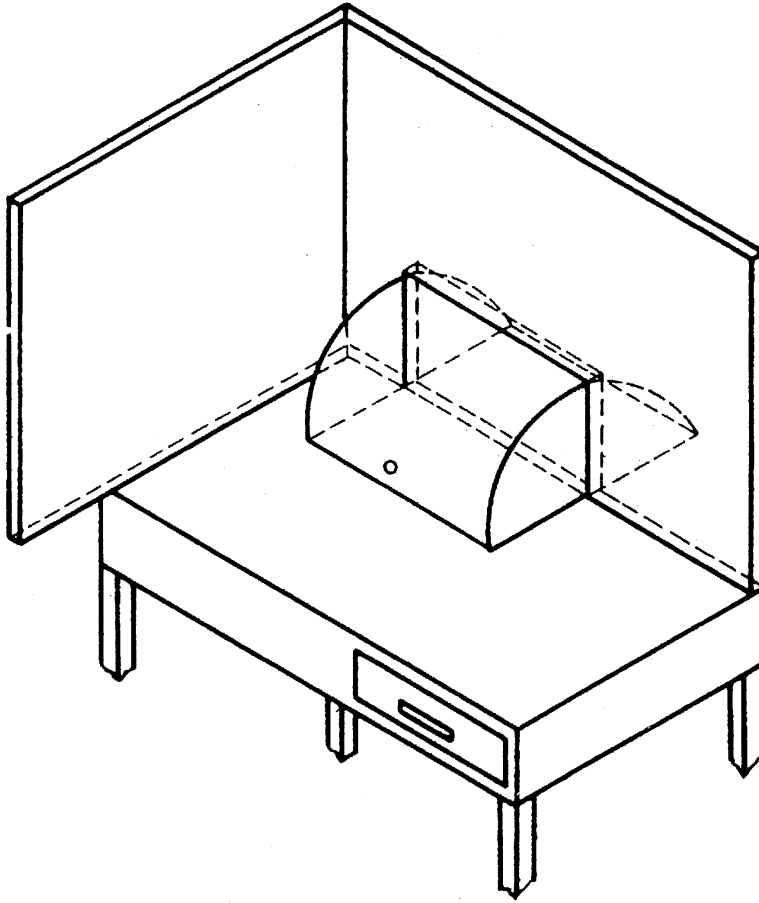
Kuva 2



▼B

VAAKATASOSSA SARANOITU LUUKKU, JOSTA NÄYTTEET VOIDAAN
ANTAA

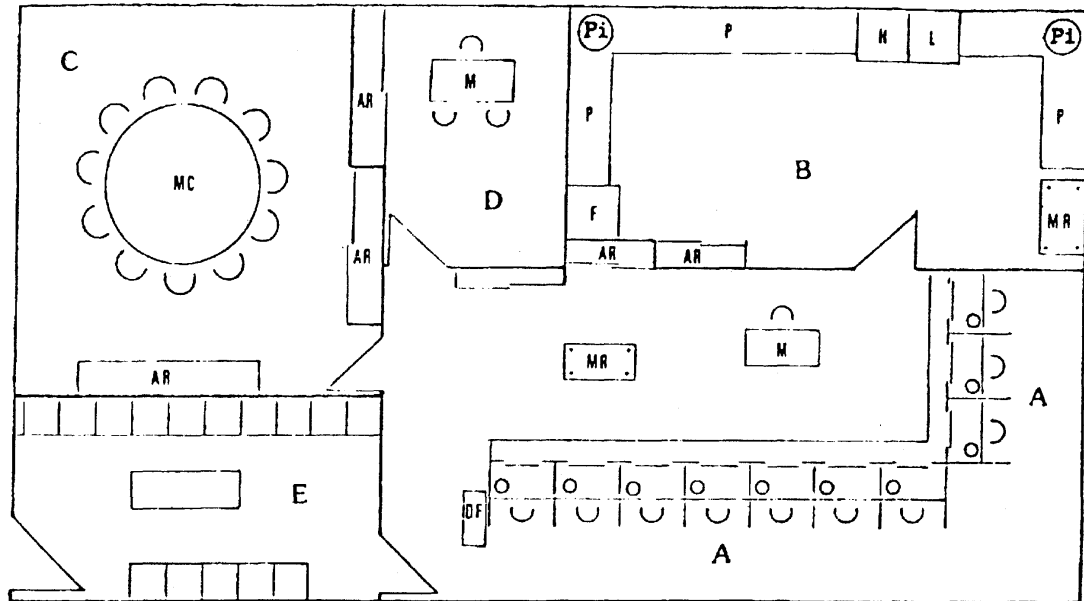
Kuva 3



▼B

AISTINVARAISEN ARVIOINNIN LABORATORIO

Kuva 4 — Esimerkki maistamishuoneesta



- A: maistamiskopit
 B: huone näytteiden valmistelua ja astioiden puhdistusta varten
 C: ryhmäkeskusteluhuone
 D: toimisto
 E: odotushuone
 F: jääkaappi
 H: uuni
 L: astianpesukone
 P1: allas
 AR: kaappi
 MR: pyörällä kulkeva apupöytä
 DF: lomakkeden jako
 MC: pyöreä pöytä
 M: pöytä
 P: työtaso



LIITE XIII

ÖLJYN PUHDISTUKSEN TOTEAMINEN

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 vesihauteessa 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 vesiliukoisien faasin päälle ja öljyfaasin alle; myös tämä välikerros on poistettava.

Seuraavaksi neutraalin öljyn heksaaniliuos pestään isopropanolin ja tislatus 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;
 - c) tyhjiöpumppuliitäntä,
- tyhjiöpumppu, jossa on manometri, joka kykenee mittaamaan 15—30 millibaarin jännöspaineen.

▼B

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-savia. 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.



LIITE XIV

YHDISTETYN NIMIKKEISTÖN 15 RYHMÄN LISÄHUOMAUTUKSET
2, 3 JA 4

1 Huom. 2A: Nimikkeissä 1509 ja 1510 termillä 'oliiviöljy' tarkoitetaan yksinomaan oliiveista valmistettua öljyä, ei kuitenkaan uudelleen esteröityä oliiviöljyä tai oliiviöljyn ja muiden öljyjen keskinäisiä seoksia.

