

Ovaj je tekst namijenjen isključivo dokumentiranju i nema pravni učinak. Institucije Unije nisu odgovorne za njegov sadržaj. Vjerodostojne inačice relevantnih akata, uključujući njihove preambule, one su koje su objavljene u Službenom listu Europske unije i dostupne u EUR-Lexu. Tim službenim tekstovima može se izravno pristupiti putem poveznica sadržanih u ovom dokumentu.

► B **UREDBA KOMISIJE (EEZ) br. 2568/91**
od 11. srpnja 1991.
o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize
(SL L 248, 5.9.1991., str. 1.)

Koju je izmijenila:

		Službeni list		
		br.	stranica	datum
► <u>M1</u>	Uredba Komisije (EEZ) br. 3682/91 od 17. prosinca 1991.	L 349	36	18.12.1991.
► <u>M2</u>	Uredba Komisije (EEZ) br. 1429/92 od 26. svibnja 1992.	L 150	17	2.6.1992.
► <u>M3</u>	Commission Regulation (EEC) No 1683/92 of 29 June 1992 (*)	L 176	27	30.6.1992.
► <u>M4</u>	Commission Regulation (EEC) No 1996/92 of 15 July 1992 (*)	L 199	18	18.7.1992.
► <u>M5</u>	Uredba Komisije (EEZ) br. 3288/92 od 12. studenoga 1992.	L 327	28	13.11.1992.
► <u>M6</u>	Uredba Komisije (EEZ) br. 183/93 od 29. siječnja 1993.	L 22	58	30.1.1993.
► <u>M7</u>	koju je izmijenila Uredba Komisije (EEZ) br. 826/93 od 6. travnja 1993.	L 87	6	7.4.1993.
► <u>M8</u>	Commission Regulation (EEC) No 620/93 of 17 March 1993 (*)	L 66	29	18.3.1993.
► <u>M9</u>	Uredba Komisije (EZ) br. 177/94 od 28. siječnja 1994.	L 24	33	29.1.1994.
► <u>M10</u>	Commission Regulation (EC) No 2632/94 of 28 October 1994 (*)	L 280	43	29.10.1994.
► <u>M11</u>	Uredba Komisije (EZ) br. 656/95 od 28. ožujka 1995.	L 69	1	29.3.1995.
► <u>M12</u>	Commission Regulation (EC) No 2527/95 of 27 October 1995 (*)	L 258	49	28.10.1995.
► <u>M13</u>	Commission Regulation (EC) No 2472/97 of 11 December 1997 (*)	L 341	25	12.12.1997.
► <u>M14</u>	Uredba Komisije (EZ) br. 282/98 od 3. veljače 1998.	L 28	5	4.2.1998.
► <u>M15</u>	Commission Regulation (EC) No 2248/98 of 19 October 1998 (*)	L 282	55	20.10.1998.
► <u>M16</u>	Uredba Komisije (EZ) br. 379/1999 od 19. veljače 1999.	L 46	15	20.2.1999.
► <u>M17</u>	Uredba Komisije (EZ) br. 455/2001 od 6. ožujka 2001.	L 65	9	7.3.2001.
► <u>M18</u>	Commission Regulation (EC) No 2042/2001 of 18 October 2001 (*)	L 276	8	19.10.2001.
► <u>M19</u>	Uredba Komisije (EZ) br. 796/2002 od 6. svibnja 2002.	L 128	8	15.5.2002.
► <u>M20</u>	Uredba Komisije (EZ) br. 1989/2003 od 6. studenoga 2003.	L 295	57	13.11.2003.
► <u>M21</u>	Uredba Komisije (EZ) br. 702/2007 od 21. lipnja 2007.	L 161	11	22.6.2007.
► <u>M22</u>	Uredba Komisije (EZ) br. 640/2008 od 4. srpnja 2008.	L 178	11	5.7.2008.
► <u>M23</u>	Uredba Komisije (EU) br. 61/2011 od 24. siječnja 2011.	L 23	1	27.1.2011.
► <u>M24</u>	Commission Implementing Regulation (EU) No 661/2012 of 19 July 2012 (*)	L 192	3	20.7.2012.

(*) Ovaj akt nije nikada objavljen na hrvatskome.

► <u>M25</u>	Provedbena uredba Komisije (EU) br. 299/2013 od 26. ožujka 2013.	L 90	52	28.3.2013.
► <u>M26</u>	Provedbena uredba Komisije (EU) br. 1348/2013 od 16. prosinca 2013.	L 338	31	17.12.2013.
► <u>M27</u>	Delegirana uredba Komisije (EU) 2015/1830 od 8. srpnja 2015.	L 266	9	13.10.2015.
► <u>M28</u>	Provedbena uredba Komisije (EU) 2015/1833 od 12. listopada 2015.	L 266	29	13.10.2015.
► <u>M29</u>	Provedbena uredba Komisije (EU) 2016/1227 od 27. srpnja 2016.	L 202	7	28.7.2016.

▼B**UREDBA KOMISIJE (EEZ) br. 2568/91****od 11. srpnja 1991.****o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize****▼M20***Članak 1.*

1. Ulja čija su svojstva u skladu s onima iznesenima u točkama 1. i 2. Priloga I. ovoj Uredbi smatraju se djevičanskim maslinovim uljima u smislu točaka 1(a) i (b) Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ.

2. Ulje čija su svojstva u skladu s onima iznesenima u točki 3. Priloga I. ovoj Uredbi smatra se lampante maslinovim uljem u smislu točke 1(c) Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ.

3. Ulje čija su svojstva u skladu s onima iznesenima u točki 5. Priloga I. ovoj Uredbi smatra se rafiniranim maslinovim uljem u smislu točke 2. Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ.

4. Ulje čija su svojstva u skladu s onima iznesenima u točki 5. Priloga I. ovoj Uredbi smatra se maslinovim uljem sastavljenim od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja u smislu točke 3. Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ.

5. Ulje čija su svojstva u skladu s onima iznesenima u točki 6. Priloga I. ovoj Uredbi smatra se sirovim uljem iz komine maslina u smislu točke 4. Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ.

6. Ulje čija su svojstva u skladu s onima iznesenima u točki 7. Priloga I. ovoj Uredbi smatra se rafiniranim uljem iz komine maslina u smislu točke 5. Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ.

7. Ulje čija su svojstva u skladu s onima iznesenima u točki 8. Priloga I. ovoj Uredbi smatra se uljem komine maslina u smislu točke 6. Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ.

▼ M26*Članak 2.*

1. Svojstva ulja utvrđena u Prilogu I. određuju se u skladu sa sljedećim metodama analize:

- (a) za određivanje slobodnih masnih kiselina, iskazanih kao postotak oleinske kiseline, metoda utvrđena u Prilogu II.;
- (b) za određivanje peroksidnog broja, metoda utvrđena u Prilogu III.;
- (c) za određivanje sadržaja voskova, metoda utvrđena u Prilogu IV.;
- (d) za određivanje sastava i sadržaja sterola i triterpenskih alkohola kapilarnom plinskom kromatografijom, metoda utvrđena u Prilogu V.;
- (e) za određivanje postotka 2- gliceril monopalmitata, metoda utvrđena u Prilogu VII.;
- (f) za spektrofotometrijsku analizu, metoda utvrđena u Prilogu IX.;

▼ M28

- (g) za određivanje sastava masnih kiselina, metoda utvrđena u Prilogu X.;

▼ M26

- (h) za određivanje hlapivih halogeniranih otapala, metoda utvrđena u Prilogu XI.;
- (i) za ocjenjivanje organoleptičkih svojstava djevičanskog maslinova ulja, metoda utvrđena u Prilogu XII.;
- (j) za određivanje stigmastadiena, metoda utvrđena u Prilogu XVII.;
- (k) za određivanje sadržaja triglicerida s ECN42, metoda utvrđena u Prilogu XVIII.;

▼ M28

- (l) za određivanje sadržaja alifatskih i triterpenskih alkohola, metoda utvrđena u Prilogu XIX.;

▼ M26

- (m) za određivanje sadržaja voskova, metil estera masnih kiselina i etil estera masnih kiselina, metoda utvrđena u Prilogu XX.;

▼ M28

▼ M26

2. Provjeru organoleptičkih svojstava djevičanskih ulja od strane nacionalnih vlasti ili njihovih predstavnika obavljaju komisije za ocjenjivanje koje su odobrile države članice.

▼ M26

Organoleptička svojstva ulja u skladu s prvim podstavkom smatraju se usklađenima s deklariranom kategorijom ako komisija koju je odobrila država članica potvrdi predmetnu ocjenu.

Ako komisija ne potvrdi deklariranu kategoriju u vezi s organoleptičkim svojstvima, na zahtjev zainteresirane strane nacionalna tijela ili njihovi predstavnici obavljaju bez odgađanja dva protuocjenjivanja koja provode ostale odobrene komisije, s time da je najmanje jedna od njih komisija koju je odobrio proizvođač predmetne države članice. Predmetna se svojstva smatraju usklađenima s deklariranim svojstvima ako se najmanje dvama protuocjenjivanjima potvrdi deklarirana kategorija. Ako to nije slučaj, zainteresirana strana odgovorna je za trošak protuocjenjivanja.

3. Kad nacionalna tijela ili njihovi predstavnici potvrde svojstva ulja kako je predviđeno u stavku 1., uzorci se uzimaju u skladu s međunarodnim standardima EN ISO 661 o pripremi uzoraka za ispitivanje i EN ISO 5555 o uzorkovanju. Međutim, neovisno o točki 6.8. norme EN ISO 5555, u slučaju serija takvih ulja u unutarnjem pakiranju, uzorak se uzima u skladu s Prilogom I.a ovoj Uredbi. U slučaju ulja u velikim pakiranjima za koje se uzorkovanje ne može obaviti u skladu s EN ISO 5555, uzorkovanje će se obaviti u skladu s uputama koje omogućava nadležno tijelo države članice.

Ne dovodeći u pitanje normu EN ISO 5555, i Poglavlje 6. norme EN ISO 661, uzeti se uzorci odmah stavljaju na tamno mjesto dalje od izvora velike topline i šalju u laboratorij na analizu najkasnije pet radnih dana nakon uzimanja, u protivnom se uzorci čuvaju na način da ne propadnu ili se ne oštete tijekom prijevoza ili skladištenja prije nego što se pošalju u laboratorij.

4. Za potrebe provjere predviđene u stavku 3., analize iz priloga II., III., IX., XII. i XX. i, prema potrebi, sve protuanalize potrebne u skladu s nacionalnim zakonodavstvom izvršavaju se prije najkraćeg roka trajanja u slučaju pakiranih proizvoda. U slučaju uzorkovanja ulja u velikim pakiranjima te se analize obavljaju najkasnije šest mjeseci nakon mjeseca u kojem je uzet uzorak.

Za druge analize predviđene ovom Uredbom ne vrijedi nikakvo vremensko ograničenje.

Ako je uzorak uzet manje od dva mjeseca prije najkraćeg roka trajanja i ako rezultati analize ne odgovaraju svojstvima deklarirane kategorije maslinova ulja ili ulja komine maslina, predmetnu se stranu obavješćuje najkasnije mjesec dana prije završetka razdoblja utvrđenog u prvom podstavku.

▼ M26

5. U svrhu određivanja svojstava maslinovih ulja metodama utvrđenima u stavku 1. prvom podstavku, rezultate se analize izravno uspoređuje s ograničenjima iz ove Uredbe.

▼ M25*Članak 2.a*

1. Za potrebe ovog članka, „maslinovo ulje stavljeno na tržište” znači ukupna količina maslinovog ulja i ulja komine maslina odnosno države članice koje se konzumira u toj državi članici ili se izvozi iz te države članice.

2. Države članice osiguravaju da se provjere sukladnosti provode selektivno i odgovarajućom učestalošću te na temelju analize rizika kako bi se osiguralo da maslinovo ulje stavljeno na tržište bude u skladu s deklariranom kategorijom.

3. Kriteriji za procjenu rizika mogu uključivati:

- (a) kategoriju ulja, razdoblje proizvodnje, cijenu ulja u odnosu na druga biljna ulja, postupke miješanja i pakiranja, skladišne prostore i uvjete, zemlju podrijetla, zemlju odredišta, prijevozno sredstvo ili količinu serije;
- (b) položaj gospodarskih subjekata u trgovinskom lancu, opseg i/ili vrijednost koju stavljaju na tržište, raspon kategorija ulja koja stavljaju na tržište, vrstu poslovanja koje obavljaju, kao što su mljevenje, skladištenje, rafiniranje, miješanje, pakiranje ili maloprodaja;
- (c) nalaze prijašnjih provjera koji uključuju broj i vrstu utvrđenih nedostataka, uobičajenu kvalitetu ulja stavljenih na tržište, učinkovitost korištene tehničke opreme;
- (d) pouzdanost sustava osiguranja kvalitete ili sustava samoprovjere gospodarskih subjekata vezanih uz usklađenost s tržišnim standardima;
- (e) mjesto provođenja provjere, posebno ako se radi o prvom mjestu ulaska u Uniju, posljednjem mjestu izlaska iz Unije ili mjestu gdje se ulja proizvode, pakiraju, utovaraju ili prodaju krajnjem potrošaču;
- (f) sve druge informacije koje bi mogle ukazivati na rizik nesukladnosti.

4. Države članice unaprijed utvrđuju:

- (a) kriterije za procjenu rizika nesukladnosti serija;
- (b) na temelju analize rizika za svaku kategoriju rizika, najmanji broj gospodarskih subjekata ili serija i/ili količine koje podliježu provjeri sukladnosti.

▼ M25

Godišnje se provodi najmanje jedna provjera sukladnosti na tisuću tona maslinovog ulja stavljenog na tržište u državi članici.

5. Države članice provjeravaju sukladnost:
 - (a) provođenjem, bilo kojim redosljedom, analiza utvrđenih Prilogom I.; ili
 - (b) slijedeći redosljed utvrđen u Prilogu I.b na shemi odlučivanja sve dok se ne postigne jedna od odluka sa sheme odlučivanja.

▼ M19**▼ M25***Članak 3.*

Ako se utvrdi da ulje ne odgovara opisu svoje kategorije, dotična država članica, ne dovodeći u pitanje druge sankcije, primjenjuje učinkovite, proporcionalne i odvraćajuće sankcije koje se određuju s obzirom na ozbiljnost otkrivene nepravilnosti.

Ako provjere otkriju značajne nepravilnosti, države članice povećavaju učestalost provjera u odnosu na fazu prodaje, kategoriju ulja, podrijetlo ili druge kriterije.

▼ M5*Članak 4.***▼ M19**

1. Države članice mogu odobriti ocjenjivačke komisije tako da nacionalna tijela ili njihovi predstavnici mogu ocijeniti i potvrditi organoleptičke karakteristike.

Uvjete odobrenja određuju države članice i osiguravaju da:

- su zahtjevi Priloga XII.4 ispunjeni,
- predsjednik komisije ima izobrazbu priznatu u tu svrhu od strane države članice,
- daljnje odobrenje ovisi o uspješnosti u godišnjim provjerama koje provodi država članica.

Države članice Komisiji priopćuju popis odobrenih komisija i mjere poduzete na temelju ovog stavka.

▼ M5

2. U slučaju kad se pojedine države članice susretnu s poteškoćama u uspostavi komisije organoleptičkih ocjenjivačana svojem državnom području, mogu se obratiti komisiji ocjenjivačakoja je odobrena u nekoj drugoj državi članici.

3. Svaka država članica sastavlja popis komisija organoleptičkih ocjenjivača koje su strukovne organizacije ili međustrukovne organizacije uspostavile u skladu s uvjetima utvrđenim u stavku 1. i osiguravaju se da se ti uvjeti poštuju.

▼ M19**▼ B***Članak 6.*

1. Sadržaj ulja u uljnoj pogači i drugim ostacima maslina koje nastaju ekstrakcijom maslinovog ulja (oznake KN 2306 90 11 i 2306 90 19) utvrđuju se primjenom metoda navedenih u Prilogu XV.

