

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 määrittämenetelmistä

(EYVL L 248, 5.9.1991, s. 1)

sellaisena kuin se on muutettuna seuraavilla:

		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
► <u>M5</u>	Komission asetus (ETY) N:o 3288/92, annettu 12 päivänä marraskuuta 1992	L 327	28	13.11.1992
► <u>M6</u>	Komission asetus (ETY) N:o 183/93, annettu 29 päivänä tammikuuta 1993	L 22	58	30.1.1993
► <u>M7</u>	sellaisena kuin se on muutettuna seuraavilla commission Regulation (EEC) No 826/93 of 6 April 1993 (*)	L 87	6	7.4.1993
► <u>M8</u>	Komission asetus (ETY) N:o 620/93, annettu 17 päivänä maaliskuuta 1993	L 66	29	18.3.1993
► <u>M9</u>	Komission asetus (EY) N:o 177/94, annettu 28 päivänä tammikuuta 1994	L 24	33	29.1.1994
► <u>M10</u>	Komission asetus (EY) N:o 2632/94, annettu 28 päivänä lokakuuta 1994	L 280	43	29.10.1994
► <u>M11</u>	Komission asetus (EY) N:o 656/95, annettu 28 päivänä maaliskuuta 1995	L 69	1	29.3.1995
► <u>M12</u>	Komission asetus (EY) N:o 2527/95, annettu 27 päivänä lokakuuta 1995	L 258	49	28.10.1995
► <u>M13</u>	Komission asetus (EY) N:o 2472/97, annettu 11 päivänä joulukuuta 1997	L 341	25	12.12.1997
► <u>M14</u>	Komission asetus (EY) N:o 282/98, annettu 3 päivänä helmikuuta 1998	L 28	5	4.2.1998
► <u>M15</u>	Komission asetus (EY) N:o 2248/98, annettu 19 päivänä lokakuuta 1998	L 282	55	20.10.1998
► <u>M16</u>	Komission asetus (EY) N:o 379/1999, annettu 19 päivänä helmikuuta 1999	L 46	15	20.2.1999
► <u>M17</u>	Komission asetus (EY) N:o 455/2001, annettu 6 päivänä maaliskuuta 2001	L 65	9	7.3.2001
► <u>M18</u>	Komission asetus (EY) N:o 2042/2001, annettu 18 päivänä lokakuuta 2001	L 276	8	19.10.2001
► <u>M19</u>	Komission asetus (EY) N:o 796/2002, annettu 6 päivänä toukokuuta 2002	L 128	8	15.5.2002
► <u>M20</u>	Komission asetus (EY) N:o 1989/2003, annettu 6 päivänä marraskuuta 2003	L 295	57	13.11.2003
► <u>M21</u>	Komission asetus (EY) N:o 702/2007, annettu 21 päivänä kesäkuuta 2007	L 161	11	22.6.2007
► <u>M22</u>	Komission asetus (EY) N:o 640/2008, annettu 4 päivänä heinäkuuta 2008	L 178	11	5.7.2008
► <u>M23</u>	Komission asetus (EU) N:o 61/2011, annettu 24 päivänä tammikuuta 2011	L 23	1	27.1.2011
► <u>M24</u>	Komission täytäntöönpanoasetus (EU) N:o 661/2012, annettu 19 päivänä heinäkuuta 2012	L 192	3	20.7.2012

(*) Tätä asiakirjaa ei ole julkaistu suomenkielisenä.

► <u>M25</u>	Komission täytäntöönpanoasetus (EU) N:o 299/2013, annettu 26 päivänä maaliskuuta 2013	L 90	52	28.3.2013
► <u>M26</u>	Komission täytäntöönpanoasetus (EU) N:o 1348/2013, annettu 16 päivänä joulukuuta 2013	L 338	31	17.12.2013

Oikaistu:

- **C1** Oikaisu, EUVL L 78, 24.3.2011, s. 71 (61/2011)



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

annettu 11 päivänä heinäkuuta 1991,

oliiviöljyn ja uutetun oliiviöljyn ominaisuuksista sekä niiden
määrittämismenetelmistä

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 määrittellä kyseisten tuotteiden puhtauden ja laadun takaamiseksi, sanottuna 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 kemiallisen määrittämisestä ja aistinvaraista arviointia varten; siirtymäkauden aikana olisi kuitenkin sallittava jäsenvaltioissa sovellettavien muiden määrittämismenetelmien käyttö ottaen kuitenkin huomioon, että jos tulokset ovat erilaisia, yhteisellä menetelmällä saadut tulokset ovat ratkaisevia,

oliiviöljyn fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien sekä määrittämismenetelmien 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,

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

⁽²⁾ EYVL N:o L 353, 17.12.1990, s. 23

▼B

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 ⁽¹⁾, sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna asetuksella (ETY) N:o 1858/88 ⁽²⁾, ja

rasvojen hallintokomitea ei ole antanut lausuntoa puheenjohtajansa asettamassa määräajassa,

ON ANTANUT TÄMÄN ASETUKSEN:

▼M20*1 artikla*

1. Öljyä, joiden ominaisuudet ovat tämän asetuksen liitteessä I olevassa 1 ja 2 kohdassa määritettyjen ominaisuuksien mukaiset, pidetään asetuksen N:o 136/66/ETY liitteessä olevan 1 kohdan a ja b alakohdassa tarkoitettuina neitsytoliiviöljyinä.

2. Öljyä, jonka ominaisuudet ovat tämän asetuksen liitteessä I olevassa 3 kohdassa määritettyjen ominaisuuksien mukaiset, pidetään asetuksen N:o 136/66/ETY liitteessä olevassa 1 c kohdassa tarkoitettuna oliivilamppuöljynä.

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

4. Öljyä, jonka ominaisuudet ovat tämän asetuksen liitteessä I olevassa 5 kohdassa määritettyjen ominaisuuksien mukaiset, pidetään asetuksen N:o 136/66/ETY liitteessä olevassa 3 kohdassa tarkoitettuna jalostetusta oliiviöljystä ja neitsytoliiviöljystä valmistettuna oliiviöljynä.

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

6. Öljyä, jonka ominaisuudet ovat tämän asetuksen liitteessä I olevassa 7 kohdassa määritettyjen ominaisuuksien mukaiset, pidetään asetuksen N:o 136/66/ETY liitteessä olevassa 5 kohdassa tarkoitettuna jalostettuna oliivin puristemassaöljynä.

7. Öljyä, jonka ominaisuudet ovat tämän asetuksen liitteessä I olevassa 8 kohdassa määritettyjen ominaisuuksien mukaiset, pidetään asetuksen N:o 136/66/ETY liitteessä olevassa 6 kohdassa tarkoitettuna oliivin puristemassaöljynä.

⁽¹⁾ EYVL N:o L 128, 24.5.1977, s. 6

⁽²⁾ EYVL N:o L 166, 1.7.1988, s. 10

▼ **M26***2 artikla*

1. Liitteessä I säädettyjen öljyjen ominaisuudet määritetään seuraavilla määritysmenetelmillä:

- a) oleiinihappoprosentteina ilmaistavat vapaat rasvahapot määritetään liitteessä II esitetyllä menetelmällä;
 - b) peroksidiluku määritetään liitteessä III esitetyllä menetelmällä;
 - c) vahapitoisuus määritetään liitteessä IV esitetyllä menetelmällä;
 - d) sterolien ja triterpeenidialkoholien koostumus ja pitoisuus määritetään kapillaarikaasukromatografialla liitteessä V esitetyllä menetelmällä;
 - e) 2-glyseryylimonopalmiitin prosenttiosuus määritetään liitteessä VII esitetyllä menetelmällä;
 - f) spektrofotometrinen määrittäminen tehdään liitteessä IX esitetyllä menetelmällä;
 - g) rasvahappokoostumus määritetään liitteissä X A ja X B esitetyllä menetelmällä;
 - h) haihtuvat halogeeniliuottimet määritetään liitteessä XI esitetyllä menetelmällä;
- neitsytoliiviöljyn aistinvaraiset ominaisuudet arvioidaan liitteessä XII esitetyllä menetelmällä;
- j) stigmastadienit määritetään liitteessä XVII esitetyllä menetelmällä;
 - k) C42:ta sisältävien triglyseridien koostumus määritetään liitteessä XVIII esitetyllä menetelmällä;
 - l) alifaattisten alkoholien pitoisuus määritetään liitteessä XIX esitetyllä menetelmällä;
 - m) vahojen, rasvahappojen metyyliestereiden ja rasvahappojen etyyliestereiden pitoisuudet määritetään liitteessä XX esitetyllä menetelmällä.

Oliiviöljyissä esiintyvien vieraiden kasviöljyjen havaitsemiseksi sovelletaan liitteessä XX a esitettyä määritysmenetelmää.

2. Kansallisilta viranomaisilta tai näiden edustajilta edellytettävistä neitsytoliiviöljyjen aistinvaraisten ominaisuuksien tarkistuksesta vastaavat jäsenvaltioiden hyväksymät maistajaraadit.

▼ **M26**

Ensimmäisessä kohdassa tarkoitetun oliiviöljyn aistinvaraisten ominaisuuksien katsotaan olevan yhdenmukaisia ilmoitetun oliiviöljyluokan kanssa, jos asianomaisen jäsenvaltion hyväksymä raati vahvistaa kyseisen luokituksen.

Jos raati ei vahvista ilmoitusta ilmoitetun oliiviöljyluokan aistinvaraisten ominaisuuksien osalta, kansalliset viranomaiset tai niiden edustajat teettävät asianomaisen pyynnöstä viipymättä muilla hyväksytyillä raadeilla kaksi seurantamäärittystä, joista ainakin toisen tekee asianomaisen tuottajajäsenvaltion hyväksymä raati. Kyseisten ominaisuuksien katsotaan olevan yhdenmukaisia ilmoitettujen ominaisuuksien kanssa, jos ilmoitettu luokitus vahvistetaan molemmissa seurantamäärittelyissä. Päinvaltaisessa tapauksessa seurantamäärittelyn kustannuksista vastaa asianomainen.

3. Kun on kyse kansallisten viranomaisten tai niiden edustajien tekemästä 1 kohdan mukaisesta öljyn ominaisuuksien toteamisesta, näytteenotto tehdään koenäytteen valmistelua ja näytteenottoa koskevia kansainvälisiä standardeja EN ISO 661 ja EN ISO 5555 noudattaen. Poiketen siitä, mitä standardissa EN ISO 5555 olevassa 6.8 kohdassa määrätään, silloin kun kyseessä ovat tällaiset pakkaukseen suorassa kosketuksessa olevat öljyt, näytteenotto tehdään kuitenkin tämän asetuksen liitteen I a mukaisesti. Kun kyseessä on pakkaamaton öljy, josta ei voida ottaa näytettä standardin EN ISO 5555 mukaisesti, näytteenotto tehdään jäsenvaltion toimivaltaisen viranomaisten ohjeiden mukaisesti.

Rajoittamatta standardin EN ISO 5555 ja standardissa EN ISO 661 olevan 6 luvun määräysten soveltamista näytteet on sijoitettava viipymättä valolta ja lämmöltä suojattuun paikkaan ja lähetettävä laboratorioon määritettäväksi viimeistään näytteenottoa seuraavana viidentenä työpäivänä; muussa tapauksessa näytteet on säilytettävä niin, että ne eivät heikenny tai vahingoitu kuljetuksen tai varastoinnin aikana ennen laboratorioon lähettämistä.

4. Edellä 3 kohdassa tarkoitettua todentamista varten liitteissä II, III, IX, XII ja XX tarkoitetut määritykset ja tapauksen mukaan kansallisessa lainsäädännössä säädetyt vastamääritykset on tehtävä ennen vähimmäissäilymisajan päättymistä, kun kyseessä ovat pakatut tuotteet. Kun kyseessä ovat pakkaamattomat öljyt, määritykset on tehtävä kuuden kuukauden kuluessa näytteenottokuukaudesta.

Muihin tässä asetuksessa säädettyihin määrityksiin ei sovelleta määraaikoja.

Jos määritysten tulokset eivät vastaa oliiviöljyn tai oliivin puristemassa-öljyn ilmoitetun luokan ominaisuuksia, asianomaisen on ilmoitettava asiasta kuukauden kuluessa ensimmäisessä alakohdassa tarkoitetun määräajan päättymisestä, paitsi jos näyte on otettu vähimmäissäilymisajan päättymistä edeltävien kahden kuukauden kuluessa.

▼ **M26**

5. Määrittystuloksia verrataan suoraan tässä asetuksessa säädettyihin rajoihin oliiviöljyjen ominaisuuksien määrittämiseksi 1 kohdan ensimmäisessä alakohdassa säädettyjä menetelmiä noudattaen.

▼ **M25***2 a artikla*

1. Tämän artiklan soveltamiseksi ”kaupan pidetyllä oliiviöljyllä” tarkoitetaan jäsenvaltion oliiviöljyn ja oliivin puristemassaöljyn kokonaismäärää, joka kulutetaan kyseisessä jäsenvaltiossa tai viedään sieltä.

2. Jäsenvaltioiden on sen varmistamiseksi, että kaupan pidetty oliiviöljy on ilmoitetun luokan mukaista, huolehdittava, että vaatimustenmukaisuustarkastukset tehdään valikoivasti riskianalyysin perusteella ja asianmukaisin aikavälein.

3. Riskien arviointiperusteisiin voi kuulua myös

a) öljyn luokka, tuotantokausi, öljyjen hinta suhteessa muihin kasviöljyihin, sekoitus- ja kauppakunnostustoimet, varastointitilat ja -olosuhteet, alkuperämaa, määränpäämaa, kuljetustapa tai erän suuruus;

b) toimijoiden asema kaupan pitämisen ketjussa, toimijoiden kaupan pitämä määrä ja/tai arvo, toimijoiden kaupan pitämät öljyluokat, kaupallisen toiminnan tyyppi, kuten puristus, varastointi, jalostus, sekoittaminen, pakkaaminen tai vähittäismyynti;

c) aiemmissa tarkastuksissa tehdyt havainnot mukaan lukien puutteiden lukumäärä ja tyyppi, kaupan pidettyjen öljyjen tavanomainen laatu tai käytettävien teknisten laitteiden suorituskyky;

d) toimijoiden laadunvarmistusjärjestelmien tai omavalvonnan luotettavuus kaupan pitämisen vaatimusten mukaisuuden osalta;

e) tarkastusentehopaikka, erityisesti jos se on unioniin saapumispaikka, unionista lähtöpaikka tai paikka, jossa öljyt tuotetaan, kauppakunnostetaan, lastataan tai myydään loppukuluttajalle;

f) muut tiedot, jotka voivat osoittaa vaatimustenvastaisuusriskin.

4. Jäsenvaltioiden on vahvistettava etukäteen

a) erien vaatimustenvastaisuusriskin arviointiperusteet;

b) kunkin riskiluokan riskianalyysin perusteella toimijoiden tai erien ja/tai määrien vähimmäismäärät, joille on tehtävä vaatimustenmukaisuustarkastus.

▼ M25

Tuhatta jäsenvaltiossa kaupan pidettyä oliiviöljytonnia kohden on tehtävä vuosittain vähintään yksi vaatimustenmukaisuustarkastus.

5. Jäsenvaltioiden on varmistettava vaatimustenmukaisuus

- a) tekemällä liitteessä I säädetty määritykset missä tahansa järjestyksessä; tai
- b) seuraamalla päätöksentekokaaviota koskevassa liitteessä I b säädettyä järjestystä, kunnes päästään johonkin kyseisessä kaaviossa mainittuun päätökseen.

▼ M19**▼ M25***3 artikla*

Jos havaitaan, ettei öljy vastaa luokan kuvausta, asianomaisen jäsenvaltion on sovellettava tehokkaita, oikeasuhteisia ja varoittavia seuraamuksia, jotka vahvistetaan havaitun poikkeaman vakavuuden mukaisesti, sanotun kuitenkin rajoittamatta muiden mahdollisten seuraamusten soveltamista.

Jos tarkastuksissa havaitaan merkittäviä poikkeamia, jäsenvaltion on lisättävä kaupanpitämisen vaiheen, öljyluokan, alkuperän tai muiden seikkojen tarkastuksia.

▼ M5*4 artikla***▼ M19**

1. Jäsenvaltiot voivat hyväksyä maistajaraateja, jotta kansalliset viranomaiset tai niiden edustajat voivat arvioida ja valvoa aistinvaraisia ominaisuuksia.

Jäsenvaltioiden on vahvistettava hyväksymistä koskevat edellytykset etenkin siten, että:

- liitteessä XII olevan 4 kohdan edellytykset täyttyvät,
- raadin puheenjohtajan koulutuksesta vastaa laitos jäsenvaltion tässä tarkoituksessa hyväksymin edellytyksin,
- hyväksynnän pätevyys ratkaistaan jäsenvaltion käyttöönottamassa vuotuisessa valvontajärjestelmässä saatujen tulosten perusteella.

Kunkin jäsenvaltion on toimitettava komissiolle luettelo hyväksytyistä raadeista ja tämän kohdan mukaisesti toteutetuista toimenpiteistä.

▼ M5

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

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

▼ M19**▼ B***6 artikla*

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

▼B

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

▼M20*7 artikla*

Haitallisten aineiden osalta sovelletaan niiden esiintymistä koskevia yhteisön säännöksiä.

Halogeeniliuottimien pitoisuuden osalta raja-arvot ovat kaikkien oliiviöljyluokkien osalta seuraavat:

- Kunkin havaitun halogeeniliuottimen enimmäispitoisuus 0,1 mg/kg
- Havaittujen halogeeniliuottimien summan enimmäispitoisuus 0,2 mg/kg

▼M25*7 a artikla*

Luonnollisten henkilöiden, oikeushenkilöiden tai henkilöryhmittymien, joilla on hallussaan oliiviöljyä tai oliivin puristemassaöljyä jossakin vaiheessa puristamosta pullotusvaiheeseen mihin tahansa ammatillisiin tai kaupallisiin tarkoituksiin, on pidettävä jokaisen öljyluokan osalta kirjaa varastoonvienneistä ja varastotapoistoista.

Jäsenvaltion on varmistettava, että ensimmäisessä kohdassa säädettyä velvollisuutta noudatetaan asianmukaisesti.

8 artikla

1. Jäsenvaltioiden on annettava tämän asetuksen täytäntöönpanotoimenpiteet komissiolle tiedoksi. Niiden on ilmoitettava komissiolle kaikista myöhemmistä muutoksista.

2. Jäsenvaltioiden on vuosittain viimeistään 31 päivänä toukokuuta annettava komissiolle kertomus tämän asetuksen täytäntöönpanosta edellisenä kalenterivuonna. Kertomuksessa on oltava vähintään oliiviöljyille tehtyjen vaatimustenmukaisuustarkastusten tulokset, jotka on ilmoitettava liitteessä XXI esitetyn mallin mukaisesti.

3. Tässä asetuksessa tarkoitetut ilmoitukset on tehtävä komission asetuksen (EY) N:o 792/2009 ⁽¹⁾ mukaisesti.

▼B*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.

⁽¹⁾ EUVL L 228, 1.9.2009, s. 3.

▼ M5

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

▼ B

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

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

▼ B*LIITTEET***Yhteenveto**

Liite I	Oliiviöljyjen ominaisuudet
Liite I a	Näytteenotto oliiviöljyistä tai oliivin puristemassaöljyistä, jotka toimitetaan tuotteeseen suorassa kosketuksessa olevissa pakkauksissa
Liite I b	Päätöksentekojärjestelmä sen todentamiseksi, onko oliiviöljynäyte ilmoitetun luokan mukainen
Liite II	► M21 Vapaiden rasvahappojen määrittäminen kylmämenetelmällä ◀
Liite III	Peroksidiluvun määrittäminen
Liite IV	► M6 Vahapitoisuuden määrittäminen kapillaarikaasukromatografisella menetelmällä ◀
Liite V	Sterolien ja triterpeenidialkoholien rakenteen ja pitoisuuden määrittäminen kapillaarikaasukromatografisella menetelmällä
Liite VII	► M21 2-glyceryylimonopalmiitin prosenttiosuuden määrittäminen ◀

▼ M20**▼ B**

Liite IX	Spektrofotometrinen määrittäminen ultraviolettivalossa
Liite X A	Rasvahappojen metyyliestereiden määrittäminen kaasukromatografisella menetelmällä
Liite X B	Rasvahappojen metyyliestereiden valmistaminen
Liite XI	Haihtuvien halogeeniliuottimien pitoisuuden määrittäminen oliiviöljystä
Liite XII	Kansainvälisen oliivineuvoston menetelmä neitsytoliiviöljyjen aistinvaraista arviointia varten

▼ M20**▼ M19****▼ B**

Liite XV	Oliivijätteen öljypitoisuus
Liite XVI	Jodiluvun määrittäminen
Liite XVII	Menetelmä stigmastadienien määrittämiseksi kasviöljyistä
Liite XVIII	ECN42-Triasyyliglyserolien teoreettisen koostumuksen ja todellisen koostumuksen välisen eron määrittäminen
Liite XIX	Alifaattisten alkoholien pitoisuuden määrittäminen menetelmä

▼ M23

Liite XX	Vahojen, rasvahappojen metyyliestereiden ja rasvahappojen etyyliestereiden pitoisuuksien määrittäminen kapillaarikaasukromatografiamenetelmällä
----------	---

▼ M26

Liite XX a:	Method for the detection of extraneous oils in olive oils
-------------	---

▼ M25

Liite XXI	8 artiklan 2 kohdassa tarkoitettujen oliiviöljyjen tehtyjen vaatimustenmukaisuustarkastusten tulokset
-----------	---

LIITE I

OLIIVIÖLJYJEN OMINAISUUDET

Luokka	Rasvahappojen etyyliesterit (FAEE) mg/kg (*)	Happopi- toisuus (%) (*)	Peroksidi- luku mEq O ₂ /kg (*)	Vahat mg/kg (**)	2-glyceryylimonopalmiitaatti (%)	Stigmasta- dieeni mg/kg (1)	HPLC:llä määritetyn ja teoreet- tisesti lasketun ECN42: n (2) välinen ero	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ tai K ₂₇₀ (*)	δ-K (*)	Aistinvarai- nen arvio Virheen mediaani (Md) (*)	Aistinvarai- nen arvio Hedelmä- syyden mediaani (Mf) (*)
1. Ekstra-neit- sytolii- viöljy	FAEE ≤ 40 (2013–2014 sa- tovuosi) (3) FAEE ≤ 35 (2014–2015 sa- tovuosi) FAEE ≤ 30 sa- tovuodet 2015:stä eteen- päin)	≤ 0,8	≤ 20	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150	≤ 0,9 jos palmitiiniha- pon kokonaisprosenttiosuus- % ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
					≤ 1,0 jos palmitiiniha- pon kokonaisprosenttiosuus- % > 14 %							
2. Neitsytolii- viöljy	—	≤ 2,0	≤ 20	C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 150	≤ 0,9 jos palmitiiniha- pon kokonaisprosenttiosuus- % ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
					≤ 1,0 jos palmitiiniha- pon kokonaisprosenttiosuus- % > 14 %							
3. Lamppuolii- viöljy	—	> 2,0	—	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 300 (4)	≤ 0,9 jos palmitiiniha- pon kokonaisprosenttiosuus- % ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (5)	—
					≤ 1,1 jos palmitiiniha- pon kokonaisprosenttiosuus- % > 14 %							

▼ **M26**

Luokka	Rasvahappojen etyyliesterit (FAEE) mg/kg (*)	Happopi- toisuus (%) (*)	Peroksidi- luku mEq O ₂ /kg (*)	Vahat mg/kg (**)	2-glyceryylimonopalmiitti (%)	Stigmasta- dieeni mg/kg ⁽¹⁾	HPLC:llä määritetyn ja teoreet- tisesti lasketun ECN42: n ⁽²⁾ välinen ero	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ tai K ₂₇₀ (*)	δ-K (*)	Aistinvarai- nen arvio Virheen mediaani (Md) (*)	Aistinvarai- nen arvio Hedelmäi- syyden mediaani (Mf) (*)
4. Jalostettu oliiviöljy	—	≤ 0,3	≤ 5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 350	≤ 0,9 jos palmitiiniha- pon kokonaisprosenttiosuus- % ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1 jos palmitiiniha- pon kokonaisprosenttiosuus- % > 14 %							
5. Jalostetusta oliiviöljystä ja neitsyto- liiviöljystä valmistettu oliiviöljy	—	≤ 1,0	≤ 15	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ ≤ 350	≤ 0,9 jos palmitiiniha- pon kokonaisprosenttiosuus- % ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0 jos palmitiiniha- pon kokonaisprosenttiosuus- % > 14 %							
6. Raaka olii- vin puriste- massaöljy	—	—	—	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350 ⁽⁶⁾	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Jalostettu oliivin pu- ristemassa- öljy	—	≤ 0,3	≤ 5	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—

▼ M26

Luokka	Rasvahappojen etyyliesterit (FAEE) mg/kg (*)	Happopi- toisuus (%) (*)	Peroksidi- luku mEq O ₂ /kg (*)	Vahat mg/kg (**)	2-glyceryylimonopalmiitti (%)	Stigmasta- dieeni mg/kg ⁽¹⁾	HPLC:llä määritetyn ja teoreet- tisesti lasketun ECN42: n ⁽²⁾ välinen ero	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ tai K ₂₇₀ (*)	δ-K (*)	Aistinvarai- nen arvio Virheen mediaani (Md) (*)	Aistinvarai- nen arvio Hedelmäi- syyden mediaani (Mf) (*)
8. Oliivin pu- ristemassa- öljy	—	≤ 1,0	≤ 15	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

⁽¹⁾ Isomeerien kokonaismäärä, joka voidaan (tai jota ei voida) erottaa kapillaarikolonnin avulla.
⁽²⁾ Oliiviöljyn on oltava liitteessä XX a esitetyn menetelmän mukaista.
⁽³⁾ Tätä rajaa sovelletaan 1 päivästä maaliskuuta 2014 alkaen tuotettuihin oliiviöljyihin.
⁽⁴⁾ Kun öljyn vahapitoisuus on 300–350 mg/kg, sitä pidetään lamppuöljynä, jos alifaattisten alkoholien kokonaispitoisuus on enintään 350 mg/kg tai jos erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on enintään 3,5 prosenttia
⁽⁵⁾ Tai jos virheen mediaani on yli 3,5 tai jos virheen mediaani on enintään 3,5 ja hedelmäisyyden mediaani on 0.
⁽⁶⁾ Kun öljyn vahapitoisuus on 300–350 mg/kg, sitä pidetään raakana oliivin puristemassaöljynä, jos alifaattisten alkoholien kokonaispitoisuus on yli 350 mg/kg ja jos erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on yli 3,5 prosenttia.

Luokka	Rasvahappokoostumus ⁽¹⁾						Trans- oleiini- isomee- rien summa (%)	Trans-li- noli-iso- meerien ja trans- linolee- ni-iso- meerien summa (%)	Sterolikoostumus						Koko- naissterolit (mg/kg)	Erytrodioli ja uvaoli (%) ^(**)
	Myristiini- happo (%)	Linolee- nihappo (%)	Arakido- nihappo (%)	Eikosee- nihappo (%)	Beheeni- happo (%)	Lignose- riini- happo (%)			Koleste- roli (%)	Brassi- kasteroli (%)	Kampes- teroli ⁽²⁾ (%)	Stigmaste- roli (%)	Näenn. β- sitosteroli- pit. (%) ⁽³⁾	δ-7- stigma- tenoli ⁽²⁾ (%)		
1. Ekstra-neitsytoliiviöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Neitsytoliiviöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Lamppuoliiviöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽⁴⁾
4. Jalostettu oliiviöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5

▼ **M26**

Luokka	Rasvahappokoostumus ⁽¹⁾						Trans-oleiini-isomeerien summa (%)	Trans-linoli-isomeerien ja trans-linoleeni-isomeerien summa (%)	Sterolikoostumus						Koko-naissterolit (mg/kg)	Erytrodioli ja uvaoli (%) ^(**)
	Myristiini-happo (%)	Linoleeni-happo (%)	Arakidoni-happo (%)	Eikoseeni-happo (%)	Beheeni-happo (%)	Lignoseeriini-happo (%)			Kolesteroli (%)	Brassikasteroli (%)	Kamposteroli ⁽²⁾ (%)	Stigmasteroli (%)	Näenn. β-sitosterolipit. (%) ⁽³⁾	δ-7-stigmas-tenoli ⁽²⁾ (%)		
5. Jalostetusta oliiviöljystä ja neitsytoliiviöljystä valmistettu oliiviöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Raaka oliivin puristemassaöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁵⁾
7. Jalostettu oliivin puristemassaöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Oliivin puristemassaöljy	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Muiden rasvahappojen pitoisuus (%): palmitiinihappo: 7,50–20,00; palmitoleiinihappo: 0,30–3,50; heptadekaanihappo: ≤ 0,30; heptadekeenihappo: ≤ 0,30; steariinihappo: 0,50–5,00; oleiinihappo: 55,00–83,00; linolihappo: 3,50–21,00.

⁽²⁾ Ks. tämän liitteen lisäys.

⁽³⁾ Näennäinen β-sitosterolipitoisuus: δ-5,23-stigmastadienoli + klerosteroli + β-sitosteroli + sitostanoli + δ-5-avenasteroli + δ-5,24-stigmastadienoli.

⁽⁴⁾ Kun öljyn vahapitoisuus on 300–350 mg/kg, sitä pidetään lampuöljynä, jos alifaattisten alkoholien kokonaispitoisuus on enintään 350 mg/kg tai jos erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on enintään 3,5 prosenttia.

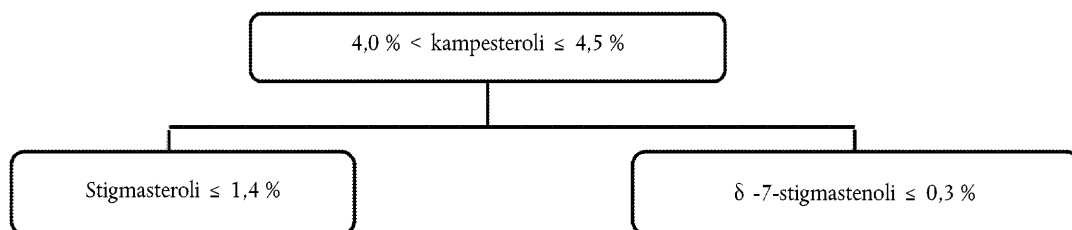
⁽⁵⁾ Kun öljyn vahapitoisuus on 300–350 mg/kg, sitä pidetään raakana oliivin puristemassaöljynä, jos alifaattisten alkoholien kokonaispitoisuus on yli 350 mg/kg ja jos erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on yli 3,5 prosenttia.

Huom.

- a) Analyysitulokset on ilmaistava yhtä monen desimaalin tarkkuudella kuin kunkin ominaisuuden osalta esitetään. Viimeinen luku on pyöristettävä yhdellä yksiköllä ylöspäin, jos sitä seuraava luku on suurempi kuin 4.
- b) Jos öljyn yksikin ominaisuus poikkeaa annetuista arvoista, sen luokka muutetaan tai todetaan, ettei se täytä tässä asetuksessa säädettyjä puhtausvaatimuksia.
- c) Öljyn laatuun viittaavat tähdellä (*) merkityt ominaisuudet tarkoittavat seuraavaa: – lampuoliiviöljyn ei tarvitse täyttää kaikkia raja-arvoja koskevia vaatimuksia samanaikaisesti, – jos neitsytoliiviöljy ei täytä jotain raja-arvoa koskevaa vaatimusta, öljyn luokka muutetaan, mutta se säilyy edelleen luokiteltuna johonkin neitsytoliiviöljyluokista.
- d) Kaksi tähteä (**) oliiviöljyn jonkin laatuominaisuuden kohdalla tarkoittaa, että oliivin puristemassaöljyjen ei tarvitse täyttää kaikkia raja-arvoja koskevia vaatimuksia samanaikaisesti.

▼ **M26***Lisäys***Päätöksentekojärjestelmä**

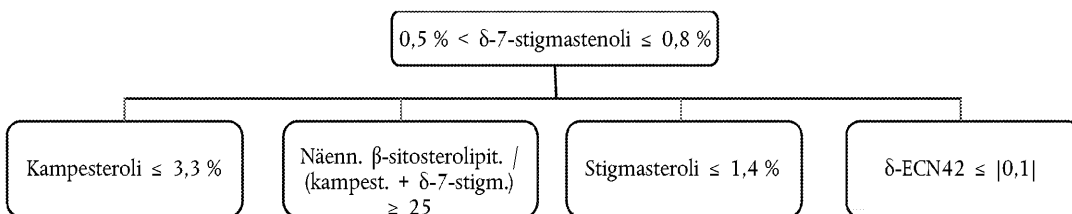
Kampesterolia koskeva päätöksentekokaavio neitsyt- ja ekstra-neitsytoliiviöljyä varten:



Muiden parametrien on vastattava asetuksen mukaisia rajoja.

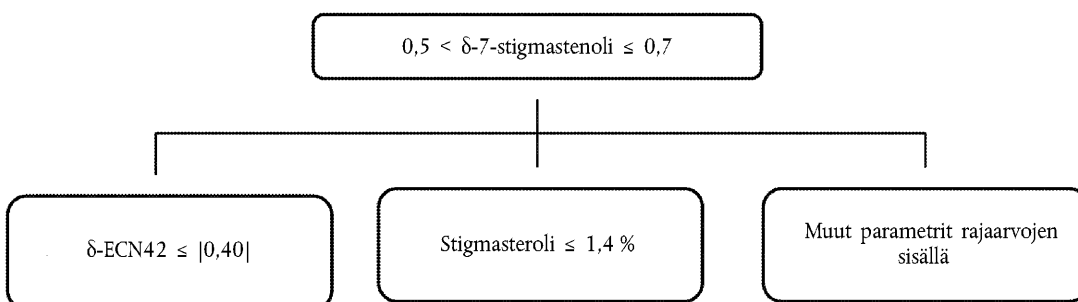
δ-7- stigmasterolia koskeva päätöksentekojärjestelmä:

— ekstraneitsyt- ja neitsytoliiviöljyä varten



Muiden parametrien on vastattava asetuksen mukaisia rajoja.

— oliivin puristemassaöljyä varten (raaka ja jalostettu)



▼ **M26***LIITE I a***NÄYTTEENOTTO OLIIVIÖLJYISTÄ TAI OLIIVIN PURISTEMASSA-ÖLJYISTÄ, JOTKA TOIMITETAAN TUOTTEeseen SUORASSA KOSKETUKSESSA OLEVISSA PAKKAUKSISSA**

Tätä näytteenottomenetelmää sovelletaan oliiviöljy- tai oliivin puristemassaöljyisiin, jotka toimitetaan suorassa kosketuksessa tuotteeseen olevissa pakkauksissa. Näytteenottomenetelmä vaihtelee sen mukaan, onko suorassa kosketuksessa tuotteeseen olevan pakkauksen vetoisuus yli viisi litraa vai ei.

Ilmaisulla ”erä” tarkoitetaan kaikkia myyntiyksiköitä, jotka on tuotettu, valmistettu ja pakattu sellaisissa olosuhteissa, että kunkin tällaisen myyntiyksikön sisältämää öljyä pidetään yhdenmukaisena kaikkien analyttisten ominaisuuksien osalta. Erä on yksilöitävä Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivin 2011/91/EU ⁽¹⁾ mukaisesti.

”Näyteyksiköllä” tarkoitetaan tuotteeseen kosketuksessa olevaan pakkaukseen sisältyvää öljymäärää, joka otetaan erästä satunnaisotannalla.

1. PERUSNÄYTTEEN SISÄLTÖ**1.1. Tuotteeseen kosketuksessa olevat, vetoisuudeltaan enintään viiden litran pakkaukset**

Tuotteeseen kosketuksessa olevista, vetoisuudeltaan enintään viiden litran pakkauksista otetulla ”perusnäytteellä” tarkoitetaan erästä taulukon 1 mukaisesti otettujen näyteyksiköiden lukumäärää.

*Taulukko 1***Perusnäytteen vähimmäiskoko muodostetaan seuraavasti**

Jos tuotteeseen kosketuksessa olevien pakkausten vetoisuus on	Perusnäytteeksi valitaan
a) vähintään 1 litra	a) yhden tuotteeseen kosketuksessa olevan pakkauksen öljy
b) alle 1 litra.	b) pienin mahdollinen määrä pakkauksia, joiden vetoisuus yhteensä on vähintään 1,0 litraa.

Jokainen jäsenvaltio voi lisätä perusnäytteen muodostavien taulukossa 1 tarkoitettujen pakkausten määrää omien tarpeidensa mukaan (esimerkiksi, jotta aistinvaraisen arvioinnin voi tehdä eri laboratorio kuin kemialliset analyysit, vastamäärityksiä varten jne.).

1.2. Tuotteeseen kosketuksessa olevat, vetoisuudeltaan yli viiden litran pakkaukset

Tuotteeseen kosketuksessa olevista, vetoisuudeltaan yli viiden litran pakkauksista otetulla ”perusnäytteellä” tarkoitetaan edustavaa otosta kaikista näyteyksiköistä, jotka on saatu jakomenettelyn avulla ja taulukon 2 mukaisesti. Perusnäyte on muodostettava useista kappaleista.

Perusnäytteen ”kappaleella” tarkoitetaan kutakin perusnäytteeseen kuuluvaa pakkausta.

*Taulukko 2***Valittavien näyteyksiköiden vähimmäismäärä**

Erään kuuluvien pakkausten lukumäärä	Valittavien näyteyksiköiden vähimmäismäärä
Enintään 10	1
11–150	2

⁽¹⁾ Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2011/91/EU, annettu 13 päivänä joulukuuta 2011, elintarvike-erän tunnistamismerkinnöistä (EUVL L 334, 16.12.2011, s. 1).