Uudelleen esteröidyn oliiviöljyn tai muiden öljyjen mukanaolo todetaan käyttämällä liitteissä V, VII, IX, X ja XII määrättyjä menetelmiä. Kaikkien nimikkeisiin 1509 ja 1510 kuuluvien oliiviöljyjen steroli- ja rasvahappokoostumukset esitetään jäljempänä olevassa taulukossa.

Taulukko I — Happokoostumus prosentteina		Taulukko II — Sterolikoostumus prosentteina	
Myristiinihappo	M 0,1	Kolesteroli	M 0,5
Linoleenihappo	M 0,9	Brassikasteroli	M 0,2
Arakidonihappo	M 0,7	Kampestroli	M 4,0
Eikosaeenihappo	M 0,5	Stigmasteroli	≤ kampestroli
Bahenihappo	M 0,3	Beetasitosteroli ⁽¹⁾	m 93,0
Lignoseriinihappo	M 0,5	Δ7-stigmasteroli	M 0,5

M = suurin määrä

m = pienin määrä

⁽¹⁾ Delta-5-23 stigmasteroli + kolesteroli + beetasitosteroli + sitostanoli + delta-5-avenasteroli + delta-5-24-stigmastadienoli.

Huom. 2B: Termillä 'neitsytoliiviöljyt' tarkoitetaan öljyjä, jotka on valmistettu ainoastaan mekaanisia tai muita fysikaalisia valmistusmenetelmiä käyttäen sellaisissa olosuhteissa, varsinkin lämpöolosuhteissa, jotka eivät johda öljyalaadun heikkenemiseen, ja joita ei ole käsitelty muuten kuin pesty, dekantoitu, sentrifugoitu tai suodatettu, mutta ei kuitenkaan öljyjä, jotka on valmistettu liuottimien avulla uuttamalla (nimike 1510) ja jotka määritellään jäljempänä I ja II alakohdassa.