▼ B

2. Sadržaj ulja na koje se odnosi stavak 1. iskazuje se kao postotak težine ulja u odnosu na težinu suhe tvari.

▼ M20*Članak 7.*

Primjenjuju se odredbe Zajednice koje se tiču prisustva kontaminanata.

U pogledu halogeniranih otapala, ograničenja za sve kategorije maslinovog ulja su sljedeća:

- otkriveni maksimalni sadržaj svakog halogeniranog otapala: 0,1 mg/kg,
- otkriveni maksimalni ukupni sadržaj svakog halogeniranog otapala: 0,2 mg/kg.

▼ M25*Članak 7a.*

Fizičke ili pravne osobe i skupine osoba koje drže maslinovo ulje i ulje komine masline od faze ekstrakcije u uljari do uključivo faze punjenja u boce, u bilo koje profesionalne ili komercijalne svrhe, za svaku kategoriju tih ulja vode registar ulaza i izlaza.

Država članica osigurava propisno ispunjavanje obveze utvrđene u stavku 1.

Članak 8.

1. Države članice obavješćuju Komisiju o mjerama kojima se provodi ova Uredba. One obavješćuju Komisiju o svim naknadnim izmjenama.

2. Najkasnije do 31. svibnja svake godine države članice Komisiji dostavljaju izvješće o provedbi ove Uredbe tijekom prethodne kalendarske godine. Izvješće sadrži najmanje rezultate provjera sukladnosti provedenih na maslinovim uljima u skladu s obrascima iz Priloga XXI.

3. Obavijesti navedene u ovoj Uredbi sastavljaju se u skladu s Uredbom Komisije (EZ) br. 792/2009. ⁽¹⁾.

▼ B*Članak 9.*

Uredba (EEZ) br. 1058/77 stavlja se izvan snage.

Članak 10.

1. Ova Uredba stupa na snagu trećeg dana od dana objave u *Službenom listu Europskih zajednica*.

Bez obzira na to, metoda navedena u Prilogu XII. Primjenjuje se od ► **M1** 1. studenoga 1992. ◀, osim kad su u pitanju djelatnosti vezane uz sustav intervencija.

⁽¹⁾ SL L 228, 1.9.2009., str. 3.

▼ **M5**

Ta se metoda ne primjenjuje na djevičansko maslinovo ulje pripremljeno za tržište prije 1. studenoga 1992.

▼ **B**

2. Ova Uredba ne primjenjuje se na maslinova ulja i ulja komine maslina zapakirana prije stupanja ove Uredbe na snagu i stavljena na tržište do 31. listopada 1992.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje u svim državama članicama.

▼ B*PRILOZI***Sadržaj**

Prilog I.:	Svojstva maslinova ulja
Prilog I.a:	Uzorkovanje ulja od ploda ili komine maslina koje se dostavlja u unutarnjem pakiranju
Prilog I.b:	Shema odlučivanja za provjeru usklađenosti uzorka maslinova ulja sa deklariranom kategorijom
Prilog II.:	Određivanje slobodnih masnih kiselina, hladna metoda
Prilog III.:	Određivanje peroksidnog broja
Prilog IV.:	Određivanje sadržaja voska kapilarnom plinskom kromatografijom
Prilog V.:	Određivanje sastava i sadržaja sterola i triterpenskih dialkoha kapilarnom plinskom kromatografijom
Prilog VII.:	► <u>M21</u> Određivanje postotka 2-gliceril monopalmitata ◀

▼ M20**▼ B**

Prilog IX.:	Spektrofotometrijsko ispitivanje u ultraljubičastom području
-------------	--

▼ M28

Prilog X.:	Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom
------------	--

▼ B

Prilog XI.:	Određivanje hlapivih halogeniranih otapala u maslinovom ulju
Prilog XII.:	Postupak međunarodnog vijeća za masline za organoleptičku ocjenjivanje djevičanskog maslinova ulja

▼ M20**▼ M19****▼ B**

Prilog XV.:	Sadržaj ulja u komini maslina
Prilog XVI.:	Određivanje jodnog broja
Prilog XVII.:	Metoda za određivanje stigmastadiena u biljnim uljima
Prilog XVIII.:	Određivanje razlike između stvarne i teoretske količine triacilglicerola s ecn 42
Prilog XIX.:	► <u>M28</u> Određivanje sadržaja alifatskih i triterpenskih alkohola kapilarnom plinskom kromatografijom ◀

▼ M23

Prilog XX.:	Metoda određivanja udjela voskova, metil estera masnih kiselina i etil estera masnih kiselina kapilarnom plinskom kromatografijom
-------------	---

▼ M28**▼ M25**

Prilog XXI.:	Rezultati provjera sukladnosti provedenih na maslinovim uljima iz članka 8. stavka 2.
--------------	---

PRILOG I.

SVOJSTVA MASLINOVA ULJA

Kategorija	Etilni esteri masnih kiselina (FAEE) (*)	Kiselost (%) (*)	Peroksidni broj mEq O ₂ /kg (*)	Voskovi mg/kg (**)	2-gliceril monopalmitat (%)	Stigmastadieni mg/kg (1)	Razlika: ECN42 (HPLC) i ECN42 (teoretski izračun)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ ili K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptičko ocjenjivanje Medijan mana (Mm) (*)	Organoleptičko ocjenjivanje Medijan vočnosti (Mv) (*)
1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje	FAEE ≤ 40 mg/kg (godina usjeva 2013.–2014.) (2) FAEE ≤ 35 mg/kg (godina usjeva 2014.–2016.) FAEE ≤ 30 mg/kg (godine usjeva nakon 2016.)	≤ 0,8	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9 ako je ukupni % palmitske kiseline ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Mm = 0	Mv > 0
					≤ 1,0 ako je ukupni % palmitske kiseline > 14 %							
2. Djevičansko maslinovo ulje	—	≤ 2,0	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9 ako je ukupni % palmitske kiseline ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Mm ≤ 3,5	Mv > 0
					≤ 1,0 ako je ukupni % palmitske kiseline > 14 %							

▼ M27

Kategorija	Etilni esteri masnih kiselina (FAEE) (*)	Kiselost (%) (*)	Peroksidni broj mEq O ₂ /kg (*)	Voskovi mg/kg (**)	2-gliceril monopalmitat (%)	Stigmastadieni mg/kg (1)	Razlika: ECN42 (HPLC) i ECN42 (teoretski izračun)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ ili K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptičko ocjenjivanje Medijan mana (Mm) (*)	Organoleptičko ocjenjivanje Medijan vočnosti (Mv) (*)
3. Maslinovo ulje lampante	—	> 2,0	—	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 300 (3)	≤ 0,9 ako je ukupni % palmitske kiseline ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Mm > 3,5 (4)	—
					≤ 1,1 ako je ukupni % palmitske kiseline > 14 %							
4. Rafinirano maslinovo ulje	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9 ako je ukupni % palmitske kiseline ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1 ako je ukupni % palmitske kiseline > 14 %							
5. Maslinovo ulje koje se sastoji od rafiniranih i djevičanskih maslinovih ulja	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9 ako je ukupni % palmitske kiseline ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0 ako je ukupni % palmitske kiseline > 14 %							

▼ M27

Kategorija	Etilni esteri masnih kiselina (FAEE) (*)	Kiselost (%) (*)	Peroksidni broj mEq O ₂ /kg (*)	Voskovi mg/kg (**)	2-gliceril monopalmitat (%)	Stigmastadieni mg/kg (1)	Razlika: ECN42 (HPLC) i ECN42 (teoretski izračun)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ ili K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptičko ocjenjivanje Medijan mana (Mm) (*)	Organoleptičko ocjenjivanje Medijan vočnosti (Mv) (*)
6. Sirovo ulje komine maslina	—	—	—	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350 (5)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Rafinirano ulje komine maslina	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Ulje komine maslina	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Ukupni izomeri koji bi se mogli (ili ne) odijeliti kapilarnom kolonom.

(2) Ovo se ograničenje primjenjuje na maslinova ulja proizvedena od 1. ožujka 2014.

(3) Ulja s udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se maslinovim uljima lampante ako je ukupni udjel alifatskih alkohola manji od ili jednak 350 mg/kg ili ako je udjel eritrodiole i uvaole manji od ili jednak 3,5 %.

(4) Medijan mana može biti manji od ili jednak 3,5, a medijan vočnosti jednak 0.

(5) Ulja s udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se sirovim uljima komine maslina ako je ukupni udjel alifatskih alkohola iznad 350 mg/kg i ako je udjel eritrodiole i uvaole veći od 3,5 %.

▼ M27

Kategorija	Sastav masnih kiselina ⁽¹⁾						Ukupni transoleinski izomeri (%)	Ukupni translinolni i translinolenski izomeri (%)	Sastav sterola						Ukupni steroli (mg/kg)	Eritrodiol i uvaol (%) (**)
	Miristinska (%)	Linolenska (%)	Arahinska (%)	Eikozenska (%)	Behenska (%)	Lignocerinska (%)			Kolesterol (%)	Brasikosterol (%)	Kampesterol ⁽²⁾ (%)	Stigmasterol (%)	App β-sitosterol ⁽³⁾ (%) (**)	Delta-7-stigmasterol ⁽²⁾ (%)		
1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje	≤ 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. Djevičansko maslinovo ulje	≤ 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. Maslinovo ulje lampante	≤ 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. Rafinirano maslinovo ulje	≤ 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
5. Maslinovo ulje koje se sastoji od rafiniranih i djevičanskih maslinovih ulja	≤ 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. Sirovo ulje komine maslina	≤ 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. Rafinirano ulje komine maslina	≤ 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

▼ M27

Kategorija	Sastav masnih kiselina ⁽¹⁾						Ukupni transoleinski izomeri (%)	Ukupni translinolni i translinolenski izomeri (%)	Sastav sterola						Ukupni steroli (mg/kg)	Eritrodiol i uvaol (%) (**)
	Miristinska (%)	Linolenska (%)	Arahinska (%)	Eikozenska (%)	Behenska (%)	Lignocerinska (%)			Kolesterol (%)	Brasikosterol (%)	Kampesterol ⁽²⁾ (%)	Stigmasterol (%)	App β-sitosterol ⁽³⁾ (%) (**)	Delta-7-stigmasterol ⁽²⁾ (%)		
8. Ulje komine maslina	≤ 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⁾ Udjel drugih masnih kiselina (%): palmitinska: 7,50-20,00; palmitoleinska: 0,30-3,50; heptadekanska: ≤ 0,30; heptadecanska: ≤ 0,30; stearinska: 0,50-5,00; oleinska: 55,00-83,00; linolna: 2,50-21,00.

⁽²⁾ Vidjeti Dodatak ovom Prilogu.

⁽³⁾ App β-sitosterol: Delta-5,23-stigmastadienol + klerosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-stigmastadienol.

⁽⁴⁾ Ulja s udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se maslinovim uljima lampante ako je ukupni udjel alifatskih alkohola manji od ili jednak 350 mg/kg ili ako je udjel eritrodiola i uvaola manji od ili jednak 3,5 %.

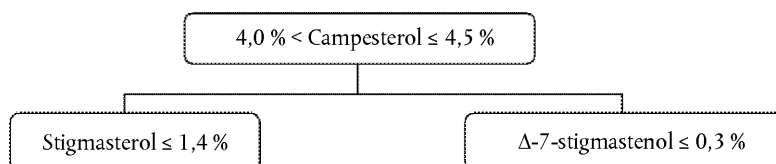
⁽⁵⁾ Ulja s udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se sirovim uljima komine maslina ako je ukupni udjel alifatskih alkohola iznad 350 mg/kg i ako je udjel eritrodiola i uvaola veći od 3,5 %.

Napomene:

- (a) Rezultati analiza moraju biti izraženi onim brojem decimalnih mjesta kojim je izražena granična vrijednost za pojedino svojstvo. Posljednja se znamenka mora uvećati za jednu jedinicu ako je znamenka koja slijedi veća od 4.
- (b) Ako najmanje jedno od svojstava ne odgovara navedenim vrijednostima, za svrhu ove Uredbe kategorija ulja može se promijeniti ili se ulje može deklarirati kao onečišćeno.
- (c) Ako je svojstvo koje se odnosi na kvalitetu ulja označeno jednom zvjezdicom (*), time se podrazumijeva sljedeće: – kod maslinova ulja lampante moguće je da se istodobno oba navedena ograničenja razlikuju od navedenih vrijednosti, – kod djevičanskih maslinovih ulja, ako se najmanje jedno od tih ograničenja razlikuje od navedenih vrijednosti, kategorija se ulja mijenja, iako se i dalje svrstava u jednu od kategorija djevičanskih maslinovih ulja.
- (d) Ako je svojstvo označeno s dvije zvjezdice (**), to znači da je za sve tipove ulja komine maslina moguće da se istodobno oba navedena ograničenja razlikuju od navedenih vrijednosti.

▼ **M27***Dodatak***SHEMA ODLUČIVANJA**

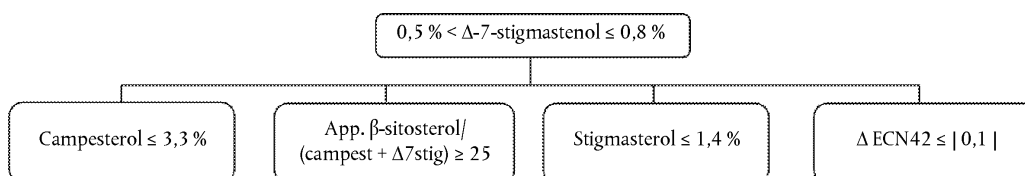
Schema odlučivanja povezana s **kampesterolom** za djevičanska i ekstra djevičanska maslinova ulja:



Drugi parametri moraju biti u skladu s ograničenjima utvrđenima u ovoj Uredbi.

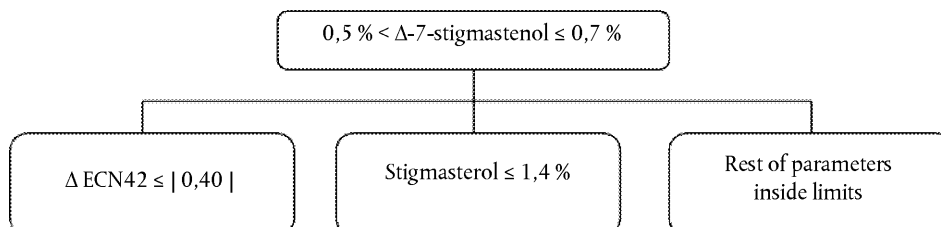
Schema odlučivanja povezana s **delta-7-stigmasterolom** za:

— ekstra djevičanska i djevičanska maslinova ulja



Drugi parametri moraju biti u skladu s ograničenjima utvrđenima u ovoj Uredbi.

— ulja komine maslina (sirova i rafinirana)



▼ **M26***PRILOG I.a***UZORKOVANJE ULJA OD PLODA ILI KOMINE MASLINA KOJE SE DOSTAVLJA U UNUTARNJEM PAKIRANJU**

Ova metoda uzorkovanja primjenjuje se na serije ulja od ploda ili komine maslina u unutarnjem pakiranju. Primjenjuju se različite metode uzorkovanja, ovisno o tome prelazi li unutarnje pakiranje 5 litara ili ne.

„Serija” označava niz prodajnih jedinica koje se proizvode, izrađuju i pakiraju u uvjetima koji omogućuju da se ulje koje se nalazi u svakoj prodajnoj jedinici smatra homogenim u smislu svih analitičkih osobina. Individuacija serije mora biti u skladu s Direktivom 2011/91/EU Europskog parlamenta i Vijeća ⁽¹⁾.

„Dodana količina” označava količinu ulja koja se nalazi u unutarnjem pakiranju i koja je uzeta s nasumično odabranog mjesta serije.

1. SADRŽAJ PRIMARNOG UZORKA**1.1. Unutarnje pakiranje koje ne prelazi 5 litara**

„Primarni uzorak” za unutarnje pakiranje koje ne prelazi 5 litara označava broj dodanih količina uzetih iz serije i u skladu s Tablicom 1.