▼ **M26**

Erään kuuluvien pakkausten lukumäärä	Valittavien näyteyksiköiden vähimmäismäärä
151–500	3
501–1 500	4
1 501–2 500	5
> 2 500, tuhatta pakkausta kohden	1 ylimääräinen näyteyksikkö

Jotta tuotteeseen kosketuksessa olevien pakkausten näytteenoton määrää voidaan pienentää, näyteyksiköiden sisältö homogenisoidaan perusnäytteen valmistamiseksi. Eri näyteyksiköiden annokset kaadetaan yhteen säiliöön ja homogenisoidaan sekoittamalla siten, että näyte suojataan ilmalta mahdollisimman hyvin.

Perusnäytteen sisältö kaadetaan useisiin, vetoisuudeltaan vähintään 1,0 litran pakkauksiin, joista jokainen muodostaa perusnäytteen kappaleen.

Jokainen jäsenvaltio voi lisätä perusnäytteiden lukumäärää omien tarpeidensa mukaan (esimerkiksi, jotta aistinvaraisen arvioinnin voi tehdä eri laboratorio kuin kemialliset analyysit, vastamäärittelyjä varten jne.).

Jokainen pakkaus on täytettävä siten, että pintaan jäävä ilmakerros on mahdollisimman pieni, ja pakkaus on suljettava asianmukaisesti ja sinetöitävä sen varmistamiseksi, että tuotetta ei voida muuttaa.

Kappaleet on merkittävä siten, että ne voidaan tunnistaa virheettömästi.

2. MÄÄRITYKSET JA TULOKSET

2.1. Kukin perusnäyte jaetaan standardissa EN ISO 5555 olevan 2.5 kohdan mukaisesti laboratorionäytteiksi, ja perusnäytteet määritetään liitteessä I b annetun päätöksentekojärjestelmän mukaisessa järjestyksessä tai muussa satunnaisessa järjestyksessä.

2.2. Jos määritysten kaikki tulokset vastaavat ilmoitetun öljyluokan ominaisuuksia, koko kyseinen erä on todettava vaatimusten mukaiseksi.

Jos määritysten yksikin tulos ei vastaa ilmoitetun öljyluokan ominaisuuksia, koko kyseinen erä on todettava vaatimusten vastaiseksi.

3. ERÄN LUOKAN TARKISTAMINEN

3.1. Toimivaltainen viranomainen voi lisätä erän eri kohdista otettujen perusnäytteiden lukumäärää erän luokan tarkistamiseksi seuraavan taulukon mukaisesti:

Taulukko 3

Erän koon mukaan määritettävä perusnäytteiden lukumäärä

Erän koko (litroina)	Perusnäytteiden lukumäärä
Alle 7 500	2
7 500:sta alle 25 000:een	3
25 500:sta alle 75 000:een	4
75 000:sta alle 125 000:een	5
125 000 ja sitä enemmän	6 + 1 kutakin 50 000:ta litraa kohden

▼ M26

Jokainen perusnäytteen muodostava näyteyksikkö on otettava samasta kohdasta erää; jokaisen perusnäytteen sijainti on merkittävä muistiin, ja siihen on laitettava selkeät tunnisteet.

Jokainen perusnäyte muodostetaan 1.1 ja 1.2 kohdassa tarkoitettujen menetelyjen mukaisesti.

Sen jälkeen jokaiselle perusnäytteelle tehdään 2 artiklan 1 kohdassa tarkoitettut määritykset.

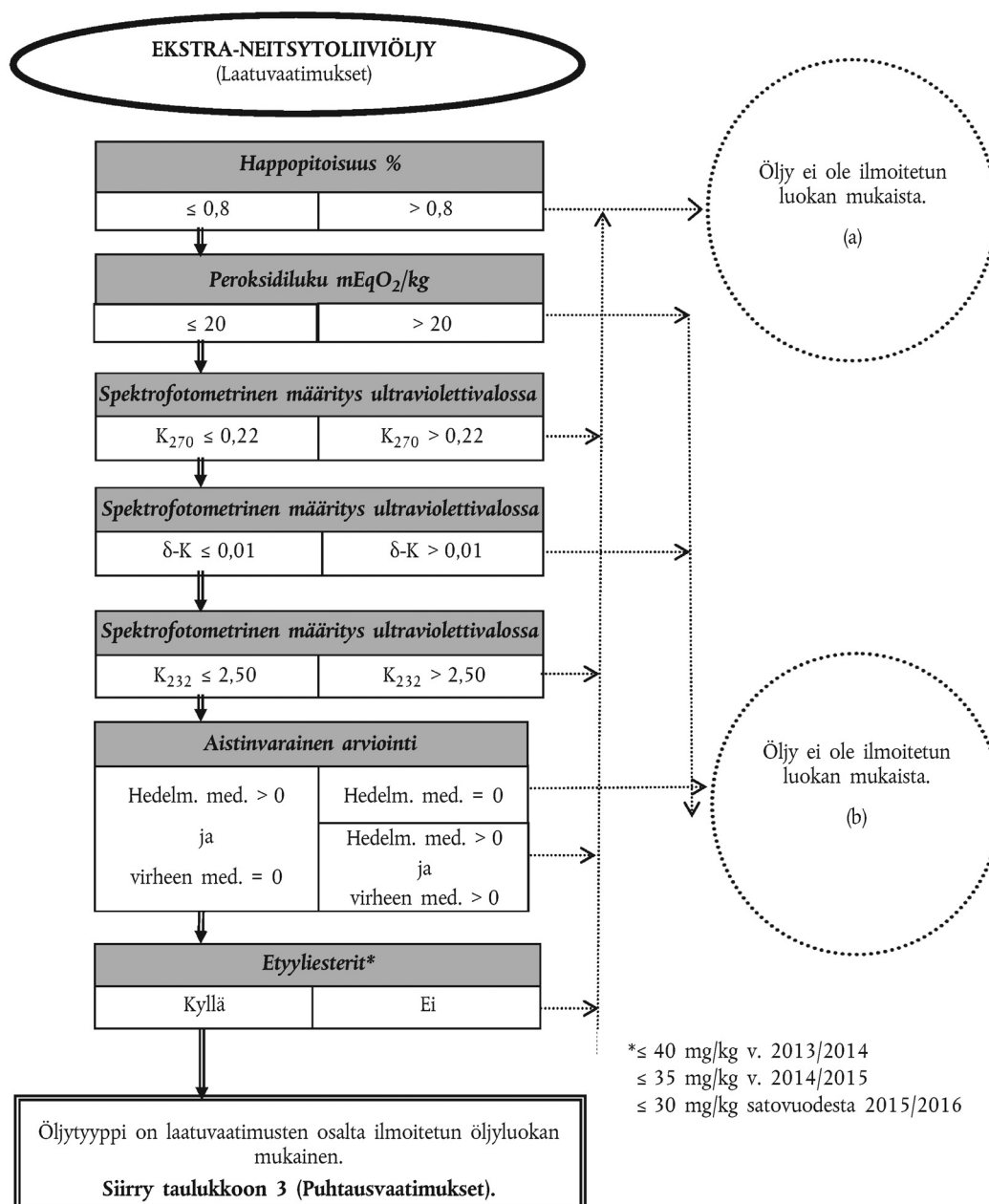
- 3.2. Jos 2 artiklan 1 kohdassa tarkoitettujen määritysten tulokset eivät vähintään yhden perusnäytteen osalta vastaa ilmoitetun öljyluokan ominaisuuksia, koko kyseinen erä on todettava vaatimusten vastaiseksi.

▼ M26

LIITE I b

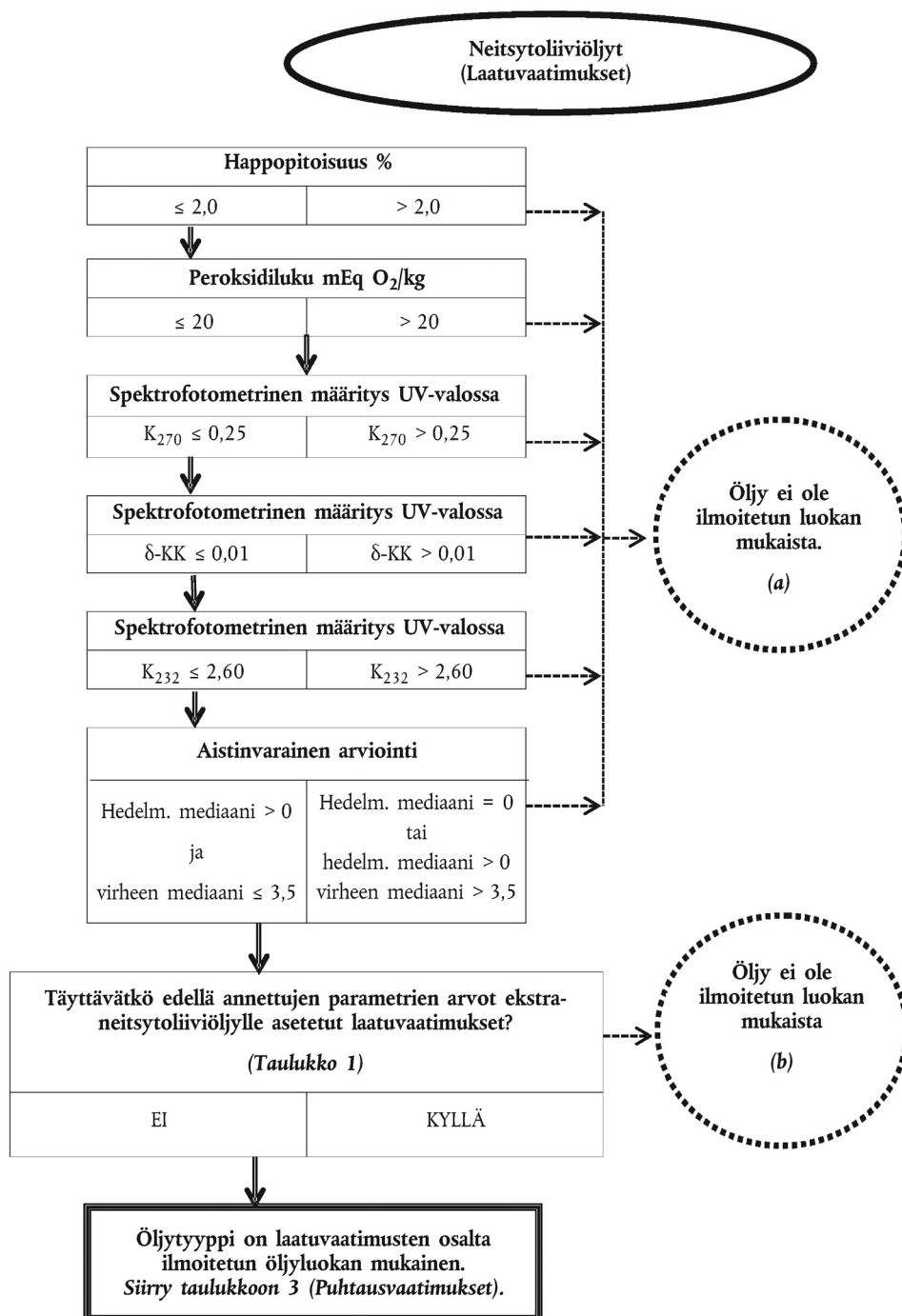
PÄÄTÖKSENTEKOJÄRJESTELMÄ SEN TODENTAMISEKSI, ONKO OLIIVIÖLJY-
NÄYTE ILMOITETUN LUOKAN MUKAINEN

Taulukko 1



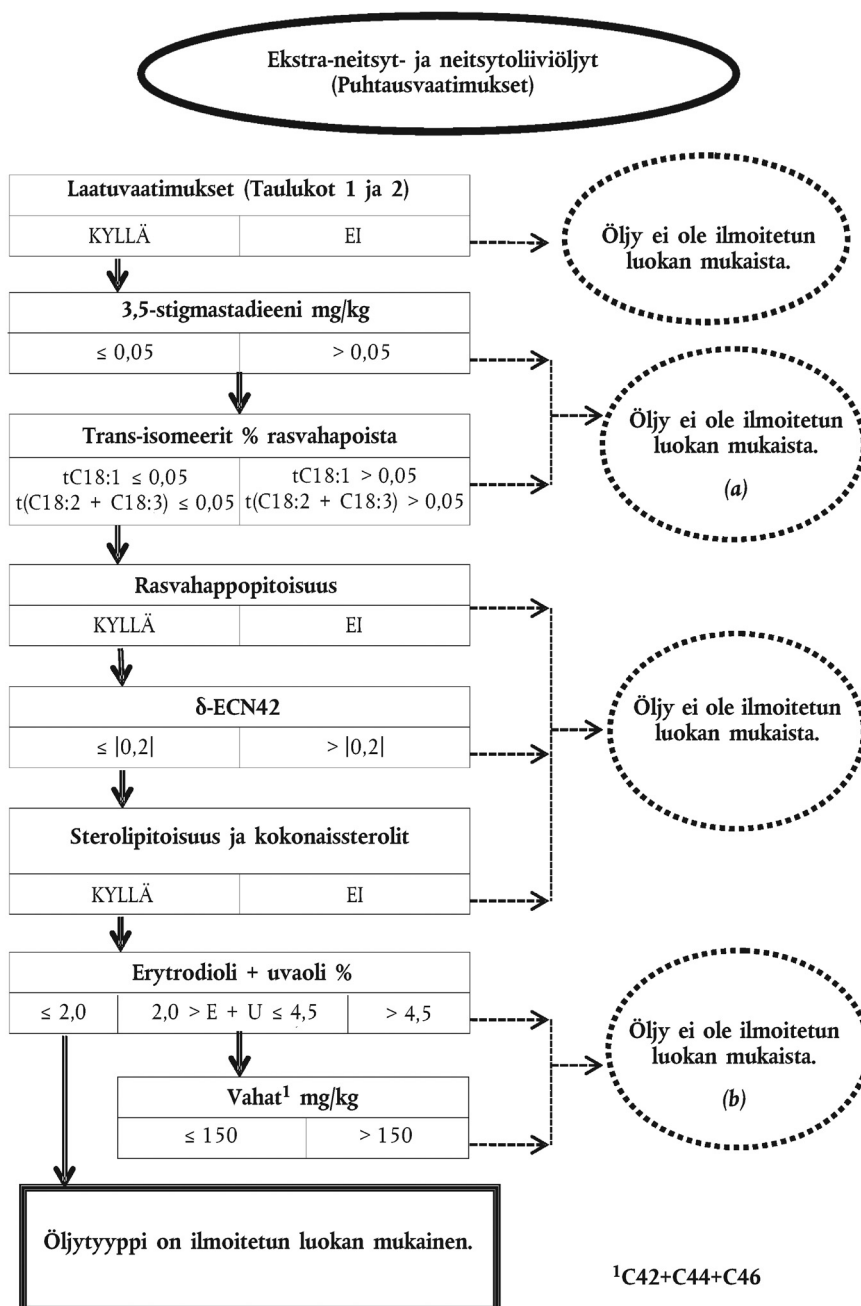
▼ M26

Taulukko 2



▼ M26

Taulukko 3



▼ **M26***Lisäys 1***Tämän asetuksen liitteiden ja päätöksentekokaaviossa tarkoitettujen määritysten väliset vastaavuudet**

— Happopitoisuus	Liite II	Vapaiden rasvahappojen määrittäminen kylmämenetelmällä
— Peroksidiluku	Liite III	Peroksidiluvun määrittäminen
— Spektrofotometrinen määrittäminen ultraviolettivalossa	Liite IX	Spektrofotometrinen määrittäminen
— Aistinvarainen arviointi	Liite XII	Neitsytoliiviöljyn aistinvarainen arviointi
— Etyyliesterit	Liite XX	Vahojen, rasvahappojen metyyliestereiden ja rasvahappojen etyyliestereiden pitoisuuksien määrittäminen kapillaarikaasukromatografisella menetelmällä
— Stigmasta-3,5-dieeni	Liite XVII	Menetelmä stigmastadieenien määrittämiseksi kasviöljyistä
— Rasvahappojen trans-isomeerit	Liite X a ja	Rasvahappojen metyyliestereiden määrittäminen kaasukromatografisella menetelmällä
	Liite X b	Rasvahappojen metyyliestereiden valmistaminen
— Rasvahappojen koostumus	Liite X a ja	Rasvahappojen metyyliestereiden määrittäminen kaasukromatografisella menetelmällä
	Liite X b	Rasvahappojen metyyliestereiden valmistaminen
— δ-ECN42	Liite XVIII	ECN42:ta sisältävien triglyseridien koostutuksen määrittäminen (teoreettisen koostumuksen ja todellisen koostumuksen välinen ero)
— Sterolien koostumus ja konaissterolit	Liite V	Sterolien ja triterpeenidialkoholien rakenteen ja pitoisuuden määrittäminen kapillaarikaasukromatografisella menetelmällä
— Erytrodioli ja uvaoli		
— Vahat	Liite IV	Vahapitoisuuden määrittäminen kapillaarikaasukromatografisella menetelmällä
— Alifaattiset alkoholit	Liite XIX	Alifaattisten alkoholien pitoisuuden määrittäminen kapillaarikaasukromatografisella menetelmällä
— 2-asemassa olevat tyydyttyneet rasvahapot	Liite VII	2-glyceryylimonopalmiitin prosenttiosuuden määrittäminen

▼B*LIITE II***▼M21****VAPAI DEN RASVAHAPPOJEN MÄÄRITTÄMINEN KYLMÄMENE-
TELMÄLLÄ****▼B****1 TARKOITUS**

Vapaiden rasvahappojen määrittäminen oliiviöljyistä. Vapaiden rasvahappojen 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 analysiilatuotetta 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 väkevyyden on tunnettava ja tarkistettava juuri ennen käyttöä. Käytetään liuosta, joka on valmistettu vähintään viisi vuorokautta ennen käyttöä ja dekantoitu ruskeaan lasipulloon, jossa on kumitulppa. Liuoksen on oltava väritöntä tai oljenkeltaista.

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

Liuos voidaan myös valmistaa ilman tislauksella 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:

▼B

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:

Oletettu happoluku	Näytemäärä (g)	Näytteen punnitustarkkuus (g)
< 1	20	0,05
1—4	10	0,02
4—15	2,5	0,01
15—75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Näyte punnitaan erlenmeyerpullossa (1.3.2).

1.4.3 Määrittys

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 Titrattu 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:

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

▼B

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 määrittelyn tulosten aritmeettinen keskiarvo.



LIITE III

PEROKSIDILUVUN MÄÄRITTÄMINEN

1 TARKOITUS

Tämä standardi kuvaa rasvojen ja öljyjen peroksidiluvun määrittämenetelmän.

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 kaasuhuhtelulla.

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

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

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

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

7 NÄYTE

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

▼ **B**

8 SUORITUS

Määrittäminen 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:

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 tärkkelysliuosta (6.5).

Samasta näytteestä tehdään kaksi määrittystä.

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 milliciekvivalentteina kilogrammaa kohti, saadaan kaavasta:

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

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.

▼ **M21***LIITE IV***VAHAPITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN KAPILLAARIKAASUKROMATOGRAFISELLA MENETELMÄLLÄ****1. TARKOITUS**

Tällä menetelmällä määritetään oliiviöljyjen vahapitoisuus. Vahat eroavat toisistaan hiiliatomien lukumäärän suhteen. Tätä menetelmää voidaan käyttää erityisesti tekemään ero puristamalla saadun oliiviöljyn ja puristemassasta saadun öljyn välillä.

2. PERIAATE

Rasva, johon on lisätty soveltuva sisäinen standardi, fraktioidaan kromatografisesti hydratoitua silikageeliä sisältävässä kolonnissa; koeolosuhteissa ensimmäisenä eluoinut jae (jonka polaarisuus on triglyseridien polaarisuutta heikompi) otetaan talteen ja määritetään suoraan kapillaarikaasukromatografian avulla.

3. VÄLINEISTÖ**3.1** Erlenmeyer-pullo, 25 ml.**3.2** Lasikolonne kaasukromatografiaa varten, sisähalkaisija 15,0 mm ja pituus 30–40 cm, varustettu hanalla.**3.3** Soveltuva kaasukromatografialaitteisto, joka toimii kapillaarikolonnin kanssa ja jossa on suoraan kolonniin johtava näytteensyöttöjärjestelmä. Laitteiston osat ovat:**3.3.1** termostaattisäätöinen lämpötilaohjelmoitu uuni kolonnille,**3.3.2** kylmäinjektor, näytteen syöttämiseksi suoraan kolonniin,**3.3.3** liekki-ionisaatiodetektor ja muuntajavahvistin,**3.3.4** integroiva piirturi, joka toimii muuntajavahvistimen (3.3.3) kanssa ja jonka vastenopeus on enintään 1 sekunti ja jonka paperin nopeutta voidaan säätää. (On myös mahdollista käyttää tietokonepohjaisia järjestelmiä, joissa kaasukromatografian tiedot saadaan tietokoneen avulla.)**3.3.5** lasinen tai kvartsilasinen kapillaarikolonne, jonka pituus on 8–12 m ja sisähalkaisija 0,25–0,32 mm ja jonka sisäpinta on päällystetty stationäärrifaasilla siten, että nestekerroksen paksuus on 0,10–0,30 µm. (Käyttövalmiina ostettavat stationäärrifaasit ovat tyyppiä SE 52 tai SE 54.)**3.4** Mikroruisku, kolonniin suoraan syöttämiseksi, 10 µl, jossa on kiinteä neula.**3.5** Sähkökäyttöinen sekoittaja.**3.6** Pyöröhaihduttaja.**3.7** Muhveliuuni.**3.8** Analyysivaaka, jonka tarkkuus $\pm 0,1$ mg.**3.9** Laboratorion tavanomaiset lasivälineet.**4. REAGENSIT****4.1** Silikageeliä, jonka hiukkaskoko 60–200 µm.

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

▼ **M21**

- 4.2 N-heksaani, kromatografialaatus.
- 4.3 Etyylieetteriä, kromatografialaatus.
- 4.4 N-heptaani, kromatografialaatus.
- 4.5 Lauryyliarakidaatin standardiliuos, 0,1 % (m/V) liuos heksaanissa (sisäisen standardin). (On myös mahdollista käyttää palmityylylipalmiitaattia tai myristyylistearaattia.)
- 4.5.1 *Sudan 1 (1-fenyylitso)-2-naftoli*.
- 4.6 Kantajakaasut: vety tai helium, kaasukromatografista laatus.
- 4.7 Apukaasut:
- puhdas vety, kaasukromatografialaatus,
 - puhdas ilma, kaasukromatografialaatus.

5. SUORITUS

5.1 **Kromatografiakolonnin esikäsittely**

Suspendoidaan 15 g silikageeliä (4.1) n-heksaaniin (4.2) ja laitetaan kolonniin (3.2). Annetaan laskeutua itsestään ja autetaan laskeutumista sähkökäyttöisellä sekoittajalla (3.5), jotta saadaan homogeenisempi kromatografiakerros. Suodatetaan läpi 30 ml n-heksaania mahdollisten epäpuhtauksien poistamiseksi. Punnitaan vaa'alla (3.8) tarkasti 500 mg näytettä 25 ml:n erlenmeyerpulloon (3.1), lisätään sopiva määrä sisäistä standardia (4.5) oletetun vahapitoisuuden mukaan. Esimerkiksi: lauryyliarakidaattia lisätään 0,1 mg, jos on kyse oliiviöljystä, ja 0,25–0,5 mg, jos kyse on puristemassaöljystä. Siirretään näin valmistettu näyte kahden 2 ml:n n-heksaaniannoksen avulla kromatografiakolonnin (4.2).

Liottimen annetaan valua, kunnes se on 1 mm absorboimisaineen pinnan yläpuolella, minkä jälkeen suodatetaan läpi 70 ml n-heksaania luonnostaan esiintyvien n-alkaanien poistamiseksi. Aloitetaan kromatografinen eluointi keräämällä 180 ml n-heksaani/etyylieetteriseosta, suhde 99:1, valumisnopeuden ollessa noin 15 tippaa 10 sekunnissa. Näyte eluoidaan lämpötilassa $22\text{ °C} \pm 4$.

Huom. — N-heksaani/etyylieetteriseos, suhde 99:1, on valmistettava uudelleen joka päivä.

- Vahojen eluoitumisen tarkkailemiseksi silmämääräisesti liuosnäytteeseen on mahdollista lisätä 100 µl 1-prosenttista sudania eluutioliuoksessa. Koska sudanin retentioaika sijoittuu vahojen ja triglyseridien välille, eluointi keskeytetään, kun väri saavuttaa kromatografiakolonnin pohjan, sillä tällöin kaikki vahat ovat eluoituneet.

Tällä tavoin saatu jae kuivataan pyöröhaihduttimessa (3.6), kunnes lähes kaikki liuotin on saatu poistettua. Viimeiset 2 ml liuotinta poistetaan heikon typpivirtauksen avulla, minkä jälkeen lisätään 2–4 ml n-heptaania.

5.2 **Kaasukromatografinen määrittäminen**5.2.1 *Esivalmistelut*

Kolonnin asennetaan kaasukromatografiin (3.3) siten, että alkupää yhdistetään on-column -järjestelmään ja loppupää detektoriin. Tarkistetaan kaasukromatografialaitteiden toimivuus (kaasuliitäntöjen kunto, detektorin ja piirturijärjestelmän suoritusteho jne.).

▼ **M21**

Jos kolonnia ei ole aikaisemmin käytetty, se on ensin valmisteltava käyttöön. Kevyt kaasuvirtaus johdetaan kolonnin läpi ja kaasukromatografia käynnistetään. Lämmitetään asteittain siten, että lämpötila on noin neljän tunnin kuluttua kohonnut 350 °C:een. Tätä lämpötilaa pidetään yllä vähintään kaksi tuntia, jonka jälkeen laitteisto säädetään käyttöolosuhteisiin (kaasuvirtojen säätö, liekin sytytys, kytkeminen elektroniseen piirturiin (3.3.4), uunin lämpötilan säätö kolonnin varten, detektorin lämpötilasäätö jne.) ja signaali säädetään niin, että sen herkkyys on vähintään kaksi kertaa niin suuri kuin on arvioitu määrittämissä tarvittavan. Saadun pohjaviivan on oltava suora, siinä ei saa olla minkäänlaisia piikkejä eikä ryömintää mihinkään suuntaan.

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

5.2.2 *Toimintaolosuhteiden valinta*

Yleisesti kromatografia tehdään seuraavissa käyttöolosuhteissa:

— kolonnin lämpötila:

	20 °C minuu- tissa		5 °C minuu- tissa		20 °C minuu- tissa	
aluksi 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10')

— detektorin lämpötila: 350 °C,

— injektoidun aineen määrä: 1 µl n-heptaaniliuosta (2–4 ml),

— kantajakaasut: helium tai vety valitun kaasun optimaalisella lineaarisuudella (ks. lisäys),

— laitteen herkkyys siten että seuraavat edellytykset täyttyvät:

Näitä olosuhteita voidaan muuttaa kolonnin ja kaasukromatografian ominaisuuksien perusteella, jotta kaikki vahat saadaan erotettua, jotta piikkien erotuskyky on riittävä (ks. kuva) ja jotta sisäisen standardin C₃₂ retentio-aika on 18 ± 3 minuuttia. Edustavimpien vahojen piikin on oltava vähintään 60 % asteikon pohjasta.

Piikkien integrointiparametrit asetetaan niin, että huomioon otettavien piikkien pinta-alat voidaan arvioida oikein.

Huom. Koska lopullinen lämpötila on korkea, sallitaan positiivinen siirtymä, joka saa kuitenkin olla enintään 10 % asteikon alarajasta.

5.3 **Määrittäminen**

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

Piirturi pidetään käynnissä, kunnes vahat ovat eluoituneet täydellisesti.

▼ **M21**

Pohjaviivan on koko ajan oltava vaatimusten mukainen.

5.4 **Piikkien tunnistaminen**

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

Kuva 1 esittää neitsytoliiviöljyn vahojen kromatogrammia.

5.5 **Kvantitatiivinen arviointi**

Sisäisen standardin ja C₄₀–C₄₆ -alifaattisten esterien piikkien pinta-alat lasketaan integraattorilla.

Lasketaan kunkin esterin vahapitoisuus, ilmoitettuna mg/kg rasvaa, seuraavasti:

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

jossa:

A_x = kunkin esterin piikin pinta-ala neliömillimetreinä

A_s = kunkin sisäisen standardin piikin pinta-ala neliömillimetreinä

m_s = lisätyn sisäisen standardin massa milligrammoina

m = määritystä varten otetun näytteen massa grammoina.

6. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

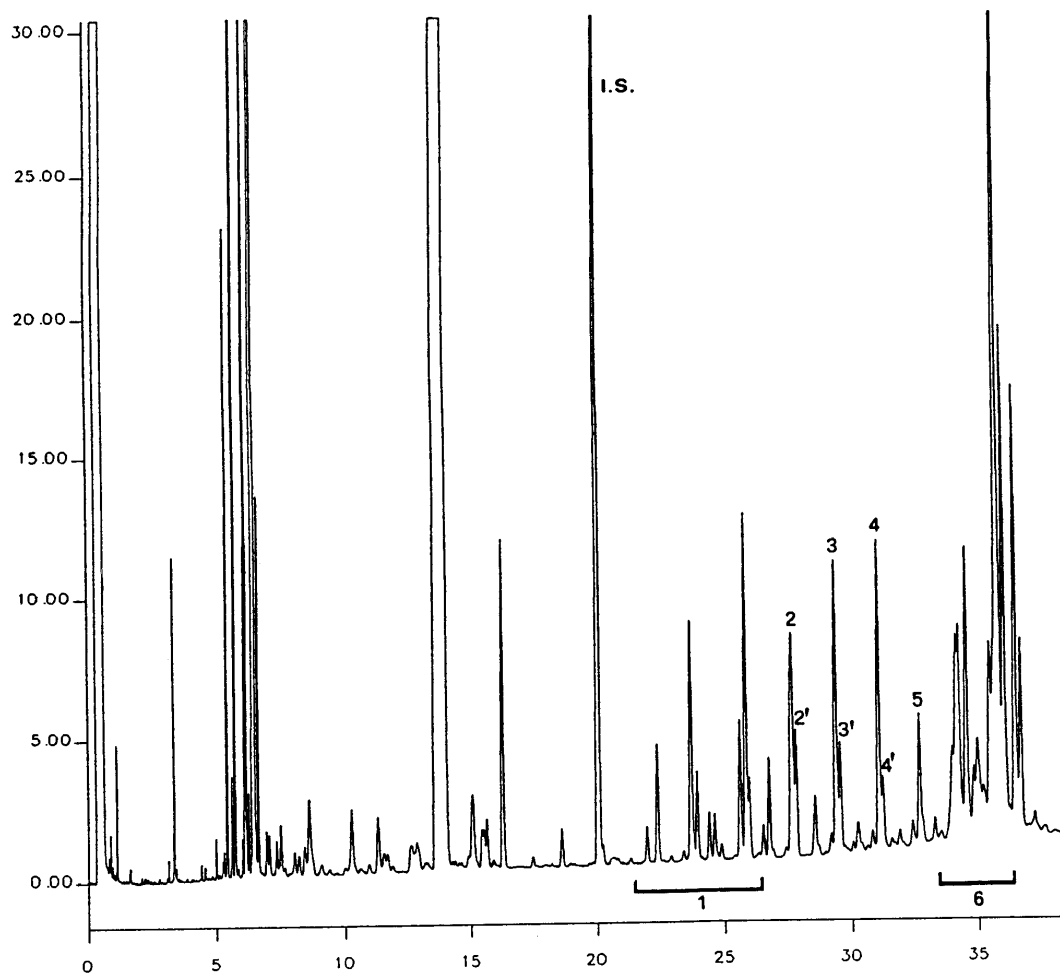
C₄₀–C₄₆:n eri vahojen pitoisuuksien summa ilmoitetaan mg/kg rasvaa (ppm).

Huom. Määritetään piikkien pinta-aloista niiden komponenttien määrät, joissa on parillinen määrä C-atomeja välillä C₄₀–C₄₆, jäljempänä olevassa kuvassa esitetyn oliiviöljyn vahojen kromatogrammin mukaisesti. Jos C₄₆-esteri esiintyy kahtena piikkinä, sen tunnistamiseksi on syytä analysoida oliivipuristemassaöljyn vahojen jae, jossa C_{46:n} piikki on helppo tunnistaa, koska se on selvästi hallitsevin.

Tulokset ilmoitetaan yhden desimaalin tarkkuudella.

▼ M21

KUVA

Oliiviöljyn vahojen kromatogrammi ⁽¹⁾

Merkkien selitykset::

I.S. = lauryyliarakidaatti

1 = diterpeniesterit

2 + 2' = C₄₀-esterit3 + 3' = C₄₂-esterit4 + 4' = esterit C₄₄5 = C₄₆-esterit

6 = steroliesterit ja triterpeenialkoholi.

⁽¹⁾ Kun steroliesterit ovat eluotuneet, kromatogrammissa ei saa olla merkittäviä piikkejä (triglyseridit).

▼ M21*Lisäys***Kaasun lineaarinopeuden määrittäminen**

Injektoidaan 1–3 µl metaania (tai propaania) tavanomaisiin käyttöolosuhteisiin säädettyyn kaasukromatografialaitteistoon. Mitataan aika, jonka kaasu kulkee kolonnin läpi, alkaen injektiohetkestä piikin muodostumiseen (t_M).

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

▼ **M26***LIITE V***STEROLIEN JA TRITERPEENIDIALKOHOLIEN RAKENTEEN JA PI-
TOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN KAPILLAARIKAASUKROMATO-
GRAFISELLÄ MENETELMÄLLÄ****1. TARKOITUS**

Tällä menetelmällä voidaan määrittää yksittäisten sterolien ja triterpeenidialkoholien määrät ja niiden kokonaismäärä oliiviöljyissä ja oliivin puristemassaöljyissä.

2. PERIAATE

Öljy, johon on lisätty α -kolestanoli sisäiseksi standardiksi, saippuoidaan kaliumhydroksidin etanoliliuoksella ja saippuotumaton aines uutetaan etyylieetterillä.

Steroli- ja triterpeenidialkoholifraktio erotetaan saippuotumattomasta aineksesta ohutkerroskromatografialla käyttämällä emäksistä silikageelilevyä. Silikageelistä saadut fraktiot muutetaan trimetyylisilyylieetteriksi ja määritetään sen jälkeen kapillaarikaasukromatografialla.

3. VÄLINEISTÖ

Tavalliset laboratoriovälineet, erityisesti seuraavat:

- 3.1. Pullo, 250 ml, jossa on hiokset ja palautusjäähdytin.
- 3.2. Erotussuppilo, 500 ml.
- 3.3. Pulloja, 250 ml.
- 3.4. Ohutkerroskromatografialaitteisto (TLC), jonka levyjen koko on 20 × 20 cm.
- 3.5. Ultraviolettilvalo, jonka aallonpituus on 254 tai 366 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 5 cm ja jossa on liitäntä tyhjiösuodattusta varten sekä koirashios.
- 3.8. Tyhjiöimupullo, 50 ml, jossa on suodatinsuppiloon (3.7 kohta) sopiva naarashios.
- 3.9. Koeputki, 10 ml, jossa on kartiomainen pohja ja ilmatiivis lasitulppa.
- 3.10. Kaasukromatografi, jota käytetään kapillaarikolonnin ja jakoinjektiojärjestelmän kanssa ja jonka osat ovat
 - 3.10.1. termostaattisäätöinen kolonniuuni, joka säilyttää halutun lämpötilan noin ± 1 °C:n tarkkuudella,
 - 3.10.2. injektoriyksikkö, jonka lämpötilaa voi säätää, jonka höyrystämisosaa on persilanoitua lasia ja jossa on virtauksenjakojärjestelmä,
 - 3.10.3. liekki-ionisaatiodektori (FID),
 - 3.10.4. tiedonkeruujärjestelmä, joka sopii käytettäväksi FID-detektorin kanssa (3.10.3 alakohta) ja jonka voi integroida manuaalisesti.
- 3.11. Kvartsilasinen kapillaarikolonne, jonka pituus on 20–30 m ja sisähalkaisija 0,25–0,32 mm ja jonka sisäpinta on päällystetty yhdisteellä, jossa on 5 prosenttia bifenyylia ja 95 prosenttia dimetyylipolysiloksaanina (SE-52 tai SE-54 stationäärijaasi tai vastaava) siten, että päällysteen paksuus on kauttaaltaan 0,10–0,30 µm.

▼ **M26**

- 3.12. Jakoinjektioon sopiva kiinteäneulallinen mikroruisku, 10 µl, kaasukromatografiaa varten.
- 3.13. Kalsiumkloridia sisältävä eksikkaattori.
4. REAGENSsit
- 4.1. Vähintään 85-prosenttinen kaliumhydroksidi.
- 4.2. Kaliumhydroksidin noin 2 N etanoliliuos.

130 g kaliumhydroksidia (4.1 kohta) liuotetaan 200 ml:aan tislattua vettä samalla jäähdyttäen ja lisätään etanolia (4.10 kohta) niin, että liuosta on yksi litra. Liuosta säilytetään tiiviisti suljetuissa, tummasta lasista valmistetuissa pulloissa enintään kahden päivän ajan.
- 4.3. Etyylieetteri, analyysilaatua.
- 4.4. Kaliumhydroksidin noin 0,2 N etanoliliuos.

13 g kaliumhydroksidia (4.1 kohta) liuotetaan 20 ml:aan tislattua vettä ja lisätään etanolia (4.10 kohta) niin, että liuosta on yksi litra.
- 4.5. Vedetön natriumsulfaatti, analyysilaatua.
- 4.6. Silikageelillä päällystetyt lasilevyt (20 x 20 cm), paksuudeltaan 0,25 mm, ilman fluoresenssi-indikaattoria (voidaan ostaa käyttövalmiina).
- 4.7. Toluenei, kromatografialaatua.
- 4.8. Asetoni, kromatografialaatua.
- 4.9. *n*-Heksaani, kromatografialaatua.
- 4.10. Etyylieetteri, kromatografialaatua.
- 4.11. Etanoli, analyysilaatua.
- 4.12. Etyyliasettaatti, analyysilaatua.
- 4.13. Ohutkerroskromatografian vertailuliuos: kolesterolin tai fytosterolin ja erytrodinolin viisiprosenttinen etyyliasettaattiliuos (4.11 kohta).
- 4.14. 2,7-dikloorifluoreseiini, 0,2-prosenttinen etanoliliuos. Liuos tehdään lievästi emäksiseksi lisäämällä muutama tippa kaliumhydroksidin 2 N alkoholiliuosta (4.2 kohta).
- 4.15. Vedetön pyridiini, kromatografialaatua (ks. huomautus 5).
- 4.16. Heksametyylidisilatsaani, analyysilaatua.
- 4.17. Trimetyylikloorisilaani, analyysilaatua.
- 4.18. Sterolien trimetyylisilylieettereiden (TMSE) näyteliuokset.