Alanimikkeessä 1509 10 10 'oliivilamppuöljyllä (virgin lampante olive oil)' tarkoitetaan sen happamuusasteesta riippumatta oliiviöljyä, jonka:

- a) alifaattisten alkoholien pitoisuus on enintään 400 mg/kg;
- b) erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on yhteensä enintään 4,5 prosenttia;
- c) tyydyttyneiden rasvahappojen pitoisuus triglyseridien 2-asemassa on enintään 1,3 prosenttia;
- d) ja/tai jolla on yksi seuraavista ominaisuuksista:
 - d1) peroksidiluku on suurempi kuin 20 meq O₂/kg;
 - d2) haihtuvien halogenoitujen liuottimien pitoisuus on suurempi kuin 0,2 mg/kg kaikkien osalta tai suurempi kuin 0,1 mg/kg yhden liuottimen osalta;
 - d3) K²⁷⁰-ekstinktiokerroin on suurempi kuin 0,25, mutta enintään 0,11, sen jälkeen kun öljy on käsitelty aktiivoidulla alumiinioksidilla. Enemmän kuin 3,3 g/100 g vapaita rasvahappoja (oleiinihappona ilmaistuna) sisältävien öljyjen K²⁷⁰-ekstinktiokerroin voi olla suurempi kuin 0,11, öljyn kuljettua aktivoidun alumiinioksidin yli liitteessä XV annetun menetelmän mukaisesti. Tällaisessa tapauksessa öljyillä

▼B

on oltava seuraavat ominaisuudet laboratoriossa tapahtuneen neutraloinnin ja värinpoiston jälkeen:

- K_{270} -ekstinktiokerroin on enintään 1,20;
- ekstinktiokertoimen poikkeama (ΔK)⁽¹⁾(²) on 270 nanometrialueella suurempi kuin 0,01, mutta enintään 0,16;

- d4) aistein todettavat ominaisuudet, jotka paljastavat havaittavissa olevat viat, joita ei voi hyväksyä, ja arviointitestin tulos on pienempi kuin 3,5.

II Alanimikkeessä 1509 10 90 termillä 'neitsytöljy' tarkoitetaan oliiviöljyä, jolla on seuraavat ominaisuudet:

- a) happopitoisuus oleiinihappona ilmaistuna on enintään 3,3 g/100 g;
- b) peroksidiluku on enintään 20 meq O₂/kg;
- c) alifaattisten alkoholien pitoisuus on enintään 300 mg/kg;
- d) haihtuvien halogeeniliuottimien pitoisuus on enintään 0,2 mg/kg kaikkien osalta ja enintään 0,1 mg/kg yhden liuottimen osalta;
- e) K_{270} -ekstinktiokerroin on enintään 0,250, mutta enintään 0,10 (²), sen jälkeen kun öljy on käsitelty aktivoidulla alumiinioksidilla;
- f) ekstinktiokertoimen poikkeama (DK) on 270 nanometrialueella enintään 0,010;
- g) aistein todettavat ominaisuudet, jotka myös paljastavat havaittavissa olevat viat, jotka voidaan hyväksyä, ja arviointitestin tulos on suurempi kuin 3,5;
- h) erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on yhteensä enintään 4,5 prosenttia;
- i) tyydyttyneiden rasvahappojen pitoisuus triglyseridien 2-asemassa on enintään 1,3 prosenttia;

Huom. 2C: Alanimikkeeseen 1509 90 00 kuuluu oliiviöljy, joka on valmistettu käsittelemällä alanimikkeisiin 1509 10 10 ja/tai 1509 10 90 kuuluvia oliiviöljyjä, myös jos siihen on sekoitettu neitsytoliiviöljyä, ja jolla on seuraavat ominaisuudet:

- a) happopitoisuus oleiinihappona ilmaistuna on enintään 3,3 g/100 g;
- b) alifaattisten alkoholien pitoisuus on enintään 350 mg/kg;
- c) K_{270} -ekstinktiokerroin on suurempi kuin 0,25, mutta enintään 1,20, ja sen jälkeen kun näyte on käsitelty aktivoidulla alumiinioksidilla, suurempi kuin 0,10;
- d) ekstinktiokertoimen poikkeama (DK) on 270 nanometrialueella suurempi kuin 0,01, mutta enintään 0,16;
- e) erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on yhteensä enintään 4,5 prosenttia;
- f) tyydyttyneiden rasvahappojen pitoisuus triglyseridien 2-asemassa on enintään 1,5 prosenttia;