*Tablica 1.***Najmanja veličina primarnog uzorka mora sadržavati sljedeće**

Kada unutarnje pakiranje ima zapreminu	Primarni se uzorak mora sastojati od ulja od
(a) 1 litre ili više	(a) 1-og unutarnjeg pakiranja;
(b) manje od 1 litre	(b) najmanjeg broja pakiranja ukupne zapremine ne manje od 1,0 litre

Broj pakiranja iz Tablice 1. koji predstavlja unutarnje pakiranje može povećavati svaka država članica prema svojim vlastitim potrebama (na primjer, za organoleptičku ocjenu u laboratorijima različitim od onih koji su proveli kemijsku analizu, ponovnu analizu, itd.).

1.2. Unutarnje pakiranje koje prelazi 5 litara

„Primarni uzorak” za unutarnje pakiranje koje prelazi 5 litara označava reprezentativni dio ukupnih dodanih količina dobivenih postupkom smanjenja i u skladu s Tablicom 2. Primarni se uzorak mora sastojati od različitih primjera.

„Primjerak” primarnog uzorka označava svaki paket koji čini primarni uzorak.

*Tablica 2.***Minimalni broj dodanih količina koje se uzimaju**

Broj pakiranja u seriji	Minimalni broj dodanih količina koje se uzimaju
Do 10	1
Od ... 11 do 150	2

⁽¹⁾ Direktiva 2011/91/EU Europskog parlamenta i Vijeća od 13. prosinca 2011. o oznakama ili znakovima koji određuju seriju kojoj hrana pripada (SL L 334, 16.12.2011., str. 1.).

▼ **M26**

Broj pakiranja u seriji	Minimalni broj dodanih količina koje se uzimaju
Od ... 151 do 500	3
Od ... 501 do 1 500	4
Od ... 1 501 do 2 500	5
> 2 500 na 1 000 pakiranja	1 rezervna dodana količina

Kako bi se smanjio volumen uzorkovanja unutarnjih pakiranja, za pripremu primarnog uzorka homogenizira se sadržaj dodanih količina za uzorkovanje. Kako bi se najbolje zaštitili od zraka, dijelovi različitih dodanih količina miješanjem se ulijevaju u zajednički spremnik za njihovu homogenizaciju.

Sadržaj primarnog uzorka mora se uliti u niz pakiranja najmanje zapremnine 1,0 l od kojih svaki predstavlja primjer primarnog uzorka.

Broj primarnih uzoraka može povećati svaka država članice prema svojim vlastitim potrebama (na primjer, za organoleptičku procjenu u laboratorijima različitima od onih koji su proveli kemijsku analizu, ponovno analizu, itd.).

Svako pakiranje puni se tako da se sloj zraka na vrhu svede na najmanju moguću mjeru i zatim se primjereno zatvori i zapečati kako bi se osiguralo da se proizvod ne može mijenjati.

Ti se primjeri moraju označavati kako bi se omogućila ispravna identifikacija.

2. ANALIZE I REZULTATI

2.1. Svaki primarni uzorak mora se podijeliti na laboratorijske uzorke, u skladu s točkom 2.5. norme EN ISO 5555, i analizirati prema redosljedu prikazanom u shemi odlučivanja iz Priloga I.b ili bilo kojim drugim nasumičnim redosljedom.

2.2. Kad svi rezultati analize odgovaraju svojstvima deklarirane kategorije ulja, čitava se serija proglašava odgovarajućom.

Ako samo jedan rezultat analize ne odgovara svojstvima deklarirane kategorije ulja, čitava se serija proglašava neodgovarajućom

3. PROVJERA KATEGORIJE SERIJE

3.1. Kako bi se provjerila kategorija serije, nadležno tijelo može povećati broj primarnih uzoraka uzetih s različitih mjesta serije u skladu sa sljedećom tablicom:

Tablica 3.

Broj primarnih uzoraka određenih veličinom serije

Veličina serije (litre)	Broj primarnih uzoraka
manje od 7 500	2
Od 7 500 do manje od 25 000	3
Od 25 000 do manje od 75 000	4
Od 75 000 do manje od 125 000	5
Jednako i više od 125 000	6 + 1 za svakih dodatnih 50 000 litara

▼M26

Svaka dodana količinakojia predstavlja primarni uzorak mora se uzeti s neprekinutog mjesta u seriji; potrebno je zabilježiti položaj svakog primarnog uzorka i nedvosmisleno ga identificirati.

Stvaranje svakog primarnog uzorka mora se provesti u skladu s postupcima iz točaka 1.1. i 1.2.

Svaki primarni uzorak zatim podliježe analizi iz članka 2. stavka 1.

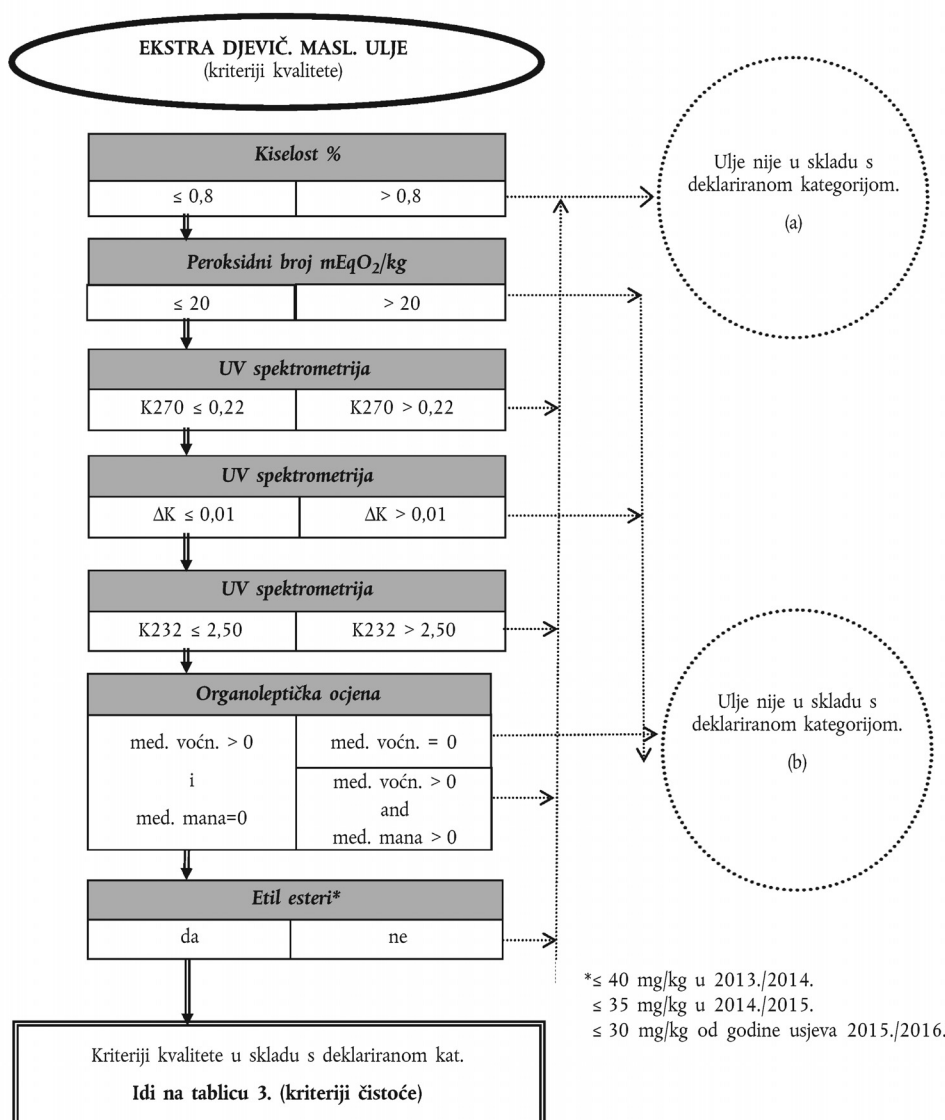
- 3.2. Ako jedan od rezultata analize iz članka 2. stavka 1. najmanje jednog primarnog uzorka nije u skladu sa svojstvima deklarirane kategorije ulja, čitava se serija za uzorkovanje proglašava neodgovarajućom.

▼ **M26**

PRILOG I.b

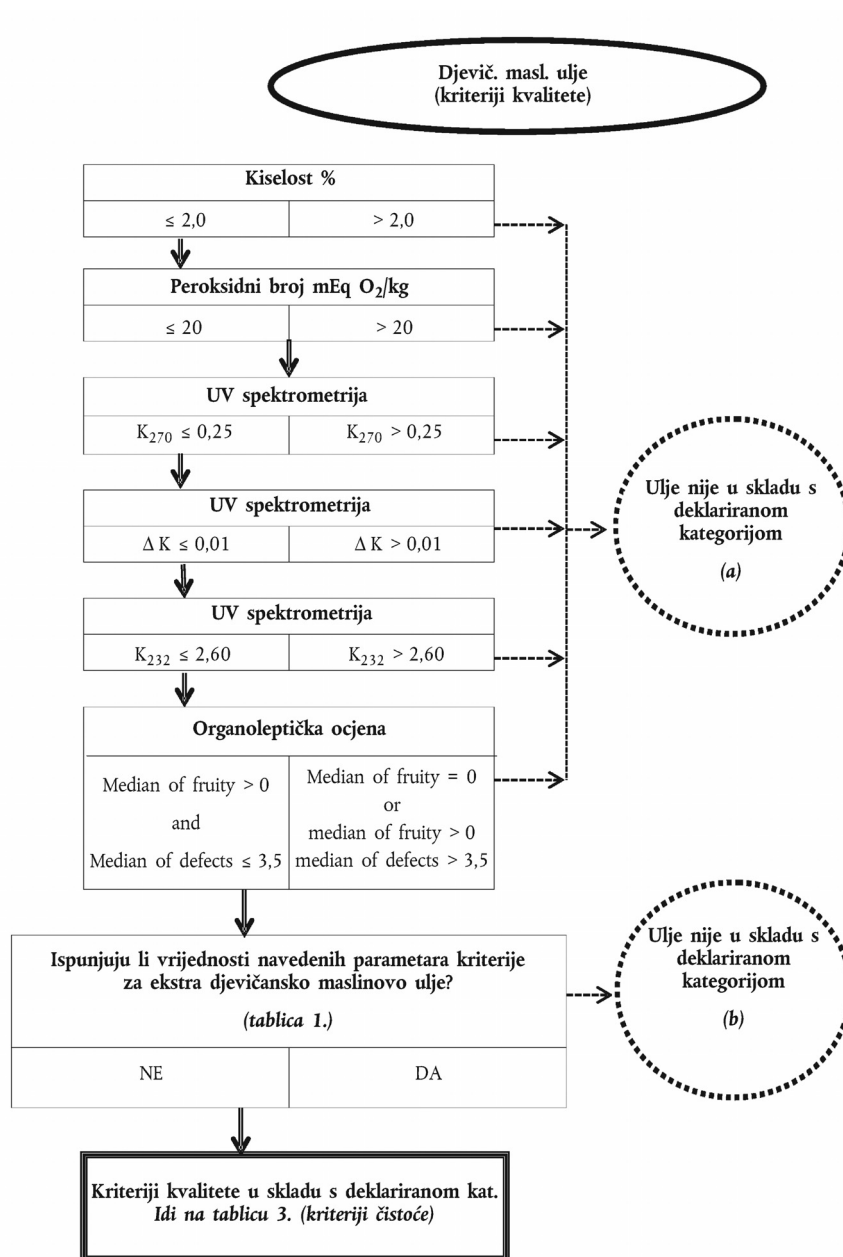
**HEMA ODLUČIVANJA ZA PROVJERU USKLAĐENOSTI UZORKA MASLINOVA
ULJA SA DEKLARIRANOM KATEGORIJOM**

Tablica 1.



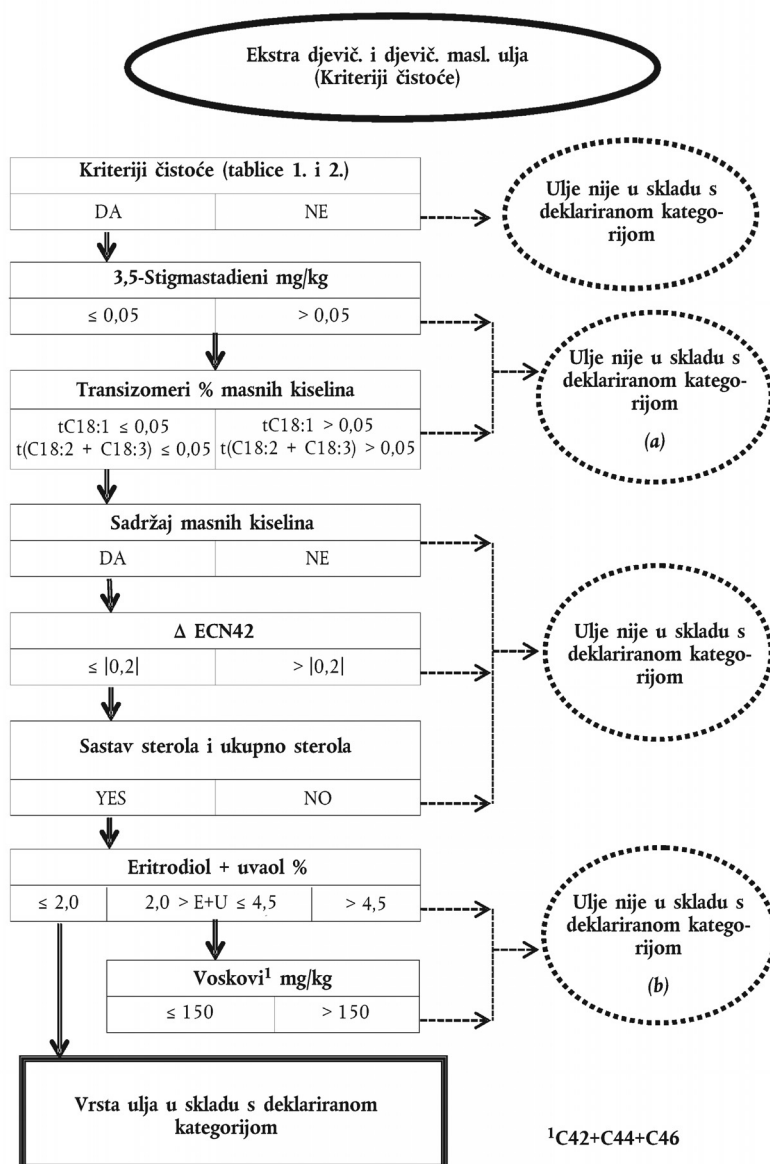
▼ M26

Tablica 2.



▼ **M26**

Tablica 3.



▼ **M26***Dodatak 1.***Tablica podudarnosti između priloga ove Uredbe i analiza navedenih u shemi odlučivanja**

— Kiselost	Prilog II.	Određivanje slobodnih masnih kiselina, hladna metoda
— Peroksidni broj	Prilog III.	Određivanje peroksidnog broja
— UV spektrometrija	Prilog IX.	Spektrofotometrijska analiza
— Organoleptičko ocjenjivanje	Prilog XII.	Organoleptičko ocjenjivanje djevičanskog maslinova ulja
— Etil esteri	Prilog XX.	Metoda određivanja sadržaja voskova, metil estera masnih kiselina i etil estera masnih kiselina kapilarnom plinskom kromatografijom
— 3,5-stigmastadieni	PRILOG XVII.	Metoda za određivanje stigmastadiena u biljnim uljima
▼ M28		
— Trans-izomeri masnih kiselina	Prilog X.	Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom
— Sadržaj masnih kiselina	Prilog X.	Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom
▼ M26		
— ΔECN42	Prilog XVIII.	Određivanje sastava triglicerida s ECN42 (razlika između podataka HPLC-a i teoretskog sadržaja)
— Sastav sterola i ukupni steroli	Prilog V.	Određivanje sastava i sadržaja sterola i triterpenskog dialkohola kapilarnom plinskom kromatografijom
— Eritriol i uvaol		
— Voskovi	Prilog IV.	Određivanje sadržaja voska kapilarnom plinskom kromatografijom
▼ M28		
— Alifatski i triterpenski alkoholi	Prilog XIX.	Određivanje sadržaja alifatskih i triterpenskog alkohola kapilarnom plinskom kromatografijom
▼ M26		
— Zasićene masne kiseline u položaju 2.	Prilog VII.	Determination of the percentage of 2-glycerol monopalmitate

▼ **M29***PRILOG II.***ODREĐIVANJE SLOBODNIH MASNIH KISELINA, HLADNA METODA**

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Ovom metodom opisuje se određivanje slobodnih masnih kiselina u maslinovim uljima i uljima komine. Sadržaj slobodnih masnih kiselina iskazuje se kao kiselost izračunata kao postotak oleinske kiseline.