Ne valmistetaan vasta käyttöhetkellä steroleista ja erytrodinolist, jotka saadaan niitä sisältävistä öljyistä.
- 4.19. α -Kolesteroli, puhtausaste yli 99 prosenttia (puhtausaste on tarkastettava kaasukromatografisella määrittelyksellä).
- 4.20. α -Kolestanoli, sisäisen standardin mukainen liuos, 0,2-prosenttisena (m/v) etyyliasettaattiliuksena (4.11 kohta).
- 4.21. Fenoliftaleiini, 10 g liuotettuna litraan etanolia (4.10 kohta).
- 4.22. Kantajakaasut: vety tai helium, kaasukromatografista laatua.
- 4.23. Apukaasut: vety, helium, typi ja ilma, kaasukromatografista laatua.

▼ **M26**

4.24. *n*-Heksaanin (4.9 kohta) ja etyylietterin (4.10 kohta) seos 65:35 (v/v).

4.25. Silylointireagenssi, jossa on pyridiiniä, heksametyylidisilatsaania ja trimetyylikloorisilaania tilavuussuhteessa 9:3:1.

5. MENETTELY

5.1. Saippuoitumattomien aineiden esikäsittely

5.1.1. 250 ml:n pulloon (3.1 kohta) lisätään 500 µl:n mikroruiskulla (3.6 kohta) sellainen tilavuusmäärä α -kolestanolin sisäisen standardin mukaista liuosta (4.20 kohta) jonka sisältämä kolestanolin määrä on noin 10 prosenttia sterolin määrästä näytteessä. Esimerkiksi 5 gramman oliiviöljynäytteeseen lisätään 500 µl α -kolestanoliliuosta (4.20 kohta), ja jos näytteenä on oliivin puristemassaöljyä, lisätään 1 500 µl α -kolestanoliliuosta. Haihdutetaan kuiviin kevyessä typpivirrassa lämpimässä vesihauteessa ja pullon jäähdyttyä punnitaan $5 \pm 0,01$ g kuivatua, suodatettua näytettä samaan pulloon.

Huom. 1: Eläin- ja kasvipäriset rasvat ja öljyt, jotka sisältävät paljon kolesterolia, voivat tuottaa piikin, jonka retentioaika on lähes 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 (4.2 kohta) ja hohkakiveä, käynnistetään palautusjäähdytin ja kuumennetaan vesihauhteessa 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 (3.2 kohta) käyttämällä useita annoksia tislattua vettä (50 ml). Lisätään noin 80 ml etyylietteriä (4.10 kohta), ravistetaan voimakkaasti noin 60 sekunnin ajan siten, että paine poistetaan ajoittain kääntämällä erotussuppilo ylösalaisin ja avaamalla tulppa. Annetaan seistä, kunnes kaksi faasia ovat täysin erottuneet (huomautus 2).

Sen jälkeen saippuuliuos otetaan mahdollisimman tarkoin toiseen erotussuppiloon. Vesi-alkoholifaasi uutetaan vielä kaksi kertaa samalla tavoin käyttämällä 60–70 ml etyylietteriä (4.10 kohta).

Huom. 2: Mahdollinen emulsio voidaan hajottaa lisäämällä pieni määrä etanolia (4.11 kohta).

5.1.4. Yhdistetään kolme eetteriuutetta yhteen erotussuppiloon, joka sisältää 50 ml vettä. Pestään vedellä (50 ml kerralla), kunnes pesuvesi ei enää saa vaaleanpunaista väriä, kun siihen lisätään tippa fenoliftaleiiniiliuosta (4.21 kohta).

Kun pesuvesi on poistettu, suodatetaan vedettömän natriumsulfaatin (4.5 kohta) läpi etukäteen punnittuun 250 ml:n pulloon ja pestään suppilo ja suodatin pienillä määrillä etyylietteriä (4.10 kohta).

5.1.5. Liuotin haihdutetaan haihduttimessa 30 °C lämpötilassa tyhjiössä. Lisätään 5 ml asetonia, ja haihtuva liuotin poistetaan kokonaan kevyessä ilmavirrassa. Jäännöstä kuivatetaan lämpökaapissa 103 ± 2 °C:n lämpötilassa 15 minuutin ajan. Jäähdytetään eksikkaattoreissa ja punnitaan 0,1 mg:n tarkkuudella.

▼ **M26**

5.2. Steroli- ja triterpeenidialkoholifraktion (erytrodoli + uvaoli) erottaminen

5.2.1. Emäksisten levyjen valmistelu ohutkerroskromatografiaa varten: silikaageelilevyt (4.6 kohta) upotetaan kaliumhydroksidin 0,2 N etanoliliuokseen (4.5 kohta) noin neljän senttimetrin syvyyteen kymmeneksi sekunniksi, minkä jälkeen niiden annetaan kuivua kaksi tuntia vetokaapissa ja lopuksi yksi tunti 100 °C:ssa lämpökaapissa.

Kun levyt on otettu lämpökaapista, niitä säilytetään kalsiumkloridia sisältävässä eksikkaattorissa (3.13 kohta) käyttöhetkeen saakka (näin käsitellyt levyt on käytettävä 15 päivän kuluessa).

Huom. 3: Kun sterolifraktion erottamiseen käytetään emäksisiä silikaageelilevyjä, ei ole tarpeen käsitellä saippuoitumattomia aineita alumiinioksidilla. Näin kaikki happamat aineet (rasvahapot ja muut hapot) jäävät lähtöviivalle. Sterolivyöhyke erottuu selvästi alifaattisten ja triterpeenisten alkoholien vyöhykkeestä.

5.2.2. Heksaani-etyylieetteriseosta (4.24 kohta) (huomautus 4) kaadetaan kehitysastiaan niin, että sitä on noin 1 cm. Kehitysastia suljetaan sopivalla kannella ja annetaan seistä avaamatta vähintään puoli tuntia, jotta syntyy neste-höyrytasapaino. Astian sisäseinille voidaan kiinnittää suodatinpaperisuikaleita, jotka ulottuvat eluointiaineeseen. Tämä lyhentää kehitysaikaa lähes kolmanneksella ja aineosat eluotuvat tasaisemmin.

Huom. 4: Kehitysluos on vaihdettava uuteen ennen jokaista koetta, jotta eluointiolosuhteet olisivat täysin toistettavissa. Vaihtoehtoisena liuottimena voidaan käyttää n-heksaani-etyylieetteriseosta (50:50, v/v).

5.2.3. Saippuoitumattomista aineista (5.1.5 alakohta) valmistetaan noin 5-prosenttinen etyliasetaattiliuos (4.12 kohta), jota levitetään 0,3 ml ohuena ja tasaisena nauhana 100 µl:n mikroruiskulla kromatografialevyn (5.2.1 alakohta) alareunaan (2 cm). Asetetaan 2–3 µl aineiden vertailuliuosta (4.13 kohta) lähtöviivan tasalle niin, että steroli ja triterpeenidialkoholit voidaan tunnistaa kehityksen jälkeen.

5.2.4. Levy asetetaan kehitysastiaan, joka on valmisteltu 5.2.2 alakohdan ohjeiden mukaan. Ympäristön lämpötilan on oltava 15–20 °C (huomautus 5). Astian kansi suljetaan heti ja annetaan levyn eluotua, kunnes liuotinrintama on siirtynyt noin 1 cm:n päähän levyn yläreunasta. Levy otetaan kehitysastiasta ja liuotin haihdutetaan kuumassa ilmavirrassa tai panemalla levy joksikin aikaa vetokaappiin.

Huom. 5: Korkeampi lämpötila voi haitata erottelua.

5.2.5. Levylle suihkutetaan ohuelti ja tasaisesti 2,7-dikloorifluoreseiiniliuosta (4.14 kohta), ja se jätetään kuivumaan. Sterolin ja triterpeenidialkoholien vyöhykkeet voidaan tunnistaa ultraviolettivalossa kohdistamalla ne vertailuliuoksesta (4.13 kohta) syntyneisiin pisteisiin. Vyöhykkeiden ääriviivat merkitään mustalla kynällä fluoresenssin rajoja seuraten (ks. kuva 3, TLC-levy).

5.2.6. Silikageelikerros raaputetaan merkityltä alueelta metallilastalla. Saatu aines hienonnetaan, siirretään suodatinsuppiloon (3.7 kohta), lisätään 10 ml kuumaa etyliasetaattia (4.12 kohta), sekoitetaan huolellisesti metallilastalla ja suodatetaan tyhjiössä. Suodos kerätään suodatinsuppiloon liitettyyn erlenmeyerpulloon (3.8 kohta).

▼ **M26**

Pulloon jäänyt aines pestään kolme kertaa noin 10 ml:lla etyylietteriä (4.3 kohta), ja suodos kerätään samaan, suodatinsuppiloon liitettyn pulloon. Suodosta haihdutetaan, kunnes sen tilavuus on noin 4–5 ml, ja jäännösluos kaadetaan etukäteen punnittuun 10 ml:n koeputkeen (3.9 kohta). Liuosta kuivataan alhaisella lämmöllä kevyessä typpivirrassa; jäännös liuotetaan muutama tippaan asetonia (4.8 kohta) ja kuivataan jälleen.

Koeputkessa olevan jäännöksen on sisällettävä steroli- ja triterpeenidi-alkoholifraktio.

5.3. Trimetyylisilylieettereiden valmistus

5.3.1. Koeputkessa olevaan steroli- ja triterpeenifraktioon lisätään 50 µl silylointireagenssia (4.25 kohta) (huomautus 6) jokaista koeputkessa olevaa sterolien ja triterpeenidialkoholien milligrammaa kohti niin, että kosteutta ei pääse mukaan (huomautus 7).

Huom. 6: Käyttövalmiita liuoksia on kaupan. Saatavana on myös muita silylointireagensseja, kuten esim. bistrimetyylisilylitrifluoriasetamidi + 1 % trimetyylikloorisilaania; reagenssi laimennetaan samalla määrällä vedetöntä pyridiiniä.

Pyridiini voidaan korvata samalla määrällä asetonitriiliä.

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

Huom. 7: Lievä sameus on tavallista eikä ole haitaksi. Valkoiset hiutaleet tai vaaleanpunaiseksi värjäytyminen ovat merkkejä kosteudesta tai reagenssien muuttumisesta. Jos näitä ilmenee, koe on uusittava (ainoastaan käytettäessä heksametyylidisilatsaania tai trimetyylikloorisilaania).

5.4. Kaasukromatografinen määrittäminen

5.4.1. Esivalmistelut ja kapillaarikolonin valmistelu

5.4.1.1. Kolonni (3.11 kohta) asennetaan kaasukromatografialaitteistoon kiinnittämällä kolonnin alkupää jakoinjektoriin ja kolonnin loppupää 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 (huomautus 8). Korkeaa lämpötilaa pidetään yllä vähintään kaksi tuntia, minkä jälkeen kromatografialaitteisto saatetaan käyttövalmiiksi (kaasuvirran ja erotuksen säätö, liekinsytytys, tietojärjestelmän kytkeminen, kolonnin, 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.

▼M26

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

Huom. 8: Esivalmistelulämpötilan on aina oltava vähintään 20 °C alempi kuin käytetyn stationäärifaasin korkein lämpötila.

5.4.2. Toimintaolosuhteiden valinta

5.4.2.1. Käyttöolosuhteiden ohjeet ovat seuraavat:

- kolonnin lämpötila: 260 ± 5 °C,
- injektorin lämpötila: 280–300 °C,
- detektorin lämpötila: 280–300 °C,
- kantajakaasun lineaarinopeus: heliumille 20–35 cm/s ja vedylle 30–50 cm/s,
- jakosuhte: 1:50–1:100,
- laitteiston herkkyys: 4–16 kertaa vähimmäisvaimennus,
- rekisteröintiherkkyys: 1–2 mV täydestä asteikosta,
- injektoidun aineen määrä: 0,5–1 µl TMSE-liuosta.

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

- β-sitosterolipiikin retentioaika on 20 ± 5 minuuttia,
- kampesterolipiikki: oliiviöljylle (pitoisuus keskimäärin 3 %) 20 ± 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 suhteellisen retentioajan (RRT) 1,02 piikki (sitostanoli) pystytään mittaamaan kohtisuoraan.

5.4.3. Määrittäminen

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

Myös automaattista injektoria voidaan käyttää.

5.4.3.2. Rekisteröintiä jatketaan, kunnes näytteessä olevien triterpeenidialkoholien TMSE on kokonaan eluoitunut. Perusviivan on koko ajan oltava 5.4.1.2 alakohdan vaatimusten mukainen.

5.4.4. Piikkien tunnistaminen

Yksittäiset piikit tunnistetaan niiden retentioajan perusteella sekä vertaamalla sterolien ja triterpeenidialkoholien TMSE-seokseen, joka on määritetty samoissa olosuhteissa (ks. lisäys).

▼ **M26**

Sterolit ja triterpeenidialkoholit eluotuvat seuraavassa järjestyksessä: kolesteroli, brassikasteroli, ergosteroli, 24-metyleenikolesteroli, kampesteroli, kampestanoli, stigmasteroli, δ -7-kampesteroli, δ -5,23-stigmastadienoli, klerosteroli, β -sitosteroli, sitostanoli, δ -5-avenasteroli, δ -5,24-stigmastadienoli, δ -7-sigmastanoli, δ -7-avenasteroli, erytrodioli ja uvaoli.

β -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 sekä sterolien ja triterpeenidialkoholien piikkien pinta-alat tietojärjestelmän avulla. Sellaisten aineiden piikit jätetään huomiotta, jotka eivät esiinny taulukossa 1 (ergosterolin piikkiä ei lasketa). α -Kolestanolin vastekerroin on 1.

5.4.5.2. Lasketaan yksittäisten sterolien pitoisuus mg/kg:ssa rasvaa tai öljyä seuraavasta kaavasta:

$$\text{steroli } x = \frac{A_x \times m_s \times 1\,000}{A_s \times m}$$

jossa:

A_x = x-sterolin piikin pinta-ala, tietojärjestelmällä laskettuna;

A_s = α -kolestanolin piikin pinta-ala, tietojärjestelmällä laskettuna;

m_s = lisätyn α -kolestanolin massa milligrammoina;

m = määrittämiseen käytetyn näytteen massa grammoina.

6. TULOSTEN ESITTÄMINEN

6.1. Ilmoitetaan yksittäisten sterolien pitoisuus mg/kg:ssa rasvaa tai öljyä ja niiden pitoisuuksien yhteismäärä, ”kokonaisssterolimäärä”.

Yksittäisten sterolien sekä erytrodiolin ja uvaolin pitoisuudet ilmaistaan yhden desimaalin tarkkuudella.

Kokonaisssterolimäärä on ilmaistava kokonaislukuna.

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

$$\text{steroli } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

jossa:

A_x = x:n piikin pinta-ala;

ΣA = kaikkien sterolien piikkien yhteenlaskettu pinta-ala.

6.3. Näennäinen β -sitosterolipitoisuus: δ -5-23-stigmastadienoli + klerosteroli + β -sitosteroli + sitostanoli + δ -5-avenasteroli + δ -5-24-stigmastadienoli.

▼ M26

- 6.4. Lasketaan erytrodiolin ja uvaolin prosentuaalinen osuus:

$$\text{Erytrodioli + uvaoli} = \frac{\text{Er} + \text{Uv}}{\text{Er} + \text{Uv} + \Sigma\text{A}} \times 100$$

jossa

ΣA = sterolin kokonaispinta-ala, tietojärjestelmällä laskettuna;

Er = erytrodiolin pinta-ala tietojärjestelmällä laskettuna;

Uv = uvaolin pinta-ala tietojärjestelmällä laskettuna.

▼ **M26***Lisäys***Kaasun lineaarinopeuden määrittäminen**

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

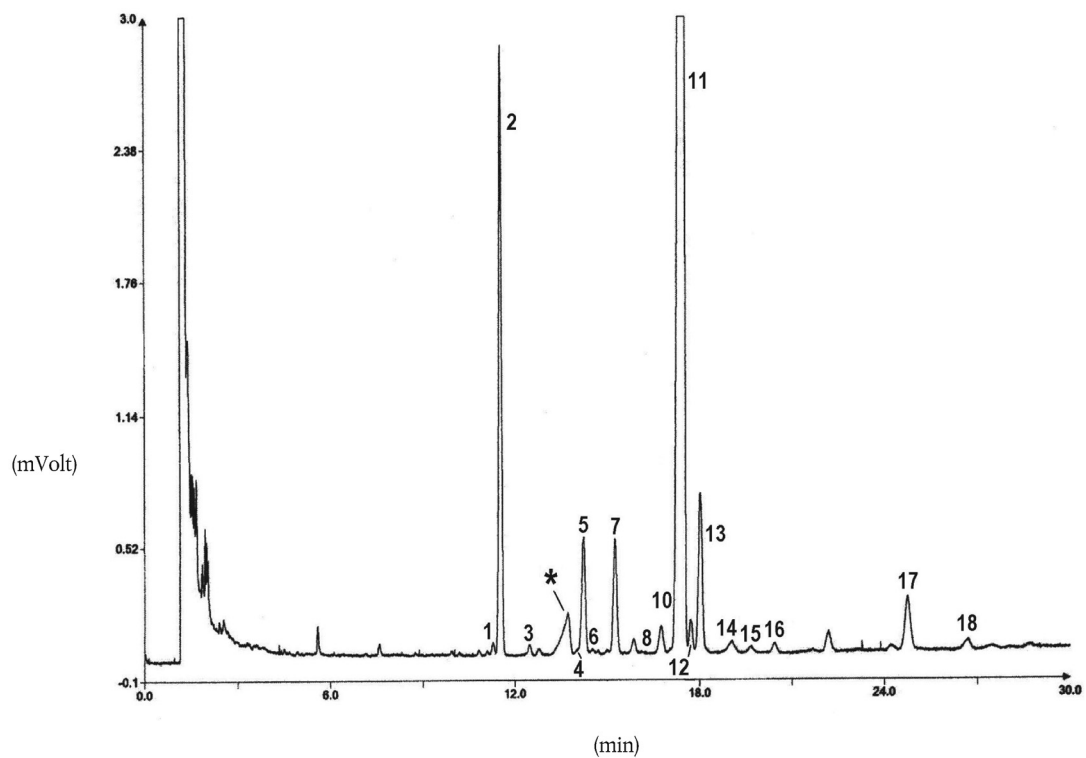
Lineaarinopeus cm/s saadaan kaavasta L/t_M , jossa L on kolonnin pituus senttimetreinä ja t_M on mitattu aika sekunteina.

*Taulukko 1***Sterolien suhteelliset retentioajat**

Piikki	Nimi		Suhteellinen retentioaika	
			Kolonne SE 54	Kolonne SE 52
1	kolesteroli	Δ -5-kolesteeni-3- β -oli	0,67	0,63
2	kolestanoli	5- α -kolestaani-3- β -oli	0,68	0,64
3	brassicasteroli	[24S]-24-metyyli- Δ -5,22-kolestadieeni-3- β -oli	0,73	0,71
*	ergosteroli	[24S]-24-metyyli- Δ -5-7-22-kolestatrieeni-3- β -oli	0,78	0,76
4	24-metyleenikolesteroli	24-metyleeni- Δ -5,24-kolestadieeni-3- β -oli	0,82	0,80
5	kampesteroli	(24R)-24-metyyli- Δ -5-kolesteeni-3- β -oli	0,83	0,81
6	kampestanoli	(24R)-24-metyyli-kolestaani-3- β -oli	0,85	0,82
7	stigmasteroli	(24S)-24-etyyli- Δ -5,22-kolestadieeni-3- β -oli	0,88	0,87
8	δ -7-kampesteroli	(24R)-24-metyyli- Δ -7-kolesteeni-3- β -oli	0,93	0,92
9	δ -5,23-stigmastadienoli	(24R,S)-24-etyyli- Δ -5,23-kolestadieeni-3- β -oli	0,95	0,95
10	klerosteroli	(24S)-24-etyyli- Δ -5,25-kolestadieeni-3- β -oli	0,96	0,96
11	β -sitosteroli	(24R)-24-etyyli- Δ -5-kolesteeni-3- β -oli	1,00	1,00
12	sitostanoli	24-etyyli-kolestaani-3- β -oli	1,02	1,02
13	Δ -5-avenasteroli	(24Z)-24-etyylideeni- Δ -kolesteeni-3- β -oli	1,03	1,03
14	Δ -5-24-stigmastadienoli	(24R,S)-24-etyyli- Δ -5,24-kolestadieeni-3- β -oli	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastenoli	(24R,S)-24-etyyli- Δ -7-kolesteeni-3- β -oli	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasteroli	(24Z)-24-etyylideeni- Δ -7-kolesteeni-3- β -oli	1,16	1,16
17	erytrodioli	5- α -oleaani-12-eeni-3- β -28-dioli	1,41	1,41
18	uvaoli	Δ -12-urseeni-3- β -28-dioli	1,52	1,52

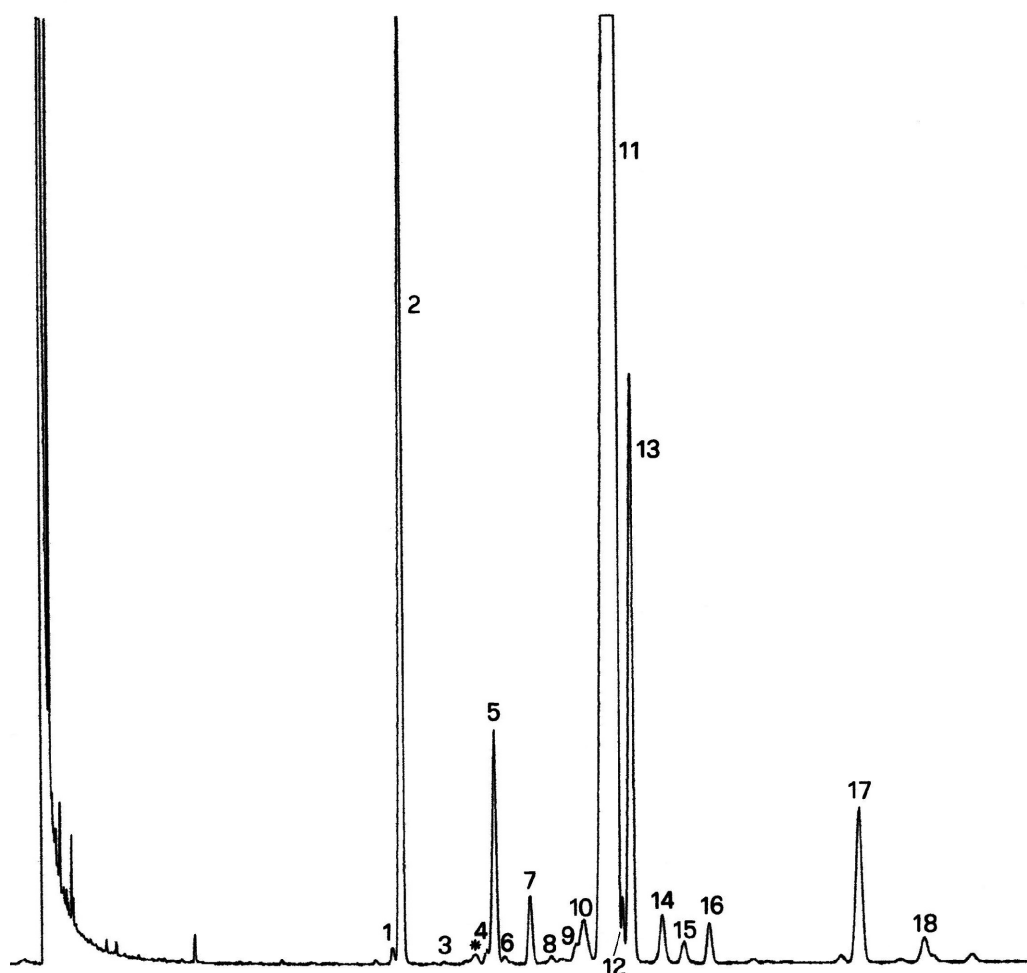
▼ **M26***Kuva 1*

Lamppuoliiviöljyn steroli- ja triterpeenidialkoholifraktion kaasukromatogrammi (jossa näkyy sisäisen standardin huippu)



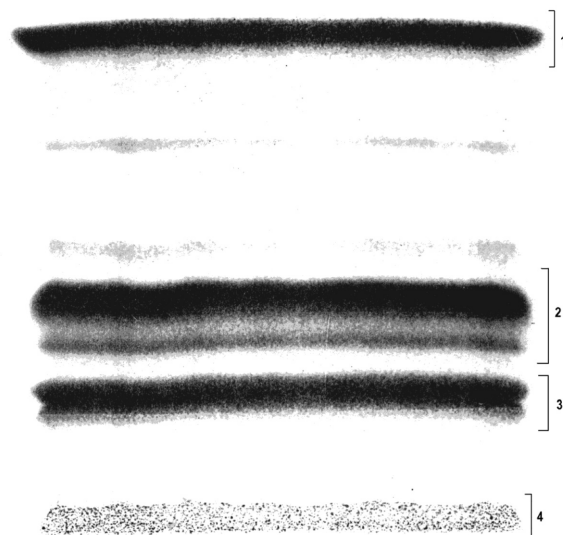
▼ **M26***Kuva 2*

Puhdistetun oliiviöljyn steroli- ja triterpeenidialkoholifraktion kaasukromatogrammi (jossa näkyy sisäisen standardin huippu)



▼ **M26***Kuva 3*

Oliivin puristemassaöljyn TLC-levyn vyöhyke, joka on raaputettava sterolien ja triterpeenialkoholien määrittämiseksi.



- 1 – Skvaleeni
- 2 – Triterpeeniset ja alifaattiset alkoholit
- 3 – Sterolit ja triterpeenidialkoholit
- 4 – Alku; vapaat rasvahapot

▼ **M21***LIITE VII***2-GLYSERYYLIMONOPALMITAATIN PROSENTTIOSUUDEN
MÄÄRITTÄMINEN****1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA**

Tällä menetelmällä määritetään triglyseridin 2-asemassa olevan palmitiinihapon prosenttiosuus 2-glyseryylimonopalmiitaatin määrityksen avulla.

Menetelmää sovelletaan kasviöljyihin, jotka ovat nestemäisiä huoneenlämmössä (20 °C).

2. PERIAATE

Öljynäyte valmistellaan ja käsitellään haimalipaasin avulla: kun triglyseridimolekyyli hydrolysoidaan osittain ja spesifisesti 1- ja 3-asemassa, jäävät jäljelle 2-asemassa olevat monoglyseridit. 2-glyseryylimonopalmiitaatin prosenttiosuus monoglyseridijakeessa määritetään silyloinnin jälkeen käyttäen kapillaarikaasukromatografista määrittystä.

3. VÄLINEISTÖ

3.1 Erlenmeyer-pullo, 25 ml.

3.2 Dekantterilaseja, 100, 250 ja 300 ml.

3.3 Lasikolonne kromatografiaa varten (sisähalkaisija 21–23 mm, pituus 400 mm), varustettuna sintterilasilevyllä ja hanalla.

3.4 Koeputkia, 10, 50, 100 ja 200 ml.

3.5 Kolveja, 100 ja 250 ml.

3.6 Pyöröhaihduttaja.

3.7 Kartiopohjaisia sentrifugiputkia, 10 ml, hiottu tulppa.

3.8 Sentrifugi 10 ja 100 ml:n putkia varten.

3.9 Termostaatti, joka ylläpitää lämpötilaa 40 °C ± 0,5 °C.

3.10 Mittapipettejä, 1 ja 2 ml.

3.11 Injektioruisku, 1 ml.

3.12 Mikroruisku, 100 µl.

3.13 Suppilo, 1 000 ml

3.14 Kapillaarikolonnilla varustettu kaasukromatografi, jossa on kolonniin liitetty kylmäinjektori, jonka avulla näyte voidaan syöttää suoraan kolonniin, sekä uuni, joka pysyy valitussa lämpötilassa yhden celsiusasteen tarkkuudella.

3.15 Kolonniin liitetty kylmäinjektori, näytteen syöttämiseksi suoraan kolonniin.

3.16 Liekki-ionisaatiodetektor ja analysaattori.

3.17 Integroiva piirturi, joka toimii analysaattorin kanssa ja jonka vastenopeus on enintään 1 sekunti ja jonka paperin nopeutta voidaan säätää.

3.18 Lasinen tai kvartsilasinen kapillaarikolonne, jonka pituus on 8–12 m ja sisähalkaisija 0,25–0,32 mm ja jonka sisäpinta on päällystetty 5-prosenttisellä metyyliopolysiloksaanilla tai fenyyli-metyyliopolysiloksaanilla siten, että nestekerroksen paksuus on 0,10–0,30 µm, ja jota voidaan käyttää 370 °C:n lämpötilassa.

▼ **M21**

3.19 Mikroruisku, 10 µl, jossa on vähintään 7,5 cm:n kiinteä neula, jonka avulla näyte voidaan syöttää suoraan kolonniin.

4. REAGENSsit

4.1 Silikageeli, jonka hiukkaskoko 0,063–0,200 mm (70/280 mesh) ja joka valmistetaan seuraavasti: Silikageeli pannaan posliinastiaan, kuivataan lämpökaapissa 160 °C:n lämpötilassa neljän tunnin ajan, minkä jälkeen jäädytetään eksikkaattorissa huoneenlämmössä. Lisätään vettä 5 % silikageelin painosta seuraavasti: punnitaan 500 ml:n erlenmeyer-pulloon 152 g silikageeliä, lisätään 8 g tislattua vettä, suljetaan pullo ja ravistetaan varovasti siten, että vesi jakautuu tasaisesti. Säilytetään vähintään 12 tuntia ennen käyttöä.

4.2 N-heksaani, kromatografialaatu.

4.3 Isopropanoli

4.4 Isopropanoli, vesiliuos 1/1 (V/V)

4.5 Haimalipaasi. Käytettävän lipaasiaktiivisuuden on oltava 2,0–10 lipaasiyksikköä/mg. (Haimalipaasia, jonka aktiivisuus on 2–10 yksikköä/mg, on saatavilla valmiina.)

4.6 Tri-hydroksimetyyliaminometaani-puskuriliuos: lisätään vesiliuokseen suolahappoa 1 M, kunnes pH on 8 (tarkistetaan potentiometrillä) (1/1 V/V)

4.7 Natriumkolaatti (entsyymilaatu), 0,1 % vesiliuos (käytettävä 15 päivän kuluessa valmistamisesta).

4.8 Kalsiumkloridi, vesiliuos 22 %.

4.9 Dietyylieetteri, kromatografialaatu.

4.10 Kehitysluos: n-heksaani/etyylieetteriseos (87/13) (V/V)

4.11 Natriumhydroksidi, 12-painoprosenttinen liuos.

4.12 1-prosenttinen fenoliftaleiiniliuos etanolissa.

4.13 Kantajakaasut: vety tai helium, kaasukromatografista laatua.

4.14 Apukaasut: vety, vähintään 99-prosenttinen, kuiva ja ilman orgaanisia aineita, ja vesi kaasukromatografista laatua, sama puhtausaste.

4.15 Silylointireagenssi: Pyridiinin, heksametyylidisilatsaanin ja trimetyylikloorisilaanin seos 9/3/1 (V/V/V). (Käyttövalmiita liuoksia on kaupallisesti saatavana. Voidaan käyttää myös muita silylointireagensseja, kuten esim. bis-trimetyylisilyylitrifluoriasetamidi + 1 % trimetyylikloorisilaania; reagenssi laimennetaan samalla määrällä vedetöntä pyridiiniä.)

4.16 Standardit: puhtaat monoglyseridit tai monoglyseridien seokset, joiden prosenttiosuukien mukainen tunnettu koostumus on samanlainen kuin näytteen.

5. MENETTELY

5.1 **Näytteen valmistelu**

5.1.1 Öljyjä, joiden vapaiden happojen pitoisuus on alle 3 %, ei tarvitse neutraloida ennen silikageelikolonnikromatografiaa. Öljyt, joiden vapaiden happojen pitoisuus on yli 3 %, on neutraloitava 5.1.1.1 kohdan mukaisesti.

▼ **M21**

- 5.1.1.1 1 000 ml:n suppiloon (3.13) kaadetaan 50 g öljyä ja 200 ml n-heksaania. Lisätään 100 ml isopropanolia ja 12-prosenttista natriumhydroksidiliuosta (4.11) määrä, joka vastaa öljyn vapaiden rasvahappojen määrää lisättynä 5 prosentilla. Ravistetaan voimakkaasti yhden minuutin ajan. Lisätään 100 ml tislattua vettä, ravistetaan uudelleen ja annetaan seistä.

Kun erottuminen on tapahtunut, pohjalla oleva saippuoitunut kerros poistetaan. Myös mahdolliset välikerrokset (liimamaiset ja liukenemattomat aineet) poistetaan. Neutraalin öljyn heksaaniliuos pestään useita kertoja isopropanolin ja tislattun veden liuoksella, 50–60 ml, suhteessa 1:1 (V/V) (4.4), kunnes fenoliftaleiinin vaaleanpunainen väri on hävinnyt.

Poistetaan suurin osa heksaania höyrystämällä tyhjiössä (käyttäen esim. kiertohaihdutinta) ja siirretään öljy 100 ml:n kolviin (3.5). Kuivataan öljy tyhjiössä, kunnes liuotin on kokonaan haihtunut.

Tämän vaiheen jälkeen öljyn happopitoisuuden on oltava alle 0,5 %.

- 5.1.2 Kaadetaan 1,0 g edellä kuvatulla tavalla käsiteltyä öljyä 25 ml:n erlenmeyer-pulloon (3.1) ja liuotetaan se 10 ml:aan kehitysluosta (4.10). Liuoksen annetaan seistä vähintään 15 minuuttia ennen silikageelikolonnikromatografiaa.

Jos liuos on sameaa, se sentrifugoidaan optimaalisten edellytysten varmistamiseksi kromatografiaa varten. (Voidaan käyttää käyttövalmiita 500 mg:n SPE-silikageelipatruunoita.)

- 5.1.3 *Kromatografiakolonnin esikäsitteily*

Kolonnein (3.3) kaadetaan noin 30 ml kehitysluosta (4.10) ja kolonnin alaosaan työnnetään lasisauvalla pumpulituppo; painetaan tuppota ilman poistamiseksi.

Valmistetaan dekantterilasissa suspensio, jossa on 25 g silikageeliä (4.1) ja noin 80 ml kehitysluosta, ja kaadetaan se suppilon avulla kolonnein.

Varmistetaan, että kaikki silikageeli on syötetty kolonnein; pestään kehitysluoksella (4.10), avataan hana ja annetaan neste tulla pylvästä, kunnes sen pinta on noin 2 mm piihappogeeelin yläpinnan yläpuolella.

- 5.1.4 *Kolonnikromatografia*

Punnitaan 25 ml:n erlenmeyer-pulloon (3.1) tarkasti 1,0 g 5.1 kohdan mukaisesti valmistettua näytettä.

Liuotetaan näyte 10 ml:aan kehitysluosta (4.10). Kaadetaan liuos 5.1.3 kohdan mukaisesti valmistettuun kromatografiakolonnein. Vältetään koskemasta kolonnin pintaa.

Hana avataan ja liuottimen annetaan tulla pylvästä, kunnes sen pinta on silikageelin pinnan tasolla. Annetaan kehittyä 150 ml:ssa kehitysluosta. Säädetään virtaukseksi 2 ml/minuutissa (siten että 150 ml valuu 60–70 minuutissa).

Eluaatti kerätään 250 ml:n taarattuun kolviin. Liuotin haihdutetaan tyhjiössä ja sen jäänteet poistetaan typpivirtauksen avulla.

Punnitaan pullo ja lasketaan kerätty uute.

▼ **M21**

(Jos käytetään käyttövalmiita SPE-silikageelipatruunoita, toimitaan seuraavasti: Lisätään 1 ml liuosta (5.1.2) patruunoihin, jotka on etukäteen käsitelty 3 ml:lla n-heksaania.

Kun liuos on suodattunut, annetaan kehittyä 4 ml:ssa n-heksaania/-dietyylieetteriä 9/1 (V/V).

Eluaatti kerätään 10 ml:n putkeen ja haihdutetaan kuiviin typpivirtauksen alla.

Kuiva jäännös käsitellään haimalipaasin (5.2) avulla. Rasvahappokoostumus on ehdottomasti tarkistettava sekä ennen SPE-patruunan käyttöä että sen jälkeen.

5.2 Hydrolyysi haimalipaasin avulla

5.2.1 Mitataan sentrifugin putkeen 0,1 g 5.1 kohdan mukaisesti valmisteltua öljyä. Lisätään 2 ml puskuriliuosta (4.6), 0,5 ml natriumkolaattiliuosta (4.7) ja 0,2 ml kalsiumkloridiliuosta sekoittaen hyvin jokaisen lisäyksen jälkeen. Putki suljetaan hiotulla tulpalla ja asetetaan heti termostoituun hauteeseen, jonka lämpötila on $40\text{ °C} \pm 0,5$.

5.2.2 Putkeen lisätään 20 mg lipaasia, ravistetaan varovasti (niin että tulppa ei pääse kastumaan), asetetaan putki termostoituun hauteeseen tasan 2 minuutiksi ja poistetaan, minkä jälkeen ravistetaan voimakkaasti tasan 1 minuutti ja annetaan jäähtyä.