Huom. 2D: Alanimikkeessä 1510 00 10 ilmaisulla 'raa'at öljyt' tarkoitetaan öljyjä, erityisesti uutettuja oliiviöljyjä, joilla on seuraavat ominaisuudet:

- a) happopitoisuus oleiinihappona ilmaistuna on suurempi kuin 2 g/100 g;
- b) erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on yhteensä suurempi kuin 12 prosenttia;
- c) tyydyttyneiden rasvahappojen pitoisuus triglyseridien 2-asemassa on enintään 1,8 prosenttia.

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

K_m on ekstinktiokerroin absorptiokäyrän maksimin aallonpituudella 270 nanometrialueella, K_{m-4} ja K_{m+4} ovat ekstinktiokertoimia aallonpituuksilla, jotka ovat vastaavasti 4 nm lyhyempiä tai pidempiä kuin K_m .

⁽²⁾ Jos K_{270} on suurempi kuin 0,25, täytyy koe uusia alumiinioksidikäsitelyn jälkeen. K_{270} ei saa olla yli 0,10.

▼B

Huom. 2E: Alanimikkeeseen 1510 00 90 kuuluu öljyjä, jotka on valmistettu käsittelemällä alanimikkeeseen 1510 00 10 kuuluvia öljyjä, myös jos niihin on sekoitettu neitsytoliiviöljyä, ja joilla ei ole I ja II kohdassa mainittuja ominaisuuksia, ja jos niiden tyydyttyneiden rasvahappojen pitoisuus triglyseridien 2-asemassa on enintään 2 prosenttia.

2 *Huom. 3* Alanimikkeisiin 1522 00 31 ja 1522 00 39 eivät kuulu:

- a) öljyä sisältävien rasvaisten aineiden käsittelyssä syntyvät jätteet, joiden jodiluku, liitteessä XVI määrätyn menetelmän mukaisesti määritettynä, on pienempi kuin 70 tai suurempi kuin 100.
- b) öljyä sisältävien rasvaisten aineiden käsittelyssä syntyvät jätteet, joiden jodiluku on vähintään 70, mutta enintään 100, mutta joiden beetasitosterolin retentiotilavuutta osoittava huippuala, jäljempänä 4 lisähuomautuksessa tarkoitetun asetuksen liitteen V säännösten mukaisesti määritettynä, on pienempi kuin 93 prosenttia sterolin kokonaishuippualoista.

3 *Huom. 4* Edellä mainittujen tuotteiden ominaisuuksien määrittelyyn käytettävät analyttiset menetelmät määrätään asetuksen (ETY) N:o 2568/91 liitteissä.

▼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 puhalttaa 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 vähenisivät 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 jäähdytetään eksikkaattorissa vähintään tunnin ajan.

2.6 Ensimmäinen uutto

Uuttohylsy näytteineen (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 mikrojauhatuslaitteeseen 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 suodattetaan 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, jäähdytetään eksikkaattorissa ja punnitaan uudelleen.

Näiden kahden punnitustuloksen ero saa olla enintään 10 mg. Ellei tähän päästä, kuumennetaan jälleen 10 minuuttia, jäähdytetään 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 hyväksyttyä analyysilaatua.

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

Lisätään 5 g liukoista tärbekelystä 30 ml:aan vettä, lisätään tämä seos 1 000 ml:aan kiehuvaa 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 ICl_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 suupipettiä.

Sokeakoe valmistellaan samalla tavalla käyttäen liuotinta ja reagenssia ilman näytettä.

Pullost jätetään pimeään tunniksi, jos näytteen oletettu jodiluku on alle 150; jos oletettu jodiluku on yli 150 tai tuote on polymeroitunut tai hyvin hapettunut, pullost 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 tärkkelysliuosta (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

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

jossa:

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

V_1 = sokeakokeeseen käytetyn natriumtiosulfaattiliuoksen (4.4) tilavuus millilitroina;

V_2 = määrittämiseen käytetyn natriumtiosulfaattiliuoksen (4.4) tilavuus millilitroina;

m = näytemäärä (7.1) grammoina.

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