2. PRINCIP

Uzorak se otopi u mješavini otapala i postojeće se slobodne masne kiseline odrede titracijom s otopinom kalijevog hidroksida ili natrijevog hidroksida.

3. REAGENSI

Svi reagensi trebaju biti priznate analitičke kvalitete, a voda koja se upotrebljava treba biti destilirana ili odgovarajuće čistoće.

3.1. Dietil eter; 95 % etanol (V/V), mješavina dijelova jednakih po volumenu.

Neutralizirati točno u trenutku upotrebe otopine kalijevog hidroksida (3.2.) uz dodatak 0,3 ml otopine fenolftaleina (3.3.) na 100 ml mješavine.

Bilješka 1.: Dietil eter visoko je zapaljiv i može stvoriti eksplozivne perokside. Prilikom njegove upotrebe treba biti posebno pažljiv.

Bilješka 2.: Ako nije moguće upotrijebiti dietil eter, može se upotrijebiti mješavina otapala koja sadržava etanol i toluen. Ako je potrebno, etanol se može zamijeniti 2-propanolom.

3.2. Kalijev hidroksid ili natrijev hidroksid, titrirana etanolna ili vodena otopina, $c(\text{KOH})$ [ili $c(\text{NaOH})$] približno 0,1 mol/l ili, ako je potrebno, $c(\text{KOH})$ [ili $c(\text{NaOH})$] približno 0,5 mol/l. Na raspolaganju su otopine dostupne na tržištu.

Neposredno prije upotrebe treba biti poznata i provjerena točna koncentracija otopine kalijevog hidroksida (ili otopine natrijevog hidroksida). Treba upotrijebiti otopinu koja je pripremljena najmanje pet dana prije upotrebe i dekantirana u smeđe staklene boce s gumenim čepom. Otopina treba biti bezbojna ili boje slame.

Ako se pri upotrebi vodene otopine kalijevog hidroksida (ili natrijevog hidroksida) uoči fazno razdvajanje, vodenu otopinu treba zamijeniti otopinom u etanolu.

Bilješka 3.: Stabilna bezbojna otopina kalijevog hidroksida (ili natrijevog hidroksida) može se pripremiti na sljedeći način: zavrite 1 000 ml etanola ili vode s 8 g kalijevog hidroksida (ili natrijevog hidroksida) i 0,5 g aluminijskih strugotina i pustite da vrije pod povratnim hladilom sat vremena. Odmah destilirajte. Otopite potrebnu količinu kalijevog hidroksida (ili natrijevog hidroksida) u destilatu. Pustite da odstoji nekoliko dana i zatim dekantirajte kako biste odvojili bistru, supernatantnu tekućinu od nataloženog kalijevog karbonata (ili natrijevog karbonata).

Otopina se može pripremiti i bez destiliranja, na sljedeći način: na 1 000 ml etanola (ili vode) dodajte 4 ml aluminijevog butilata i pustite mješavinu da odstoji nekoliko dana. Dekantiranjem odvojite supernatantnu tekućinu i u njoj otopite potrebnu količinu kalijevog hidroksida (ili natrijevog hidroksida). Otopina je spremna za upotrebu.

▼ M29

3.3. Otopina 10 g/l fenolftaleina u 95 do 96 % etanolu (v/v) ili otopina 20 g/l alkalnog modrila 6B ili timolftaleina u 95 do 96 % etanolu (v/v). U slučaju snažnih obojenih ulja upotrebljavaju se alkalno modrilo ili timolftalein.

4. OPREMA

Uobičajena laboratorijska oprema, koja uključuje:

4.1. analitičku vagu;

4.2. Erlenmeyerovu tikvicu volumena 250 ml;

4.3. graduiranu biretu volumena 10 ml, razreda A, s podjelom po 0,05 ml ili odgovarajuću automatsku biretu.

5. POSTUPAK

5.1. Priprema uzorka za ispitivanje

Ako je uzorak mutan, potrebno ga je filtrirati.

5.2. Uzorak za ispitivanje

Uzorak treba odabrati ovisno o pretpostavljenoj kiselosti u skladu sa sljedećom tablicom:

Očekivana kiselost (oleinska kiselost g/100g)	Masa uzorka (g)	Preciznost vaganja (g)
0 do 2	10	0,02
> 2 do 7,5	2,5	0,01
> 7,5	0,5	0,001

Uzorak treba odvagati u Erlenmeyerovoj tikvici (4.2.).

5.3. Određivanje

Uzorak (5.2.) treba otopiti u 50 do 100 ml prethodno neutralizirane mješavine dietil etera i etanola (3.1.).

Titrirati uz miješanje 0,1 mol/l otopinom kalijevog hidroksida (ili natrijevog hidroksida) (3.2.) (vidjeti bilješku 4.) dok se ne promijeni boja indikatora (boja obojanog indikatora treba biti postojana najmanje 10 sekundi).

Bilješka 4.: Ako potrebna količina otopine kalijevog hidroksida (ili natrijevog hidroksida) od 0,1 mol/l bude veća od 10 ml, treba upotrebljavati otopinu od 0,5 mol/l ili promijeniti masu uzorka u skladu s očekivanom kiselosti i predloženom tablicom.

Bilješka 5.: Ako otopina tijekom titriranja postane mutna, treba dodati dovoljno otapala (3.1.) da bi se dobila bistra otopina.

Provedite drugo određivanje samo ako je prvi rezultat viši od utvrđenog ograničenja za kategoriju ulja.

▼ M29

6. ISKAZIVANJE REZULTATA

Kiselost izražena u težinskim postocima oleinske kiseline jednaka je:

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

pri čemu je:

V = volumen otopine kalijevog hidroksida (ili natrijevog hidroksida) utrošen za titiranje, u mililitrima;

c = točna koncentracija u mol po litri upotrebjene otopine kalijevog hidroksida (ili natrijevog hidroksida) za titiranje;

M = 282 g/mol, molarna masa u gramima po molu oleinske kiseline;

m = masa uzorka u gramima.

Oleinska kiselost iskazuje se kako slijedi:

- (a) do dva decimalna mjesta za vrijednosti od 0 do uključivo 1;
- (b) do jednog decimalnog mjesta za vrijednosti od 1 do uključivo 100.



PRILOG III.

ODREĐIVANJE PEROKSIDNOG BROJA

1. OPSEG

Ova norma opisuje metodu za određivanje peroksidnog broja ulja i masti.

2. PODRUČJE PRIMJENE

Ova norma primjenjuje se na ulja i masti životinjskog i biljnog podrijetla.

3. DEFINICIJA

Peroksidni broj je količina onih tvari u uzorku, iskazanih u obliku miliekvivalenata aktivnog kisika na kilogram, koji pod opisanim radnim uvjetima oksidiraju kalijev jodid.

4. PRINCIP

Reakcija ispitivanog dijela uzorka u otopini octene kiseline i kloroforma s otopinom kalijevog jodida. Titriranje oslobođenog joda standardiziranom otopinom natrijevog tiosulfata.

5. OPREMA

Sva oprema koja se koristi ne smije sadržavati tvari koje uzrokuju redukciju ili oksidaciju.

Bilješka: Površinu podloge ne zamastiti.

5.1. Staklena odmjerna posudica volumena 3 ml.

5.2. Tikvice s užim grlom i čepom, volumena približno 250 ml, prethodno osušene i ispunjene čistim, suhim, inertnim plinom (dušikom ili, još bolje, ugljičnim dioksidom).

5.3. Graduirana bireta volumena 25 ili 50 ml, s podjelom po 0,1 ml.

6. REAGENSI

6.1. Kloroform, kvalitete analitičkog reagensa, očišćen od kisika propuhivanjem strujom čistog, suhog inertnog plina.

6.2. Ledena octena kiselina, kvalitete analitičkog reagensa, očišćena od kisika propuhivanjem strujom čistog, suhog inertnog plina.

6.3. Kalijev jodid, zasićena vodena otopina, svježe pripremljena, bez joda i jodata.

6.4. Precizno standardizirana vodena otopina natrijevog tiosulfata 0,01 ili 0,002 mol/l, standardizirana neposredno prije korištenja.

6.5. Škrobna otopina, vodena otopina 10 g/l, svježe pripremljena korištenjem prirodnog topivog škroba.

7. UZORAK

Treba paziti da uzeti uzorak bude pohranjen na tamnom i hladnom mjestu u potpuno ispunjenim staklenim posudama, hermetički zatvorenima staklenim ili plutenim čepovima.

▼B

8. POSTUPAK

Ispitivanje treba provesti pri difuznom dnevnom svjetlu ili pod umjetnim svjetlom. U staklenoj odmjernoj posudici (5.1.), ili, ako to ne uspije, u tikvici (5.2.), treba izvagati masu uzorka s preciznošću od 0,001 g, u skladu sa sljedećom tablicom, u skladu s očekivanim peroksidnim brojem:

Očekivani peroksidni broj (meq)	Težina ispitivanog dijela uzorka (g)
0 do 12	5,0 do 2,0
12 do 20	2,0 do 1,2
20 do 30	1,2 do 0,8
30 do 50	0,8 do 0,5
50 do 90	0,5 do 0,3

Tikvicu (5.2.) treba odčepiti i u nju staviti staklenu odmjernu posudicu koja sadrži ispitivani dio uzorka. Dodati 10 ml kloroforma (6.1.). Miješanjem brzo otopiti uzorak. Dodati 15 ml octene kiseline (6.2.), zatim 1 ml otopine kalijevog jodida (6.3.). Brzo začepiti, protresti jednu minutu i odložiti da odleži točno pet minuta na tamnom mjestu i na temperaturi između 15 i 25 °C.

Dodati približno 75 ml destilirane vode. Titirati oslobođeni jod otopinom natrijevog tiosulfata (6.4.) (otopina 0,002 mol/l za očekivane vrijednosti niže od 12 i otopina 0,01 mol/l za očekivane vrijednosti više od 12), snažnim protresanjem uz korištenje škrobne otopine (6.5.) kao indikatora.

Treba provesti dva određivanja na istom uzorku.

Istodobno treba provesti slijepu probu. Ako rezultat slijepa probe prelazi 0,05 ml 0,01 mol/l otopine natrijevog tiosulfata (6.4.), treba zamijeniti onečišćeni reagens.

9. ISKAZIVANJE REZULTATA

Peroksidni broj (PB) iskazan u miliekvivalentima aktivnog kisika na kilogram dan je sljedećom formulom:

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

pri čemu je:

V = volumen standardizirane otopine natrijevog tiosulfata (6.4.) utrošen za ispitivanje, iskazan u mililitrima, ispravljen rezultatom za slijepu probu;

T = točna molarnost korištene otopine natrijevog tiosulfata (6.4.);

m = masa ispitivanog dijela uzorka u gramima.

Kao rezultat treba uzeti aritmetički prosjek dvaju provedenih određivanja.

▼ **M21***PRILOG IV.***ODREĐIVANJE SADRŽAJA VOSKA KAPILARNOM PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM**

1. PREDMET

Ova metoda opisuje postupak za određivanje sadržaja voska u maslinovim uljima. Voskovi se odvajaju prema broju njihovih atoma ugljika. Metoda se posebno može koristiti za razlikovanje maslinovog ulja dobivenog prešanjem i onog dobivenog ekstrakcijom (ulje komine maslina).

2. PRINCIP

Dodaje se odgovarajući interni standard masti ili ulju, potom frakcioniramo pomoću kromatografije na hidratiziranoj koloni od silikagela. Frakcija koja je u početku eluirana u uvjetima testiranja, (čija je polarnost slabija od polarnosti triglicerida), vraća se i neposredno analizira kapilarnom plinskom kromatografijom.

3. OPREMA

3.1 Erlenmeyerova tikvica volumena 25 ml.

3.2 Staklena kolona za plinsku kromatografiju, unutarnjeg promjer 15,0 mm, dužine 30 do 40 cm, s pipcem.

3.3 Odgovarajući plinski kromatograf s kapilarnom kolonom, opremljen sustavom za neposredno uvođenje u kolonu koji se sastoji od sljedećeg:

3.3.1. Termostatska komora za kolone, opremljena regulatorom temperature.

3.3.2. Hladni injektor za izravno unošenje u kolonu.

3.3.3. Plameno-ionizacijski detektor i pretvarač s pojačalom.

3.3.4. Snimač-integrator kompatibilan s pretvaračem s pojačalom (3.3.3.), s vremenom reakcije koje nije dulje od jedne sekunde i s varijabilnom brzinom papira. (Također je moguće koristiti kompjutorizirane sustave koji omogućavaju dobivanje podataka o plinskoj kromatografiji putem osobnog računala.)

3.3.5. Staklena ili kvarcna kapilarna kolona dužine 8 do 12 m, unutarnjeg promjera od 0,25 do 0,32 mm, s tekućom fazom, s ujednačenom debljinom filma između 0,10 i 0,30 μm . (Na tržištu su dostupne tekuće faze pogodne za tu svrhu tipa SE-52 ili SE-54.)

3.4. Mikroštrcaljka za izravno unošenje u kolonu volumena 10 μl s čvrsto fiksanom iglom.

3.5. Električna tresilica.

3.6. Rotirajući isparivač.

3.7. Visokotemperaturna peć.

3.8. Analitička vaga sa zajamčenom preciznošću od $\pm 0,1$ mg.

3.9. Uobičajeno laboratorijsko stakleno suđe.

4. REAGENSI

4.1. Silikagel veličine zrna između 60 i 200 μm .

Silikagel staviti na četiri sata u peć na 500 °C. Nakon hlađenja, dodati 2 % vode u odnosu na količinu uzorkovanog silikagela. Dobro protresti da se suspenzija homogenizira. Čuvati na tamnom mjestu najmanje 12 sati prije uporabe.

▼ M21

- 4.2. n-heksan, za kromatografiju.
- 4.3. dietilni eter, za kromatografiju.
- 4.4. n-heptan, za kromatografiju.
- 4.5. Standardna otopina lauril arahidata koncentracije 0,1 % (m/v) u heksanu (interni standard). (Moguće je koristiti palmitil palmitat ili miristol stearat.)

4.5.1. *Sudan 1 (1-fenil-azo-2-naftol).*

- 4.6. Plin nosač: vodik ili helij, plinsko-kromatografska čistoća.

- 4.7. Pomoćni plinovi:

— vodik, čistoće za plinsku kromatografiju,

— zrak, čistoće za plinsku kromatografiju.

5. POSTUPAK

5.1. **Priprema kromatografske kolone.**

Otopiti 15 g silikagela (4.1.) u n-heksanu (4.2.) i unijeti u kolonu (3.2.). Ostaviti da se samo slegne. Dovršiti taloženje pomoću električne tresilice (3.5.) kako bi se postigao što ujednačeniji kromatografski sloj. Propustiti 30 ml n-heksana kako bi se odstranile sve eventualne nečistoće. Korištenjem vage (3.8.) odvagati točno 500 mg uzorka u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 25 ml (3.1.), dodati odgovarajuću količinu internog standarda (4.5.), ovisno o pretpostavljenom sadržaju voska. Na primjer, dodati 0,1 mg lauril arahidata za maslinovo ulje i 0,25 do 0,5 mg za ulje komine maslina. Prenijeti pripremljen uzorak na kromatografsku kolonu pomoću dva puta po 2 ml n-heksana (4.2.).