5.2.3 Lisätään 1 ml dietyylieetteriä, suljetaan pullo ja ravistetaan voimakkaasti, sentrifugoidaan ja siirretään eetteriliuos mikroruiskulla puhtaaseen ja kuivaan putkeen.

5.3 Silanoitujen johdannaisten ja kaasukromatografian valmistelu

5.3.1 Lisätään mikroruiskulla 10 ml:n kartiopohjaiseen putkeen 100 µl liuosta (5.2.3).

5.3.2 Liuotin haihdutetaan heikossa typpivirrassa, lisätään 20 µl silylointireagenssia (4.15), suljetaan putki tulpalla ja annetaan seistä 20 minuuttia.

5.3.3 Lisätään 1–5 ml n-heksaania (kromatografiaolosuhteiden mukaisesti). Tuloksena on liuos kaasukromatografiaa varten.

5.4 Kaasukromatografia

Käyttöolosuhteet ovat seuraavat:

— Injektorin (kolonniin liitetty kylmäinjektori) lämpötila matalampi kuin liuoksen kiehumislämpötila (68 °C),

— Detektorin lämpötila: 350 °C ,

— Kolonnin lämpötila: uunin lämpötila ohjelmoidaan seuraavasti: 60 °C yhden minuutin ajan, lisätään 15 °C minuutissa kunnes lämpötila on 180 °C , minkä jälkeen lisätään 5 °C minuutissa kunnes lämpötila on 340 °C , minkä jälkeen lämpötila pidetään 340 °C :ssa 13 minuutin ajan,

— Kantajakaasut: vety tai helium sopivalla lineaarinopeudella kuvassa 1 esitetyn resoluution saavuttamiseksi. C_{54} -triglyseridin retentioajan on oltava 40 ± 5 minuuttia (ks. kuva 2). (Jäljempänä esitetyt käyttöolosuhteet ovat ohjeellisia. Käyttäjän on optimoitava ne halutun resoluution saavuttamiseksi. 2-glyserylimonopalmiitin piikin korkeuden on oltava vähintään 10 % piirturin asteikosta.),

▼ M21

— Injektoidun aineen määrä: 0,5–1 µl n-heksaaniliuosta (5 ml) (5.3.3.).

5.4.1 *Piikkien tunnistaminen*

Yksittäiset monoglyseridit tunnistetaan retentioaikojen perusteella ja suhteessa niihin, jotka on saatu samoissa olosuhteissa määritetyillä monoglyseridien standardiseoksilla.

5.4.2 *Kvantitatiivinen arviointi*

Jokaisen piikin pinta-ala lasketaan elektronisen integraattorin avulla.

6. TULOSTEN ESITTÄMINEN

Glyceryylimonopalmitaatin prosenttiosuus lasketaan sitä vastaavan piikin suhteellisenä osuutena kaikkien monoglyseridien piikkien yhteenlasketusta pinta-alasta (ks. kuva 2) seuraavan kaavan mukaisesti:

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

NdT: Glycéril monopalmitate = glyceryylimonopalmitaatti jossa:

A_x = glyceryylimonopalmitaatin piikin pinta-ala

ΣA = kaikkien monoglyseridien piikkien pinta-alojen summa.

Tulos ilmoitetaan yhden desimaalin tarkkuudella.

7. MÄÄRITYSSELOSTE

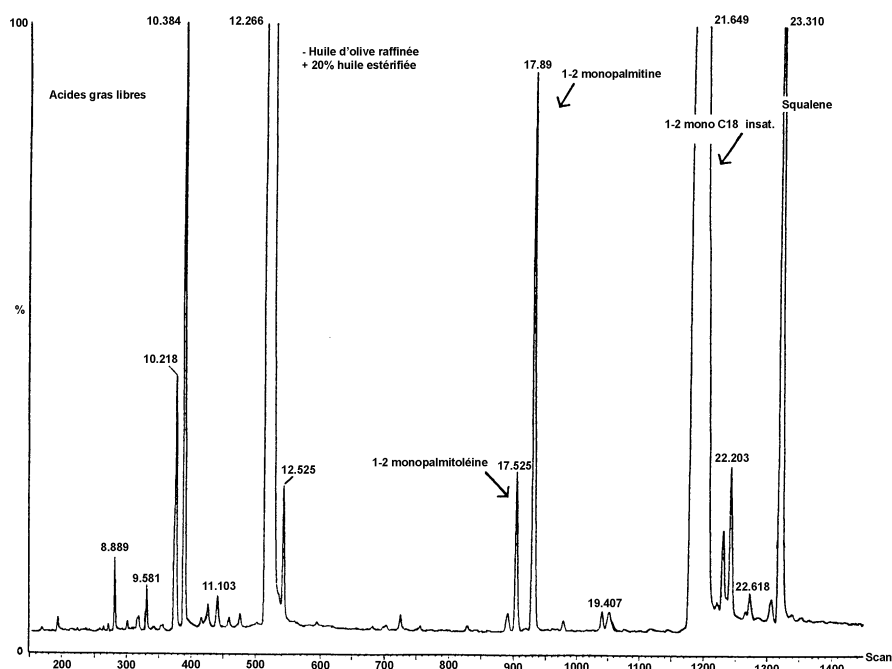
Määrittelyselosteessa on oltava:

- viittaus tähän menetelmään,
- näytteen tunnistamiseksi tarvittavat tiedot,
- määrittelyn tulos,
- poikkeamiset tästä menetelmästä riippumatta siitä, johtuvatko ne asianomaisten päätöksestä vai jostain muusta syystä,
- laboratorion tunnistetiedot, määrittäminen ja määrittämisestä vastaavien allekirjoitukset.

▼ M21

Kuva 1

Kromatogrammi silylointireaktion tuotteista, saatu lipaasikäsittelyllä jalostetusta oliiviöljystä, johon lisätty 20 % esteröityä öljyä (100 %).



Selityksiä: Acides gras libres = vapaat rasvahapot Huile d'olive raffinée = jalostettu oliiviöljy + 20 % huile estérifiée = + 20 % esteröityä öljyä 1-2 monopalmitine = 1-2-monopalmitiini 1-2 mono C₁₈ insat. = tyydyttymätön C₁₈, 1-2-mono- Squalene = skvaleeni

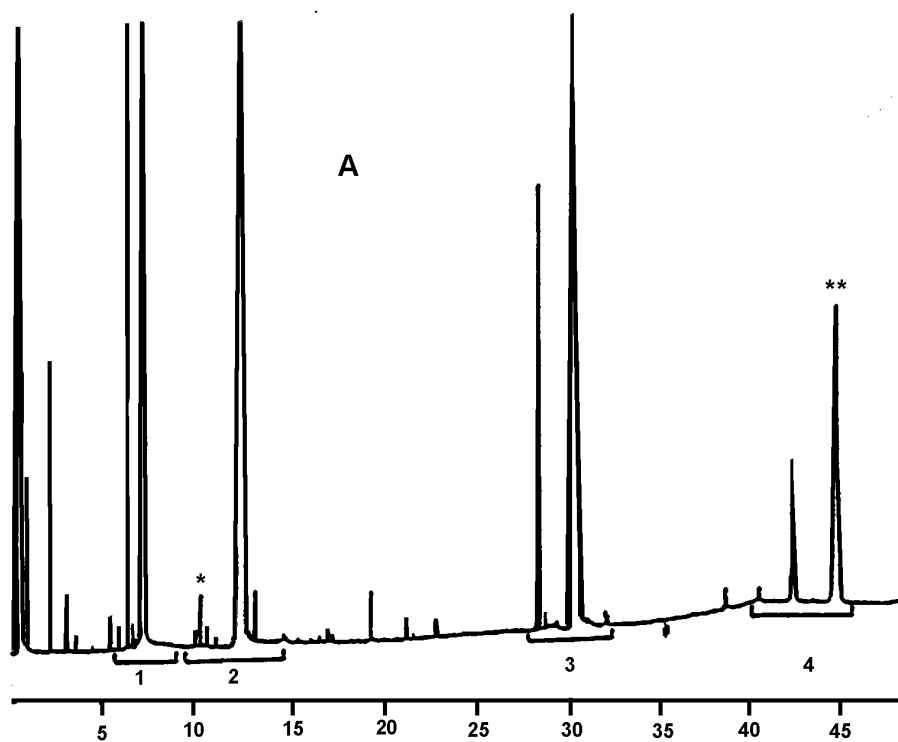
▼ M21

Kuva 2

Kromatogrammi:

A) esteröimätön oliiviöljy, lipaasikäsittelyn jälkeen; silyloinnin jälkeen; näissä olosuhteissa (kapillaarikolonne 8–12 m) vahajae eluoituu samassa ajassa kuin diglyseridijae tai hieman sen jälkeen.

Triglyseridipitoisuus saa lipaasikäsittelyn jälkeen olla enintään 15 %.



Merkkien selitykset::

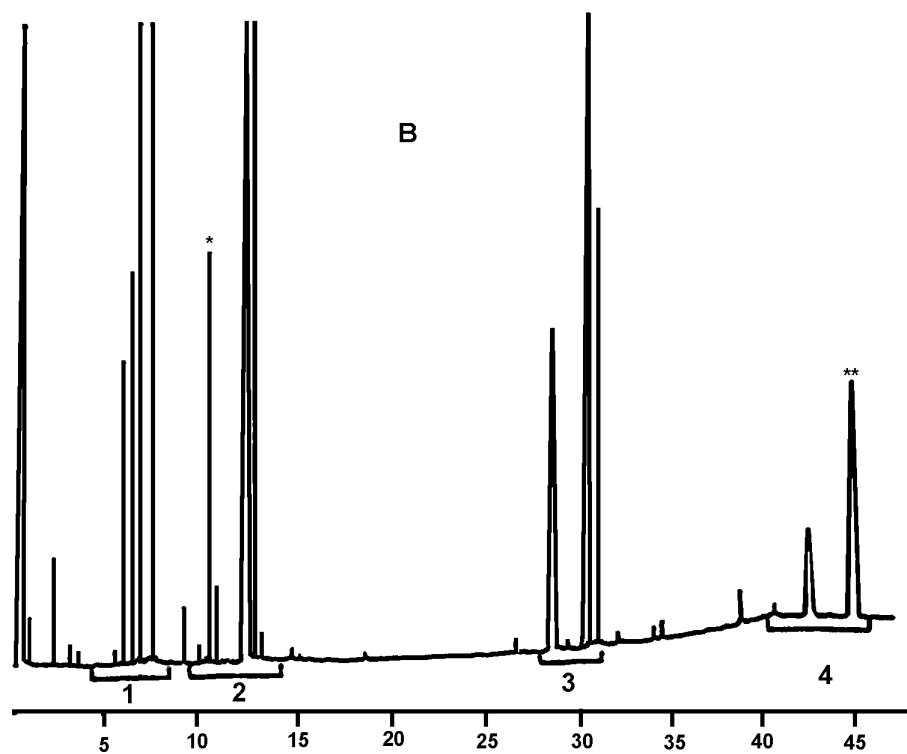
- 1 = Vapaat rasvahapot
- 2 = Monoglyseridit
- 3 = Diglyseridit
- 4 = Triglyseridit
- * = 2-monopalmitiini
- ** = C₅₄-triglyseridi

▼ **M21**

Kromatogrammi:

B) esteröity öljy lipaasikäsittelyn jälkeen; silyloinnin jälkeen; näissä olosuhteissa (kapillaarikolonne 8–12 m) vahajae eluoituu samassa ajassa kuin diglyseridijae tai hieman sen jälkeen.

Triglyseridipitoisuus saa lipaasikäsittelyn jälkeen olla enintään 15 %



Merkkien selitykset:

1 = Vapaat rasvahapot

2 = Monoglyseridit

3 = Diglyseridit

4 = Triglyseridit

* = 2-monopalmitiini

** = C₅₄-triglyseridi

▼ **M21**

8. SELITYKSIÄ

Huom. 1. LIPAASIN VALMISTUS

Myynnissä on lipaaseja, joiden aktiivisuus on tyydyttävä. On myös mahdollista valmistaa niitä laboratoriossa 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 4–6 tuntia, minkä jälkeen liuos sentrifugoidaan. Jäännöstä uutetaan vielä kolme kertaa samalla tilavuusmäärällä vedetöntä 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, joka säilyy kauan jääkaapissa ja kuivissa olosuhteissa.

Huomautus 2. LIPAASIAKTIIVISUUDEN TARKISTAMINEN

Valmistetaan oliiviöljyemulsio seuraavasti:

Sekoitetaan 165 ml arabikumiliuosta (100 g/l), 15 g jäämurskaa ja 20 ml neutraloitua öljyä sekoittimella.

Lisätään 50 ml:n dekantterilasiin 10 ml tätä emulsiota, sitten 0,3 ml natriumkolaattiliuosta (0,2 g/ml) ja sitten 20 ml tislattua vettä.

Dekantterilasi asetetaan termostoituihin hauteeseen, jonka lämpötila on 37 °C. Upotetaan pH-mittarin elektrodit nesteeseen ja asetetaan spiraalisekoitin paikoilleen.

Lisätään natriumhydroksidiliuosta (0,1 N) tipoitain byretin avulla, kunnes pH on 8,3.

Lisätään sama tilavuusmäärä lipaasijauheen vesisuspensiota (0,1 g/ml lipaasia). Heti kun pH on 8,3, käynnistetään sekuntikello ja aloitetaan natriumhydroksidiliuoksen tiputtaminen sellaisella nopeudella, että pH pysyy koko ajan 8,3:ssa. Liuoksen kulutus luetaan joka minuutti.

Tiedot kirjataan koordinaatistoon, jossa x-akselilla on aika ja y-akselilla on pH:n säilyttämiseen tarvittavan emäsliuoksen määrä millilitroina. Tuloksena on oltava lineaarinen kuvaaja.

Lipaasiaktiiviteetti, joka mitataan lipaasiyksikköinä mg:aa kohden, saadaan seuraavasti:

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

jossa:

A aktiiviteetti lipaasiyksikköä/mg

V natriumhydroksidiliuoksen (0,1 N) määrä millilitroina minuutissa (kuvaajasta laskettuna)

N natriumhydroksidiliuoksen normaalisuus

m lipaasinäytteen paino mg:oina.

Lipaasiyksikkö on se määrä entsyymiä, joka tarvitaan vapauttamaan 10 mikroekvivalenttia happoa minuutissa.

▼ **M20**

▼ M25

LIITE IX

SPEKTROFOTOMETRINEN MÄÄRITYS ULTRAVIOLETTIVALOSSA

JOHDANTO

Spektrofotometrinen määrittäminen ultraviolettilähdössä antaa tietoa rasvan laadusta ja säilymisestä sekä muutoksista, joita käsittelevät ovat siinä aiheuttaneet.

Tässä menetelmässä käytetyillä aallonpituuksilla tapahtuva absorptio johtuu konjugoiduista dieeni- ja trieenijärjestelmistä. Nämä absorptiot ilmaistaan ominaiskustintion $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ (ekstinktio, joka tapahtuu tiettyyn liuottimeen valmistetun 1-prosenttisen rasvaliuoksen 1 cm:n paksuisessa kerroksessa), josta tavallisesti käytetään merkkiä K (kutsutaan myös ekstinktiokertoimeksi).

1. SOVELTAMISALA

Tällä menetelmällä voidaan tutkia oliiviöljyä (ks. lisäys) spektrofotometrisesti ultraviolettilähdössä.

2. MENETELMÄN PERIAATE

Rasva liuotetaan määrättyyn liuottimeen ja liuoksen ekstinktio mitataan tietyllä aallonpituudella käyttäen vertailuliuksena puhdasta liuotinta. Yksittäiset ekstinktiot lasketaan spektrofotometrin lukemista. Lasketaan spesifinen absorbanssi iso-oktaanissa aallonpituuksilla 232 nm ja 268 nm tai sykloheksaanissa aallonpituuksilla 232 nm ja 270 nm, kun pitoisuus on 1 g / 100 ml 10 mm:n kyvetissä.

3. VÄLINEISTÖ

- 3.1 Spektrofotometri, joka mittaa ekstinktion ultraviolettilähdössä aallonpituuksilla 220–360 nm yhden nanometrin tarkkuudella. Ennen käyttöä spektrometrin aallonpituus- ja absorbanssiasteikot on tarkistettava seuraavasti:

- 3.1.1 *Aallonpituusasteikko:* Voidaan tarkistaa käyttämällä vertailumateriaalia, joka muodostuu holmiumoksidia sisältävästä optisesta lasisuodattimesta, jossa on selvät absorptioasteikat. Vertailumateriaali on tarkoitettu UV/VIS-spektrofotometrien, joiden spektrikaistan nominaaliset leveydet ovat enintään 5 nm, aallonpituusasteikkojen tarkistamiseen ja kalibrointiin. Holmiumlasisuodatin mitataan absorbanssitoiminnolla vertaamalla ilmanollanäytteeseen aallonpituudella 640–240 nm. Jokaiselle spektrikaistan leveydelle (0,10–0,25–0,50–1,00–1,50–2,00 ja 3,00) tehdään perusviivan korjaus tyhjällä kyvetinpitimellä. Spektrikaistan leveyksien aallonpituudet on lueteltu vertailumateriaalin sertifikaatissa ISO 3656 -standardissa.

- 3.1.2 *Absorbanssiasteikko:* Voidaan tarkistaa käyttäen vertailumateriaalia, jossa on 4 kaliumdikromaattiliuosta perkloorihapossa sinetöityinä 4:ään UV-kvartsikyvettiin lineaarisuuden ja fotometrisen tarkkuuden vertailuarvon mittaamiseksi ultraviolettilähdössä. Kaliumdikromaatilla täytetyt kyvetit (40 mg/ml, 60 mg/ml, 80 mg/ml ja 100 mg/ml) mitataan vertaamalla perkloorihapponollanäytteeseen. Absorbanssin nettoarvot on lueteltu vertailumateriaalin sertifikaatissa ISO 3656 -standardissa.

- 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 ekstinktiokyysikköä.

▼ **M25**

3.3 25 ml:n mittapulloja.

3.4 Analyysivaaka, jonka tarkkuus 0,0001 g.

4. REAGENSSEIT

Kaikkien reagenssien on oltava hyväksyttyä analyysilaatua, jollei toisin mainita.

Liuotin: Iso-oktaani (2,2,4-trimetyylipentaani) mitattavaksi aallonpituudella 232 nm ja 268 nm tai sykloheksaani mitattavaksi aallonpituudella 232 nm ja 270 nm; liuottimen absorbanssin on oltava alle 0,12 aallonpituudella 232 nm ja alle 0,05 aallonpituudella 250 nm suhteessa tislattuun veteen, mitattuna 10 mm:n kyvetiin.

5. MENETTELY

5.1 Näytteen on oltava täysin homogeenista eikä siinä saa olla suspendoituja epäpuhtauksia. Öljyt, jotka ovat huoneenlämmössä nestemäisiä, suodatetaan paperin läpi noin 30 °C:ssa, kiinteät rasvat homogenoidaan ja suodatetaan lämpötilassa, joka saa olla enintään 10 °C korkeampi kuin niiden sulamispiste.

5.2 Punnitaan noin 0,25 g näytettä (0,1 mg:n tarkkuudella), joka on esikäsitelty edellä kuvatulla tavalla, 25 ml:n mittapulloon, joka täytetään merkkiin liuottimella ja homogenoidaan. Syntyvän liuoksen on oltava täysin kirkasta. Jos ilmenee sameutta tai sakkaa, liuos suodatetaan nopeasti paperin läpi.

5.3 Kvartsikyvetti 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.

HUOM. Absorbanssia ei välttämättä tarvitse mitata koko aallonpituusalueella.

6. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

6.1 Lasketaan ominaisekstinktiot (ekstinktiokertoimet) eri aallonpituuksilla seuraavasta kaavasta:

$$K_{\lambda} = \left(\frac{E_{\lambda}}{c \cdot s} \right)$$

jossa

K_{λ} = ominaisekstinktio aallonpituudella λ

E_{λ} = aallonpituudella λ mitattu ekstinktio

c = liuoksen väkevyys g/100 ml

s = kvartsikyvetien paksuus senttimetreinä.

Tulokset ilmoitetaan kahden desimaalin tarkkuudella.

6.2 Ominaisekstinktion variaatio (ΔK)

Kun oliiviöljylle tehdään spektrofotometrinen määrittäminen unionin lainsäädännössä säädettyä virallisella menetelmällä, on määritettävä myös ominaisekstinktion absoluuttisen arvon variaatio (ΔK), joka saadaan seuraavalla kaavalla:

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

jossa K_m on ominaisekstinktio aallonpituudella m ; maksimaalisen absorption aallonpituus riippuu käytetystä liuottimesta ja on sykloheksaanilla 270 ja iso-oktaanilla 268.

Lisäys

OLIIVIÖLJYJEN OMINAISUUDET

Luokka		Rasvahappojen metyyliesterit (FAME) ja rasvahappojen etyyliesterit (FAEE)	Happopitoisuus (%) (*)	Peroksidiluku mEq O ₂ /kg (*)	Vahat mg/kg (**)	2-glyceryylimonopalmiitaatti (%)	Stigma- stadieni mg/kg (1)	HPLC:llä määritetyn ja teoreettisesti lasketun ECN42:n välinen ero	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*) (5)	Aistinvarainen arvio virheen mediaani (Md) (*)	Aistinvarainen arvio hedelmäisyyden mediaani (Mf) (*)
1.	Ekstra-neitsytoliiviöljy	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg/kg tai 75 mg/kg < Σ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg ja (FAEE/FAME) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % ≤ 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
						1,0 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % > 14 %							
2.	Neitsytoliiviöljy	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % ≤ 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
						≤ 1,0 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % > 14 %							
3.	Lamppuoliiviöljy	—	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (2)	—
						≤ 1,1 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % > 14 %							
4.	Jalostettu oliiviöljy	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
						≤ 1,1 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % > 14 %							

▼ M25

Luokka		Rasvahappojen metyyliesterit (FAME) ja rasvahappojen etyyliesterit (FAEE)	Happopitoisuus (%) (*)	Peroksidi-luku mEq O2/kg (*)	Vahat mg/kg (**)	2-glyceryylimonopalmiitaatti (%)	Stigma-stadieeni mg/kg ⁽¹⁾	HPLC:llä määritetyn ja teoreettisesti lasketun ECN42:n välinen ero	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*) ⁽⁵⁾	Aistinvarainen arvio virheen mediaani (Md) (*)	Aistinvarainen arvio hedelmäisyyden mediaani (Mf) (*)
5.	Jalostetusta oliiviöljystä ja neitsytoliiviöljystä valmistettu oliiviöljy	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
						≤ 1,0 jos palmitiinihapon kokonaisprosenttiosuus % > 14 %							
6.	Raaka oliivin puristemassaöljy	—	—	—	> 350 ⁽⁴⁾	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7.	Jalostettu oliivin puristemassaöljy	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8.	Oliivin puristemassaöljy	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

⁽¹⁾ Sellaisten isomeerien yhteismäärä, joka voidaan (tai jota ei voida) erottaa kapillaarikolonnin avulla.
⁽²⁾ Tai jos virheen mediaani on enintään 2,5 ja hedelmäisyyden mediaani 0.
⁽³⁾ Kun öljyn vahapitoisuus on 300–350 mg/kg, sitä pidetään lamppuöljynä, jos alifaattisten alkoholien kokonaispitoisuus on enintään 350 mg/kg tai jos erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on enintään 3,5 prosenttia.
⁽⁴⁾ Kun öljyn vahapitoisuus on 300–350 mg/kg, sitä pidetään raakana oliivin puristemassaöljynä, jos alifaattisten alkoholien kokonaispitoisuus on yli 350 mg/kg ja jos erytrodioli- ja uvaolipitoisuus on yli 3,5 prosenttia.
⁽⁵⁾ K 270, jos liuotin on sykloheksaani, K 268, jos liuotin on iso-oktaani.

▼B*LIITE X A***RASVAHAPPOJEN METYYLIESTEREIDEN MÄÄRITTÄMINEN
KAASUKROMATOGRAFISELLA MENETELMÄLLÄ****1 SOVELTAMISALA**

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

Menetelmä ei sovellu polymeroitujen rasvahappojen tutkimiseen.

2 REAGENSIT**2.1 Kantajakaasu**

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

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

2.2 Apukaasut

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

2.2.2 Ilmaa tai happea, ei saa sisältää orgaanisia epäpuhtauksia.

2.3 Vertailustandardi

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

Monityydyttymättömien 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:

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

▼B

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

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 monitydyttymättömiä 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.

▼B

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

Huom. 5 On olemassa vaara, että polaariset polysiloksaanit vaikeuttavat linoleenihapon ja C₂₀-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 kapillaarikolonnien 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).

Kolonneja 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 kolonne.

3.2 Ruisku

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

3.3 Piirturi

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

- a) vasteaika alle 1,5 s, mieluummin 1 s (vasteaika on aika, joka kuluu, kun piirturin kärki siirtyy nolasta 90 %:iin, kun yhtäkkiä annetaan 100 %:n signaali);

- b) paperin leveys vähintään 20 cm;

- c) paperin nopeutta on voitava säätää 0,4:stä 2,5 cm:iin minuutissa.

3.4 Integraattori tai laskin (valinnainen)

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

▼B**4 SUORITUS**

Toimenpiteet alakohdissa 4.1—4.3 koskevat liekki-ionisaatiodektorin 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) määrittelyn kesto.

Taulukoissa 1 ja 2 annetut arvot johtavat yleensä haluttuihin tuloksiin, eli vähintään 2 000 teoreettista pohjaa yhtä kolonnimetriä kohti metyylistearaattilla, 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-ionisaatiodektoriin 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 määrittäminen riippuvat voimakkaasti kantajakaasun virtausnopeudesta kolonnissa. Tämän vuoksi toimintaolosuhteet on valittava tätä parametria (eli kolonin täytehäviötä) muuttamalla sen mukaan, halutaanko parantaa erotuskykyä vai saada tulos nopeasti.

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

Määrittäminen tehdään metyylisteraatin ja metyylisteraatin seoksesta, jossa on suunnilleen yhtä paljon molempia (esim. kaakaovoin metyylisteraateista).

Näytteen määrä, kolonin lämpötila ja kantajakaasun virtaus valitaan niin, että mahdollisimman suuri osa metyylisteraatin piikistä piiryy 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 piikin huippuun;

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

Δ metyylisteraatin ja metyylisteraatin piikkien huippujen väli millimetreinä;

▼ M2

ja resoluutioluku I_r , kaavalla

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

jossa:

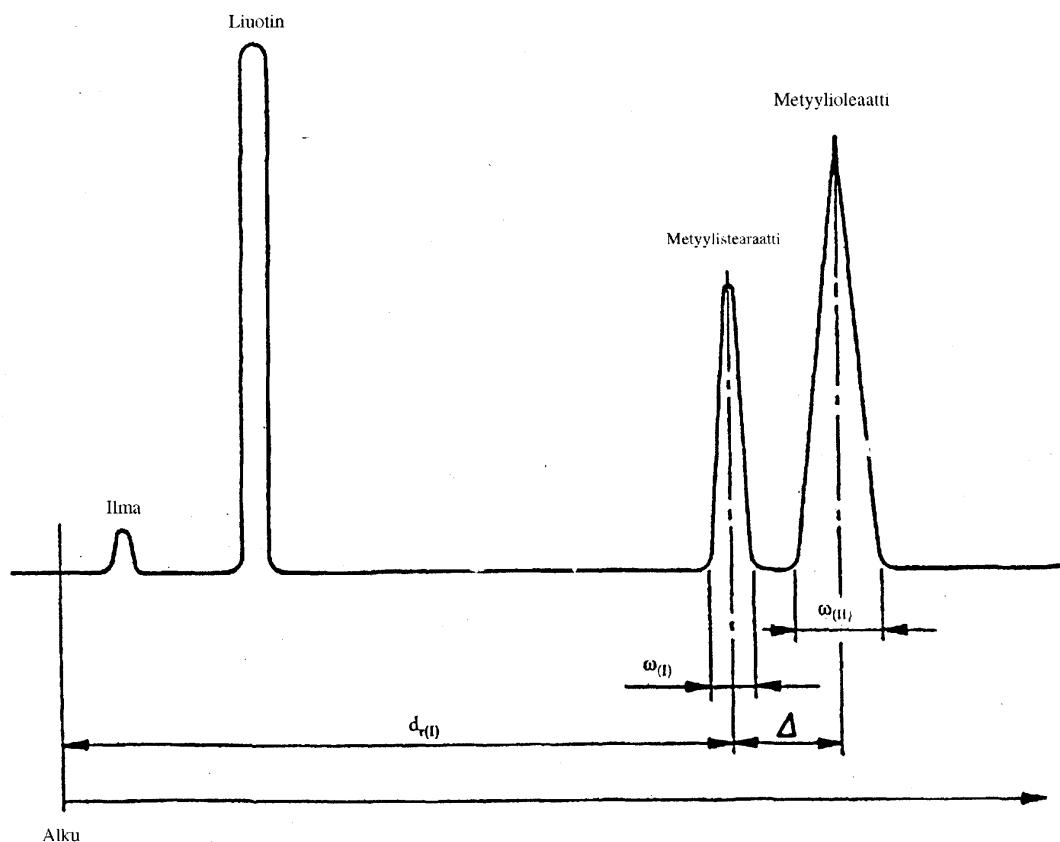
a = pienimmän piikin korkeus, mitattuna suhteessa perusviivaan,

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.

▼B

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 kahdessa polaarisuudeltaan erilaisessa faasissa, jotta varmistutaan siitä, että mukana ei ole toisen 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 eluotuminen).

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:

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

jossa:

A_i on aineen i piikin pinta-ala;

$\sum A$ on kaikkien piikkien yhteenlaskettu pinta-ala.

▼ B

Tulos annetaan yhden desimaalin tarkkuudella.

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

5.2.2.2 Korjauskertoimien käyttö

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

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

Vertailuseoksen aineen i prosentuaalinen massaosuus saadaan kaavasta:

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

jossa:

m_i on vertailuseoksen aineen i massa;

$\sum m$ on vertailuseoksen eri aineosien massojen summa.

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

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

jossa:

A_i on aineen i piikin pinta-ala;

$\sum A$ on kaikkien piikkien pinta-alojen summa.

Korjauskerroin saadaan kaavasta:

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

Yleensä korjauskertoimet ilmoitetaan suhteessa K_{C16} :een; tällöin suhteelliset kertoimet ovat:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C16}}$$

Näytteen jokaisen aineen i määrä prosenttiosuutena metyyliestereiden massasta on:

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

Tulos annetaan yhden desimaalin tarkkuudella.

▼ B

5.2.2.3 Sisäisen standardin käyttö

Tietyissä määrittäyksissä (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_{C16} :een);

K'_s on sisäisen standardin korjauskerroin (suhteessa K_{C16} :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 Pioksidiasta 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).

▼ M21

- 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 5.1.1 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.

▼ **M2**

— detektorin lämpötila: 260 °C,

— kantajakaasun (heliumia ja vetyä) virtausnopeus: 1,2 ml/min.

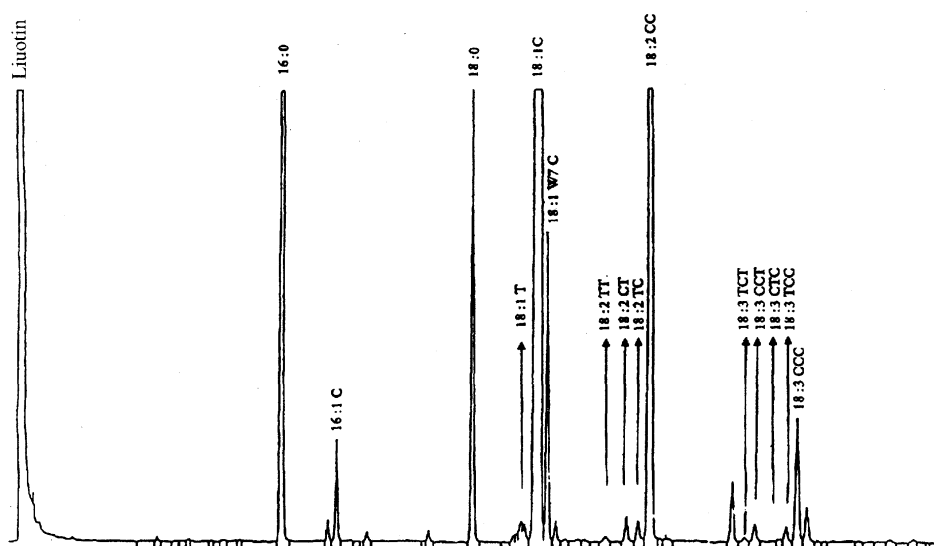
Ruiskutetun määrän on oltava sellainen, että käytetyissä herkkyysolosuhteissa arakidonihapon metyyliesteriä vastaavan piikin korkeus on vähintään 20 % asteikon alarajasta.

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

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

Kuva 2

Kaasukromatogrammi, joka kuvaa rasvahappojen trans-isomeerien määrittystä kapillaarikolonin avulla



- 6.5 Kolonin 4.1.2 kohdan mukaisesti määritetyn tehokkuuden on oltava sellainen, että se sallii tiettyjen kriittisten parien erottamisen, esimerkiksi parin, joka muodostuu oleiinihapon piikistä ja transoleiinihappojen massiivista, trans C 18:1/cis C 18:1, siten, että resoluutioluku on suurempi kuin 2.
- 6.6 Eri ”trans”-rasvahappojen prosenttiosuus lasketaan niihin liittyvän piikin pinta-alan ja kaikkien mukana olevien piikkien yhteenlasketun pinta-alan välisen suhteen perusteella.

Seuraavien rasvahappojen prosenttiosuudet on otettava huomioon:

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

▼ **M2**

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

▼ **B**

7 ERIKOISTAPPAUS — KATAROMETRIDETEKTORIN KÄYTTÖ
(PERUSTUU LÄMMÖNJOHTOKYVYN MUUTOKSIIN)

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

Kvantitatiivista määrittystä varten käytetään 5.2.2.2 kohdan mukaisia korjauskertoimia.

Taulukko 3

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

8 KOESELÖSTE

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

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

▼ **M19***LIITE X B***OLIIVIÖLJYN JA OLIIVIN PURISTEMASSAÖLJYN
RASVAHAPPOJEN METYYLIESTEREIDEN VALMISTAMINEN**

Oliiviöljyn ja oliivin puristemassaöljyn metyyliestereiden valmistamiseksi suositellaan seuraavia kahta menetelmää:

Menetelmä A: Transesteröinti kaliumhydroksidin metanoliliuoksella kylmässä.

Menetelmä B: Metylointi natriummetylaatin metanoliliuoksella kuumassa, minkä jälkeen esteröinti happamassa ympäristössä.

Menetelmä valitaan määriteltävän analyttisen parametrin ja öljyluokan perusteella seuraavasti:

a) E₄₂-triglyseridien määrittystulosten ja teoreettisten pitoisuuksien välisen eron määrittäminen:

— menetelmää A sovelletaan kaikkien luokkien öljyihin sen jälkeen, kun öljy on puhdistettu pihhappogeelikolonissa;

b) rasvahappokoostumuksen määrittäminen:

— menetelmää A sovelletaan suoraan seuraavien luokkien öljynäytteisiin:

— neitsytoliiviöljy, jonka vapaiden happojen pitoisuus on alle 3,3 %,

— puhdistettu oliiviöljy,

— oliiviöljy (neitsytoliiviöljyn ja puhdistetun oliiviöljyn sekoitus),

— puhdistettu oliivin puristemassaöljy,

— oliivin puristemassaöljy (neitsytoliiviöljyn ja puhdistetun oliivin puristemassaöljyn sekoitus),

— menetelmää B sovelletaan sellaisenaan seuraavien luokkien öljynäytteisiin:

— neitsytoliiviöljy, jonka vapaiden happojen pitoisuus on yli 3,3 %,

— Raaka oliivin puristemassaöljy,

c) trans-isomeerien rasvahappojen määrittäminen:

— menetelmää A sovelletaan suoraan seuraavien luokkien öljynäytteisiin:

— neitsytoliiviöljy, jonka vapaiden happojen pitoisuus on alle 3,3 %,

— puhdistettu oliiviöljy,

— oliiviöljy (neitsytoliiviöljyn ja puhdistetun oliiviöljyn sekoitus),

— puhdistettu oliivin puristemassaöljy,

— oliivin puristemassaöljy (neitsytoliiviöljyn ja puhdistetun oliivin puristemassaöljyn sekoitus),

— menetelmää B sovelletaan seuraavien luokkien öljyihin sen jälkeen, kun öljy on puhdistettu pihhappogeelikolonissa:

— neitsytoliiviöljy, jonka vapaiden happojen pitoisuus on yli 3,3 %,

— raaka oliivin puristemassaöljy.

▼ **M19****ÖLJYNÄYTTEIDEN PUHDISTAMINEN**

Näytteet on tarvittaessa puhdistettava piihappogeelikolonissa käyttäen liuottimena heksaania/dietyylioksidia (87:13, v/v) IUPAC 2.507 -menetelmässä kuvatulla tavalla.

Vaihtoehtoisesti voidaan tehdä kiinteäfaasiuutto piihappopatruneita käyttäen. Piihappopatruneita (1 g, 6 ml) laitetaan tyhjiöeluuttolaitteeseen ja pestään 6 ml:lla heksaania. Tyhjiöinti lopetetaan, jottei kolonni kuivu. Kolonniin laitetaan öljyliuos (noin 0,12 g) 0,5 ml:ssa heksaania. Tyhjiöidään, jotta liuos imeytyy piihappoon, eluoidaan tyhjiössä 10 ml:lla heksaania/dietyylioksidia (87:13 v/v). Homogenoidaan eluaatti kokonaan ja jaetaan se kahdeksi yhtä suureksi näytteeksi. Toinen näyte haihdutetaan kuiviin alipaineessa pyöröhaihduttajassa huoneenlämmössä. Jäännös liotetaan 1 ml:aan heptaania. Saadusta liuoksesta voidaan määrittää rasvahapot kaasukromatografialla. Toinen näyte haihdutetaan ja liotetaan jäännös 1 ml:aan asetonia triglyseridien määrittämiseksi tarvittaessa HPCL-menetelmällä.

RASVAHAPPOJEN METYYLIESTERIEN VALMISTUSMENETELMÄT

1 *Menetelmä A: Transesteröinti kaliumhydroksidin metanoliliuoksella kylmässä*

1.1 *Soveltamisala*

Tätä nopeaa menetelmää sovelletaan oliiviöljyihin ja oliivin puristemas-
saöljyihin, joiden vapaiden happojen pitoisuus on alle 3,3 %. Vapaat
rasvahapot eivät esteröidy kaliumhydroksidilla. Rasvahappojen etyyli-
terit transesteröityvät hitaammin kuin glyseroliesterit, ja on mahdollista,
että ne metyloituvat vain osittain.

1.2 *Periaate*

Metyyliesterit muodostuvat transesteröitymällä kaliumhydroksidin meta-
noliliuoksessa välivaiheessa ennen saippuointia (ISO 5509:2000 -mene-
telmän 5 kohta, IUPAC 2.301 -menetelmän 5 kohta).

1.3 *Reagenssit*

Metanolia, jossa enintään 0,5 % (m/m) vettä.

Heptaania kromatografiaa varten.

Kaliumhydroksidin noin 2 N metanoliliuos, joka saadaan liuottamalla
11,2 grammaa kaliumhydroksidia 100 ml:aan metanolia.

1.4 *Välineistö*

Kierrekorkkisia koeputkia (tilavuus 5 ml), joiden korkissa PTFE-liitos.

Mitta- tai automaattipipetit, 2 ja 0,2 ml.

1.5 *Suoritus*

Mitataan 5 ml:n kierrekorkilliseen koeputkeen noin 0,1 grammaa näyte-
öljyä. Lisätään 2 ml heptaania ja ravistetaan. Lisätään 0,2 ml kaliumhyd-
roksidin 2 N metanoliliuosta, suljetaan tiiviisti PTFE-liitoksella varuste-
tulla korkilla, ravistetaan voimakkaasti 30 sekuntia. Putken annetaan
seistä kunnes liuoksen pintakerros kirkastuu. Erotetaan pintakerros, jossa
metyyliesterit ovat. Heptaaniliuos voidaan injektoida kromatografiin.
Liuos on syytä säilyttää jääkaapissa kunnes se määritetään kromatogra-
filla. Liuosta ei suositella säilyttäväksi yli 12:tä tuntia.

▼ M19**2 Menetelmä B: Metylointi natriummetylaatin metanoliliuoksella kuumassa, minkä jälkeen esteröinti happamassa ympäristössä****2.1 Soveltamisala**

Tätä menetelmää sovelletaan oliiviöljyihin ja oliivin puristemassaöljyihin, joiden vapaiden happojen pitoisuus on yli 3,3 %.

2.2 Periaate

Vapaiden rasvahappojen neutralointi ja glyseridien emäksinen metanolyysi, minkä jälkeen rasvahapot esteröidään happamassa ympäristössä (IUPAC 2.301 -menetelmän 4.2 kohta).

2.3 Reagenssit

- heptaania kromatografiaa varten,
- metanolia, jossa enintään 0,05 % (m/m) vettä,
- natriummetylaatin 0,2 N metanoliliuos, joka saadaan liuottamalla 5 g natriumia 1 000 ml:aan metanolia (voidaan valmistaa kaupallisesta liuoksesta),
- fenoliftaleiinin 0,2 % metanoliliuos,
- rikkihapon 1 N metanoliliuos, joka saadaan lisäämällä 3 ml 96 %:sta rikkihappoa 100 ml:aan metanolia,
- natriumkloridin kyllästettyä vesiliuosta.

2.4 Välineistö

- tasapohjainen mittapullo, tilavuus 50 ml, pitkä- ja kapeakaulainen ja hiosliitoksella varustettu,
- palautusjäähdytin. Ilmapalautusjäähdytin (1 m), jossa hiosliitos,
- Kiehumakivi
- Lasisuppilo

2.5 Suoritus

Kaadetaan 0,25 g näyteöljyä hiottukaulaiseen 50 ml:n pulloon. Lisätään lasisuppilon avulla 10 ml natriummetylaatin 0,2 N metanoliliuosta ja kiehumakivi. Palautusjäähdytin asennetaan paikoilleen, ravistetaan ja keitetään kiehuvaan. Liuoksen on muututtava kirkkaaksi noin 10 minuutissa. Reaktio on käytännössä loppunut 15 minuutin kuluttua. Otetaan pullo lämmönlähteestä, odotetaan palautuksen loppumista, poistetaan jäähdyttävä ja lisätään 2 tippaa fenoliftaleiiniiliuosta. Lisätään muutama ml rikkihapon 1 N metanoliliuosta kunnes se muuttuu värittömäksi, minkä jälkeen lisätään vielä 1 ml. Kytetään jäähdytin päälle ja kuumennetaan uudestaan kiehuvaan noin 20 minuutin ajan. Otetaan pullo lämmönlähteestä ja jäähdytetään juoksevan veden alla. Poistetaan jäähdyttävä, lisätään 20 ml kyllästettyä natriumkloridiliuosta ja ravistetaan. Lisätään 5 ml heptaania, suljetetaan pullo ja ravistetaan voimakkaasti 15 sekuntia.

Annetaan erottua, kunnes molemmat faasit ovat täysin erottuneet. Lisätään kyllästettyä natriumkloridiliuosta kunnes vesifaasi nousee pullon kaulan alareunan tasalle. Pullon kaulassa oleva pintafaasi sisältää metyyliesterit. Saatua liuos voidaan injektoida kaasukromatografiin.

Huom: Menetelmää B käytettäessä metylointi on tehtävä vetokaapissa.

▼ **M19****2.6 Vaihtoehtoja menetelmän B mukaiselle metyloinnille****2.6.1 Menetelmä C****2.6.1.1 Periaate**

Määritettävä rasva tai öljy käsitellään vetykloridin metanoliliuoksella suljetussa suppilossa 100 °C:ssa.

2.6.1.2 Välineistö

— Noin 5 ml:n vahvaseinäinen lasisuppilo (korkeus 40—45 mm, halkaisija 14—16 mm).

— Mittapipettejä, 1 ja 2 ml.

2.6.1.3 Reagenssit

Kloorivetyhapon 2 % metanoliliuos, valmistettu kaasumaisesta kloorivetyhaposta ja vedettömästä metanolista (Huom. 1).

Heksaania kromatografiaa varten

Huom 1: On mahdollista käyttää kaupallisia kloorivetyhapon metanoliliuoksia. Pieniä määriä vetykloridikaasua voidaan helposti valmistaa laboratoriossa lisäämällä kaupalliseen liuokseen ($p = 1,18$) muutama tippa väkevää rikkihappoa. 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. Reagenssi voidaan valmistaa myös liuottamalla asetyylikloridia vedettömään metanoliin.

2.6.1.4 Suoritus

— Ennalta natriumsulfaatilla kuivattua ja suodatettua rasvaa tai öljyä punnitaan 0,2 g lasipulloon ja lisätään 2 ml vetykloridin metanoliliuosta. Suljetaan pullo.

— Uпотetaan pullo 100 °C:een 40 minuutiksi.

— Jäähdytetään pullo juoksevan veden alla, avataan ja lisätään 2 ml tislattua vettä ja 1 ml heksaania.

— Sentrifugoidaan ja poistetaan heksaanifaasi, joka on valmis käytettäväksi.

2.6.2 Menetelmä D**2.6.2.1 Periaate**

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

2.6.2.2 Välineistö

— Hiosliitoksella varustettu koeputki, tilavuus noin 20 ml, jossa noin 1 m:n pituinen ilmapalautusjäähdytin.

▼ M19

- Mittapipetti, 5 ml
- Erotussuppilo, 50 ml
- Koeputkia, 10 ja 25 ml
- Kartiopohjainen koeputki, tilavuus 15 ml.

2.6.2.3 Reagenssit

- Metylointireagenssi: vedettömän metanolin, heksaanin ja väkevän rik-
kihapon ($p = 1,84$) seos 75:25:1 (v/v/v).
- Petrolieetteri, 40—60 °C.
- Vedetön natriumsulfaatti.

2.6.2.4 Suoritus

Punnitaan 20 ml:n putkeen 0,1 g öljyä ja lisätään 5 ml metylointireagenssia.

Palautusjäähdytin asennetaan paikoilleen ja koeputkea kuumennetaan 30 minuuttia kiehuvaan vesihauteeseen (Huom. 2).

Seos siirretään kvantitatiivisesti 50 ml:n erotussuppiloon käyttäen 10 ml tislattua vettä ja 10 ml petrolieetteriä. Ravistetaan voimakkaasti ja odotetaan faasien erottumista. Erotetaan vesifaasi ja pestään eetterifaasi kaksi kertaa 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. 2: Kiehumisen hillitsemiseksi koeputkeen asetetaan lasisauva ja estetään vesihauteen lämpötilaa nousemasta yli 90 °C:n.

3 Tarkkuusparametrit

Kansainvälisen oliiviöljyneuvoston menetelmässä COI/T.20/DOC. nro 24 esitetään menetelmien A ja B tarkkuuden tilastollinen arvio.

**SUOSITUKSET OLIIVIÖLJYN JA OLIIVIN PURISTEMASSAÖLJYN
RASVAHAPPOJEN ESTERIEN KAASUKROMATOGRAFISTA
MÄÄRITYSTÄ VARTEN**

1 Suoritus

Rasvahappojen esterien heksaaniliuosten kaasukromatografinen määrittäminen tehdään ISO 5508 -standardin mukaisesti käyttämällä kapillaarikolonnia (pituus 50 m × sisähalkaisija 0,25 tai 0,32 mm), joka on varustettu syanopropysilikonipinnoitteella, kuten trans-isomeerien rasvahappojen määrittämiseksi on vahvistettu. (ks. COI/T.20/Asiakirja nro 17).

Kuviossa 1 esitetään rasvahappojen metyyli- ja etyyliestereitä sekä metyyliestereiden trans-isomeerejä sisältävän oliivin puristemassaöljyn tyyppillinen kromatogrammi.

2 Laskeminen**2.1 Rasvahappokoostumuksen ja ECN42:n laskemiseksi on otettava huomioon seuraavat rasvahapot:**

Myristiinihappo (C14:0).

Palmitiinihappo (C16:0) Metyyli- ja etyyliestereitä vastaavien piikkien pinta-alojen summa.

▼ M19

Palmitoleiinihappo (C16:1) Metyyliestereiden ω 9- ja ω 7 -isomeerejä vastaavien piikkien pinta-alojen summa.

Heptadekaanihappo (C17:0).

Heptadekeenihappo (C17:1).

Steariinihappo (C18:0).

Oleiinihappo (C18:1) Metyyliestereiden ω 9- ja ω 7 -isomeerejä, etyyliesterejä sekä metyyliestereiden trans-isomeerejä vastaavien piikkien pinta-alojen summa.

Linolihappo (C18:2) Metyyli- ja etyyliesterejä ja metyyliestereiden trans-isomeerejä vastaavien piikkien pinta-alojen summa.

Arakidiinihappo (C20:0).

Linoleenihihappo (C18:3) Metyyliesterejä ja metyyliestereiden trans-isomeerejä vastaavien piikkien pinta-alojen summa.

Eikosaeenihihappo (C20:1).

Beheenihappo (C22:0).

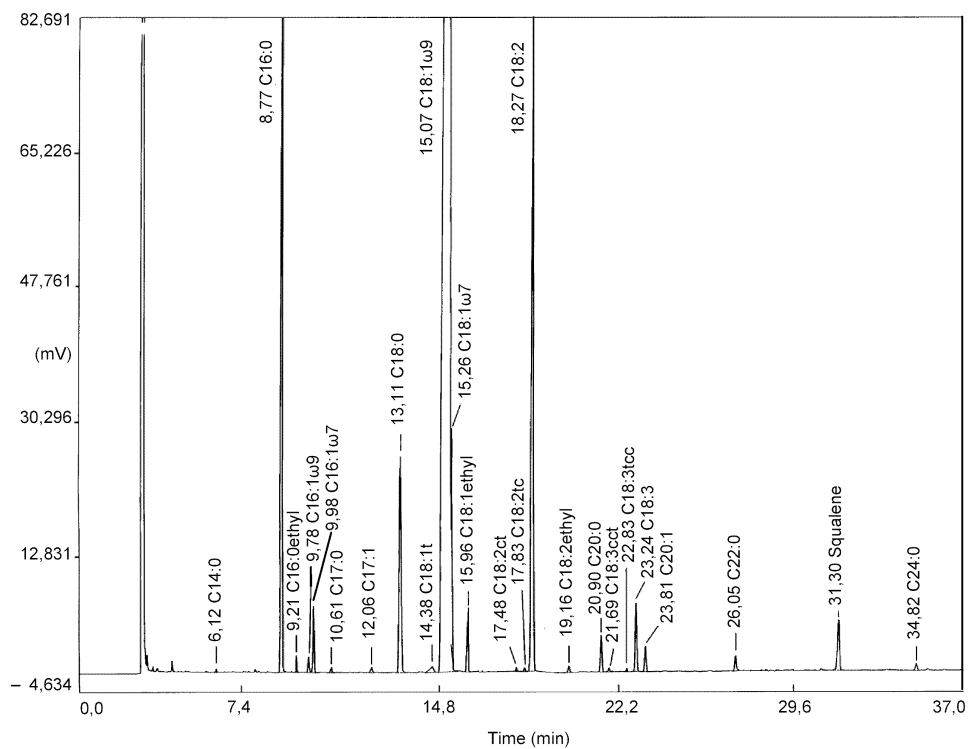
Lignoseriinihihappo (C24:0).

Skvaleenia ei oteta huomioon kokonaispinta-alaa laskettaessa.

- 2.2 Trans-C18:1:n prosenttiosuutta laskettaessa käytetään kyseisen rasvahapon metyyliestereitä vastaavaa piikkiä. Trans-C18:2 ja trans-C18:3:n summan saamiseksi lasketaan yhteen kaikki molempien rasvahappojen trans-isomeerejä vastaavat piikit. Kokonaispinta-alan laskemiseksi otetaan huomioon kaikki 2.1 kohdassa mainitut piikit. (ks. COI/T.20/Asiakirja nro 17).

Kunkin rasvahapon prosenttiosuus lasketaan seuraavan kaavan mukaisesti:

$$\% X = (\text{pinta} - \text{ala } X \times 100) / (\text{kokonaispinta} - \text{ala})$$

▼ **M19**

Kuvio 1: Metylaatiomenetelmällä kylmässä saatu oliivin puristemassaöljyn kromatogrammi. Kromatogrammin piikit vastaavat metyyliestereitä, ellei toisin mainita.



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 Kaasukromatografiakolonne, lasinen, pituus 2 m, halkaisija 2 mm, stationääri-faasi.

OV101 10 % tai vastaava, kalsinoituun, happopestyyn ja silanoituun piimaa-han imeytettynä, hiukkaskoko 80—100 mesh.

2.4 Kantaja- ja apukaasu: kaasukromatografiaan tarkoitettua tyyppiä, joka sovel-tuu elektronikaappausdetektorille.

2.5 Teflonpinnoitteisia lasipulloja, 10—15 ml, varustettu alumiinitulpalla, jossa on sovitettu näytteenotto-ruiskua 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.

▼ **M26***LIITE XII***KANSAINVÄLISEN OLIVINEUVOSTON MENETELMÄ NEITSYTO-LIIVIÖLJYJEN AISTINVARAISTA ARVIOINTIA VARTEN****1. TARKOITUS JA SOVELTAMISALA**

Tämän kansainvälisen menetelmän tarkoituksena on määrittää asetuksen (EY) N:o 1234/2007 liitteessä XVI olevassa 1 kohdassa tarkoitettujen neitsytoliiviöljyjen aistinvaraisten ominaisuuksien arvioinnissa käytettävä menettely ja vahvistaa menetelmä niiden luokitteluksi kyseisten ominaisuuksien perusteella. Menetelmässä annetaan myös valinnaisia pakkausmerkintöjä koskevia ohjeita.

Kuvattua menetelmää sovelletaan ainoastaan neitsytoliiviöljyihin ja niiden luokitteluun tai niiden pakkausmerkintöihin raadissa havaittujen virheiden ja hedelmäisyyden voimakkuuden perusteella. Raadin muodostaa ryhmä valikoituja, koulutettuja ja valvottuja maistajia.

Menetelmässä annetaan myös valinnaisia pakkausmerkintöjä koskevia ohjeita.

Tässä liitteessä mainituista kansainvälisen oliivineuvoston standardeista käytetään niiden viimeisintä saatavilla olevaa versiota.

2. YLEINEN PERUSSANASTO AISTINVARAISTA ARVIOINTIA VARTEN

Viitataan standardiin IOC/T.20 / Asiak. nro 4 *Sensory Analysis: General Basic Vocabulary* (Aistinvarainen arviointi: yleinen perussanasto).

3. ERITYISSANASTO**3.1. Negatiiviset ominaisuudet**

Tunkkainen, sakkainen Maku on ominainen öljylle, joka on saatu kasoina tai muutoin sellaisissa olosuhteissa varastoiduista oliiveista, että anaerobin käyminen on päässyt pitkälle, tai öljylle, joka on ollut kosketuksissa niin ikään anaerobiseen käymisprosessiin joutuneen tynnyrien ja sammioiden pohjasakan kanssa.

Homeinen, kostea, maa Maku on ominainen sellaisista oliiveista saadulle öljylle, joita on säilytetty useita päiviä kosteissa olosuhteissa siten, että niihin on päässyt kasvamaan sienirihmastoja ja homeita, tai pesemättömistä maahan pudonneista tai mutaisista oliiveista saadulle öljylle.

Viinimäinen, etikkainen, happoinen, hapan Öljylle ominainen viiniä tai etikkaa muistuttava maku johtuu pääasiassa oliivien tai huonosti pestyissä puristumatoissa olevien oliivimassajäännösten aerobisesta käymisestä, joka johtaa etikkahapon, etyyliasetaatin ja etanolin muodostumiseen.

Eltaantunut Maku on ominainen vahvasti hapettuneelle öljylle.

Jäätäneet oliivit (puumainen, kostea) Maku on ominainen puussa jäätäneistä oliiveista saadulle öljylle.

3.2. Muut negatiiviset ominaisuudet

Paistunut tai palanut Maku on ominainen öljylle, jota on kuumennettu valmistuksen aikana liikaa ja/tai liian pitkään, varsinkin kun tahnaa sekoitetaan ja kuumennetaan samanaikaisesti ja se tehdään sopimattomissa lämpöolosuhteissa.

Heinämäinen, puumainen Maku on ominainen kuivuneista oliiveista tuotetulle öljylle.

Karkea Toisinaan vanha öljy aiheuttaa paksun, tahmean suutuntuman.

▼ **M26**

Rasvainen Öljyn maku muistuttaa petrolia, rasvaa tai mineraaliöljyä.

Kasvisvesi Maku syntyy, kun öljy on ollut kauan kosketuksissa käymisprosessiin joutuneen kasvisveden kanssa.

Suolavesi Maku johtuu siitä, että öljy on saatu suolaliemessä säilötyistä oliiveista.

Metallinen Metallia muistuttava maku on ominainen öljylle, joka on ollut pitkäaikaisessa kosketuksessa metallipintojen kanssa murskauksen, sekoituksen, puristuksen tai varastoinnin aikana.

Espartoheinä Maku on ominainen öljylle, joka on puristettu uusien espartomattojen läpi. Se voi olla erilainen sen mukaan, oliko mattojen esparto vihreää vai kuivaa.

Toukkainen Maku on ominainen öljylle, joka on saatu oliivikärpäsen (*Bactrocera oleae*) toukkien pilaamista oliiveista.

Kurkku Maku syntyy, kun öljyä on säilytetty ilmatiiviissä peltiastioissa liian kauan, ja se johtuu 2,6-nonadienaalin muodostumisesta.

3.3. Positiiviset ominaisuudet

Hedelmäinen Oliivien lajikkeesta riippuvat hajuaistimukset ovat ominaisia hyvänlaatuisista ja tuoreista, raaoista tai kypsistä oliiveista saadulle öljylle. Ne havaitaan suoraan ja/tai nenän takaosan kautta.

Karvas Maku on raaoista tai vielä kypsyvistä oliiveista saadun öljyn perusominaismaku, joka havaitaan kielen takaosan V:n muodostavilla vallinystyillä.

Pistävä Pistelevä suutuntuma on ominainen satokauden alussa pääasiassa vielä raaoista oliiveista tuotetuille öljyille, ja se voidaan havaita koko suuontelossa, erityisesti kurkussa.

3.4. Valinnaiset termit pakkausmerkintöjä varten

Raadin puheenjohtaja voi pyynnöstä todistaa, että arvioidut öljyt ovat ominaisuuksien voimakkuuden ja havaitsemisen osalta seuraavia ilmauksia ja adjektiiveja vastaavien määritelmien ja vertailuvälien mukaisia:

Positiiviset ominaisuudet (hedelmäinen, karvas ja pistävä): Aistimuksen voimakkuuden mukaan:

— ”*voimakas*”, jos asianomaisen ominaisuuden mediaani on yli 6,

— ”*keskivoimakas*”, jos asianomaisen ominaisuuden mediaani on 3–6,

— ”*mieto*”, jos asianomaisen ominaisuuden mediaani on alle 3.

Hedelmäinen Oliivien lajikkeesta riippuvat hajuaistimukset ovat ominaisia hyvänlaatuisista ja tuoreista oliiveista saadulle öljylle, jossa raakoja ja kypsiä oliiveja on samassa suhteessa. Ne havaitaan suoraan ja/tai nenän takaosan kautta.

Vihreän hedelmäinen Oliivien lajikkeesta riippuvat hajuaistimukset tuovat mieleen vihreät hedelmät. Ne ovat ominaisia raaoista, hyvänlaatuisista ja tuoreista oliiveista saadulle öljylle. Ne havaitaan suoraan ja/tai nenän takaosan kautta.

▼ **M26**

Kypsan hedelmäinen Oliivien lajikkeesta riippuvat hajuaistimukset tuovat mieleen kypsät hedelmät. Ne ovat ominaisia hyvännlaatuisista ja tuoreista oliiveista saadulle öljylle. Ne havaitaan suoraan ja/tai nenän takaosan kautta.

Tasapainoinen Öljy ei ole epätasapainossa; epätasapainolla tarkoitetaan sellaisen öljyn haju- ja makuaihimusta sekä suutuntumaa, jossa karvauuden ja/tai pistävyyden mediaani on yli kaksi yksikköä korkeampi kuin hedelmäisyyden mediaani.

Mieto öljy Karvauuden mediaani ja pistävyyden mediaani ovat öljyssä 2 tai vähemmän.

4. LASI ÖLJYN MAISTAMISTA VARTEN

Viitataan standardiin IOC/T.20 / Asiak. nro 5, *Glass for Oil Tasting* (Öljynmaistamislasi).

5. MAISTAMISHUONE

Viitataan standardiin IOC/T.20 / Asiak. nro 6, *Guide for the Installation of a Test Room* (Maistamishuoneen suunnittelu).

6. TARVIKKEET

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

- laseja (standardoituja), joissa tunnuksella merkityt näytteet peitetään kellolasilla ja säilytetään $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$:n lämpötilassa,
- profiililomake (ks. kuva 1) paperitulosteena tai tiedostona edellyttäen, että profiililomakkeen käyttöä koskevat ehdot täyttyvät; tarvittaessa lomakkeen käyttöohjeet,
- kuulakärkikynä tai pysyvä muste,
- tarjottimia, joilla omenalohkoja ja/tai vettä, hiilihapotettua vettä ja/tai korppuja,
- lasillinen huoneenlämpöistä vettä,
- 8.4 ja 9.11 kohdassa luetellut yleiset säännöt,
- sylkykuppeja.

7. RAADIN PUHEENJOHTAJA JA MAISTAJAT

7.1. **Raadin puheenjohtaja**

Raadin puheenjohtajalla on oltava asianmukainen koulutus ja asiantuntemusta niistä öljyistä, joita työn kuluessa tulee käsiteltäväksi. Puheenjohtaja on raadin avainhenkilö ja vastaa sen organisaatiosta ja toiminnasta.

Raadin puheenjohtajan työ edellyttää peruskoulutusta aistinvaraisen arvioinnin välineisiin, aistinvaraisia taitoja, huolellisuutta kokeiden valmistelussa, järjestämisessä ja toteuttamisessa sekä taitoa ja kärsivällisyyttä suunnitella ja toteuttaa kokeet tieteellisellä tavalla.

Puheenjohtaja on yksin vastuussa maistajien valinnasta, koulutuksesta ja valvonnasta, jotta näiden soveltuvuus tehtäväänsä säilyy riittävän hyvänä. Puheenjohtaja vastaa siten myös maistajien arvioinnista, jonka on aina oltava objektiivista ja jota varten puheenjohtajien on kehitettävä erityiset kokeisiin perustuvat menettelyt ja hyvin perustellut hyväksyntä- ja hylkäämisperusteet. Viitataan standardiin IOC/T.20 / Asiak. nro 14, *Guide for the selection, training and monitoring of skilled virgin olive oil tasters* (Neitsytoliiviöljyn pätevien maistajien valinta-, koulutus- ja valvontaopas).

Raadin puheenjohtaja on vastuussa raadin toiminnasta ja siten sen suorittamasta arvioinnista, josta puheenjohtajan on esitettävä luotettavaa ja objektiivista näyttöä. Puheenjohtajan on kaikissa tapauksissa aina voitava osoittaa, että menetelmä ja maistajat ovat hänen hallinnassaan. Suositellaan, että raati kalibroidaan määrääjoin (IOC/T.20 / Asiak. nro 14, 5 §).

▼ **M26**

Puheenjohtaja on viime kädessä vastuussa raadin asiakirjojen säilyttämisestä. Asiakirjojen on aina oltava jäljitettävissä. Hänen on noudatettava aistinvaraisen arvioinnin varmistamista ja laatua koskevien kansainvälisten standardien vaatimuksia ja varmistettava aina näytteiden nimettömyys.

Puheenjohtaja vastaa välineistön ja tarvittavien laitteiden inventoinnista ja siitä, että ne ovat tämän menetelmän edellyttämien eritelmien mukaisia sekä asianmukaisesti puhdistettuja ja huollettuja. Hänen on varmistettava, että siitä säilytetään kirjalliset todisteet, samoin kuin koeolosuhteiden vaatimustenmukaisuudesta.

Puheenjohtaja vastaa näytteiden vastaanotosta ja säilyttämisestä sen jälkeen, kun ne saapuvat laboratorioon, samoin kuin niiden varastoinnista kokeiden jälkeen. Puheenjohtajan on edellä mainituissa toimissa aina varmistettava, että näytteet pysyvät nimettöminä ja että niitä säilytetään asianmukaisesti. Hänen on laadittava sitä varten kirjalliset menettelyt, joilla varmistetaan koko prosessin jäljitettävyys ja takeet vaatimustenmukaisuudesta.

Lisäksi puheenjohtaja vastaa näytteiden valmistelusta, merkinnästä ja esittelystä maistajille noudattamalla ennalta vahvistettujen protokollien mukaista asiaankuuluvaa koesuunnitelmaa sekä maistajilta saatavien tietojen kokoamisesta ja tilastollisesta käsittelystä.

Puheenjohtaja vastaa myös kaikkien muiden sellaisten menettelyjen kehittelystä ja laatisemasta, joita saatetaan tarvita täydentämään tätä standardia ja varmistamaan, että raati toimii asianmukaisesti.

Hänen on pohdittava keinoja, joilla raadin tuloksia voidaan verrata muiden neitsytoliiviöljyä arvioivien raatien tuloksiin sen varmistamiseksi, että raati toimii asianmukaisesti.

Raadin puheenjohtajan velvollisuus on motivoida raadin jäseniä luomalla heidän keskuudessaan innostunut, utelias ja kilpaileva henki. Tätä varten suositellaan voimakkaasti, että sujuva vuorovaikutus raadin jäsenten kanssa varmistetaan pitämällä jäsenet ajan tasalla kaikista tehtävistä, joita he suorittavat, sekä saaduista tuloksista. Lisäksi puheenjohtajan on varmistettava, että hänen oma mielipiteensä ei ole tiedossa, jotta hän ei siirrä omia perusteitaan muille maistajille.

Puheenjohtaja kutsuu maistajat koolle riittävän ajoissa ja vastaa mahdollisiin kysymyksiin kokeiden suorittamisesta, mutta hän ei saa esittää näytettä koskevia näkemyksiä.

7.2. Maistajat

Oliiviöljyä koskevilla aistinvaraisilla kokeilla maistajina toimivien henkilöiden on oltava vapaaehtoisia ja ymmärrettävä tällaisen vapaaehtoistoiminnan seuraukset velvoitteiden osalta sekä rahallisen korvauksen puuttuminen. Tästä syystä on suositeltavaa, että ehdokkaat tekevät kirjallisen hakemuksen. Raadin puheenjohtaja valitsee ja kouluttaa maistajaehdokkaat ja valvoo heidän taitoaan erottaa samanlaisia näytteitä. On muistettava, että koulutus lisää maistajien tarkkuutta.

Maistajan on toimittava todellisen aistinvaraisen havainnoitsijan tavoin, jätettävä syrjään oma henkilökohtainen makunsa ja raportoitava pelkästään havaitsemistaan aistimuksista. Tätä varten työ on aina tehtävä hiljaisuudessa, rennosti ja kiirehtimättä, jotta aistit voidaan kokonaan suunnata maistettavaan näytteeseen.

Jokaiseen kokeeseen tarvitaan 8–12 maistajaa, vaikka on aina hyvä pitää varalla muutama ylimääräinen maistaja, jotta mahdollisesti poisjääneet voidaan korvata.

▼ M26**8. KOEOLOSUHTEET****8.1. Näytteen esittely**

Arvioitava öljynäyte esitellään standardin IOC/T.20 / Asiak. nro 5, *Glass for Oil Tasting* mukaisessa maistamislasiissa.

Lasissa on 14–16 ml öljyä tai 12,8–14,6 g, jos näytteet punnitaan. Ne on peitetty kellolasilla.

Jokainen lasi on merkitty tunnuksella, joka koostuu kahdesta satunnaisesta numerosta tai kirjaimista. Merkinnät on tehtävä hajuttomalla tavalla.

8.2. Kokeen ja näytteen lämpötila

Maistettavaksi tarkoitetut öljynäytteet on koko kokeen ajan säilytettävä lasissa 28 ± 2 °C:n lämpötilassa. Tämä lämpötila on valittu siksi, että siinä on helpompi havaita aistinvaraisia eroja kuin huonelämpötilassa. Toinen syy tämän lämpötilan valintaan on, että kylmemmässä öljyn aromaattiset aineet tuskin pääsevät haihtumaan ja korkeammassa lämpötilassa haihtuu aineita, jotka ovat ominaisia kuumennetulle öljylle. Näytteen lämmittämiseen lasissa käytettävä menetelmä on esitetty standardissa IOC/T.20 / Asiak. nro 5, *Glass for Oil Tasting*.

Maistamishuoneen lämpötilan on oltava 20–25 °C (ks. IOC/T.20 / Asiak. nro 6).

8.3. Kokeen ajankohta

Aamupäivä on parasta aikaa maistaa öljyjä: on todettu, että päivän aikana on jaksoja, jolloin maku- ja hajuaistimukset havaitaan parhaiten. Maku- ja hajuerokkyys kohoavat ennen aterioita ja vähenevät aterioiden jälkeen.

Tätä seikkaa ei saa kuitenkaan korostaa liikaa niin, että maistajat kärsivät nälän tunteesta, joka häiritsee heitä ja vaikuttaa erottelukykyyn. Siitä syystä maistamistilaisuudet suositellaan järjestettäväksi klo 10–12 aamupäivällä.

8.4. Maistajat: yleiset käyttäytymissäännöt

Maistajien työskentelyyn sovelletaan seuraavia käyttäytymissuosituksia.

Kun raadin puheenjohtaja kutsuu osallistumaan aistinvaraiseen arviointiin, maistajan olisi voitava osallistua etukäteen sovittuna ajankohtana ja noudattaa seuraavia ohjeita:

- Ennen kokeen alkamista maistaja ei tupakoi eikä juo kahvia ainakaan 30 minuuttiin.
- Maistaja ei saa käyttää hajusteita, kosmetiikkaa tai saippuaa, jonka tuoksu voi säilyä koeajankohtaan asti. Kädet pestään tuoksuttomalla saippualla, ja kädet huuhdellaan ja kuivataan pesun jälkeen niin monta kertaa kuin on tarpeen mahdollisen tuoksun poistamiseksi.
- Ennen maistamista ollaan syömättä ainakin yhden tunnin ajan.
- Jos maistaja tuntee olonsa fyysisesti sairaaksi ja varsinkin jos tämä vaikuttaa haju- tai makuaistiin tai jos maistajaan kohdistuva psyykinen paine estää häntä keskittymästä työhönsä, maistaja pidättyy maistamisesta ja ilmoittaa asiasta raadin puheenjohtajalle.
- Noudatettuaan edellä annettuja ohjeita maistaja asettuu hänelle osoitettuun maistamiskoppiin hillitysti ja rauhallisesti.

▼ **M26**

— Maistaja tutustuu huolellisesti profiililomakkeessa annettuihin ohjeisiin. Hän ei ala tutkia näytettä, ennen kuin on täysin valmistautunut tehtävään (rento ja kiireetön). Jos maistajalla on jotain kysymyksiä, hän kysyy yksityisesti neuvoa raadin puheenjohtajalta.

— Tehtävä suoritetaan hiljaisuudessa.

— Matkapuhelin kytketään aina pois päältä, jotta kollegojen keskittyminen ja työskentely ei häiriidy.

9. AISTINVARAINEN ARVIOINTIMENETTELY JA NEITSYTOIIVIÖLJYN LUOKITTELU

9.1. Maistamistekniikka

9.1.1. 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 öljyn arvioimiseksi. Haistaminen ei saa kestää yli 30:tä sekuntia. Ellei maistaja ole tässä ajassa ehtinyt päätyä mihinkään tulokseen, hänen on odotettava hetki ennen kuin yrittää uudelleen.

Kun haistamiskoe on suoritettu, voidaan siirtyä maun arviointiin (sisältää haju-, maku- ja tuntoaistimuksen). Tätä varten maistaja ottaa suuhunsa noin 3 ml öljyä. On tärkeätä, että öljy leviää kaikkialle suuhun, suun etuosasta ja kielen kärjestä sivuja pitkin suun takaosaan ja kitapurjeeseen, sillä makuaistin ja suutuntuman herkkyyks vaihtelevat tunnetusti kitalaen ja kielen eri osissa.

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 pakottaa haihtuvat, aromaattiset yhdisteet nenän takaosaan aistittaviksi.

Myös pistävä suutuntuma otetaan huomioon. Tätä tarkoitusta varten öljy on suositeltavaa niellä.

9.1.2. Kun neitsytoliiviöljyä arvioidaan aistinvaraisesti, yhdellä maistamiskerralla on suositeltavaa arvioida enintään NELJÄÄ NÄYTETTÄ siten, että päivässä järjestetään enintään kolme maistamistilaisuutta, 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, jota pureskellaan ja joka syljetään sitten sylkykupiin. Sen jälkeen suu huuhdellaan pienellä määrällä huoneenlämpöistä vettä. Maistamisten välillä pidetään vähintään 15 minuutin tauko.

▼ **M26****9.2. Miten maistaja käyttää profiililomaketta**

Maistajan käyttämä profiililomake on esitetty yksityiskohtaisesti tämän liitteen kuvassa 1.

Jokainen raatiin kuuluva maistaja haistaa ja maistaa ⁽¹⁾ tarkasteltavaa öljyä. Sen jälkeen hänen on merkittävä profiililomakkeessa oleviin 10 cm:n asteikkoihin kunkin havaitsemansa negatiivisen ja positiivisen ominaisuuden voimakkuus.

Jos maistaja havaitsee negatiivisia ominaisuuksia, joita ei ole lueteltu 4 kohdassa, ne merkitään kohtaan ”muut” käyttämällä ilmauksia, jotka täsmällisimmin kuvaavat kyseisiä ominaisuuksia.

9.3. Miten raadin puheenjohtaja käyttää tietoja

Raadin puheenjohtaja kerää kunkin maistajan täyttämät profiililomakkeet ja tarkastaa eri ominaisuuksille osoitetut voimakkuusasteet. Jos havaitaan poikkeavuuksia, puheenjohtaja pyytää maistajaa tarkistamaan profiililomakkeensa ja tarvittaessa toistamaan kokeen.

Raadin puheenjohtaja vie raadin jäsenten arviointitiedot (standardin IOC/T.20 / Asiak. nro 15 mukaiseen) tietokonesovellukseen, jotta arvioinnin tulokset voidaan laskea tilastollisesti niiden mediaanin perusteella. Ks. tämän liitteen 9.4 kohta ja lisäys. Tiettyä näytettä koskevat tiedot kirjataan yhdeksän saraketta käsittävän matriisin avulla. Sarakkeet edustavat yhdeksää aistimusominaisuutta. Matriisissa on n riviä, jotka edustavat käytettyjen raadin jäsenten lukumäärää n.

Jos vähintään 50 prosenttia raadin jäsenistä on merkinnyt havaitsemansa virheen kohtaan ”muut”, kyseisen virheen mediaani lasketaan ja öljy luokitellaan vastaavasti.

Robusti variaatiokerroin (voimakkuudeltaan voimakkain virhe ja hedelmäinen ominaisuus), joka määrittää luokituksen, saa olla enintään 20 prosenttia.

Jos näin ei ole, raadin puheenjohtajan on toistettava kyseisen näytteen arviointi toisessa maistamistilaisuudessa.