Otapalo ispuštati dok ne dostigne 1 mm iznad gornje razine absorbenta, potom filtrirati daljnjih 70 ml n-heksana kako bi se uklonili prirodno prisutni n-alkani. Potom započeti kromatografsko eluiranje sakupljanjem 180 ml mješavine n-heksana/dietilnog etera (omjer 99:1), pri brzini protoka od oko 15 kapi svakih 10 sekundi. Eluiranje uzorka se izvodi na sobnoj temperaturi pri 22 ± 4 °C.

BILJEŠKA: — Mješavina n-heksana/dietilnog etera, (99:1), priprema se svakodnevno.

— Za vizualnu provjeru ispravnog eluiranja voskova, može se dodati 100 µm 1 % sudana iz elucijske mješavine u uzorak u otopini. S obzirom da bojilo ima retenciju između voskova i triglicerida, kad obojenje dostigne dno kolone, elucijsku otopinu treba otopiti jer će tada svi voskovi biti eluirani.

Osušiti tako dobivenu frakciju u rotirajućem isparivaču (3.6.) dok se ne ukloni gotovo svo otapalo. Ukloniti preostala 2 ml otpala pomoću slabe struje dušika; potom dodati 2-4 ml n-heptana.

5.2. **Analiza plinskom kromatografijom**5.2.1. *Pripremne radnje*

Postaviti kolonu na plinski kromatograf (3.3) spajajući ulazni otvor na sustav neposredno na koloni i izlazni otvor na detektor. Obaviti opću provjeru plinskog kromatografa (funkcioniranje protoka plina, učinkovitost detektora i snimača itd.).

▼ **M21**

Ako se kolona koristi po prvu put, potrebno ju je najprije kondicionirati. Pustiti da kroz kolonu proteče malo plina, potom uključiti plinski kromatograf. Postupno zagrijavati do dostizanja temperature od 350 °C nakon približno četiri sata. Održavati temperaturu najmanje dva sata te potom regulirati aparat na radne uvjete, (reguliranje protoka plina, paljenje plamena, spoj na elektronički snimač (3.3.4), prilagođavanje temperature peći za kolonu, prilagođavanje detektora itd.), i zapisati signal pri osjetljivosti koja je najmanje dvostruka od one koju zahtijeva analiza. Bazna linija mora biti linearna, bez pikova i bez bilo kakvih znakova otklona.

Negativan pravocrtni otklon ukazuje da spojevi kolone nisu dobro postavljeni; pozitivan otklon da kolona nije pravilno kondicionirana.

5.2.2. *Odabir radnih uvjeta*

Radni uvjeti su uglavnom sljedeći:

— temperatura kolone:

	20 °C/ minuti		5 °C/ minuti		20 °C/ minuti	
Inicijalno 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10')

— temperatura detektora: 350 °C,

— količina ubrizgane tvari: 1 µl otopine n-heptana (2-4ml),

— plin nosač: helij ili vodik pri ispravnoj linearnoj brzini za odabrani plin (vidjeti Dodatak),

— osjetljivost instrumenta: pogodno za sljedeće uvjete:

Uvjete se može modificirati u skladu s karakteristikama kolone i plinskog kromatografa kako bi se dobilo odvajanje svih voskova i zadovoljavajuća rezolucija pika, (vidjeti sliku); retencijsko vrijeme internog standarda C₃₂ mora biti 18 ± 3 minute. Najreprezentativniji pik voska mora biti najmanje 60 % pune skale.

Parametre za integraciju pikova potrebno je odrediti na takav način da se postigne ispravna procjena površine pikova koje se analizira.

BILJEŠKA: Zbog visoke konačne temperature, dopušten je pozitivan otklon od najviše 10 % pune skale.

5.3. **Provođenje analize**

Pomoću mikroštrcaljke volumena 10 µl unosi se 1 µl otopine; klip štrcaljke izvući dok se igla ne isprazni. Iglu uvesti u sustav za injektiranje i nakon 1-2 sekunde brzo injektirati; nakon otprilike pet sekundi, lagano izvući iglu.

Bilježiti sve dok voskovi nisu u potpunosti eluirani.

▼ M21

Bazna linija u svakom trenutku mora zadovoljavati tražene uvjete.

5.4. Identificiranje pikova

Pikovi se identificiraju pomoću retencijskih vremena uspoređivanjem s mješavinama voskova čije je retencijsko vrijeme poznato, a koji su analizirani u istim uvjetima.

Na slici je prikazan kromatogram voskova djevičanskog maslinovog ulja.

5.5. Ocjena količina

Pomoću integratora odrediti površine pikova koje odgovaraju internom standardu i alifatskim esterima od C₄₀ do C₄₆.

Izračunati sadržaj voska svakog pojedinog estera u mg/kg masti određujemo prema sljedećoj formuli: ester, mg/kg =

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

pri čemu je:

A_x = površina pika svakog estera, u kvadratnim milimetrima;

A_s = površina pika internog standarda, u kvadratnim milimetrima;

m_s = masa dodanog internog standarda, u miligramima;

m = masa uzorka za analizu, u gramima.

6. ISKAZIVANJE REZULTATA

Iskazati ukupan sadržaj različitih voskova C₄₀ do C₄₆ u mg/kg masti (ppm).

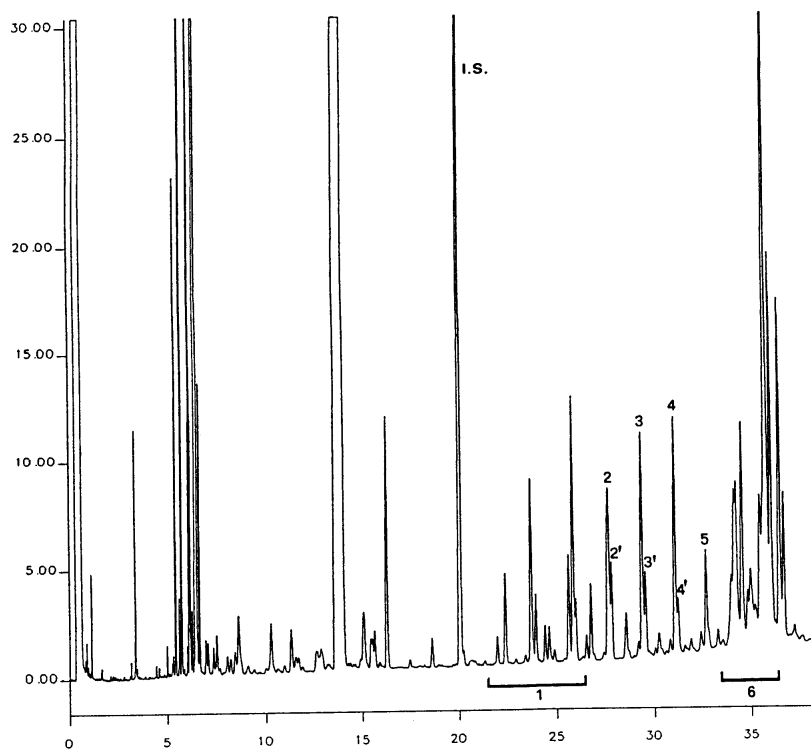
BILJEŠKA: Sastojci koje treba kvantificirati se odnose na pikove s brojevima parova ugljika između C₄₀ do C₄₆ estera, korištenjem primjera kromatograma voska maslinovog ulja prikazanog na donjoj slici. U slučaju da se C₄₆ ester pojavi dva puta, preporuča se da se za njegovu identifikaciju analizira frakcija voskova ulja komine maslina gdje je pik C₄₆ jednostavno identificirati jer je u očiglednoj većini.

Rezultati trebaju biti izraženi na jednu decimalu.

▼ M21

Slika

Kromatogram voskova maslinovog ulja (1)



Legenda:

- I.S. = Lauril arahidat
- 1. = Diterpenski esteri
- 2 + 2' = Esteri C₄₀
- 3 + 3' = Esteri C₄₂
- 4 + 4' = Esteri C₄₄
- 5. = Esteri C₄₆
- 6. = Sterolni esteri i triterpenski alkohol

(1) Nakon eluiranja sterolnih estera, linija kromatograma ne smije pokazivati nikakve znatne pikove (trigliceridi).

▼ M21*Dodatak***Određivanje linearne brzine plina**

U plinski kromatograf, postavljen na normalne radne uvjete, injektira se 1-3 μl metana (ili propana). Mjeri se vrijeme potrebno za protok plina kroz kolonu od trenutka injektiranja do pojave pika (t_M).

Linearna brzina u cm/s zadana je formulom L/t_M , pri čemu je L duljina kolone u cm, a t_M je vrijeme mjereno u sekundama.;

▼ **M26***PRILOG V.***ODREĐIVANJE SASTAVA I SADRŽAJA STEROLA I TRITERPENSKIH DIALKOHOLA KAPILARNOM PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM**

1. **PODRUČJE PRIMJENE**
U ovoj se metodi opisuje postupak određivanja udjela pojedinačnih i ukupnih sterola i triterpenskkih dialkohola u maslinovim uljima i uljima komine maslina.
2. **NAČELO**
Ulje s dodatkom α -kolestanola koji služi kao interni standard saponificira se otopinom kalijeveg hidroksida u etanolu i zatim se neosapunjiva tvar ekstrahira etil eterom.

Frakcija sterola i triterpenskkih dialkohola odjeljuje se od neosapunjivog ekstrakta tankoslojnom kromatografijom na osnovnoj silikagel ploči. Frakcije koje se dobiju sa silikagela pretvaraju se u trimetilsilil etera i zatim analiziraju kapilarnom plinskom kromatografijom.
3. **APARATURA**
Uobičajena laboratorijska oprema, a posebno sljedeće:
 - 3.1. Tikvica od 250 ml s povratnim hladilom i nastavcima od brušenog stakla.
 - 3.2. Lijevak za odjeljivanje od 500 ml.
 - 3.3. Tikvice od 250 ml.
 - 3.4. Cjeloviti instrument za analizu tankoslojnom kromatografijom, korištenjem staklenih ploča veličine 20 × 20 cm.
 - 3.5. Ultraljubičasta svjetiljka valne duljine 254 ili 366 nm.
 - 3.6. Mikroštrcaljke od 100 μ l i 500 μ l.
 - 3.7. Cilindrični lijevak za filtriranje s poroznom pločom G 3 (poroznost između 15 i 40 μ m) približnog promjera 2 cm i visine 5 cm, primjeren za filtriranje pod vakuumom s muškim spojem od brušenog stakla.
 - 3.8. Vakuumska tikvica od 50 ml, sa ženskim spojem od brušenog stakla koji se može pričvrstiti na lijevak za filtriranje (točka 3.7.).
 - 3.9. Epruveta od 10 ml s konusnim dnom i brtvenim staklenim čepom.
 - 3.10. Plinski kromatograf koji se može koristiti s kapilarnom kolonom s razdjelnim sustavom za injektiranje koji se sastoji od:
 - 3.10.1. Termostatske komore za kolone koja može održavati željenu temperaturu s točnošću od ± 1 °C;
 - 3.10.2. Jedinice za injektiranje s mogućnošću podešavanja temperature, s elementom za uparavanje od persilaniziranog stakla i razdjelnim sustavom;
 - 3.10.3. Plameno-ionizacijskog detektora (FID);
 - 3.10.4. Sustava za prikupljanje podataka koji se može koristiti s detektorom FID (točka 3.10.3.) koji se može uključiti ručno.
 - 3.11. Kvarcna kapilarna kolona duljine između 20 i 30 m, unutarnjeg promjera između 0,25 i 0,32 mm, sa slojem 5 % difenila - 95 % dime-tilpolisiloksana (SE-52 ili SE-54 ili odgovarajućom stacionarnom fazom), s ujednačenom debljinom filma između 0,10 i 0,30 μ m.

▼ **M26**

- 3.12. Mikroštrcaljka za plinsku kromatografiju volumena 10 l s čvrsto učvršćenom iglom primjerenom za razdjelno injektiranje.
- 3.13. Eksikator s kalcijevim kloridom
4. REAGENSI
- 4.1. Kalijev hidroksid, minimalne koncentracije 85 %
- 4.2. Otopina kalijevog hidroksida u etanolu približno 2 mol/l
Otopiti 130 g kalijevog hidroksida (točka 4.1.), uz hlađenje, u 200 ml destilirane vode, a zatim nadopuniti etanolom do jedne litre (točka 4.10). Otopinu treba čuvati u dobro začepljenim bocama od tamnog stakla i čuvati najviše dva dana.
- 4.3. Etil eter, analitičke kvalitete.
- 4.4. Otopina kalijevog hidroksida u etanolu približno 0,2 N
Otopiti 13 g kalijevog hidroksida (točka 4.1.) u 20 ml destilirane vode i nadopuniti etanolom do jedne litre (točka 4.10.).
- 4.5. Bezvodni natrijev sulfat, analitičke kvalitete.
- 4.6. Staklene ploče (20 × 20 cm) sa slojem silikagela, bez indikatora fluorescencije, debljine 0,25 mm (na tržištu su dostupne ploče spremne za uporabu).
- 4.7. Toluen, za kromatografiju.
- 4.8. Aceton, za kromatografiju.
- 4.9. n-heksan, za kvalitetu kromatografije.
- 4.10. Etil eter, za kvalitetu kromatografije.
- 4.11. Etanol analitičke kvalitete.
- 4.12. Etil acetat analitičke kvalitete.
- 4.13. Referentna otopina za tankoslojnu kromatografiju: 5 %-tna otopina kolesterola ili fitosterola i eritrodiola u etil acetatu (točka 4.11.).
- 4.14. 2,7-diklorofluorescein, 0,2 %-tna otopina u etanolu. Može se učiniti blago lužnatim dodavanjem nekoliko kapi otopine 2 N kalijevog hidroksida u alkoholu (točka 4.2.).
- 4.15. Bezvodni piridin, za kvalitetu kromatografije (vidi Napomenu 5).
- 4.16. Heksametildisilazan analitičke kvalitete.
- 4.17. Trimetilklorosilan analitičke kvalitete.
- 4.18. Otopine sterolnih trimetilsilil etera iz uzorka.
Trebaju ih se pripremiti neposredno prije korištenja od sterola i eritrodiola dobivenih iz ulja koja ih sadrže.
- 4.19. α -kolestanol, čistoće veće od 99 % (čistoća se mora provjeriti plinskom kromatografijom).
- 4.20. Otopina α -kolestanola internog standarda, 0,2 %-tna otopina (m/V) u etil acetatu (točka 4.11.).
- 4.21. Otopina 10 g/l fenolftaleina u etanolu (točka 4.10.).
- 4.22. Plinovi nosači: vodik ili helij, plinsko-kromatografske čistoće.
- 4.23. Pomoćni plinovi: vodik, helij, dušik i zrak, plinsko-kromatografske čistoće.

▼ M26

4.24. Smjesa n-heksana (točka 4.9.) i etil etera (točka 4.10.) 65:35 (V/V).

4.25. Reagens za sililaciju koji se sastoji od smjese piridina, heksametildisilazana i trimetilklorosilana.

5. POSTUPAK

5.1. Pripremanje neosapunjive tvari.

5.1.1. S pomoću mikroštrcaljke (točka 3.6.) od 500 μ l u tikvicu volumena 250 ml ubrizgati onu količinu 0,2 %-tne otopine α -kolestanola internog standarda (točka 4.20.) koja sadržava količinu kolestanola koja je približno jednaka 10 % sadržaja sterola uzorka. Primjerice, na 5 g uzorka maslinova ulja treba dodati 500 μ l otopine α -kolestanola (točka 4.20.) i 1 500 μ l za ulje komine maslina. Upariti do suha pod blagom strujom dušika u toploj vodenoj kupelji i, nakon što se tikvica ohladi, izvagati $5 \pm 0,01$ g suhog filtriranog uzorka u istu tikvicu.

Napomena 1.: Ulja i masti životinjskog ili biljnog podrijetla koja sadrže znatne količine kolesterola mogu pokazati pik s retencijskim vremenom koje je blizu onome kolestanola. U tom slučaju frakcija sterola treba se analizirati dvostruko - s internim standardom i bez njega.