Jos tällainen tilanne toistuu usein, raadin puheenjohtajan on suositeltavaa antaa maistajille erityistä lisäkoulutusta (IOC/T.20 / Asiak. nro 14, 5 §) ja käyttää toistettavuusindeksiä ja poikkeamaindeksiä raadin suorituksen tarkastamiseen (IOC/T.20 / Asiak. nro 14, 6 §).

9.4. Öljyn luokittelu

Öljy luokitellaan jäljempänä esitettyihin luokkiin virheen mediaanin ja hedelmäisyyden ominaisuuden mediaanin mukaan. Virheen mediaanilla tarkoitetaan voimakkaimmin havaitun virheen mediaania. Virheen mediaani ja hedelmäisyyden mediaani ilmaistaan yhden desimaalin tarkkuudella.

Öljy luokitellaan vertaamalla virheen mediaanin ja hedelmäisyyden mediaanin arvoa jäljempänä esitettyihin vertailuväleihin. Koska vertailuvälien rajoja määriteltäessä on otettu huomioon menetelmän virhe, niitä on pidettävä absoluuttisina. Luokittelu voidaan esittää tietokonesovelluksien avulla visuaalisesti tilastotiedoista koottuna taulukkona tai kaaviona.

- a) Ekstra-neitsytoliiviöljy: virheen mediaani on 0 ja hedelmäisyyden mediaani yli 0.

⁽¹⁾ 1 Maistaja voi kieltäytyä maistamasta öljyä, jos hän havaitsee suoraan hajuaistimuksen perusteella jonkin äärimmäisen voimakkaan negatiivisen ominaisuuden. Hänen on merkittävä tällainen poikkeuksellinen TILANNE profiililomakkeeseen.

▼ **M26**

- b) Neitsytoliiviöljy: virheen mediaani on yli 0 mutta enintään 3,5 ja hedelmäisyyden mediaani on yli 0.
- c) Lamppuoliiviöljy: virheen mediaani on yli 3,5 tai virheen mediaani on enintään 3,5 ja hedelmäisyyden mediaani on 0.

Huom. 1:

Jos karvaan ja/tai pistävän ominaisuuden mediaani on yli 5,0, raadin puheenjohtaja tekee siitä merkinnän öljyn arviointitodistukseen.

Kuva 1

NEITSYTOLIIVIÖLJYN PROFILILOMAKE

Havaittujen virheiden voimakkuus		
Tunkkainen/sakkainen (*)		
Homeinen/kostea/maa (*)		
Viinimäinen/etikkainen/happoinen/hapan (*)		
Jäätäneet oliivit (puumainen, kostea)		
Eltaantunut		
Muut negatiiviset ominaisuudet:		
Laatusana:	metallinen ☐ heinämäinen ☐ toukkainen ☐ karkea ☐ suolavesi ☐ paistunut tai palanut ☐ kasvisneste ☐ esparto ☐ kurkku ☐ rasvainen ☐	

(*) Poista tarpeeton.

Havaittujen positiivisten ominaisuuksien voimakkuus		
Hedelmäinen		
	vihreä ☐	kypsä ☐
Karvas		
Pistävä		
Maistajan nimi:		Maistajan tunnus:
Näytteen tunnus:	Allekirjoitus:	

▼ **M26***Lisäys***Mediaanin ja luottamusvälin laskutapa****Mediaani**

$$Me = [p(X < x_m) \leq \frac{1}{2} \wedge p(X \leq x_m) \geq \frac{1}{2}]$$

Mediaanilla tarkoitetaan reaali lukua X_m , joka osoittaa, että todennäköisyys (p) siihen, että jakauman arvot (X) ovat pienempiä kuin X_m , on enintään 0,5 ja että samanaikaisesti todennäköisyys (p) siihen, että jakauman arvot (X) ovat enintään X_m , on vähintään 0,5. Käytännönläheisemmän määritelmän mukaan mediaani on 50. prosenttipiste suuruusjärjestykseen asetetuista luvuista. Yksinkertaisemmin sanottuna mediaani on keskimäinen suuruusjärjestykseen asetetuista luvuista, jos niitä on pariton määrä, tai kahden keskimäisen luvun keskiarvo, jos suuruusjärjestykseen asetettuja lukuja on parillinen määrä.

Robusti keskihajonta

Jotta mediaanin variaatiosta saataisiin luotettava arvio, on käytettävä Stuartin ja Kendallin (4) arviointimenetelmää robustin keskihajonnan määrittämiseksi. Seuraavalla kaavalla saadaan asymptoottinen keskihajonta eli kyseessä olevien tietojen variaation robusti arvio, jossa N on havaintojen lukumäärä ja IQR kvartiilivälin pituus, joka sisältää täsmälleen 50 prosenttia tietyn todennäköisyysjakauman havainnoista.

$$s^* = \frac{1,25 \times \text{IQR}}{1,35 \times \sqrt{N}}$$

Kvartiiliväli lasketaan laskemalla 75. ja 25. prosenttipisteen ero.

$$\text{IQR} = 75.\text{prosenttipiste} - 25.\text{prosenttipiste}$$

Prosenttipiste on arvo X_{pc} , joka osoittaa, että todennäköisyys (p) siihen, että jakauman arvot ovat pienempiä kuin X_{pc} , on enintään tietty prosentti, ja että samanaikaisesti todennäköisyys (p) siihen, että jakauman arvot ovat enintään X_{pc} , on vähintään kyseinen prosentti. Prosentti ilmoittaa tietyn jakauman fraktiilin. Kun kyseessä on mediaani, se on 50/100.

$$\text{prosenttipiste} = [p(X < x_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge p(X \leq x_{pc}) \geq \frac{n}{100}]$$

Käytännössä prosenttipiste on jakauman arvo, joka vastaa tiettyä jakauman tai tiheyden kaarelta rajattua aluetta. Esimerkiksi 25. prosenttipiste edustaa jakauman arvoa, joka vastaa aluetta 0,25 tai 25/100.

Tässä menetelmässä prosenttipisteet lasketaan tietomatriisissa olevien todellisten arvojen perusteella (prosenttipisteiden laskentamenettely).

Robusti variaatiokerroin (%)

Robusti variaatiokerroin $CV_r\%$ on puhdas luku, joka osoittaa analysoitavan lukujoukon variaation prosenttiosuuden. Tämän vuoksi se on erittäin hyödyllinen raadin jäsenten luotettavuuden tarkistamiseksi.

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

▼ **M26****95 prosentin luottamusväli suhteessa mediaaniin**

95 prosentin luottamusväli (ensimmäisen lajin virheen arvo on 0,05 tai 5 prosenttia) kuvaa väliä, jolla mediaanin arvo voi vaihdella, jos koe olisi mahdollista toistaa lukemattomia kertoja. Käytännössä luottamusväli osoittaa kokeen vaihteluväliä valituissa toimintaolosuhteissa, jos oletetaan, että koe voitaisiin toistaa useita kertoja. Luottamusvälin kuten robustin variaatiokertoimenkin avulla voidaan arvioida kokeen luotettavuus.

$$C.I.\text{-Luottamusvälinyläraja} = Me + (c \times s^*)$$

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

jossa $c = 1,96$, kun luottamusväli on 95 prosentin tasolla.

Standardin IOC/T 20 / Asiak. nro 15 liitteessä I on esitetty esimerkkilaskelma.

Kirjallisuus

- (1) Wilkinson, L. (1990). *Systat: The system for statistics*. SYSTAT Inc., Evanston, IL.
- (2) Cicchitelli, G. (1984). *Probabilità e Statistica*. Maggioli Editore, Rimini.
- (3) Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Deming, Y., Michotte, L. (1988). *Chemometrics. A textbook*. Elsevier, Amsterdam.
- (4) Kendall, M. G., Stuart, A. (1967). *The advanced theory of statistics. Vol. 1*. Hafner Publishing Co., New York.
- (5) McGill, R., Tukey, J. W., Larsen, W. A. (1978). Variation of Box Plots. *The American Statistician*, 32: 2, 12–16.
- (6) IOC/T.28 / Asiakirja nro 1 (syyskuu 2007), *Guidelines for the accreditation of sensory testing laboratories with particular reference to virgin olive oil according to standard ISO/IEC 17025:2005*.
- (7) IOC/T.20 / Asiakirja nro 14.
- (8) IOC/T.20 / Asiakirja nro 15.
- (9) ISO/IEC 17025:05.

▼ **M20**

▼ **M19**

▼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.

▼B**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 ilmvirtaan, jotta suurin osa imeytyneestä liuottimesta haihtuisi.

2.7 Toinen uutto

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

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

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

2.8 Liuottimen poistaminen ja uutteen punnitseminen

Tislataan pois ensin osa liuottimesta haihduttamalla 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:

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

▼B

jossa: S = saadun tuotteen uutteen painoprosentti,

m₀ = näytteen paino grammoina,

m₁ = 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

Saman kokeen tekijän peräkkäisten tai samanaikaisten rinnakkaiskokeiden tulosten välinen ero ei saa olla yli 0,2 g heksaaniuutetta/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.

▼B*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 määritetyissä olosuhteissa.

Jodiluku ilmoitetaan grammoina jodia/100 g näytettä.

3 PERIAATE

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

4 REAGENSsit

Kaikkien reagenssien on oltava hyväksyttyä analyysilaatua.

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

Lisätään 5 g liukoista tärkkelystä 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 määritetty oletetun jodiluvun perusteella taulukon 1 mukaisesti.

▼ B

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
151—200	0,10

Näyttemäärä 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.

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

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

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

Huom. Myös potentiometrinen titrauksen loppupisteen määrittäminen on sallittua.

7.3 Määrittäminen lukumäärä

Samasta näytteestä tehdään kaksi määrittäystä.

8 TULOSTEN ESITTÄMINEN

Jodiluku saadaan kaavasta

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

jossa:

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

V₁ = sokeakokeeseen käytetyn natriumtiosulfaattiliuksen (4.4) tilavuus millilitroina;

▼B

V_2 = määrittelykseen käytetyn natriumtiosulfaattiliuoksen (4.4) tilavuus millilitroina;

m = näytemäärä (7.1) grammoina.

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

▼ **M11***LIITE XVII***MENETELMÄ STIGMASTADIEENIEN MÄÄRITTÄMISEKSI KASVI-ÖLJYISTÄ****1. TARKOITUS**

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

2. SOVELTAMISALA

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

3. PERIAATE

Saippuoitumattoman aineksen erottaminen. Steroidihiilivetyfraktion erottaminen pylväskromatografian avulla käyttäen silikageeliä ja kapillaarikaa-sukromatografista määrittystä.

4. LAITTEISTO

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

Huomautus 1:

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

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

▼ **M11**

5. REAGENSsit

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

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

Huomautus 2:

Liuotin on tislattava epäpuhtauksien poistamiseksi.

- 5.2 96-prosenttista (v/v) etanolia.

- 5.3 Vedetöntä natriumsulfaattia.

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

Huomautus 3:

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

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

Huomautus 4:

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

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

- 5.6 Kolest-3,5-dieenin (Sigma, 99-prosenttinen puhtaus) varastoliuos (200 ppm) heksaanissa (10 mg 50 ml:ssa).

- 5.7 Kolest-3,5-dieenin standardiliuos heksaanissa, pitoisuus 20 ppm, saadaan laimentamalla edellä mainitusta liuksesta.

Huomautus 5:

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

- 5.8 n-nonakosaanin heksaaniliuos, pitoisuus n. 100 ppm.

- 5.9 Kantajakaasu kromatografiaa varten: helium tai vety, puhtaus 99,9990 %.

- 5.10 Apukaasut liekki-ionisaatiodektektoria varten: vety, jonka puhtaus on 99,9990 %, ja puhdistettu ilma.

▼ **M11**

6. MENETTELY

6.1 **Saippuoitumattoman aineksen valmistelu:**

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

huomautus 6:

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

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

6.2 **Steroidihiilivetyjakeen erottaminen:**

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

Huomautus 7:

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

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

Huomautus 8:

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

▼ **M11****6.3 Kaasukromatografia****6.3.1** Työskentelyolosuhteet jakajakatyyppistä injektoria varten:

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

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

Kaasukromatografijärjestelmä on tarkistettava ruiskuttamalla kolestadienin (5.6) varastoliuoksen ja n-nonakosaaniliuoksen (5.8) seosta. Kolestadienin huippu tulee esiintyä ennen n-notakosaanin huippua (kuva 1c); jos näin ei käy, voidaan menetellä kahdella tavalla: alentaa uunin lämpötilaa ja/tai käyttää polaarisuudeltaan pienempää kolonnia.

6.3.2 Huipun tunnistaminen

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

Huomautus 9:

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

6.3.3 Kvantitatiivinen määrittäminen

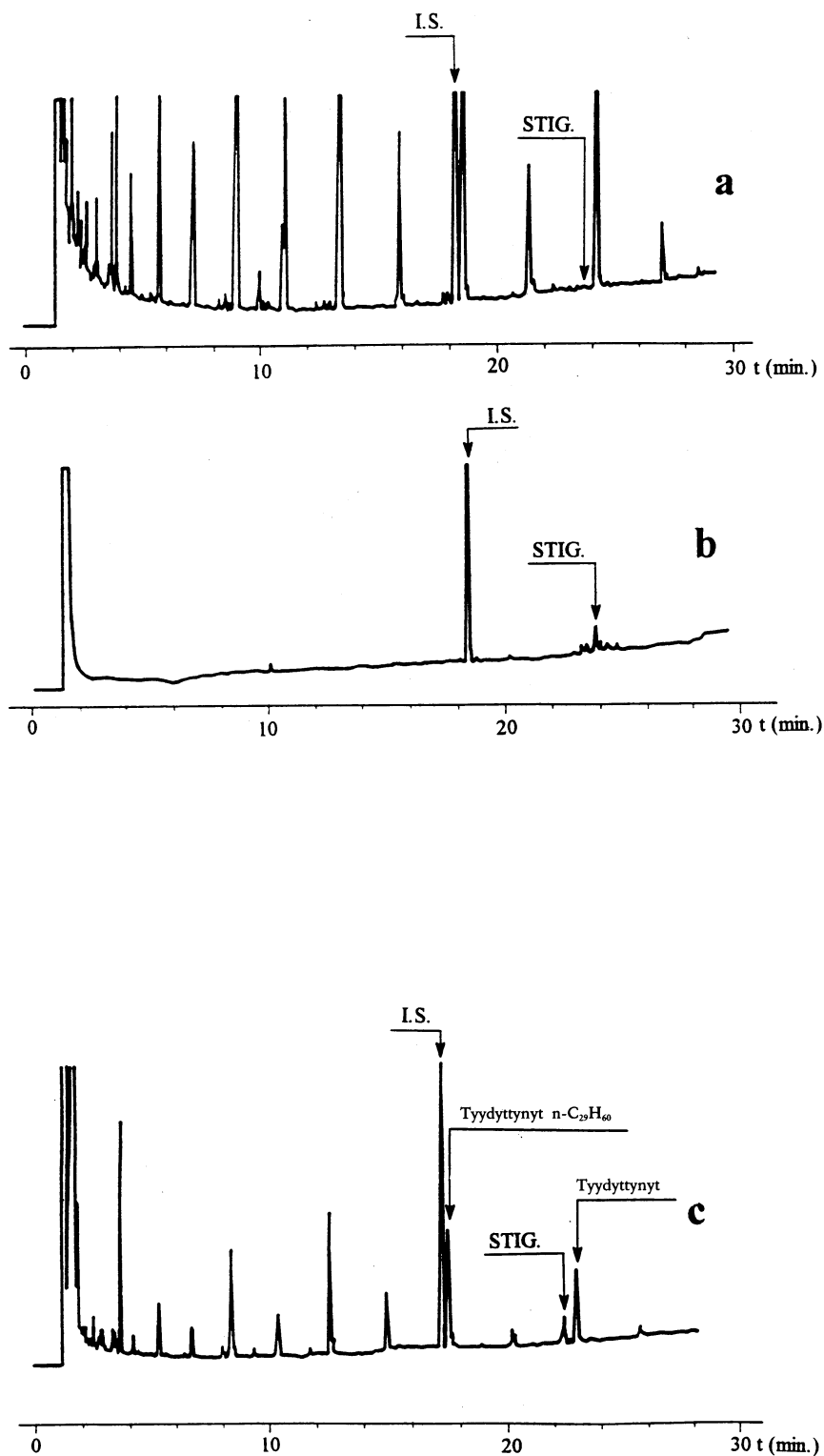
Stigmastadienipitoisuus määritetään seuraavan kaavan avulla:

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

▼M11

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

Toteamisraja: noin 0,01 mg/kg.

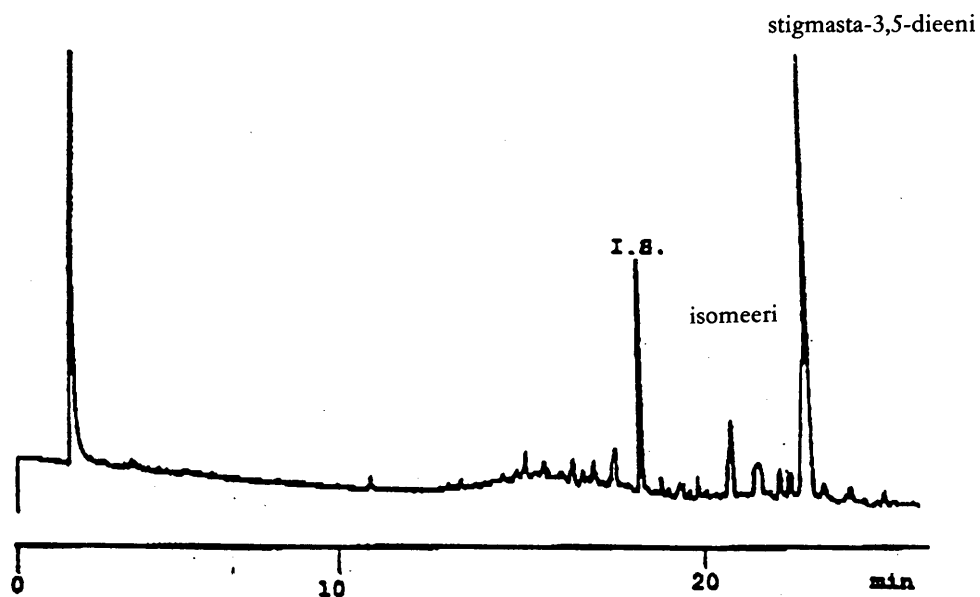
▼ M11

Kuva 1

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

▼ **M11**

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



Kuva 2

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

▼ **M25***LIITE XVIII***ECN42-TRIASYYLIGLYSEROLIEN TEOREETTISEN KOOSTUMUKSEN JA TODELLISEN KOOSTUMUKSEN VÄLISEN ERON MÄÄRITYS****1. SOVELTAMISALA**

Seuraavien arvojen välisen absoluuttisen eron määrittäminen: triasyyliglyserolien (TAG), joiden ekvivalenttihiililuku on 42 (ECN₄₂^{HPLC}), kokeelliset arvot, jotka saadaan määrittämällä ne öljyssä suuren erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografialla, ja triasyyliglyserolien, joiden ekvivalenttihiililuku on 42 (ECN 42^{theoretical}), teoreettinen arvo, joka saadaan laskemalla rasvahappokoostumuksesta.

2. SOVELTAMISALA

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

3. PERIAATE

Aitojen oliiviöljyjen ECN42-triasyyliglyserolien HPLC-analyysillä määritetty ja ECN42-triasyyliglyserolien teoreettinen koostumus (joka laskeaan rasvahappokoostumuksen GLC-määrityksen perusteella) vastaavat tietyissä rajoissa toisiaan. Jos erotus on suurempi kuin öljytyypille vahvistettu arvo, on öljyssä todennäköisesti siemenöljyä.

4. MENETELMÄ

Menetelmä ECN42-triasyyliglyserolien teoreettisen pitoisuuden ja HPLC-määrityksen tulosten välisen erotuksen laskemiseksi perustuu pääasiallisesti muilla menetelmillä saatujen analyttisten tietojen koordinoitiin. Tässä voidaan erottaa kolme vaihetta: rasvahappokoostumuksen määrittäminen kapillaarikaasukromatografialla, ECN42-triasyyliglyserolien teoreettisen koostumuksen laskeminen ja ECN42-triasyyliglyserolien HPLC-määritys.

4.1 Välineistö

4.1.1 Pyörökolveja, 250 ml ja 500 ml

4.1.2 Dekanttilaseja, 100 ml

4.1.3 Lasinen kromatografiapylväs, sisähalkaisija 21 mm, pituus 450 mm, jossa on tulppa ja standardoitu naaraspuolinen hios yläpäässä

4.1.4 Erotussuppiloita, 250 ml, joissa on standardoitu koiraspuolinen hios alapäässä ja joka voidaan liittää pylvään yläpäähän

4.1.5 Lasisauva, pituus 600 mm

4.1.6 Lasisuppilo, halkaisija 80 mm

4.1.7 Mittapulloja, 50 ml

4.1.8 Mittapulloja, 20 ml

4.1.9 Pyöröhaihdutin

4.1.10 Korkean suorituskvyn nestekromatografi, jonka pylväs voidaan termosoida

4.1.11 Injektiolaite, jolla voidaan injisoida 10 µl

4.1.12 Detektori: differentiaalirefraktometri. Koko asteikon herkkyys pitäisi olla vähintään 10⁻⁴ taitekerroinysikköä.

▼ **M25**

4.1.13 Pylväs: ruostumatonta terästä, pituus 250 mm ja sisähalkaisija 4,5 mm, johon pakattu 5 µm:n piihappopartikkeleja, jotka sisältävät 22–23 % hiiltä okta-dekyylisilaanin muodossa.

4.1.14 Tietokoneohjelma tulosten käsittelyyn

4.1.15 Suppiloita, noin 2 ml, joissa teflon-septumit ja kierrekorkit.

4.2 Reagenssit

Reagenssien on oltava analyysipuhtausluokkaa. Eluointiliuottimista on poistettava kaasut, ja niitä voi käyttää useaan kertaan ilman että se vaikuttaa erotuksiin.

4.2.1 Petrolieetteri 40–60 °C, kromatografialaatu, tai heksaani

4.2.2 Etyylieetteri, peroksidivapaa, tislattu juuri ennen käyttöä

4.2.3 Eluutioliuotin öljyn puhdistamiseksi kolonnikromatografialla: petrolieetterin ja etyylieetterin seos 87/13 (v/v)

4.2.4 Piihappogeeli, 70–230 mesh, tyyppiä Merck 7734, jonka vesipitoisuus on standardoitu 5 prosenttiin (w/w)

4.2.5 Lasivilla

4.2.6 Asetoni HPLC-määrittystä varten

4.2.7 Asetonitriili tai propionitriili HPLC-määrittystä varten

4.2.8 HPLC-eluutioliuotin: asetonitriili + asetoni (osuudet säädetään siten että saadaan haluttu erotus; aloitetaan 50:50-seoksella) tai propionitriili

4.2.9 Liuottamisliuotin: asetoni

4.2.10 Vertailutriglyseridit: joko käytetään kaupallisia triglyseridejä (tripalmitiini, trioleiini jne.) ja kuvataan retentioajat ekvivalenttihiililuvun funktiona tai tehdään vertailukromatogrammit soijaöljy-oliiviöljyseoksella suhteessa 30:70 ja puhtaalla oliiviöljyllä (ks. huomautukset 1 ja 2 sekä kuvat 1–4).

4.2.11 Kiinteäfaasiuuttopylväs, jossa on piihappofaasi 1 g, 6 ml

4.3 Näytteen valmistus

Koska monet aineet voivat antaa vääriä positiivisia tuloksia, näyte on aina puhdistettava paistorasvoissa esiintyvien polaaristen yhdisteiden määrittämiseen tarkoitetulla IUPAC-menetelmällä 2.507.

4.3.1 Kromatografiapylvään valmistelu

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

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

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

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

▼ **M25****4.3.2 Pylväskromatografia**

Punnitaan 0,001 g:n tarkkuudella $2,5 \pm 0,1$ g öljyä, joka on etukäteen suodatettu ja homogenoitu ja josta on tarvittaessa poistettu vesi, 50 ml:n mittapulloon (4.1.7).

Öljy liuotetaan noin 20 ml:aan eluutioliuotinta (4.2.3). Lämmitetään tarvittaessa liuottamisen helpottamiseksi. Annetaan jäähtyä huoneenlämpötilaan, ja tilavuus säädetään merkkiin eluutioliuottimella.

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

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

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

Pylvästä on saatava talteen vähintään 90 % näytteestä, kun kyseessä ovat ekstraneitsytoliiviöljyn, neitsytoliiviöljyn, puhdistetun oliiviöljyn ja oliiviöljyn luokat, ja vähintään 80 %, kun kyseessä ovat lamppuöljyt ja oliivin puristemassaöljyt.

4.3.3 Puhdistus kiinteäfaasiuuttona

Kiinteäfaasiuuttopihappopylväs aktivoidaan 6 ml heksaanilla (4.2.3) tyhjiössä kuivumista välttää.

Punnitaan 0,001 g:n tarkkuudella 0,12 g 2 ml:n pulloon (4.1.15) ja liuotetaan 0,5 ml:lla heksaania (4.2.3).

Täytetään kiinteäfaasiuuttopylväs liuksella ja eluoidaan tyhjiössä 10 ml:lla heksaania/dietyylioksidia (87:13 v/v) (4.2.3).

Kerätty jae haihdutetaan kuiviin alipaineessa pyöröhaihduttajassa (4.1.9) huoneenlämmössä. Haihdutusjäännös liuotetaan 2 ml:aan asetonia (4.2.6) triasyyliglyserolien määrittystä varten.

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

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

4.4.2 Menettely

Kootaan kromatografialaitteisto. Eluutioliuotinta (4.2.8) pumpataan nopeudella 1,5 ml/min laitteiston puhdistamiseksi. Odotetaan, kunnes perusviiva on tasainen.

Injisoidaan 10 µl näytettä, joka on valmistettu kuten kohdassa 4.3 selostetaan.

4.4.3 Tulosten laskeminen ja ilmoittaminen

Käytetään sisäisen standardin menetelmää, ts. oletetaan, että TAGien (ECN42-triglyserideistä ECN52-triglyserideihin) piikkien yhteenlasketut pinta-alat ovat 100 %.

Kunkin triglyseridin suhteellinen prosenttiosuus lasketaan kaavalla:

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

Tulokset on ilmoitettava vähintään kahden desimaalin tarkkuudella.

Ks. alaviitteet 1–4.

▼ **M25****4.5 Triasyyliglyseridien koostumuksen laskeminen (mooli-%) rasvahappokoostumusta koskevista tiedoista (pinta-ala-%)****4.5.1 Rasvahappokoostumuksen määrittäminen**

Rasvahappokoostumus määritetään ISO 5508 -standardia noudattaen kappilaarikolonnilla. Metyyliesterit valmistetaan asiakirjan COI/T.20/Doc. No 24 mukaisesti.

4.5.2 Laskemisessa huomioon otettavat rasvahapot

Glyseridit ryhmitellään niiden ekvivalenttihiililuvun (ECN) mukaan ottaen huomioon seuraavat vastaavuudet ECN:n ja rasvahappojen välillä. Huomioon otetaan ainoastaan 16 ja 18 hiiliatomia sisältävät rasvahapot, koska niillä on merkitystä oliiviöljylle. Rasvahapot olisi standardoitava 100 %:iin.

Rasvahappo (FA)	Lyhenne	Molekyylipaino (MW)	ECN
Palmitiinihappo	P	256,4	16
Palmito-oleiinihappo	Po	254,4	14
Steariinihappo	S	284,5	18
Öljyhappo	O	282,5	16
Linolihappo	L	280,4	14
Linoleenihappo	Ln	278,4	12

4.5.3 Pinta-alaprosenttien muuntaminen mooleiksi, kaikki rasvahapot (1)

$$\text{moolit P} = \frac{\text{pinta} - \text{ala} - \% \text{ P}}{\text{MW P}} \quad \text{moolit S} = \frac{\text{pinta} - \text{ala} - \% \text{ S}}{\text{MW S}} \quad \text{moolit Po} = \frac{\text{pinta} - \text{ala} - \% \text{ Po}}{\text{MW Po}}$$

$$\text{moolit O} = \frac{\text{pinta} - \text{ala} - \% \text{ O}}{\text{MW O}} \quad \text{moolit L} = \frac{\text{pinta} - \text{ala} - \% \text{ L}}{\text{MW L}} \quad \text{moolit Ln} = \frac{\text{pinta} - \text{ala} - \% \text{ Ln}}{\text{MW Ln}}$$

4.5.4 Rasvahappomoolien standardoiminen 100 %:iin (2)

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

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

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

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

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

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

Tulos ilmoittaa kunkin rasvahapon prosenttiosuuden mooliprosentteina TAGien 1,2,3-asemassa.

Sitten lasketaan tyydyttyneiden rasvahappojen P ja S (SFA) ja tyydyttymättömien rasvahappojen Po, O, L ja Ln (UFA) summa (3):

$$\text{mooli} - \% \text{ SFA} = \text{mooli} - \% \text{ P} + \text{mooli} - \% \text{ S}$$

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

▼ **M25**4.5.5 *Rasvahappokoostumuksen laskeminen TAGien 2- sekä 1- ja 3-asemassa*

Rasvahapot jakautuvat kolmeen ryhmään seuraavasti: yksi 2-asemalle ja kaksi samanlaista 1- ja 3-asemille siten, että tyydyttyneillä (P ja S) ja tyydyttymättömällä hapoilla (Po, O, L ja Ln) on eri kertoimet.

4.5.5.1 Tyydyttyneet rasvahapot 2-asemassa [P(2) ja S(2)] (4)

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

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

4.5.5.2 Tyydyttymättömät rasvahapot 2-asemassa [Po(2), O(2), L(2) ja Ln(2)] (5):

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

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

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

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

4.5.5.3 Rasvahapot 1,3-asemassa [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) ja Ln(1,3)] (6):

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

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

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

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

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

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

4.5.6 *Triasyyliglyserolien laskeminen*

4.5.6.1 TAGit, joissa on yksi rasvahappo (AAA, tässä LLL, PoPoPo) (7)

$$\text{mooli} - \% AAA = \frac{\text{mooli} - \% A(1,3) * \text{mooli} - \% A(2) * \text{mooli} - \% A(1,3)}{10\,000}$$

4.5.6.2 TAGit, joissa on kaksi rasvahappoa (AAB, tässä PoPoL, PoLL) (8)

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

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

▼ **M25**

- 4.5.6.3 TAGit, joissa on kolme eri rasvahappoa (ABC, tässä OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln) (9)

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

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

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

- 4.5.6.4 ECN42-triasyyliglyserolit

ECN42-triasyyliglyserolit lasketaan yhtälöistä 7, 8 ja 9, ja tulokset annetaan HPLC:n odotetussa eluutiojärjestyksessä (tavallisesti vain kolme piikkiä).

LLL

PoLL ja LPoln:n paikkaisomeeri

OLLn ja OLnLn:n sekä LnOLn:n paikkaisomeerit

PoPoL ja PoLPo:n paikkaisomeeri

PoOLn ja OPoLn:n sekä OLnPo:n paikkaisomeerit

PLLn ja LLnLn:n sekä LnPLn:n paikkaisomeerit

PoPoPo

SLnLn ja LnSLn:n paikkaisomeeri

PPoLn ja PLnPo:n sekä PoPLn:n paikkaisomeerit

ECN42-triasyyliglyseridit saadaan näiden yhdeksän triasyyliglyserolin ja niiden paikkaisomeerien summana. Tulokset on ilmoitettava vähintään kahden desimaalin tarkkuudella.

5. TULOSTEN ARVIOINTI

Verrataan laskemalla saatua teoreettista koostumusta ja HPLC:llä määritettyä koostumusta. Jos absoluuttisten HPLC-tulosten ja teoreettisten tulosten välinen erotus on suurempi kuin kyseiselle öljyluokalle kaupan pitämisen vaatimuksissa vahvistetut arvot, näyte sisältää siemenöljyä.

Tulokset ilmoitetaan kahden desimaalin tarkkuudella.

6. ESIMERKKI (NUMEROT VIITTAAVAT MENETELMÄÄ SELOSTAVAN TEKSTIN KOHTIIN)

- 4.5.1 *Rasvahappojen mooliprosenttien laskeminen GLC-tuloksista (standardisoitu pinta-ala-%)*

GLC:llä saadaan rasvahappokoostumukselle seuraavat tulokset:

FA	P	S	Po	O	L	Ln
MW	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
Pinta-ala-%	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼ **M25**

- 4.5.3 *Pinta-ala-prosenttien muuntaminen mooleiksi kaikille rasvahapoille (ks. kaava 1)*

$$\begin{aligned}\text{moolia P} &= \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moolia P} \\ \text{moolia S} &= \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moolia S} \\ \text{moolia Po} &= \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moolia Po} \\ \text{moolia O} &= \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moolia O} \\ \text{moolia L} &= \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moolia L} \\ \text{moolia Ln} &= \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ moolia Ln}\end{aligned}$$

$$\text{Yhteensä} = 0,35821 \text{ moolia TAG}$$

- 4.5.4 *Rasvahappomoolien standardoiminen 100 %:iin (ks. kaava 2)*

$$\begin{aligned}\text{mooli-}\% \text{ P(1,2,3)} &= \frac{0,03900 \text{ moolia P} * 100}{0,35821 \text{ moolia}} = 10,887 \% \\ \text{mooli-}\% \text{ S(1,2,3)} &= \frac{0,01054 \text{ moolia S} * 100}{0,35821 \text{ moolia}} = 2,942 \% \\ \text{mooli-}\% \text{ Po(1,2,3)} &= \frac{0,00393 \text{ moolia Po} * 100}{0,35821 \text{ moolia}} = 1,097 \% \\ \text{mooli-}\% \text{ O(1,2,3)} &= \frac{0,26549 \text{ moolia O} * 100}{0,35821 \text{ moolia}} = 74,116 \% \\ \text{mooli-}\% \text{ L(1,2,3)} &= \frac{0,03566 \text{ moolia L} * 100}{0,35821 \text{ moolia}} = 9,955 \% \\ \text{mooli-}\% \text{ Ln(1,2,3)} &= \frac{0,00359 \text{ moolia Ln} * 100}{0,35821 \text{ moolia}} = 1,002 \%\end{aligned}$$

$$\text{Yhteensä mooli-}\% = 100 \%$$

Tyydyttyneiden ja tyydyttymättömien rasvahappojen summa
TAGien 1,2,3-asemassa (ks. kaava 3):

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

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

- 4.5.5 *Rasvahappokoostumuksen laskeminen TAGien 2- ja 1,3-asemassa*

- 4.5.5.1 Tyydyttyneet rasvahapot 2-asemassa [P(2) ja S(2)] (ks. kaava 4):

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

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

- 4.5.5.2 Tyydyttymättömät rasvahapot 2-asemassa [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) ja Ln(1,3)] (ks. kaava 5)

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

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

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

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

▼ **M25**

- 4.5.5.3 Rasvahapot 1,3-asemassa [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) ja Ln(1,3)] (ks. kaava 6)

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

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

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

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

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

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

- 4.5.6 *Triasyyliglyserolien laskeminen*

Lasketusta rasvahappokoostumuksesta sn-2 ja sn-1,3-ase-massa:

FA seuraavissa:	1,3-as.	2-as.
P	16,004 %	0,653 %
S	4,325 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,262 %
O	68,526 %	85,296 %
L	9,204 %	11,457 %
Ln	0,927 %	1,153 %
Sum	100,0 %	100,0 %

lasketaan seuraavat triasyyliglyserolit:

LLL

PoPoPo

PoLL ja 1 paikkaisomeeri

SLnLn ja 1 paikkaisomeeri

PoPoL ja 1 paikkaisomeeri

PPoLn ja 2 paikkaisomeeriä

OLLn ja 2 paikkaisomeeriä

PLLn ja 2 paikkaisomeeriä

PoOLn ja 2 paikkaisomeeriä

- 4.5.6.1 TAGit, joissa on yksi rasvahappo (LLL, PoPoPo) (ks. kaava 7)

$$\text{mooli} - \% LLL = \frac{9,204 \% * 11,457 \% * 9,204 \%}{10\,000} = 0,09706 \text{ moolia LLL}$$

$$\text{mooli} - \% PoPoPo = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 1,015 \%}{10\,000} = 0,00013 \text{ moolia PoPoPo}$$

▼ **M25**

— 4.5.6.2 TAGit, joissa on kaksi rasvahappoa (PoLL, SLnLn, PoPoL)
(ks. kaava 8)

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

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

0,03210 moolia PoLL

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

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

0,00094 moolia SLnLn

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

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

0,00354 moolia PoPoL

— 4.5.6.3 TAGit, joissa on kolme eri rasvahappoa (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) (ks. kaava 9)

$$\text{mooli} - \% \text{PPoLn} = \frac{16,004 \% * 1,262 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,00374$$

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

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

0,00761 moolia PPoLn

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

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

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

0,43655 moolia OLLn

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

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

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

0,06907 moolia PLLn

▼ **M25**

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

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

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

0,04812 moolia PoOLn

ECN42 = 0,69512 moolia TAGs

Huomautus 1: Eluutiojärjestys voidaan määrittää laskemalla ekvivalenttihililuvut, jotka määräytyvät usein yhtälön $ECN = CN - 2n$ perusteella, jossa CN on hiihililuku ja n on kaksoissidosten määrä; se voidaan laskea tarkemmin ottamalla huomioon kaksoissidoksen alkuperä. Jos n_o , n_l ja n_{ln} ovat öljyhapon, linolihapon ja linoleenihapon kaksoissidokset, ekvivalenttihililuku voidaan laskea yhtälöstä

$$EN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln}$$

jossa kertoimet d_o , d_l ja d_{ln} voidaan laskea vertailutriglyseridien avulla. Tässä menetelmässä eritellyissä oloissa suhde on lähellä seuraavaa:

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

Huomautus 2: Usean triglyseridin avulla voi myös laskea erotuskyvyn trioleiinin suhteen:

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

käyttämällä redusoitua retentioaikaa $RT^1 = RT - RT \text{ liuotin}$.

Log α :aa f:n funktiona (jossa f on kaksoissidosten määrä) esittävän kuvaajan avulla voidaan määrittää retentioarvot kaikille vertailutriglyserideihin sisältyvien rasvahappojen triglyserideille; katso kuvio 1.

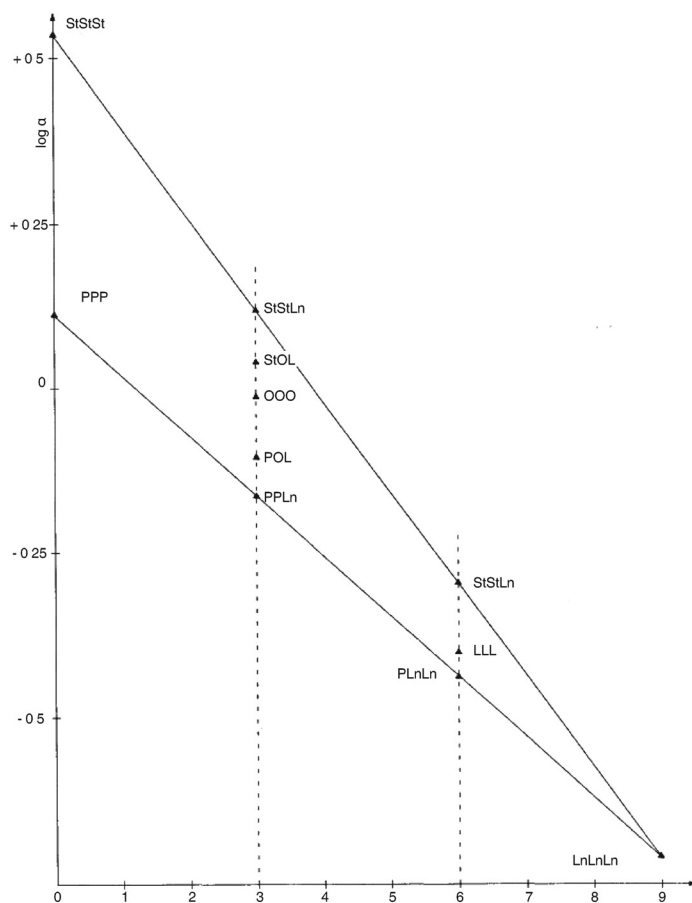
Huomautus 3: Pylvään pitäisi olla niin tehokas, että trilinoleiinihiippi erottuu selvästi niiden triglyseridien piikeistä, joiden retentioajat ovat sitä lähellä. Eluutiota jatketaan aina ECN52:een asti.

Huomautus 4: Jotta saataisiin sellainen kromatogrammi, että kaikkien tärkeiden piikkien pinta-alat voidaan mitata luotettavasti, on ECN50-triglyseridiä vastaavan toisen piikin korkeuden oltava 50 % koko asteikosta.

▼ M25

Kuvio 1

Log α :aa f:n funktiona (jossa f on kaksoissidosten määrä) esittävä kuvaaja



Kaksoissidosten määrä

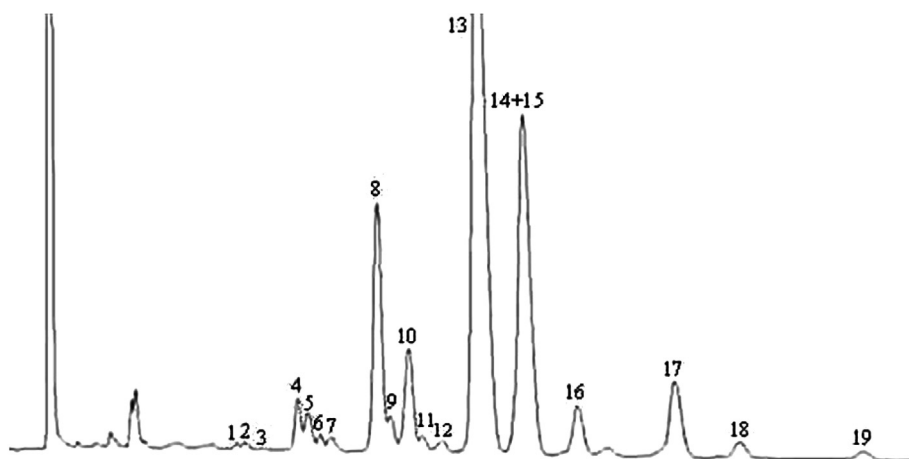
La: lauriinihappo; My: myristiinihappo; P: palmitiinihappo; S: steariinihappo;
O: öljyhappo; L: linoliuhappo; Ln: linoleenihappo.

▼ M25

Kuvio 2

Vähän linolihappoa sisältävä oliiviöljy

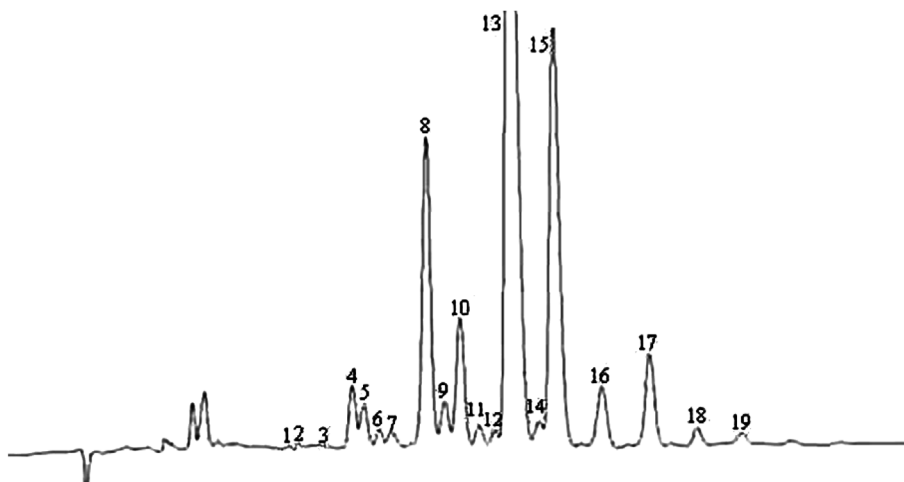
a



Liuottimena aseton/asetonitriili

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

b



Liuottimena propionitriili

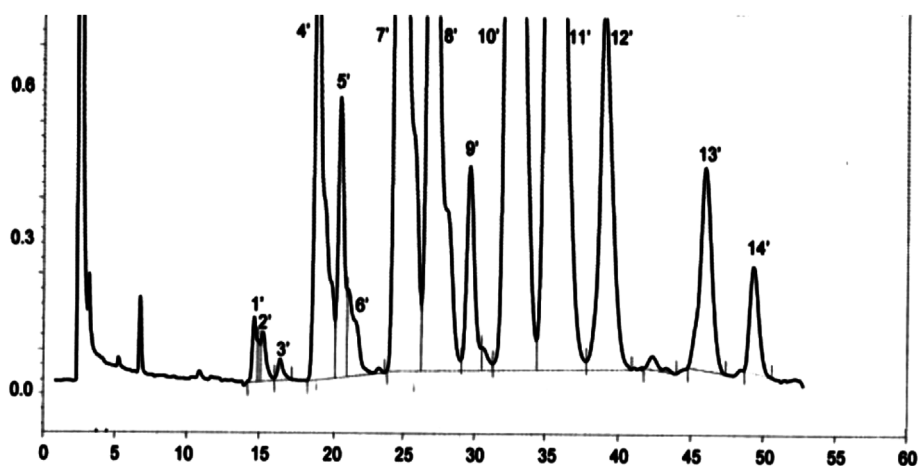
PROFIILI b: Kromatogrammin piikkien tärkeimmät komponentit: **ECN42:** (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44:** (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPoPo + PPoL; **ECN46:** (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48:** (13) OOO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

▼ M25

Kuvio 3

Paljon linolihappoa sisältävä oliiviöljy

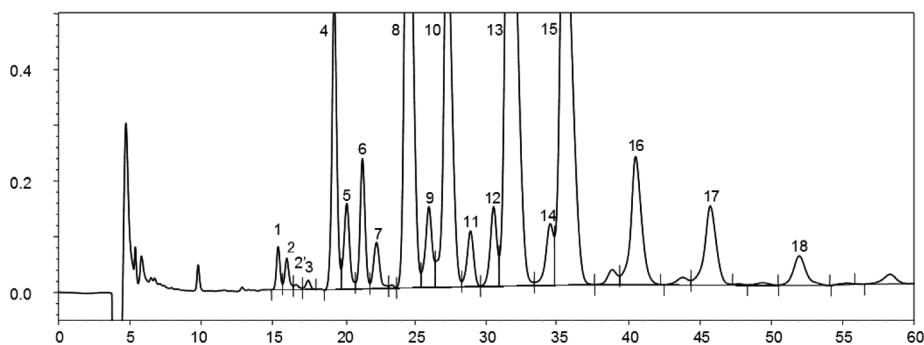
a



Liuottimena asetoni/asetonitrili (50:50)

Profiili a: Kromatogrammin piikkien tärkeimmät komponentit: ECN42: (1') LLL + PoLL; (2') OLLn + PoOLn; (3') PLLn; ECN44: (4') OLL + PoOL; (5') OOLn + PLL; (6') POLn + PPoPo; ECN46: (7') OOL + PoOO; (8') PLO + SLL + PoOP; (9') PLP + PoPP; ECN48: (10') OOO; (11') POO + SLL + PPoO; (12') POP + PLS; ECN50: (13') SOO; (14') POS + SLS

b



Liuottimena propionitrili

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

▼ **M19***LIITE XIX***ALIFAATTISTEN ALKOHOLIEN PITOISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN
KAASUKROMATOGRFISESTI KAPILLAARIKOLONNILLA****1 TARKOITUS**

Tässä kuvataan menetelmä rasvojen tai öljyjen sisältämien yksinkertaisten alifaattisten alkoholien pitoisuuden ja niiden kokonaispitoisuuden määrittämiseksi.

2 MENETELMÄN PERIAATE

Rasva tai öljy, johon on lisätty 1-eikosanolia sisäiseksi standardiksi, saippuoidaan kaliumhydroksidin avulla etanoliliuoksessa ja saippuoitumattomat osat uutetaan eetterillä. Alkoholifraktio erotetaan saippuoitumattomasta uutteesta kromatografian avulla emäksisellä silikageelilevyllä; silikageelistä saadut alkoholit muutetaan trimetyylisilyliehtereiksi 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 Mikroruiskuja, 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 liitäntä tyhjiöimusuodatusta varten sekä koirashios 12/21.
- 3.8 Tyhjiöimupullo, 50 ml, jossa on suodatinsuppiloon (3.7) sopiva naarashios.
- 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 injektioalaite, jonka lämpötilaa voi säätää ja jonka höyrystämisosaa on persilanoitua lasia,
 - 3.10.3 liekki-ionisaatiodektektori 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.
- 3.13 Analyysivaaka, herkkyys 1 mg (näyttö 0,1 mg:n tarkkuudella).

▼ **M19**

4 REAGENSIT

4.1 Kaliumhydroksidi, noin 2 N etanoliliuos: 130 g kaliumhydroksidia (vähintään 85-prosenttista) liuotetaan samalla jäädyttäen 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.

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: kolesterolin tai fytosterolin 5-prosenttinen kloroformiliuos.

4.12 2,7-dikloorifluoreseiinin 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 C₂₀–C₂₈ -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: typpi, kaasukromatografista laatua.

5 MENETTELY

5.1 Saippuoitumattoman osan esikäsittely

5.1.1 250 ml:n pulloon lisätään 500 µl: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, lisätään 250 µl 0,1-prosenttista 1-eikosanoliuosta, ja jos se on uutettua oliiviöljyä, lisätään 1 500 µl liuosta.

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

▼ **M19**

5.1.2 Lisätään 50 ml kaliumhydroksidin 2 N etanoliliuosta, palautusjäähdytin käynnistetään ja liuosta kuumennetaan vesihauteessa hiljalleen kiehuvaan 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 etyylietteriä, 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 etyylietteriä.

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 natriumsulfaattilla ja suodatetaan etukäteen punnittuun 250 ml:n pulloon ja pestään suppilo ja suodatin pienillä määrillä etyylietteriä.

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, jäännös jäähdytetään eksikkaattorisissa ja punnitaan.

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

Levyt otetaan lämpökaapist ja säilytetään kalsiumkloridia sisältävässä eksikkaattorisissa käyttöhetkeen asti (näin käsitelty 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 Heksaanin ja etyylietterin seos, 65:35 (V/V), kaadetaan kehitysastiaan niin että sitä on noin 1 cm ⁽¹⁾.

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.

⁽¹⁾ Erityisesti tällaisissa tapauksissa on käytettävä bentseenin ja asetonin eluointiseosta 95:5 (V/V), jotta vyöhykkeet eroaisivat hyvin.

▼ **M19**

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

- 5.2.3 Saippuositumattomasta osasta (5.1.5) valmistetaan noin 5-prosenttinen kloroformiliuos ja 0,3 ml liuosta levitetään mahdollisimman ohuena ja tasaisena nauhana käyttäen 100 µl:n mikroruiskua, noin 2 cm:n päähän lasilevyn alareunasta. Asetetaan yhdelle levyn reunoista 2—3 µl 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 liuotintama on noussut 1 cm:n päähän levyn yläreunasta.

Levy otetaan kehitysastiasta ja liuotin haihdutetaan kuumassa ilmavirrassa tai levy jätetään joksikin aikaa kuivumaan vetokaappiin.

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

Koeputkessa oleva jäännös sisältää alkoholifraktion.

5.3 Trimetyylisilylieetterien 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 µl jokaista alifaattisten alkoholien milligrammaa kohti.

▼ **M19**

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

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

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

5.4 Kaasukromatografinen määrittäminen

5.4.1 Esivalmistelut ja kolonnin valmistelu

- 5.4.1.1 Kapillaarikolonni asennetaan kaasukromatografialaitteistoon niin, että kolonnin alkupää kiinnitetään injektoriin, 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. 7). Korkeaa lämpötilaa pidetään yllä vähintään kaksi tuntia, minkä jälkeen kromatografialaitteisto saatetaan käyttövalmiiksi (kaasuvirran ja erotuksen säätö, liekinsytytys, elektronisen piirturin kytkeminen, uunin lämpötilan säätö kolonnia varten, detektorin ja injektorin säätö jne.) ja signaalia rekisteröidään herkkyydellä, joka on vähintään kaksi kertaa niin suuri kuin määrittämissä 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 liitännöiden vuodosta, ja jos ilmenee positiivista siirtymää, se johtuu kolonnin riittämättömästä valmistelusta.

Huom. 7: Esivalmistelulämpötilan on aina oltava vähintään 20 °C alempi kuin käytetyn stationäärifaasin 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,

— jakosuhteet: 1:50–1:100,

— laitteiston herkkyys: 4–16 kertaa vähimmäisvaimennus,

▼ **M19**

- rekisteröintiherkkyys: 1—2 mV täydestä asteikosta,
- paperin nopeus: 30—60 cm/h,
- injektoidun aineen määrä: 0,5—1 µl trimetyylisilylieetteriliuosta (TMSE).

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

- C₂₆-alkoholin retentioaika on 18 ± 5 minuuttia,
- C₂₂-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—1 µl näyteliuosta; lopuksi männällä vedetään vielä neula tyhjäksi. Neula työnnetään septumin läpi injektiopeeseen 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 C₂₂, C₂₄, C₂₆ ja C₂₈ alifaattisten alkoholien piikkien pinta-alat lasketaan integraattorilla.

5.4.5.2 Lasketaan kunkin alifaattisen alkoholin pitoisuus milligrammoina 1 000 g:ssa rasvaa tai öljyä seuraavasti:

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

jossa:

A_x = x-alkoholin piikin pinta-ala

A_s = 1-eikosanolin piikin pinta-ala

m_s = lisätyn 1-eikosanolin massa milligrammoina

m = näytteen massa grammoina.

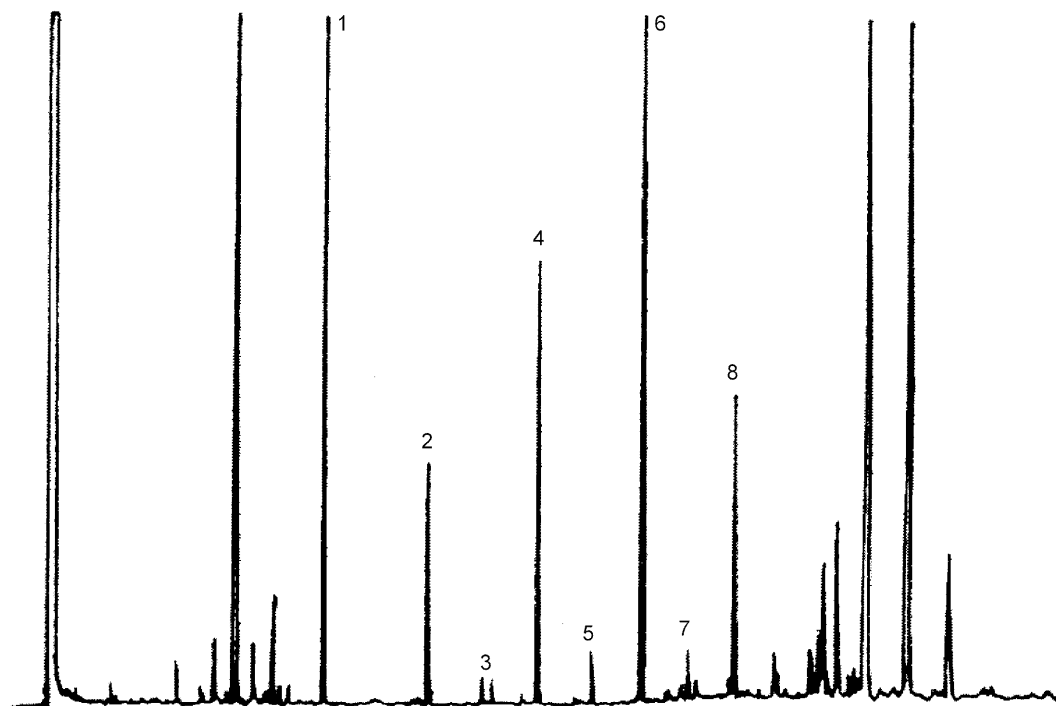
6 TULOSTEN ESITTÄMINEN

Ilmoitetaan yksinkertaisten alifaattisten alkoholien pitoisuudet milligrammoina 1 000 g:ssa öljyä tai rasvaa sekä pitoisuuksien summa alifaattisten alkoholien yhteenlaskettuna määränä.

▼ **M19***LISÄYS**Kaasun lineaarinopeuden määrittäminen*

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

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



Kuva 1 — Neitsytöljyn alkoholifraktion kromatogrammi

- 1 = Eikosanoli
- 2 = Dokosanoli
- 3 = Trikosanoli
- 4 = Tetrakosanoli
- 5 = Pentakosanoli
- 6 = Heksakosanoli
- 7 = Heptakosanoli
- 8 = Oktakosanoli

▼ **M23***LIITE XX***Menetelmä vahojen, rasvahappojen etyyliestereiden ja rasvahappojen metyyliestereiden pitoisuuksien määrittämiseksi kapillaarikaasukromatografian avulla****1. TARKOITUS**

Tällä menetelmällä määritetään vahojen, rasvahappojen metyyliestereiden ja rasvahappojen etyyliestereiden pitoisuudet oliiviöljyissä. Vahat ja alkyylesterit eroavat toisistaan hiiliatomien lukumäärän perusteella. Menetelmää suositellaan käytettävän välineenä oliiviöljyn ja oliivin puristemassaöljyn erottamiseksi toisistaan sekä ekstra-neitsytoliiviöljyn laatuparametrina, jonka avulla voidaan havaita, onko ekstra-neitsytoliiviöljyyn vilpillisesti sekoitettu heikompilaatuisia öljyjä (neitsyt- tai lampuöljyjä tai eräitä hajuttomiksi tehtyjä öljyjä).

2. PERIAATE

Öljy, johon on lisätty soveltuva sisäinen standardi, fraktioidaan kromatografisesti hydratoitua silikageeliä sisältävässä kolonnissa. Koeolosuhteissa eluoitunut jae (jonka polaarisuus on triasyyliglyserolien polaarisuutta heikempi) otetaan talteen ja määritetään suoraan kapillaarikaasukromatografian avulla.

3. LAITTEISTO**3.1. Erlenmeyer-pullo, 25 ml.****3.2. Lasikolonne** nestekromatografiaa varten, sisähalkaisija 15 mm ja pituus 30–40 cm, varustettu hanalla.**3.3. Kaasukromatografi**, jota voidaan käyttää kapillaarikolonnin kanssa ja johon kuuluu kolonniin suoraan injektointia varten sellainen järjestelmä, jonka osat ovat:**3.3.1. Termostaattisäätoinen lämpötilaohjelmoitu uuni****3.3.2.** Kolonniin liitetty **kylmäinjektor**i, jonka avulla näyte voidaan syöttää suoraan kolonniin**3.3.3. Liekki-ionisaatiodetektor**i ja **muuntaja-vahvistin****3.3.4. Integroiva piirturi** (Huomautus 1), joka sopii käytettäväksi muuntaja-vahvistimen (kohta 3.3.3) kanssa.

Huomautus 1: Voidaan käyttää myös tietokonepohjaisia järjestelmiä, joissa kaasukromatografian tiedot syötetään tietokoneen avulla.

3.3.5. Kvartsilasinen kapillaarikolonne (vahojen sekä metyyli- ja etyyliesterien määrittämiseksi), jonka pituus on 8–12 m ja sisähalkaisija 0,25–0,32 mm ja jonka sisäpinta on päällystetty nestefaasilla (Huomautus 2) siten, että nestekerroksen paksuus on tasaisesti 0,10–0,30 µm (Huomautus 2).

Huomautus 2: Soveltuvia kaupallisia nestefaaseja ovat muun muassa SE52, SE54, jne.

3.4. Mikroruisku, 10 µl, jossa on karkaistu neula, jonka avulla näyte voidaan injektoida suoraan kolonniin.**3.5. Sähkökäyttöinen ravistelijä.****3.6. Pyöröhaihdutin****3.7. Muhveliuuni****3.8. Analyysivaaka**, jonka tarkkuus $\pm 0,1$ mg

▼ **M23**

3.9. Tavanomaiset laboratorion lasivälineet.

4. REAGENSsit

4.1. **Silikageeli**, 60–200 µm mesh. Silikageeli pannaan muhveliuuniin 500 °C:n lämpötilaan vähintään 4 tunniksi. Jäähdytetään ja lisätään vettä 2 % silikageelin määrästä. Sekoitetaan massan homogenisoimiseksi ja säilytetään eksikkaattorissa vähintään 12 tunnin ajan ennen käyttöä.

4.2. **n-heksaani**, kromatografialaattua tai jäämien määrittämiseen soveltuvaa laatua (puhtausaste on tarkistettava).

VAROITUS: Höyryt ovat herkästi syttyviä. Eristettävä lämmönlähteistä, kipinöistä ja avoliekeistä. Pullot on pidettävä aina asianmukaisesti suljettuina. Riittävästä ilmanvaihdosta käytön aikana on huolehdittava. Varottava höyryjen syntymistä. Poistettava tulipaloriskin mahdollisesti aiheuttavat laitteet, kuten lämmittimet tai sähkölaitteet, joita ei ole valmistettu syttymättömästä materiaalista. Haitallista hengitettynä: voi vahingoittaa hermosoluja. Vältettävä höyryjen hengittämistä. Tarvittaessa on käytettävä asianmukaisia hengityssuojaimia. Varottava aineen joutumista silmiin tai iholle.

4.3. **Etyylietteri, kromatografialaattua.**

VAROITUS: Erittäin helposti syttyvä ja kohtalaisen myrkyllinen. Ärsyttää ihoa. Haitallista hengitettynä. Saattaa aiheuttaa silmävaurioita. Vaikutukset voivat ilmaantua viipeellä. Saattaa muodostua räjähtäviä peroksiedeja. Höyryt voivat syttyä. Eristettävä lämmönlähteistä, kipinöistä ja avoliekeistä. Pullot on pidettävä aina asianmukaisesti suljettuina. Riittävästä ilmanvaihdosta käytön aikana on huolehdittava. Varottava höyryjen syntymistä. Poistettava tulipaloriskin mahdollisesti aiheuttavat laitteet, kuten lämmittimet tai sähkölaitteet, joita ei ole valmistettu syttymättömästä materiaalista. Ei saa haihduttaa kuivaksi tai lähes kuivaksi. Veden tai muun sopivan aineen lisäys vähentää peroksidien muodostumista. Ei saa niellä. Vältettävä höyryjen hengittämistä. Varottava pitkäaikaista tai toistuvaa ihokosketusta.

4.4. **n-heptaani**, kromatografialaattua, tai **iso-oktaani**.

VAROITUS: Syttyvää. Haitallista hengitettynä. Eristettävä lämmönlähteistä, kipinöistä ja avoliekeistä. Pullot on pidettävä aina asianmukaisesti suljettuina. Riittävästä ilmanvaihdosta käytön aikana on huolehdittava. Vältettävä höyryjen hengittämistä. Varottava pitkäaikaista tai toistuvaa ihokosketusta.

4.5. **Lauryliarakidaatin standardiliuos** (Huomautus 3), 0,05 % (m/V) liuos heksaanissa (sisäinen standardi vahoille).

Huomautus 3: Voidaan käyttää myös palmityyliipalmiitaattia, myristyylisteraattia tai lauryliarakidaattia.

4.6. **Metyyliheptadekanoatin standardiliuos, 0,02 % (m/V) heksaanissa** (sisäinen standardi metyyli- ja etyyliestereille).

4.7. **Sudan 1 (1-fenyyliaito)-2-naftoli**.

▼ **M23****4.8. Kantajakaasut: vety tai helium, puhdasta kaasukromatografista laatua.****VAROITUS**

Vety. Erittäin helposti syttyvä puristettuna. Eristettävä lämmönlähteistä, kipinöistä ja avoliekeistä tai sähkölaitteista, joita ei ole valmistettu syttymättömistä materiaaleista. On varmistettava, että pullon venttiili on kiinni aina, kun se ei ole käytössä. Paineenalenninta on aina käytettävä. Jousen paine päästetään pois ennen pullon venttiilin avaamista. Älä seiso pullon edessä venttiiliä avatessasi. Riittävästä ilmanvaihdesta käytön aikana on huolehdittava. Vetyä ei saa siirtää pullosta toiseen. Kaasua ei saa sekoittaa pullossa. Pullot on kiinnitettävä kaatumisen estämiseksi. Säilytettävä auringonvalolta ja lämmönlähteiltä suojattuna. Varastointipaikan on oltava sellainen, ettei siellä voi tapahtua syöpymistä. Vaurioituneita tai merkitsemättömiä pulloja ei saa käyttää.

Helium. Korkeassa paineessa puristettu kaasu. Se pienentää hengitettävän hapen määrää. Pullo on pidettävä suljettuna. Riittävästä ilmanvaihdesta käytön aikana on huolehdittava. Varastointitiloihin, jotka eivät ole asianmukaisesti tuuletettuja, ei pidä mennä. Paineenalenninta on aina käytettävä. Jousen paine päästetään pois ennen pullon venttiilin avaamista. Kaasua ei saa siirtää pullosta toiseen. Pullot on kiinnitettävä kaatumisen estämiseksi. Älä seiso pullon edessä venttiiliä avatessasi. Säilytettävä auringonvalolta ja lämmönlähteiltä suojattuna. Varastointipaikan on oltava sellainen, ettei siellä voi tapahtua syöpymistä. Vaurioituneita tai merkitsemättömiä pulloja ei saa käyttää. Ei saa hengittää. Käytetään yksinomaan teknisiin tarkoituksiin.

4.9. Apukaasut:

— Vety, puhdasta kaasukromatografista laatua.

— Paineilma, puhdasta kaasukromatografista laatua.

VAROITUS

Paineilma. Korkeassa paineessa puristettu kaasu. Käytettävä varoen syttyvien aineiden lähistöllä, sillä useimpien paineilman sisältämien orgaanisten yhdisteiden itsesyttymislämpötila on suuressa paineessa huomattavasti alhaisempi. On varmistettava, että pullon venttiili on kiinni, kun se ei ole käytössä. Paineenalenninta on aina käytettävä. Jousen paine päästetään pois ennen pullon venttiilin avaamista. Älä seiso pullon edessä venttiiliä avatessasi. Kaasua ei saa siirtää pullosta toiseen. Älä sekoita kaasua pullossa. Pullot on kiinnitettävä kaatumisen estämiseksi. Säilytettävä auringonvalolta ja lämmönlähteiltä suojattuna. Varastointipaikan on oltava sellainen, ettei siellä voi tapahtua syöpymistä. Vaurioituneita tai merkitsemättömiä pulloja ei saa käyttää. Teknisiin tarkoituksiin tarkoitettua paineilmaa ei saa käyttää hengittämiseen tai hengityslaitteissa.

5. MENETTELY**5.1. Kromatografiakolonnin esikäsittely**

Suspendoidaan 15 g silikageeliä (kohta 4.1) n-heksaaniin (kohta 4.2) ja lisätään kolonniin (kohta 3.2). Annetaan laskeutua itsestään. Autetaan laskeutumista sähkökäyttöisellä sekoittajalla, jotta saadaan homogeenisempi kromatografiakerros. Valutetaan läpi 30 ml n-heksaania mahdollisten epäpuhtauksien poistamiseksi. Punnitaan analyysiväällä (kohta 3.8) tarkasti noin 500 mg näytettä 25 ml:n erlenmeyer-pulloon (kohta 3.1) ja lisätään sopiva määrä sisäistä standardia (kohta 4.5) oletetun vahapitoisuuden mukaan. Esimerkki: oliiviöljyn lisätään lauryylarakidaattia 0,1 mg ja oliivin puristemassaöljyyn 0,25–0,50 mg, tai oliiviöljyihin (kohta 4.6) 0,05 mg metyyliheptadekanoaattia.

▼ **M23**

Siirretään näin valmistettu näyte kahden 2 ml:n n-heksaaniannoksen avulla kromatografiakoloonniin.

Liuottimen annetaan valua, kunnes se on 1 mm absorbentin pinnan yläpuolella. Valutetaan vielä n-heksaani/etyylieetteriseosta (suhde 99:1) ja kerätään 220 ml valumisnopeuden ollessa noin 15 pisaraa 10 sekunnissa. **(Tämä jae sisältää metyyli- ja etyyliestereitä ja vahoja).** (Huomautus 4) (Huomautus 5).

Huomautus 4: N-heksaani/etyylieetteriseos, suhde 99:1, on valmistettava uudelleen joka päivä.

Huomautus 5: Vahojen eluotumisen tarkkailemiseksi silmämääräisesti voidaan näyteliuokseen lisätä 100 µl 1-prosenttista Sudan 1 -väriainetta eluutioliuoksessa.

Väriaineen retentioaika on vahojen ja triasyyliglyserolien retentioaikojen välissä. Eluointi on keskeytettävä, kun väri saavuttaa kromatografiakolonnin pohjan, sillä tällöin kaikki vahat ovat eluotuneet.

Tällä tavoin saatu jae kuivataan pyöröhaihduttimessa, kunnes lähes kaikki liuotin on saatu poistettua. Viimeiset 2 ml poistetaan heikon typpivirtauksen avulla. Kerätään metyyli- ja etyyliestereitä sisältävä jae 2–4 ml:lla n-heptaanilla tai iso-oktaanilla.

5.2. Kaasukromatografinen analyysi

5.2.1. Esivalmistelut

Kolonne liitetään kaasukromatografiin (kohta 3.3) siten, että injektioportti yhdistetään on-column -järjestelmään ja ulostulo detektoriin. Tarkistetaan kaasukromatografisten laitteiden toimivuus (kaasusilmukoiden kunto, detektorin ja piirturijärjestelmän tehokkuus jne.).

Jos kolonnilla ei ole aikaisemmin käytetty, se on ensin esikäsiteltävä. Kolonnin läpi johdetaan kevyt kaasuvirtaus ja kaasukromatografi käynnistetään. Lämmitetään asteittain, kunnes lämpötila on noin neljän tunnin kuluttua kohonnut 350 °C:een.

Tätä lämpötilaa pidetään yllä vähintään 2 tunnin ajan. Sen jälkeen laitteisto säädetään käyttöolosuhteisiin (kaasuvirtojen säätö, liekin sytytys, kytkeminen elektroniseen piirturiin (kohta 3.3.4), uunin lämpötilan säätö kolonnin varten, detektorin säätö jne.). Signaali säädetään niin, että sen herkkyys on vähintään kaksi kertaa niin suuri kuin määrityksessä tarvitaan. Saadun pohjaviivan on oltava suora, siinä ei saa olla minkäänlaisia piikkejä eikä ryömintää mihinkään suuntaan.

Jos ilmenee negatiivista suoraviivaista ryömintää, se on merkki kolonnin liittäntöjen viasta. Positiivinen ryömintä johtuu kolonnin riittämättömästä esikäsitelystä.

5.2.2. Toimintaolosuhteiden valinta vahoille sekä metyyli- ja etyyliestereille (Huomautus 6)

Kromatografia tehdään yleensä seuraavissa käyttöolosuhteissa:

— Kolonnin lämpötila:

20 °C minuutissa 5 °C minuutissa

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

— Detektorin lämpötila: 350 °C

— Injektoidun aineen määrä: 1 µl n-heptaaniliuosta (2–4 ml)

▼ M23

— Kantajakaasu: helium tai vety valitun kaasun optimaalisella lineaarisella nopeudella (ks. lisäys A)

— Laitteen herkkyys: siten, että edellä mainitut edellytykset täyttyvät.

Huomautus 6: Koska loppulämpötila on korkea, positiivinen ryömintä sallitaan, mutta se saa olla enintään 10 % huippuarvosta.

Kyseisiä käyttöolosuhteita voidaan muuttaa kolonnin ja kaasukromatografian ominaisuuksien perusteella, jotta kaikki vahat ja rasvahappojen metyyli- ja etyyliesterit saadaan erotettua ja piikkien erotus on riittävä (ks. kuvat 2, 3 ja 4) ja jotta sisäisen lauryliarakidaattistandardin retentioaika on 18 ± 3 minuuttia. Vahojen edustavimman piikin on oltava yli 60 % huippuarvosta; metyyli- ja etyyliestereiden osalta käytettävän sisäisen metyyliheptadekanoaattistandardin on saavutettava huippuarvo.

Piikkien integrointiparametrit asetetaan niin, että haluttujen piikkien pinta-alat voidaan arvioida oikein.

5.3. Määrittäminen

10 µl:n mikroruiskuun vedetään 10 µl liuosta; vedetään männällä neula tyhjäksi. Työnnetään neula injektiolaitteeseen ja 1–2 sekunnin kuluttua injektoidaan nopeasti. Noin 5 sekunnin kuluttua vedetään neula hitaasti pois.

Piirturi pidetään käynnissä, kunnes vahat tai stigmastadieenit (riippuen analysoitavasta jakeesta) ovat eluoituneet täydellisesti.

Pohjaviivan on koko ajan oltava vaatimusten mukainen.

5.4. Piikkien tunnistus

Piikit tunnistetaan retentioaikojen perusteella vertaamalla samoissa olosuhteissa määritettyihin vahojen, joiden retentioajat tunnetaan, seoksiin. Alkyyliesterit tunnistetaan oliiviöljyjen tärkeimpien rasvahappojen (palmiini- ja oleiinihappo) metyyli- ja etyyliesterien perusteella.

Kuva 1 esittää neitsytoliiviöljyn vahojen kromatogrammia. Kuvissa 2 ja 3 on kahden vähittäismyytävän ekstra-neitsytoliiviöljyn kromatogrammit; ensimmäinen metyyli- ja etyyliesterien kanssa ja toinen ilman niitä. Kuvassa 4 on kromatogrammit huippulaatuudesta ekstra-neitsytoliiviöljystä ja samasta öljystä, johon on sekoitettu 20 % hajuttomaksi tehtyä öljyä.

5.5. Vahojen kvantitatiivinen määrittäminen

Sisäisen lauryliarakidaattistandardin ja C_{40} – C_{46} -alifaattisten esterien piikkien pinta-alat lasketaan integraattorilla.

Kokonaisvahapitoisuus (mg/kg rasvaa) lasketaan muodostamalla yksittäisten vahojen summa seuraavasti:

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

▼ **M23**

jossa:

A_x = kunkin esterin piikin pinta-ala tietokoneella laskettuna

A_s = sisäisen lauryyliarakidaattistandardin piikin pinta-ala tietokoneella laskettuna

m_s = lisätyn sisäisen lauryyliarakidaattistandardin massa milligrammoina

m = määritettävän näytteen massa grammoina.

5.5.1. *Metyyli- ja etyyliesterien kvantitatiivinen määrittäminen*

Sisäisen metyyliheptadekanoaattistandardin, C_{16} - ja C_{18} -rasvahappojen metyyliesterien ja C_{16} - ja C_{18} -rasvahappojen etyyliesterien piikkien pinta-alat määritetään integraattorin avulla.

Lasketaan kunkin alkyylesterin pitoisuus (mg/kg rasvaa) seuraavasti:

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

jossa:

A_x = kunkin C_{16} - ja C_{18} -esterin piikin pinta-ala tietokoneella laskettuna

A_s = sisäisen metyyliheptadekanoaattistandardin piikin pinta-ala tietokoneella laskettuna

m_s = lisätyn sisäisen metyyliheptadekanoaattistandardin massa milligrammoina

m = määritettävän näytteen massa grammoina.

6. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

C_{40} – C_{46} :n (Huomautus 7) eri vahojen pitoisuuksien summa ilmoitetaan mg/kg rasvaa.

Ilmoitetaan C_{16} – C_{18} -rasvahappojen metyyli- ja etyyliesterien pitoisuuksien summa ja molempien yhteismäärä.