5.1.2. Dodati 50 ml 2 mol/l otopine kalijevog hidroksida u etanolu (točka 4.2.) i nešto plovućca, namjestiti povratno hladilo i zagrijavati do točke slabog vrenja dok se ne završi saponificiranje (otopina postane bistra). Nastaviti zagrijavanje još 20 minuta, zatim dodati 50 ml destilirane vode u vrh hladila, odvojiti hladilo i ohladiti tikvicu na približno 30 °C.

5.1.3. Kvantitativno prenijeti sadržaj tikvice u lijevak za odjeljivanje od 500 ml (točka 3.2.) s nekoliko obroka destilirane vode (50 ml). Dodati približno 80 ml etil etera (točka 4.10.), snažno protresti približno 60 sekundi, povremeno ispuštajući pritisak okretanjem lijevka za odjeljivanje i otvaranjem zaustavnog pipca. Odložiti dok se dvije faze potpuno ne odvoje (Napomena 2.).

Odvojiti sapunastu otopinu što je moguće potpunije u drugi lijevak za odjeljivanje. Provesti još dvije ekstrakcije na vodeno-alkoholnoj fazi na jednak način, uz korištenje između 60 i 70 ml etil etera (točka 4.10.).

Napomena 2.: Svaka se emulzija može uništiti dodavanjem malih količina etanola (točka 4.11.).

5.1.4. Kombinirati tri ekstrakta etera u jednom lijevku za odjeljivanje koji sadržava 50 ml vode. Nastaviti ispirati s vodom (50 ml) sve dok se u vodi kojom se ispiralo više ne pojavljuje ružičasto obojenje prilikom dodavanja kapljica otopine fenolftaleina (točka 4.21.).

Nakon uklanjanja vode kojom se ispiralo profiltrirati kroz bezvodni natrijev sulfat (točka 4.5.) u prethodno izvaganoj tikvicu od 250 ml perući lijevak i filter malim količinama etil etera (točka 4.10.).

5.1.5. Otopalo ispariti destiliranjem pod vakuumom u rotirajućem isparivaču na 30 °C. Dodati 5 ml acetona i potpuno odstraniti hlapivo otopalo pod blagom strujom zraka. Ostatak osušiti u peći 15 min na 103 ± 2 °C. Ohladiti u eksikatoru i izvagati uz odstupanje do 0,1 mg.

▼ **M26**

- 5.2. Odjeljivanje frakcija sterola i triterpenskih dialkohola (eritrodiol + uvaol)
- 5.2.1. Pripremanje osnovnih ploča za tankoslojnu kromatografiju. Uroniti silikagel ploče (točka 4.6.) u otopinu 0,2 mol/l kalijeveg hidroksida u etanolu (točka 4.5.) na 10 sekundi, zatim ih ostaviti da se dva sata suše u digestoru i na kraju ih staviti u peć na sat vremena na 100 °C.

Izvaditi ploče iz peći i pohraniti u eksikator s kalcijevim kloridom (točka 3.13.) do upotrebe (ploče obrađene na ovaj način moraju se upotrijebiti u roku od 15 dana).

Napomena 3.: Kad se za odjeljivanje frakcije sterola koriste osnovne silikagel ploče, nema potrebe da se neosapunjive tvari obrađuju aluminijem. Na taj način svi sastojci koji su po prirodi kiseli (masne kiseline i drugi) zadržavaju se na liniji raspršivanja, a vrpca sterola jasno se odvaja od vrpce alifatskih i triterpenskih alkohola.

- 5.2.2. U komoru za razvijanje unijeti smjesu heksana i etil etera (točka 4.24.) (Napomena 4.) do razine od približno 1 cm. Komoru zatvoriti odgovarajućim poklopcem i ostaviti tako na najmanje pola sata, na hladnom mjestu, kako bi se uspostavila ravnoteža tekućine ipare. Trake filter-papira namočene u eluens mogu se postaviti na unutarnje površine komore. Time se skraćuje vrijeme razvijanja za otprilike jednu trećinu i dobiva jednoličnija, pravilna elucija komponenata.

Napomena 4.: Smjesa za razvijanje treba se zamijeniti za svako ispitivanje da bi se postigli savršeni reproducibilni uvjeti elucije ili se umjesto toga može koristiti otapalo n-heksana i etilnog etera 50:50 (V/V).

- 5.2.3. Pripremiti približno 5 %-tnu otopinu neosapunjivih tvari (točka 5.1.5.) u etil acetatu (točka 4.12.) i s pomoću mikroštrcaljke od 100 µl nanijeti 0,3 ml te otopine u tankoj i ujednačenoj liniji na donji rub (2 cm) kromatografske ploče (točka 5.2.1.). Poravnato s nanosom nanijeti između 2 i 3 µl referentne otopine tvari (točka 4.13.) tako da se vrpca sterola i triterpenskih dialkohola može identificirati nakon razvijanja.

- 5.2.4. Postaviti ploču unutar komore za razvijanje koja je pripremljena kako je navedeno u točki 5.2.2. Sobnu temperaturu treba održavati između 15 i 20 °C (Napomena 5.). Komoru odmah zatvoriti poklopcem i ostaviti da eluira dok prednji dio otapala ne dosegne približno 1 cm od gornjeg ruba ploče. Ploča se zatim vadi iz komore za razvijanje, a otapalo isparuje pod strujom vrućeg zraka ili se ploča ostavlja još neko kraće vrijeme u digestoru.

Napomena 5.: Na višim temperaturama odjeljivanje se može pogoršati.

- 5.2.5. Blago i jednoliko pošpricati ploču otopinom 2,7-diklorofluoresceina (točka 4.14.) i zatim je ostaviti da se osuši. Kad se ploča promatra pod ultraljubičastom svjetlošću, vrpce sterola i triterpenskih dialkohola mogu se identificirati tako što su poravnate s mrljama dobivenima od referentne otopine (točka 4.13.). Rubovi trake označe se uz rub fluorescencije crnom olovkom (vidi TLC ploču na slici 3).

- 5.2.6. Silikagel koji se nalazi u označenom području sastruže se s pomoću metalne spatule. Tako dobiveni fino usitnjeni materijal unijeti u lijevak za filtriranje (točka 3.7.). Dodati 10 ml vrućeg etil acetata (točka 4.13.), pažljivo izmiješati metalnom spatulom i filtrirati pod vakuumom, skupljajući filtrat u vakuumsku tikvicu (točka 3.8.) spojenu na lijevak za filtriranje.

▼ **M26**

Ostatak u tikvici isprati tri puta etil eterom (točka 4.3.) (približno 10 ml svaki put), skupljajući filtrat u istu tikvicu spojenu na lijevak, ispariti filtrat do volumena od 4 do 5 ml, preostalu otopinu prenijeti u prethodno izvaganu epruvetu volumena 10 ml (točka 3.9.), upariti do suha laganim zagrijavanjem pod blagom strujom dušika, ponovno nadopuniti s nekoliko kapi acetona (točka 4.8.) i ponovno upariti do suha.

Ostatak unutar epruvete mora se sastojati od frakcija sterola i triterpenskih dialkohola.

5.3. Pripremanje trimetilsilil etera.

5.3.1. Dodati reagens za silaniziranje (točka 4.25.) (Napomena 6.), u omjeru od po 50 µl na svaki miligram sterola i triterpenskih alkohola, u epruvetu koja sadržava frakciju sterola i triterpena tako da se izbjegne bilo kakva apsorpcija vlage (Napomena 7.)

Napomena 6.: Otopine spremne za uporabu dostupne su na tržištu. Dostupni su i drugi reagensi za silaniziranje kao što su npr. bistrimetilsililtrifluoracetamid + 1 % trimetilklorosilan za miješanje s jednakim volumenom bezvodnog piridina.

Piridin se može zamijeniti jednakom količinom acetonitrila.

5.3.2. Epruvetu treba začepiti i pažljivo protresti (bez preokretanja) sve dok se sastojci u potpunosti ne rastope. Ostaviti da odstoji najmanje 15 minuta na sobnoj temperaturi te zatim centrifugirati nekoliko minuta. Bistra otopina spremna je za analizu plinskim kromatografom.

Napomena 7.: Normalno je da dođe do blage opalescencije koja neće uzrokovati anomalije. Stvaranje bijelog floka ili pojava ružičastog obojenja znakovi su prisutnosti vlage ili propadanja reagensa. U tom slučaju treba ponoviti ispitivanje (samo ako se koristi heksametildisilazan ili trimetilklorosilan).

5.4. Analiza plinskim kromatografom

5.4.1. Pripremne djelatnosti i kondicioniranje kapilarne kolone.

5.4.1.1. Namjestiti kolonu (točka 3.11.) u plinski kromatograf tako da se početak kolone spoji na razdjelni injektor, a izlazni kraj kolone na detektor.

Provesti opću provjeru stanja jedinice plinskog kromatografa (curenje iz plinskih tokova, učinkovitost detektora, učinkovitost sustava za razdvajanje i sustava za bilježenje, itd.).

5.4.1.2. Ako se kolona koristi prvi put, preporučljivo je podvrgnuti je postupku kondicioniranja: kroz kolonu se pusti malo plina, a zatim se jedinica plinskog kromatografa uključi i postupno zagrijava dok se ne postigne temperatura koja je najmanje 20 °C iznad radne temperature (Napomena 8.). Ta se temperatura treba održavati najmanje dva sata, zatim se cijela jedinica stavlja u radne uvjete (prilagođavanje protoka plina i razdvajanja, paljenja plamena, provjera spoja s računalnim sustavom, prilagođavanje komore za kolonu, temperature detektora i injektora, itd.), a zatim se bilježi signal uz osjetljivost koja je najmanje dvostruko viša od razine predviđene za analizu. Bazna linija za praćenje treba biti linearna, bez pikova ikakve vrste i ne smije pokazivati nikakve znakove otklona.

▼ **M26**

Negativan pravocrtni otklon ukazuje na to da je došlo do curenja iz spojeva kolone, a pozitivan otklon ukazuje na to da kolona nije kondicionirana na odgovarajući način.

Napomena 8.: Temperatura kondicioniranja mora uvijek biti najmanje 20 °C niža od maksimalne temperature utvrđene za primijenjenu stacionarnu fazu.

5.4.2. Odabir radnih uvjeta.

5.4.2.1. Opći radni uvjeti su kako slijedi:

- Temperatura kolone: 260 ± 5 °C;
- Temperatura injektora: 280 - 300 °C;
- Temperatura detektora: 280 - 300 °C;
- Linearna brzina plina nosača: helij između 20 i 35 cm/s, vodik između 30 i 50 cm/s;
- Omjer razdvajanja: između 1:50 i 1:100,
- Osjetljivost instrumenta: između 4 i 16 puta viša od minimalne atenuacije;
- Osjetljivost bilježenja: - Između 1 i 2 mV pune skale;
- Količina injektirane tvari: između 0,5 i 1 μ l otopine TMSE.

Gore navedeni uvjeti mogu se modificirati u skladu sa svojstvima kolone i svojstvima plinskog kromatografa ne bi li se dobili kromatogrami koji udovoljavaju sljedećim zahtjevima:

- Retencijsko vrijeme pika β -sitosterola treba biti 20 ± 5 minuta;
- Pik kampesterola treba biti: za maslinovo ulje (prosječni udjel 3 %) 20 ± 5 % vrijednosti pune skale; za sojino ulje (prosječni udjel 20 %) 80 ± 10 % vrijednosti pune skale;
- Svi prisutni steroli moraju biti odjeljeni. Osim odjeljivanja, pikovi moraju biti i potpuno razdvojeni, tj. trag pika mora se vratiti na baznu liniju prije no što krene stvarati novi pik. Međutim, nepotpuno razdvajanje tolerira se u slučaju da se pik pri RRT 1,02 može kvantificirati korištenjem okomice.

5.4.3. Analitički postupak

5.4.3.1. Korištenjem mikroštrcaljke volumena 10 μ l unijeti 1 μ l heksana, 0,5 μ l zraka, i zatim između 0,5 i 1 μ l otopine uzorka. Pritom podignuti klip mikroštrcaljke da bi se igla ispraznila. Igla se uvodi kroz membranu injektora; nakon jedne do dvije sekunde otopina se brzo injektira, a nakon približno pet sekundi igla se polako izvlači.

Može se upotrijebiti i automatski injektor.

5.4.3.2. Bilježenje treba provoditi sve dok se TMSE prisutnih triterpenskikh dialkohola u potpunosti ne eluiraju. Bazna linija treba u svakom trenutku odgovarati zahtjevima (točka 5.4.1.2.).

5.4.4. Identificiranje pikova

Identificiranje pojedinačnih pikova provodi se na temelju retencijskog vremena i uspoređivanjem s mješavinom sterolnih i triterpenskikh dialkohola TMSE koja se analizirala u jednakim uvjetima (vidi Dodatak).

▼ M26

Steroli i triterpenski dialkoholi se eluiraju sljedećim redosljedom: kolesterol, brasikasterol, ergosterol, 24-metilen kolesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ 7-kampesterol, Δ 5,23-stigmastadienol, klerosterol, β -sitosterol, sitostanol, Δ 5-avenasterol, Δ 5,24-stigmastadienol, Δ 7-stigmasterol, Δ 7-avenasterol, eritrodiol i uvaol.

Retencijska vremena β -sitosterola za kolone SE-52 i SE-54 prikazana su u Tablici 1.

Slike 1. i 2. prikazuju tipične kromatograme za neka ulja.

5.4.5. Kvantitativna procjena.

5.4.5.1. Površine pikova α -kolestanola i sterola i triterpenskih dialkohola izračunavaju se korištenjem računalnog sustava. Pikove bilo kojega od spojeva koji nisu uključeni među one navedene u Tablici 1. (ergosterol se ne smije izračunavati) ne treba uzimati u obzir. Koeficijent odziva za α -kolestanol treba biti jednak 1.

5.4.5.2. Treba izračunati koncentraciju svakog pojedinačnog sterola u mg/kg masnog materijala kako slijedi:

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

pri čemu je:

A_x = površina pika sterola x, u izračunima računalnog sustava;

A_s = površina pika α -kolestanola; u izračunima računalnog sustava;

m_s = masa dodanog α -kolestanola, u miligramima;

m = masa uzorka korištenog za određivanje, u gramima.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

6.1. Koncentracije pojedinačnih sterola iskazuju se kao mg/kg masnog materijala, a njihov zbroj kao „ukupni steroli”.

Sastav svakog pojedinačnog sterola i eritrodiola i uvaola iskazuje se jednim decimalnim mjestom.

Ukupni sastav sterola mora se iskazati bez ijednog decimalnog mjesta.

▼ M28

6.2. Izračunati postotak svakog pojedinačnog sterola iz omjera površine relevantnog pika prema ukupnoj površini pikova za sterole:

$$\text{sterol}_x = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

pri čemu je:

A_x = površina pika za x;

$\sum A$ = ukupna površina pikova za sterole.

▼ M26

6.3. Beta-sitosterol: 5-23-stigmastadienol + klerosterol + β -sitosterol + sitostanol + 5-avenasterol + 5-24-stigmastadienol.

▼M26

6.4. Izračunavanje postotka eritrodiola i uvaola:

$$\text{Eritrodiol + uvaol} = \frac{\text{Er} + \text{Uv}}{\text{Er} + \text{Uv} + \Sigma\text{A}} \times 100$$

pri čemu je

ΣA = zbroj površine sterola u izračunima računalnog sustava;

Er = površina eritrodiola u izračunima računalnog sustava;

Uv = površina uvaola u izračunima računalnog sustava;

▼ **M26***DODATAK***Određivanje linearne brzine plina**

U plinski kromatograf postavljen na normalne radne uvjete injektira se između 1 i 3 μl metana (ili propana) i zatim se mjeri vrijeme koje je plinu potrebno da proteče kroz kolonu od trenutka injektiranja do trenutka pojavljivanja pika (tM).