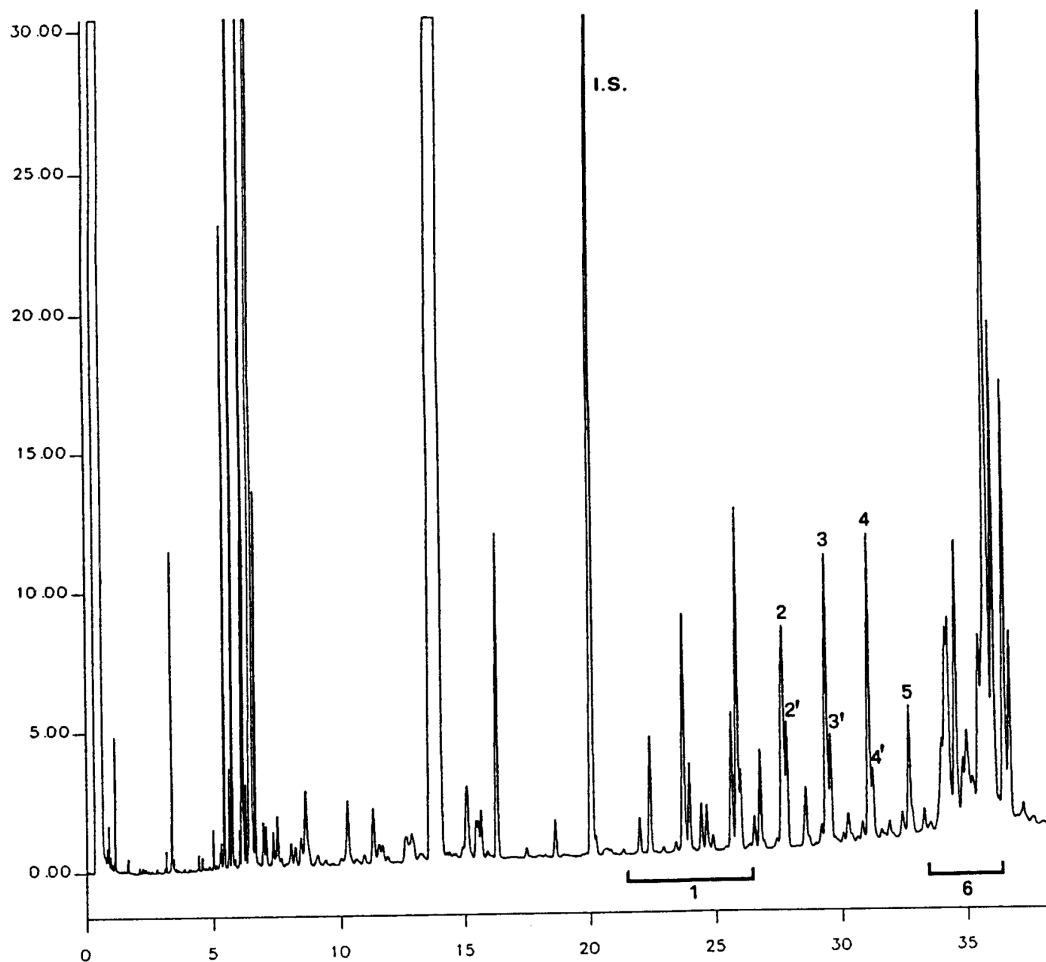
Tulokset ilmoitetaan mg/kg:n tarkkuudella.

Huomautus 7: Piikkien pinta-aloista määritetään niiden komponenttien määrät, joissa on parillinen määrä C-atomeja välillä C_{40} – C_{46} , liitteenä olevassa kuvassa esitetyn oliiviöljyn vahojen kromatogrammin mukaisesti. Jos C_{46} -esteri esiintyy kahtena piikkinä, sen tunnistamiseksi on syytä analysoida oliivin puristemassaöljyn vahojen jae, jossa C_{46} :n piikki on helppo tunnistaa, koska se on selvästi hallitsevin.

Ilmoitetaan etyyli- ja metyyliesterien välinen suhde.

▼ M23

Kuva 1

Esimerkki oliiviöljyn vahajakeen kaasukromatogrammista ⁽¹⁾

Niiden rasvahappojen metyyli- ja etyyliesterien piikit, joiden retentioajat ovat välillä 5–8 minuuttia

Merkkien selitykset:

I.S. = lauryliarakidaatti

1 = diterpeniesterit

2+2' = C₄₀-esterit

3+3' = C₄₂-esterit

4+4' = C₄₄-esterit

5 = C₄₆-esterit

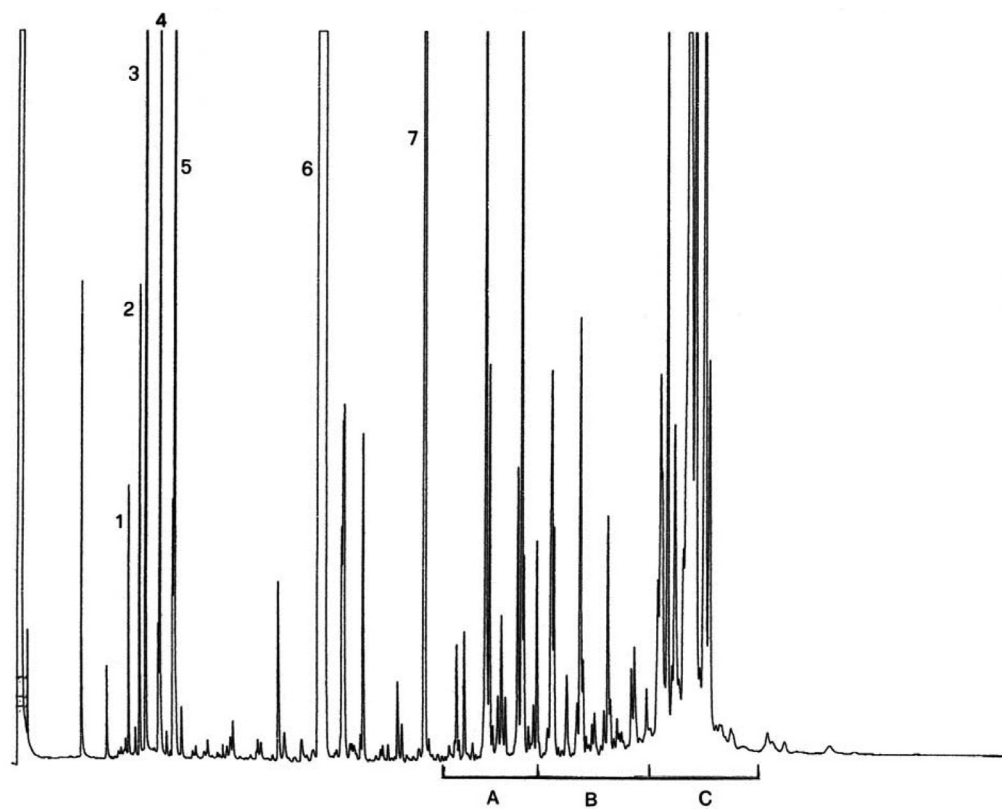
6 = steroliesterit ja triterpeenialkoholit.

⁽¹⁾ Kun steroliesterit ovat eluotuneet, kromatogrammissa ei pitäisi olla merkittäviä piikkejä (triasyyli glyseroleja).

▼ **M23**

Kuva 2

Metyyliesterit, etyyliesterit ja vahat neitsytoliiviöljyssä



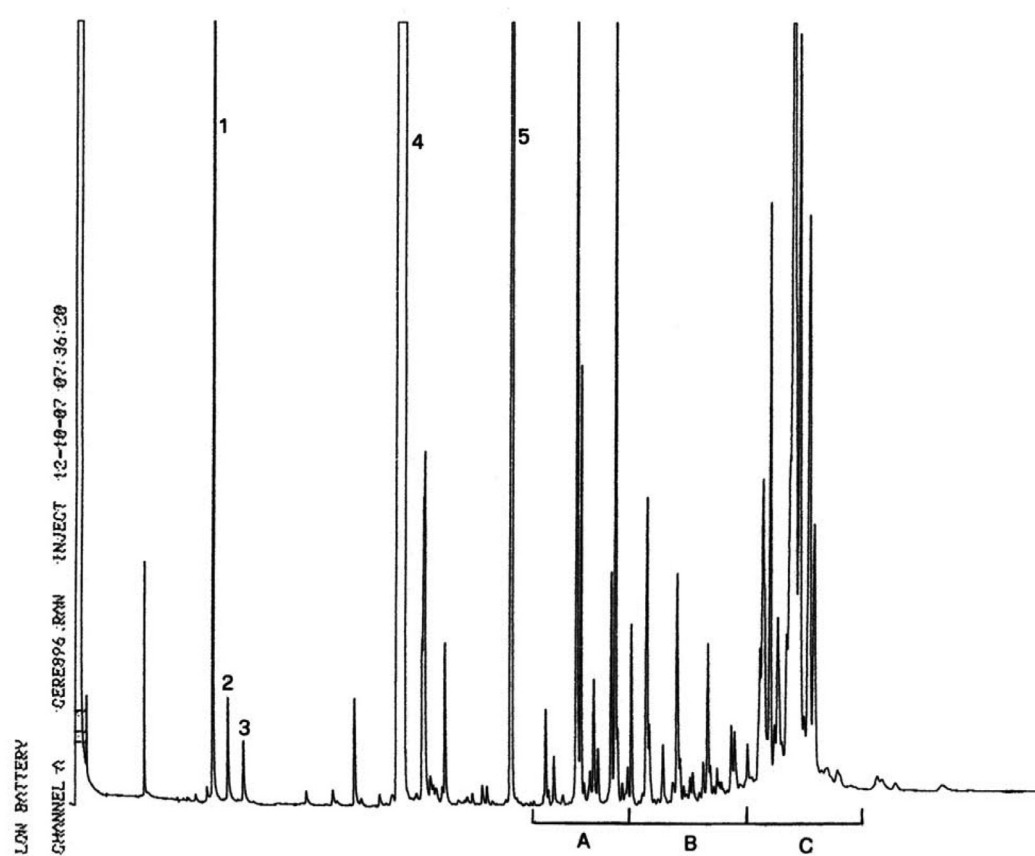
Merkkien selitykset:

- 1 – C₁₆-metyyli
- 2 – C₁₆-etyyli
- 3 – metyyliheptadekanoatti I.S.
- 4 – C₁₈-metyyli
- 5 – C₁₈-etyyli
- 6 – skvaleeni
- 7 – lauryliarakidaatti I.S.
- A – diterpeniesterit
- B – vahat
- C – steroliesterit ja triterpeniesterit

▼ **M23**

Kuva 3

Metyyliesterit, etyyliesterit ja vahat ekstra-neitsytoliiviöljyssä



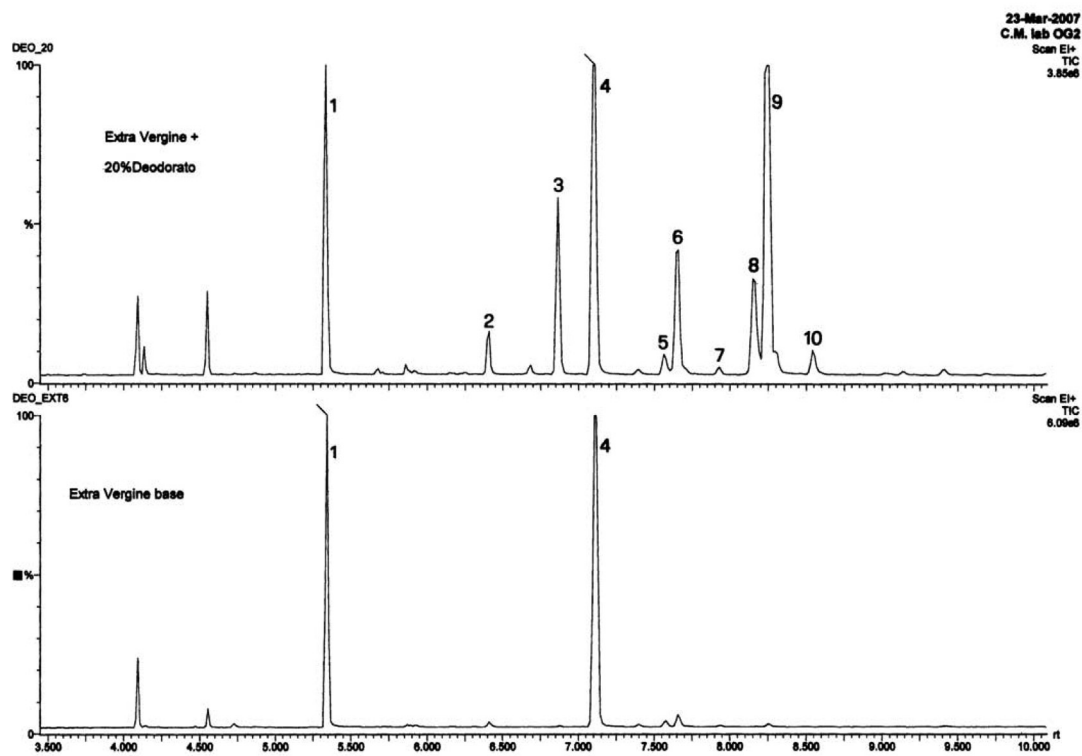
Merkkien selitykset:

- 1 – metyyliheptadekanoaatti I.S
- 2 – C₁₈-metyyli
- 3 – C₁₈-etyyli
- 4 – skvaleeni
- 5 – lauryliarakidaatti I.S.
- A – diterpeniesterit
- B – vahat
- C – steroliesterit ja triterpeniesterit

▼ M23

Kuva 4

Kromatogrammit ekstra-neitsytoliiviöljystä ja samasta öljystä, johon on sekoitettu 20 % hajuttomaksi tehtyä öljyä



Merkkien selitykset:

- 1 – metyylimyristaatti I.S.
- 2 – metyylipalmitaatti
- 3 – etyylipalmitaatti
- 4 – metyyliheptadekanoaatti I.S.
- 5 – metyyliolinoleaatti
- 6 – metyyliooleaatti
- 7 – metyylistearaatti
- 8 – etyyliolinoleaatti
- 9 – etyyliooleaatti
- 10 – etyylistearaatti

▼ M23*Lisäys A***Lineaarisen kaasuvirtausnopeuden määrittäminen**

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

Lineaarinen nopeus (cm/s) saadaan kaavasta L/t_M , jossa L on kolonnin pituus senttimetreinä ja t_M on sekunteina mitattu aika.

▼ **M26***LIITE XX a***MENETELMÄ VIERAIDEN ÖLJYJEN HAVAITSEMISEKSI OLIIVIÖLJYISSÄ****1. TARKOITUS**

Menetelmää käytetään vieraiden kasviöljyjen havaitsemiseksi oliiviöljyissä. Oliiviöljyissä saattaa olla runsaasti linolihappoja sisältäviä kasviöljyjä (soija-, rapsi- ja auringonkukkaöljyä jne.) ja joitakin runsaasti öljyhappoja sisältäviä kasviöljyjä – kuten pähkinäöljyä, runsaasti öljyhappoa sisältävä auringonkukkaöljyä ja oliivin puristemassaöljyä. Havaittu taso riippuu vieraan öljyn tyypistä ja oliivilajikkeesta. Pähkinäöljyn tavanomainen havaintotasoo on 5–15 prosenttia. Menetelmällä ei voida tunnistaa havaitun vieraan öljyn tyyppiä; sillä osoitetaan vain, onko oliiviöljy aitoa.

2. PERIAATE

Öljy puhdistetaan kiinteäfaasiekstraktiolla (SPE) piihappopatruunoissa. Triasyyliglyseridikoostumus (TAG) määritetään korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografian (HPLC) avulla käyttämällä refraktioideksidetektoria ja liikkuvana faasina propionitriiliä. Rasvahappometyyliesterit (FAME) valmistetaan puhdistetusta öljystä metyloimalla kylmällä kaliumhydroksidin metanoliliuoksella (Liite X b), minkä jälkeen esterit määritetään kapillaarikaasukromatografiamenetelmällä käyttämällä polaarisuudeltaan suurta kolonnia (Liite X a). Teoreettinen triasyyliglyseridikoostumus lasketaan rasvahappokoostumuksesta tietokonesovelluksen avulla olettamalla, että rasvahapoilla on triasyyliglyseridissä satunnaisjakauma 1,3- tai 2-asemassa, kuitenkin rajoituksin tyydyttyneiden rasvahappojen osalta 2-asemassa. Laskentamenetelmä on muunnos liitteessä XVIII kuvatussa menetelmästä. Teoreettisesta ja kokeellisesta (HPLC) triasyyliglyseridikoostumuksesta lasketaan useita matemaattisia algoritmeja, ja tuloksena saatuja arvoja verrataan aidoista oliiviöljyistä saatuihin tietokantaan sisältyviin arvoihin.

3. AINEET JA REAGENSIT**3.1. Öljyn puhdistaminen**

3.1.1. Erlenmeyerpulloja, 25 ml.

3.1.2. Kierrekorkisia koeputkia (tilavuus 5 ml), joiden korkissa PTFE-liitos.

3.1.3. Piihappopatruunoita, 1 g (6 ml), kiinteäfaasiuuttoa varten (esimerkiksi Waters, Massachusetts, USA).

3.1.4. *n*-Heksaani, analyysilaatua.

3.1.5. Heksaanin ja dietyylieetterin liuotinseos (87:13, v/v).

3.1.6. *n*-Heptaani, analyysilaatua.

3.1.7. Asetoni, analyysilaatua.

3.2. Triasyyliglyseridien HPLC-määritys

3.2.1. Mikroruiskuja (50 µl) ja neuloja HPLC-injektiota varten.

3.2.2. Propionitriili, erittäin puhdasta tai HPLC-laatua (esimerkiksi ROMIL, Cambridge, Yhdistynyt kuningaskunta), käytetään liikkuvana faasina.

▼ **M26**

3.2.3. HPLC-kolonnei (25 cm x sisähalkaisija 4 mm), johon pakattu RP-18-faasi (partikkelikoko 4 µm).

3.3. **Rasvahappometyyliesterien valmistaminen**

(ks. Liite X b)

3.3.1. Metanoli, jossa enintään 0,5 % vettä.

3.3.2. Heptaani, analyysilaatua.

3.3.3. Kaliumhydroksidin noin 2 N metanoliliuos, joka saadaan liuottamalla 1,1 grammaa kaliumhydroksidia 10 ml:aan metanolia.

3.3.4. Kierrekorkisia koeputkia (tilavuus 5 ml), joiden korkissa PTFE-liitos.

3.4. **Rasvahappometyyliesterien kaasukromatografinen määrittäminen (GC)**

(Liitteessä X a on esitetty menetelmä tyydyttymättömien trans-rasvahappojen määrittämiseksi kapillaarikaasukromatografialla.)

3.4.1. Mikroruisuja (5 µl) ja neuloja kaasukromatografian injektiota varten.

3.4.2. Kantajakaasut: vety tai helium.

3.4.3. Vetyä ja happea liekki-ionisaatiotektori (FID) varten.

3.4.4. Apukaasut: typpi tai helium.

3.4.5. Kvartsilasikapillaarikolonnei (50–60 m x sisähalkaisija 0,25–0,30 mm), joka on pinnoitettu syaanipropyylipolysiloksaani- tai syanopropyylifenyy-lisiloksaanifaasilla (SP-2380 tai vastaava), kerrospaksuus 0,20–0,25 µm.

4. **VÄLINEISTÖ**

4.1. Tyhjiölaitteisto kiinteäfaasiuuttoa varten.

4.2. Pyöröhaihdutin.

4.3. Korkean erotuskyvyn nestekromatografi (HPLC), johon kuuluvat seuraavat osat:

4.3.1. kaasunpoistolaite liikkuvaa faasia varten,

4.3.2. Rheodyne-injektoriventtiili, jonka näytesilmukka on 10 µl,

4.3.3. suurpainepumppuyksikkö,

4.3.4. HPLC-kolonnei varten termostaattisäätöinen lämpökaappi, jossa voidaan pitää yllä huonelämpötilaa alhaisempia lämpötiloja (15–20 °C) (esimerkiksi Peltier-tyyppinen),

4.3.5. refraktioindeksitektori,

4.3.6. tietokonepohjainen tiedonkeruujärjestelmä, jossa on integrointisovellus.

4.4. Liitteessä X a kuvattu kapillaarikaasukromatografialaitteisto, jossa on

4.4.1. jakoinjektori,

4.4.2. liekki-ionisaatiotektori (FID),

4.4.3. lämpötilaltaan ohjelmoitava lämpökaappi,

4.4.4. tietokonepohjainen tiedonkeruujärjestelmä, jossa on integrointisovellus.

4.5. Tietokone, jossa on Microsoft EXCEL -ohjelma.

▼ **M26**

5. MÄÄRITYS

5.1. Öljyn puhdistaminen

SPE-piihappopatruuna asetetaan tyhjiöelutiolaitteeseen ja pestään tyhjiössä 6 ml:lla heksaania. Tyhjiöinti lopetetaan, jottei kolonni kuivu, ja patruunan alle laitetaan erlenmeyerpullo. Kolonniin laitetaan öljyliuos (noin 0,12 g) 0,5 ml:ssa heksaania. Tyhjiöidään, jotta liuos imeytyy piihappoon ja sen jälkeen eluoidaan tyhjiössä 10 ml:lla heksaanin ja dietyylietterin liuot inseosta (87:13 v/v) (3.1.5 kohta). Elutioliuotin homogenoidaan, ja noin puolet määrästä kaadetaan toiseen erlenmeyerpulloon. Molemmat liuokset haihdutetaan erikseen kuiviin alipaineessa pyöröhaihduttimessa huoneenlämmössä. Triasyyliglyseridimääritystä varten toinen jäännös liotetaan 1 ml:aan asetonia (ks. 5.2 kohdan ensimmäinen alakohta) ja kaadetaan kierrekorkilla varustettuun 5 ml:n koeputkeen. Toinen jäännös liotetaan 1 ml:aan *n*-heptaania ja kaadetaan toiseen kierrekorkilla varustettuun 5 ml:n koeputkeen rasvahappometyyliestereiden valmistamista varten.

Huom.: Öljy voidaan puhdistaa piihappogeelikolonniassa IUPAC 2.507 -menetelmässä kuvatulla tavalla.

5.2. Triasyyliglyseridien HPLC-määrittäminen

HPLC-järjestelmä valmistellaan käyttöön. Kolonnin lämpötila pidetään 20 °C:ssa, ja propionitriiliä käytetään liikkuvana faasina siten, että virtaaman nopeus on 0,6 ml minuutissa. Kun perusviiva on vakaa, injektoidaan liuotin; jos perusviivassa on häiriöitä 12–25 minuutin alueella, näytteen liuottamiseen käytetään toisen tyyppistä asetonia tai propionitriilin ja asetonin seosta (25:75).

Huom.: Eräät asetonit aiheuttavat perusviivaan häiriöitä edellä mainitulla alueella.

Puhdistetun öljyn 5-prosenttista asetoniliuosta injektoidaan 10 µl. Vaihe kestää noin 60 minuuttia. Lämpökaapin lämpötilaa ja/tai virtaamanopeutta on mukautettava, jotta päästään kuvassa 1 esitetyn kaltaiseen kromatogrammiin, jossa trilinoleiini (piikki 1) eluoituu 15,5 minuutin kohdalla ja jossa erotuskyky parien LLL/OLLn (piikit 1 ja 2) sekä OLL/OOLn (piikit 4 ja 5) välillä on hyvä.

Piikin 2 (OLLn+PoLL) huippu on saavutettava vähintään kolmella prosentilla koko asteikosta.

5.3. Rasvahappometyyliestereiden valmistaminen

Lisätään 0,1 ml kaliumhydroksidin 2 N metanoliliuosta liuokseen, jossa on puhdistettua öljyä 1 ml:ssa *n*-heptaania. Koeputken kierrekorkki suljetaan tiiviisti. Putkea ravistetaan voimakkaasti 15 sekuntia, minkä jälkeen sen annetaan seistä, kunnes liuoksen pintakerros kirkastuu (viisi minuuttia). *n*-Heptaaniliuos voidaan injektoida kaasukromatografiin. Liuos voidaan jättää huoneen lämpöön enintään 12 tunniksi.

5.4. Rasvahappometyyliestereiden kaasukromatografimäärittäminen (GC)

On käytettävä tyydyttymättömien trans-rasvahappojen varten laaditussa menetelmässä (ks. Liite X a) kuvattua menettelyä.

GC-järjestelmä valmistellaan käyttöön; lämpökaapin lämpötilaksi valitaan 165 °C. Suositeltava lämpökaapin vakio- ja lämpötila on 165 °C kymmenen minuutin ajan, minkä jälkeen lämpötilaa nostetaan 1,5 °C minuutissa 200 °C:een. Injektorin lämpötilaksi suositellaan 220–250 °C, jotta trans-rasvahappojen muodostuminen mahdollisimman vähän (ks. Liite X a). Detektorin lämpötilaksi asetetaan 250 °C. Vetyä tai heliumia on käytettävä kantajakaasuna, ja kolonnin paine on noin 130 kPa. Injektion määrä on jakoinjektiossa 1 µl.

▼ **M26**

On saatava samanlainen GC-profiili kuin kuvassa 2. Erotuskykyyn on kiinnitettävä erityistä huomiota välillä C18:3 ja C20:1 (piikin C18:3 on tultava näkyviin ennen kuin C20:1). Näiden olosuhteiden saavuttamiseksi alkulämpötila ja/tai kolonnin pään paine on optimoitava. Mukauta injektorin olosuhteita (lämpötilaa, jakosuhdetta ja injektiomäärää), jotta palmitiinihapon ja palmito-oleiinihapon erottelu olisi mahdollisimman vähäistä.

Piikin C20:0 huipun on oltava noin 20 prosenttia koko asteikosta, jotta trans-isomeerien määrä voidaan määrittää. Jos piikki C18:0 vaikuttaa vääristyneeltä, näytemäärää vähennetään.

6. KROMATOGRAMMIN PIIKKIEN INTEGROINTI

6.1. HPLC-kromatogrammi

Kuvassa 1 esitetään tyypillinen HPLC-kromatogrammi puhdistetun oliiviöljyn triasyyliglyserideistä. Piikkien integrointia varten on piirrettävä kolme perusviivaa: ensimmäinen perusviiva piikin 1 alun ja piikin 3 lopun välille; toinen perusviiva piikin 4 alun ja piikkiä 8 edeltävän laakson välille; kolmas perusviiva piikkiä 8 edeltävän laakson ja piikin 18 lopun välille.

Kokonaispinta-ala on kaikkien piikkien (sekä tunnistettujen että tunnistamattomien) yhteenlaskettu pinta-ala piikistä 1 piikkiin 18. Kunkin piikin prosentuaalinen osuus lasketaan seuraavasti:

$$\text{TAG}_x (\%) = 100 (A_x + A_T)$$

Prosenttiosuudet ilmaistaan kahden desimaalin tarkkuudella.

6.2. GC-kromatogrammi

Kuvassa 2 esitetään puhdistetusta oliiviöljystä saatujen rasvahappoalkyyliesterien GC-kromatogrammi. Seuraavien rasvahappojen prosentuaaliset osuudet on laskettava:

palmitiinihappo;	P (C16:0)	=	metyyliesteri + etyyliesteri
steariinihappo;	S (C18:0)	=	metyyliesteri
palmito-oleiinihappo;	Po (C16:1)	=	kahden cis-isomeerin metyyliesterien yhteismäärä
oleiinihappo;	O (C18:1)	=	kahden cis-isomeerin metyyliesterien + etyyliesterin + trans-isomeerien yhteismäärä
linolihappo;	L (C18:2)	=	metyyliesteri + etyyliesteri + trans-isomeerit
linoleenihappo;	Ln (C18:3)	=	metyyliesteri + trans-isomeerit
arakidonihappo;	A (C20:0)	=	metyyliesteri
eikoseenihappo;	G (C20:1)	=	metyyliesteri

Etyyli- ja trans-isomeeriestereitä ei välttämättä näy kaasukromatogrammissa.

Kokonaispinta-ala (AT) on kaikkien kromatogrammissa esiintyvien piikkien yhteenlaskettu pinta-ala C14:0–C24:0, lukuun ottamatta piikkiä, joka vastaa skvaleenia. Kunkin piikin prosentuaalinen osuus lasketaan seuraavasti:

$$\text{FA}_x (\%) = 100(A_x + A_T)$$

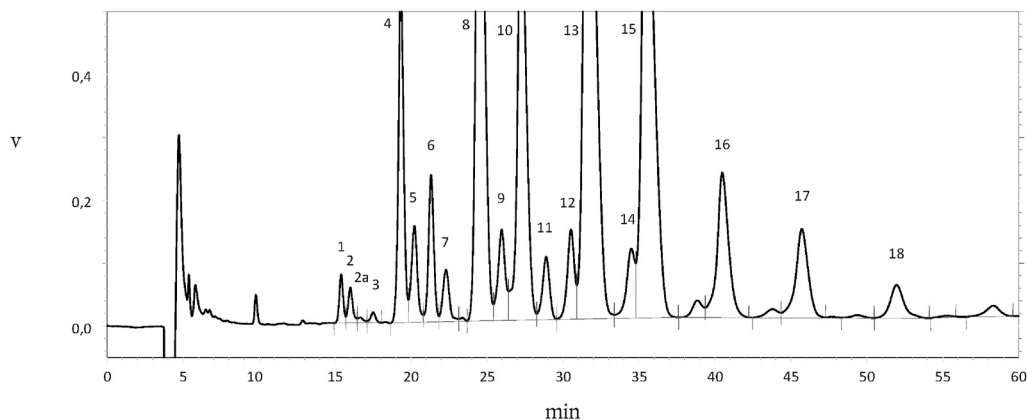
Tulokset on ilmaistava kahden desimaalin tarkkuudella.

Tietokonesovellusten laskelmia varten sataan normalisointi ei ole välttämätöntä, koska se tehdään automaattisesti.

▼ M26

Kuva 1

”Chamlali”-neitsytoliiviöljyn triasyyliglyseridien HPLC-kromatogrammi.
Kromatogrammin piikkien pääkomponentit



- (1) LLL; (2) OLLn+PoLL; (3) PLLn; (4) OLL; (5) OOLn+PoOL;
(6) PLL+PoPoO; (7) POLn+PPoPo+PPoL; (8) OOL+LnPP; (9) PoOO;
(10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; (12) PLP;
(13) OOO+PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; (17) SOO;
(18) POS+SLS.

Taulukko 1

Toistettavuustiedot neitsytoliiviöljyn triasyyliglyseridien määrittämiseksi HPLC:llä; kolonnin lämpötila on 20 °C
ja liikkuva faasi on propionitrili

ECN	HPLC- piikit	TAG	Näyte 1		Näyte 2		Näyte 3		Näyte 4		Näyte 5	
			Keski- arvo (%)	RSD _t (%)	Keskiarvo (%)	RSD _t (%)	Keskiarvo (%)	RSD _t (%)	Keskiarvo (%)	RSD _t (%)	Keskiarvo (%)	RSD _t (%)
42	1	LLL	0,020	7,23	0,066	5,18	0,095	4,10	0,113	0,95	0,34	1,05
	2	OLLn+ PoLL	0,085	7,44	0,24	1,78	0,26	2,25	0,35	2,02	0,50	2,83
	3	PLLn	0,023	15,74	0,039	5,51	0,057	5,62	0,082	4,35	0,12	6,15
44	4	OLL	0,47	1,52	1,53	0,42	2,62	0,98	3,35	1,05	4,37	1,13
	5	OOLn+ PoOL	1,07	2,01	1,54	0,46	1,61	0,71	1,72	1,07	1,77	2,40
	6	PLL+ PoPoO	0,11	12,86	0,24	4,37	0,65	1,32	1,35	0,73	2,28	1,24
	7	POLn+ Ppo- Po+ PpoL	0,42	5,11	0,49	2,89	0,55	2,01	0,85	1,83	1,09	1,96
46	8	OOL+ LnPP	6,72	0,63	8,79	0,31	11,21	0,42	13,25	0,33	15,24	0,23
	9	PoOO	1,24	2,86	1,49	0,95	1,63	0,85	2,12	0,45	2,52	0,56
	10	SLL+ PLO	2,70	0,65	4,05	0,70	6,02	0,65	9,86	0,53	11,53	0,31
	11	PoOP+ SpoL+ SOLn+ SpoPo	0,64	4,42	0,69	3,02	0,79	1,23	1,53	0,89	1,70	1,66

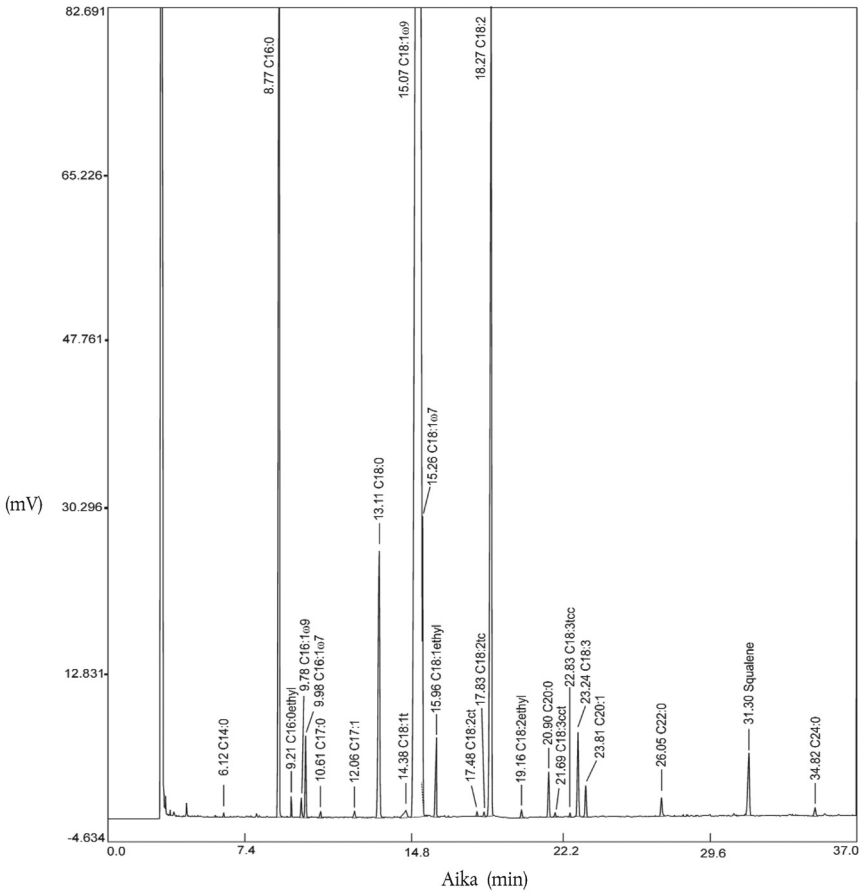
▼ **M26**

ECN	HPLC-piikit	TAG	Näyte 1		Näyte 2		Näyte 3		Näyte 4		Näyte 5	
			Keskiarvo (%)	RSD _r (%)	Keskiarvo (%)	RSD _r (%)	Keskiarvo (%)	RSD _r (%)	Keskiarvo (%)	RSD _r (%)	Keskiarvo (%)	RSD _r (%)
48	12+13	OOO+ PLP+ PoPP	49,60	0,07	48,15	0,06	42,93	0,06	33,25	0,10	24,16	0,06
	14	SOL	0,82	1,72	0,92	1,56	1,05	1,32	1,25	1,05	1,60	1,77
	15	POO	22,75	0,25	21,80	0,20	21,05	0,30	20,36	0,35	20,17	0,14
50	16	POP	3,05	0,46	4,56	0,42	4,98	0,52	5,26	0,41	5,57	0,38
	17	SOO	6,87	0,21	5,56	0,33	4,86	0,43	4,12	0,72	3,09	0,69
	18	POS+ SLS	1,73	1,23	1,65	1,10	1,54	0,99	1,49	1,10	1,41	1,00

n = 3 toistoa
RSD_r = toistettavuuden suhteellinen keskipoikkeama

Kuva 2

Oliivin puristemassaöljystä kylmällä kaliumhydroksidin metanoliliuoksella transesteröimällä saatujen rasvahappoalkyyliesterien kaasukromatogrammi



▼ M26

7. VIERAIDEN ÖLJYJEN HAVAITSEMINEN OLIIVIÖLJYISSÄ

Laskentamenetelmä, jota käytetään vieraiden öljyjen havaitsemiseksi oliiviöljyissä vertailemalla matemaattisia algoritmeja aidoista oliiviöljyistä laadittuun tietokantaan, on esitetty standardin IOC/T.20 / Asiakirja nro 25 liitteessä I.

LIITE XXI

8 artiklan 2 kohdassa tarkoitettut oliiviöljyille tehtyjen vaatimustenmukaisuustarkastusten tulokset

				Merkinnät						Kemialliset parametrit			Aistinvaraiset ominaisuudet ⁽⁴⁾			Lopullinen päätelmä	
Otos	Luokka	Alkuperä-maa	Tarkastus-paikka ⁽¹⁾	Virallinen nimi	Alkuperä-nimitys	Varastoin-tiedelly-tykset	Virheelli-set tiedot	Luettavuus	C/NC ⁽³⁾	Paramet-rejä yli rajojen Kyllä/Ei	Jos kyllä, mikä/mit-kä ⁽²⁾	C/NC ⁽³⁾	Virheen mediaani	Hedelmäi-syyden mediaani	C/NC ⁽³⁾	Vaadittu toimi	Seuraamus

⁽¹⁾ Sisämarkkinat (puristamo, pullottajat, vähittäismyyntivaihe), vienti, tuonti
⁽²⁾ Jokaisella liitteessä I esitetyllä oliiviöljyn ominaisuudella on oltava koodi.
⁽³⁾ Vaatimusten mukainen / Vaatimusten vastainen
⁽⁴⁾ Ei vaadita oliiviöljyltä ja oliivin puristemassaöljyltä.