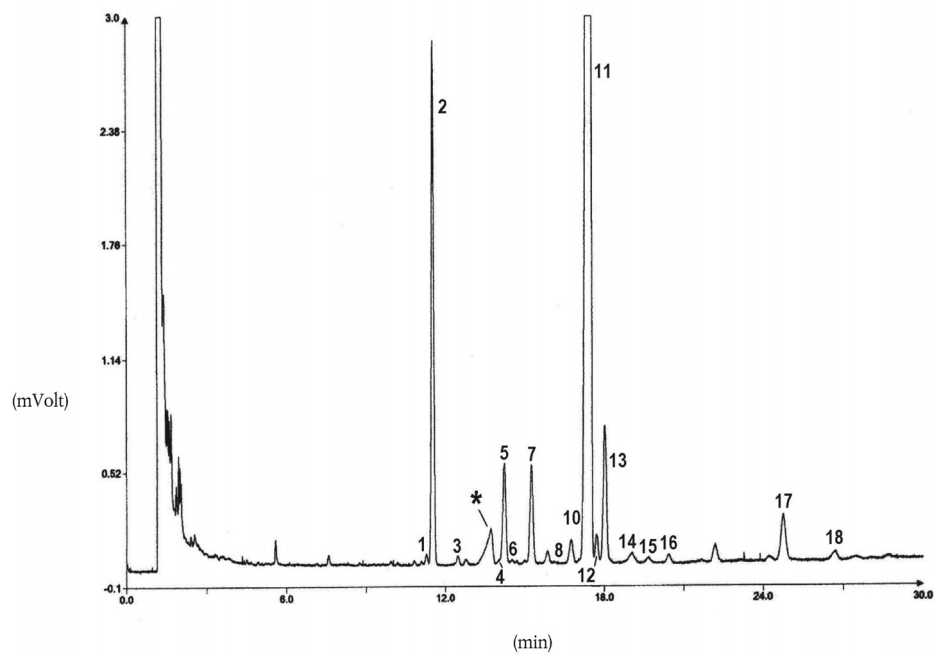
Linearna brzina u cm/s zadana je s L/tM , pri čemu je L duljina kolone u cm, a tM izmjereno vrijeme u sekundama.

*Tablica 1.***Relativna retencijska vremena za sterole**

Pik	Identifikacija		Relativno retencijsko vrijeme	
			SE 54 kolona	SE 54 kolona
1	Kolesterol	Δ -5-kolesten-3 β -ol	0,67	0,63
2	Kolestanol	5 α -kolestan-3 β -ol	0,68	0,64
3	Brasikasterol	[24S]-24-metil- Δ -5,22-kolestadien-3 β -ol	0,73	0,71
*	Ergosterol	[24S] 24 meti Δ 5-7-22 kolestatrien 3 β -ol	0,78	0,76
4	24-metilen-kolesterol	24-metilen- Δ -5,24-kolestadien-3 β -ol	0,82	0,80
5	Kampesterol	(24R)-24-metil- Δ -5-kolesten-3 β -ol	0,83	0,81
6	Kampestanol	(24R)-24-metil-kolestan-3 β -ol	0,85	0,82
7	Stigmasterol	(24S)-24-etil- Δ -5,22-kolestadien-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ -7-kampesterol	(24R)-24-metil- Δ -7-kolesten-3 β -ol	0,93	0,92
9	Δ -5,23-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,23-kolestadien-3 β -ol	0,95	0,95
10	Klerosterol	(24S)-24-etil- Δ -5,25-kolestadien-3 β -ol	0,96	0,96
11	β -sitosterol	(24R)-24-etil- Δ -7-kolesten-3 β -ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	24-etil-kolestan-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ -5-avenasterol	(24Z)-24-etiliden- Δ -kolesten-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5-24-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,24-kolestadien-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastenol	(24R,S)-24-etil- Δ -7-kolesten-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasterol	(24Z)-24-etiliden- Δ -7-kolesten-3 β -ol	1,16	1,16
17	Eritrodiol	5 α olean-12en-3 β 28 diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ 12-ursen-3 β 28 diol	1,52	1,52

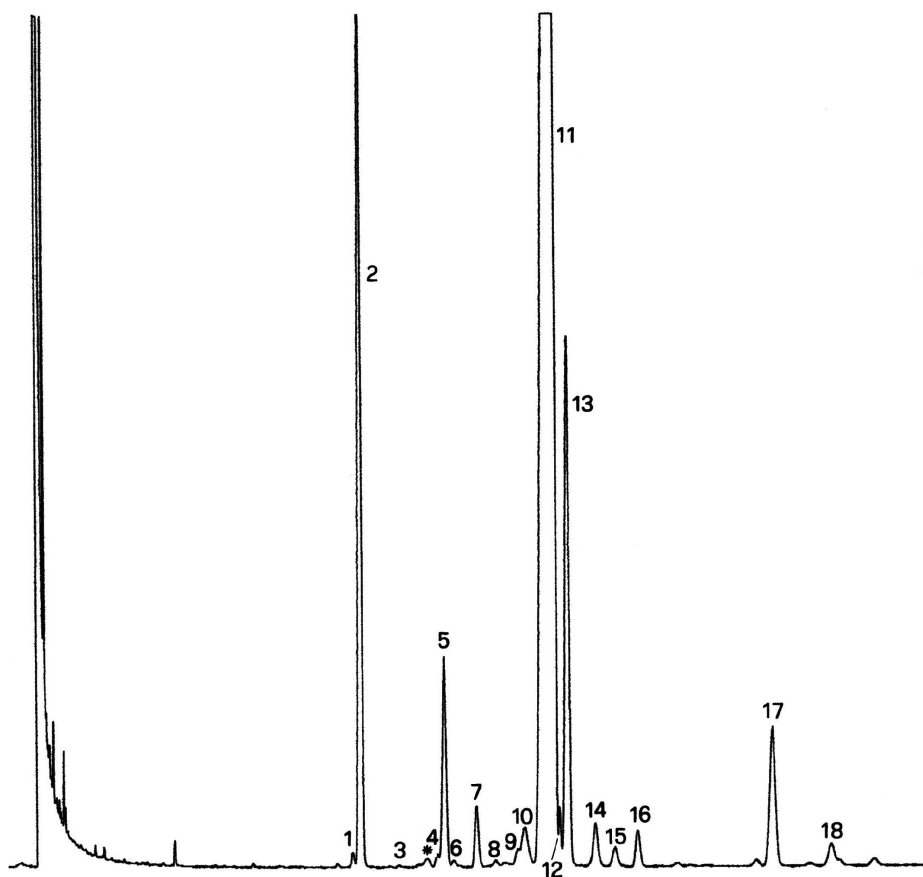
▼ M26*Slika 1.*

Plinski kromatogram frakcije sterola i triterpenskih alkohola maslinova ulja lampante (dodan unutarnji standard)



▼ M26*Slika 2.*

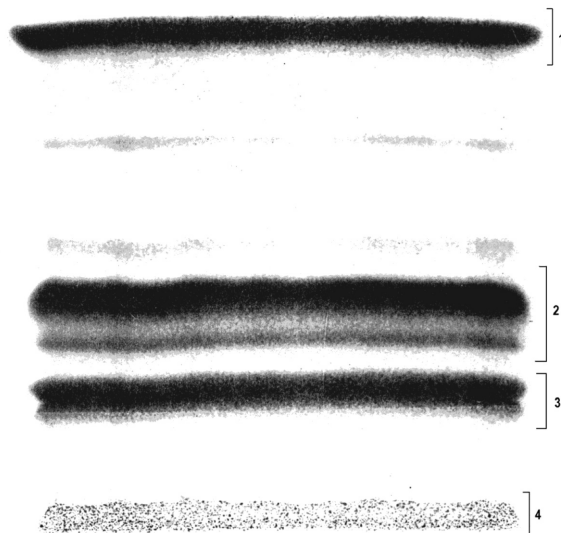
Plinski kromatogram frakcije sterola i triterpenskih alkohola rafiniranog maslinova ulja
(dodan unutarnji standard)



▼ **M26**

Slika 3.

TLC ploča ulja komine maslina sa područjem koja se sastruže za određivanje sterola i triterpenskih alkohola



- 1 – Skvalen
- 2 – Triterpen i alifatski alkoholi
- 3 – Steroli i alifatski dialkoholi
- 4 – Početak i slobodne masne kiseline

▼ **M21***PRILOG VII.***ODREĐIVANJE POSTOTKA 2-GLICERIL MONOPALMITATA**

1. SVRHA I PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda opisuje postupak za određivanje postotka palmitinske kiseline u položaju 2. na trigliceridima određivanjem 2-gliceril monopalmitata.

Ova metoda se može primijeniti na biljna ulja koja su tekuća na sobnoj temperaturi (20 °C).

2. PRINCIP

Nakon pripreme, uzorak ulja se podvrgava djelovanju pankreasne lipaze: parcijalna i specifična hidroliza u položajima 1. i 3. na molekuli triglicerida uzrokuje pojavu monoglicerida u položaju 2. Postotak 2-gliceril monopalmitata u frakciji monoglicerida se određuje nakon sizlaniziranja kapilarnom plinskom kromatografijom.

3. OPREMA I MATERIJALI

- 3.1. Erlenmeyerova tikvica volumena 25 ml
- 3.2. Laboratorijske čaše volumena 100, 250 i 300 ml,
- 3.3. Staklena kromatografska kolona unutarnjeg promjera 21-33 mm, dužina 400 mm, s pločom od sinter-stakla i pipcem
- 3.4. Menzure volumena 10, 50, 100 i 200 ml
- 3.5. Tikvice volumena 100 i 250 ml
- 3.6. Rotirajući isparivač
- 3.7. Epruvete za centrifugiranje s konusnim dnom volumena 10 ml s čepom od brušenog stakla
- 3.8. Centrifuga za epruvete volumena 10 i 100 ml
- 3.9. Termostat koji omogućava stabilnu temperaturu od $40 \pm 0,5$ °C
- 3.10. Graduirane pipete volumena 1 i 2 ml
- 3.11. Štrcaljka volumena 1 ml
- 3.12. Mikroštrcaljka volumena 100 μ m
- 3.13. Lijevak volumena 1 000 ml
- 3.14. Kapilarni plinski kromatograf opremljen hladnim injektorom za neposredno ubrizgavanje uzorka u kolonu i peći koja može održavati odabranu temperaturu u granicama od oko 1 °C
- 3.15. Hladni injektor na koloni za neposredno ubrizgavanje uzorka u kolonu
- 3.16. Plameno-ionizacijski detektor i elektrometar
- 3.17. Snimač-integrator prilagođen elektrometru s vremenom reakcije koje nije dulje od jedne sekunde i s varijabilnom brzinom papira
- 3.18. Staklena ili kvarcna kapilarna kolona duljine 8-12 metara, unutarnjeg promjera 0,25-0,32 mm, prekrivena metilpolisiloksanom ili fenil metilpolisiloksanom 5 %, debljine 0,10-0,30 μ m, koja se može koristiti na 370 °C

▼ M21

3.19. Mikroštrcaljka volumena 10 µl s tvrdom iglom (od kaljenog stakla), dužine najmanje 7,5 cm za neposredno ubrizgavanje na koloni.

4. REAGENSI

4.1. Silikagel veličine zrna između 0,063 i 0,200 mm, (70/280 mesh), pripremljen kako slijedi: staviti silikagel u porculansku posudu, osušiti u inkubatoru pri 160 °C četiri sata, potom ga ostaviti da se ohladi u eksikatoru pri sobnoj temperaturi. Dodati 5 % vode na masu silikagela kako slijedi: izvagati 152 g silikagela u Erlenmeyerovu tikvicu, potom dodati 8 g destilirane vode, začepiti i lagano protresti da se voda jednakomjerno rasporedi. Ostaviti da odstoji najmanje 12 sati prije uporabe.

4.2. n-heksan (za kromatografiju)

4.3. Izopropanol

4.4. Izopropanol, 1/1 (v/v) vodena otopina

4.5. Pankreasna lipaza. Mora imati aktivnost između 2,0 i 10 jedinica lipaze po mg. (Pankreasne lipaze s aktivnošću između 2 i 10 jedinica po mg enzima su dostupne na tržištu.)

4.6. Pufer otopina tris-hidroksimetilaminometana: 1 M otopine prilagođene na pH 8, (potencijometrijska kontrola), koncentracijom HCl (1/1 v/v)

4.7. Natrijev holat, enzimske kvalitete, vodena otopina 0,1 % (ova otopina se mora iskoristiti u roku od dva tjedna od njezine pripreme)

4.8. Kalcijev klorid, 22 % -tna vodena otopina

4.9. Dietilni eter za kromatografiju

4.10. Otopina za razvijanje: mješavina n-heksana/dietilnog etera (87:13 v:v)

4.11. Natrijev hidroksid, otopina 12 % po težini

4.12. Fenolftalein, 1 %-tna otopina u etanolu

4.13. Plin nosač: vodik ili helij, za plinsku kromatografiju

4.14. Pomoćni plinovi: vodik, čistoće najmanje 99 %, bez vlage i organskih tvari i zraka, za plinsku kromatografiju, iste čistoće

4.15. Reagens za silaniziranje: mješavina piridina/heksametil-disilazana, trimetil-klorosilana 9/3/1 (v/v/v). (Otopine spremne za uporabu su dostupne na tržištu. Mogu se koristiti drugi reagensi za silaniziranje, posebno bistrim-etilsilil trifloracetamid + 1 % trimetil-klorosilan, razrijeđen jednakim volumenom bezvodnog piridina.)

4.16. Referentni uzorci: čisti monogliceridi ili mješavine monoglicerida s poznatim postotnom udjelom sličnim uzorku.

5. METODA**5.1. Priprema uzorka**

5.1.1. Ulja sa slobodnom kiseloošću manjom od 3 % ne treba neutralizirati prije kromatografije na koloni silikagela. Ulja sa slobodnom kiseloošću većom od 3 % se moraju neutralizirati kao u točki 5.1.1.1.

▼ M21

- 5.1.1.1. Uliti 50 g ulja i 200 ml n-heksana u lijevak volumena 1 000 ml (3.13.). Dodati 100 ml izopropanola i količinu otopine 12 % natrijevog nitroksida (4.11.) istovrijednu slobodnoj kiselosti ulja uvećanu za 5 %. Snažno tresti jednu minutu. Dodati 100 ml destilirane vode, ponovo protresti i ostaviti da odstoji.

Nakon dekantiranja ukloniti donji sloj koji sadrži sapune. Skinuti međuslojeve (sluz i netopive tvari). Isprati heksansku otopinu neutraliziranog ulja uzastopnim dodavanjem otopine 1/1 (v/v) izopropanol/voda (4.4.) u obrocima od 50-60 ml dok ne nestane ružičasta boja fenolftaleina.

Ukloniti najveći dio heksana vakuumskom destilacijom, (pomoću rotacijskog isparivača, na primjer), i prenijeti ulje u tikvicu volumena 100 ml (3.5.). Osušiti ulje u vakuumu dok se otapalo potpuno ne ukloni.

Nakon okončanja postupka, kiselost ulja treba biti manja od 0,5 %.

- 5.1.2. Staviti 1,0 g ulja pripravljenog kao što je gore navedeno u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 25 ml (3.1.) i otopiti u 10 ml mješavine za razvijanje (4.10.). Ostaviti otopinu da odstoji najmanje 15 minuta prije kolonske kromatografije sa silikagelom.

Ako je otopina mutna, centrifugirati istu kako bi se osigurali optimalni uvjeti za kromatografiju. (Mogu se koristiti kapsule gotovog silikagela SPE od 500 mg pripremljene za uporabu.)

- 5.1.3. *Priprema kromatografske kolone*

Uliti oko 30 ml otopine za razvijanje (4.10.) u kolonu (3.3.), staviti komad vate u donji dio kolone pomoću staklenog štapića; utisnuti da se ukloni zrak.

U laboratorijskoj čaši pripremiti otopinu od 25 g silikagela (4.1.) u približno 80 ml otopine za razvijanje i prenijeti istu u kolonu pomoću ljevka.

Provjeriti nalazi li se sav silikagel u koloni; isprati otopinom za razvijanje (4.10.), otvoriti pipac i pustiti da tekućina dostigne razinu od oko 2 mm iznad razine silikagela.

- 5.1.4. *Kolonska kromatografija*

Točno odvagati 1,0 g uzorka pripremljenog kao u točki 5.1 u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 25 ml (3.1.).

Rastopiti uzorak u 10 ml otopine za razvijanje (4.10.). Unijeti otopinu u kromatografsku kolonu pripremljenu kao u točki 5.1.3. Izbjeći remećenje površine kolone.

Otvoriti pipac i uliti otopinu uzorka dok ne dostigne razinu silikagela. Razviti sa 150 ml otopine za razvijanje. Prilagoditi brzinu protoka na 2 ml/min (tako da 150 ml uđe u kolonu za oko 60-70 minuta).

Sakupiti eluat u prethodno izvaganu tikvicu volumena 250 ml. Upariti otopinu pod vakuumom i skinuti konačne tragove otapala pod strujom dušika.

Izvagati tikvicu i izračunati dobiven ekstrakt

▼ M21

(Ako se koriste kapsule gotovog silikagela SPE spremnog za uporabu, primijeniti sljedeću metodu: staviti 1 ml otopine (5.1.2.) u pripremljene kapsule s 3 ml n-heksana.

Nakon filtriranja otopine, razviti s 4 ml n-heksana/dietilnog etera 9/1 (v/v).

Sakupiti eluat u epruvetu volumena 10 ml i osušiti pod strujom dušika.

Izložiti suhi ostatak pankreasnoj lipazi (5.2.). (Bitno je provjeriti sastav masne kiseline prije i nakon prelaska kapsule SPE.)

5.2. Hidroliza pankreasnom lipazom

5.2.1. Odvagati u epruvetu za centrifugiranje 0,1 g ulja pripremljenog kao u točki 5.1. Dodati 2 ml pufer otopine, (4.6.), 0,5 ml otopine natrijevog holata, (4.7.), i 0,2 ml otopine kalcijevog klorida, dobro promiješati nakon svakog dodavanja. Zatvoriti epruvetu čepom od brušenog stakla i staviti u termostat na $40 \pm 0,5$ °C.

5.2.2. Dodati 20 mg lipaze, pažljivo protresti, (izbjeći močenje čepa), i staviti epruvetu u termostat na točno dvije minute. Potom ga skinuti, snažno tresti točno 1 minutu i ostaviti da se hladi.

5.2.3. Dodati 1 ml dietilnog etera, začepiti i snažno protresti, potom centrifugirati i prenijeti otopinu etera u čistu, suhu epruvetu pomoću mikroštrcaljke.

5.3. Priprema silaniziranih derivata i plinska kromatografija

5.3.1. Mikroštrcaljkom prenijeti 100 µm otopine, (5.2.3.), u epruvetu s konusnim dnom volumena 10 ml.

5.3.2. Ukloniti otapalo pod blagom strujom dušika, dodati 200 µm reagensa za silaniziranje (4.15.), začepiti epruvetu i ostaviti da stoji 20 minuta.

5.3.3. Nakon 20 minuta, dodati 1 do 5 ml n-heksana (ovisno o kromatografskim uvjetima): dobivena otopina je spremna za plinsku kromatografiju.

5.4. Plinska kromatografija

Radni uvjeti:

— temperatura injektora, (injektor neposredno na koloni), niža od vrelišta otapala (68 °C),

— temperatura detektora: 350 °C,

— temperatura kolone; programiranje temperature peći: 60 °C u trajanju od 1 minute, povećavanje za 15 °C u minuti do 180 °C, potom po 5 °C u minuti do 340 °C, potom 340 °C u trajanju od 13 minuta,

— plin nosač: vodik ili helij, postavljen na linearnu brzinu dostatnu da se dobije rezolucija naznačena na slici 1. Retencijsko vrijeme triglicerida C₅₄ mora biti 40 ± 5 minuta (vidjeti sliku 2.). (Gore naznačeni radni uvjeti su indikativni. Operateri će ih morati optimizirati kako bi dobili željenu rezoluciju. Pik koji odgovara 2-gliceril monopalmitatu mora imati minimalnu visinu jednaku 10 % skale snimača.),

▼ M21

— količina injektirane tvari: 0,5-1 µm otopine n-heksana (5 ml) (5.3.3.).

5.4.1. Identificiranje pikova

Pojedini monogliceridi mogu se identificirati na temelju svojih retencijskih vremena i usporedbom s onim dobivenim za standardne monogliceridne smjese pod istim uvjetima.

5.4.2. Kvantitativna procjena

Površina svakog pika izračunava se pomoću elektroničkog integratora.

6. ISKAZIVANJE REZULTATA

Postotak gliceril monopalmitata se izračunava iz omjera površine relevantnog pika prema ukupnoj površini pikova monoglicerida, (vidjeti sliku 2.), korištenjem formule:

$$\text{gliceril monopalmitat (\%)}: \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

gdje je:

A_x = površina pika koja odgovara gliceril monopalmitatu

ΣA = ukupna površina pikova za monogliceride

Rezultat mora biti izražen na jednu decimalu.

7. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

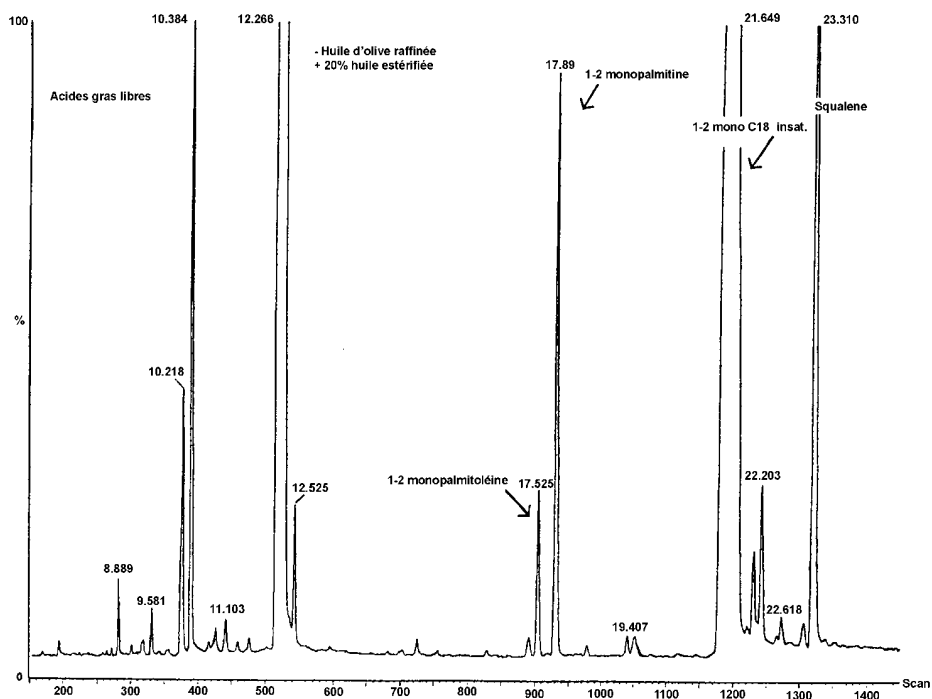
Izvješće o ispitivanju mora navoditi:

- upućivanje na ovu metodu,
- sve informacije potrebne za punu identifikaciju uzorka,
- rezultat analize,
- svako odstupanje od metode, bilo da je posljedica odluke predmetnih stranaka ili drugog razloga,
- podaci za identifikaciju laboratorija, datum analize i potpis onih koji su odgovorni za analizu.

▼ M21

Slika 1.

Kromatogram proizvoda reakcije silaniziranja dobivenih djelovanjem lipaze na rafinirano maslinovo ulje s dodatkom 20 % esterificiranog ulja (100 %)



Legenda: „acides gras libres” = slobodne masne kiseline; „Huile d’olive raffinée + 20 % huile estérifiée” = rafinirano maslinovo ulje + 20 % esterificirano ulje; „1-2 monopalmitoléine” = 1-2 monopalmitolein; „1-2 mono C₁₈ insat.” = nezasićeni 1-2 mono C₁₈

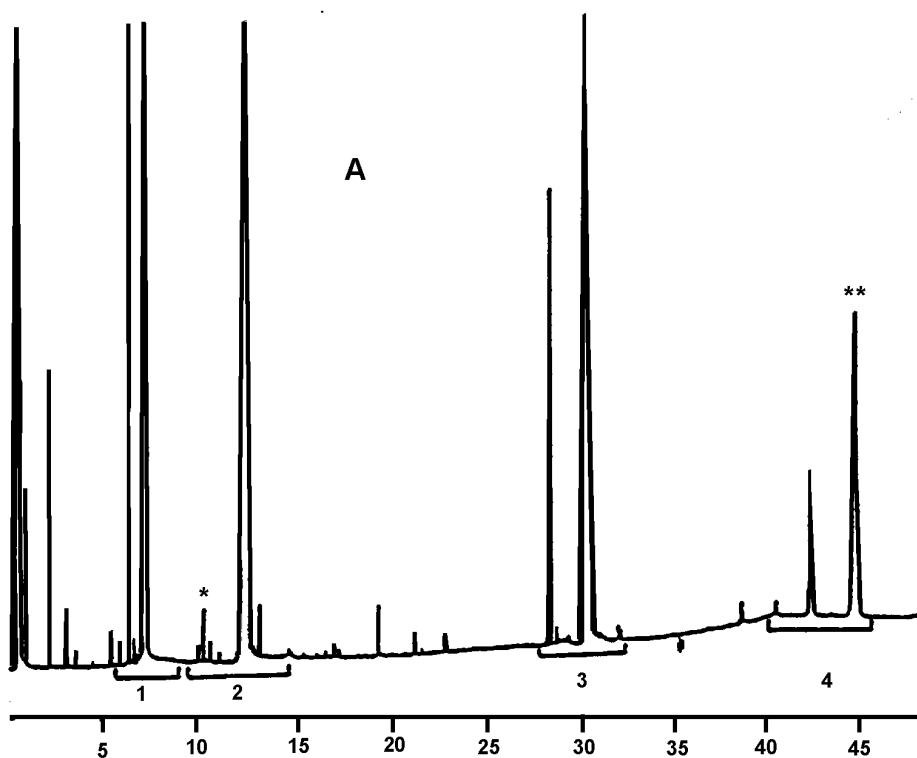
▼ M21

Slika 2.

Kromatogram:

(A) neesterificirano maslinovo ulje, nakon djelovanja lipaze; nakon silaniziranja; pod ovim uvjetima, (kapilarna kolona 8-12 m), frakcija voska se eluira istodobno kao i frakcija diglicerida ili malo nakon nje.

Nakon lipaze, sadržaj triglicerida ne smije prijeći 15 %



Legenda:

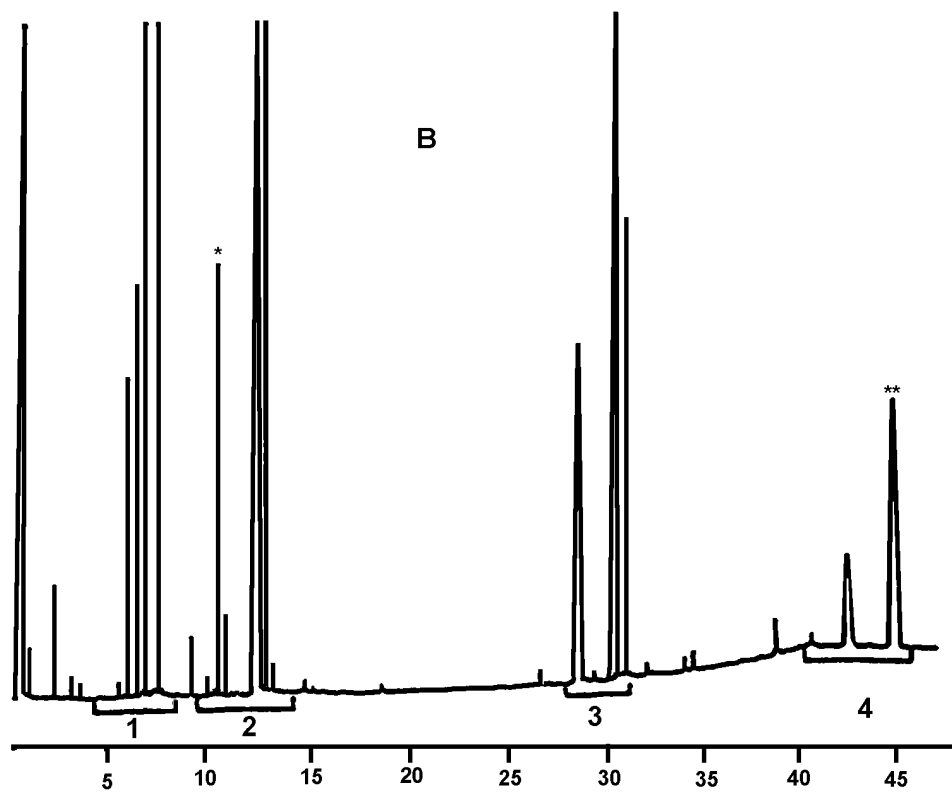
- 1. = Slobodne masne kiseline
- 2. = Monogliceridi
- 3. = Digliceridi
- 4. = Trigliceridi
- * = 2-monopalmitin
- ** = Triglicerid C₅₄

▼ M21

Kromatogram:

(B) neesterificirano ulje nakon djelovanja lipaze; nakon silaniziranja; pod ovim uvjetima, (kapilarna kolona 8-12 m), frakcija voska se eluira istodobno kad i frakcija diglicerida ili malo nakon nje.

Nakon lipaze, sadržaj triglicerida ne smije prelaziti 15 %.



Legenda:

- 1. = Slobodne masne kiseline
- 2. = Monogliceridi
- 3. = Digliceridi
- 4. = Trigliceridi
- * = 2-monopalmitin
- ** = Triglicerid C₅₄

▼ **M21**

8. BILJEŠKE

Bilješka 1. PRIPREMANJE LIPAZE

Lipaze sa zadovoljavajućom aktivnošću su dostupne na tržištu. One se također mogu pripremiti u laboratoriju na sljedeći način:

Ohladite 5 kg svježe svinjske gušterače na 0 °C. Odstranite okolnu krutu mast i vezivno tkivo i sameljite u gustu tekućinu u mikseru. Miješajte pastu s 2,5 litara bezvodnog acetona 4-6 sati, potom centrifugirajte. Ekstrahirajte ostatak još tri puta s jednakim volumenom bezvodnog acetona, a zatim dva puta s mješavinom acetona/dietilnog etera (1/1 v/v) i dva puta s dietilnim eterom.

Osušite ostatak u vakuumu 48 sati da biste dobili stabilan prah koji se može dugotrajno spremati u hladnjaku, zaštićen od vlage.

Bilješka 2. PRAĆENJE AKTIVNOSTI LIPAZE

Pripremiti emulziju maslinovog ulja kako slijedi:

U mikseru miješajte 10 minuta mješavinu 165 ml otopine gumi arabike 100 g/l, 15 g zdrobljenog leda i 20 ml prethodno neutraliziranog maslinovog ulja.

Ulijte 10 ml emulzije u laboratorijsku čašu volumena 50 ml, zatim dodajte 0,3 ml otopine natrijevog holata 0,2 g/ml i potom 20 ml destilirane vode.

Stavite laboratorijsku čašu u termostat namješten na 37 °C; umetnite elektrode pH-metra i spiralnu miješalicu.

Biretom dodajte otopinu 0,1 N natrijevog hidroksida, kap po kap, dok se ne dobije pH od 8,3.

Dodajte alikvot vodene suspenzije praha lipaze (0,1 g/ml lipaze). Čim pH-metar pokaže 8,3, uključite zapornu uru i ukapajte otopinu natrijevog hidroksida brzinom kojom se održava pH na 8,3. Očitajte svake minute volumen potrošene otopine.

Zabilježite podatke na x/y grafu s vremenom na osi x i milimetrima potrošene alkalne otopine 0,1 N da se zadrži konstantan pH na y osi. Trebali biste dobiti linearni graf.

Aktivnost lipaze, izražena u jedinicama lipaze po mg, dana je u sljedećoj formuli:

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

pri čemu je:

A aktivnost lipaze u jedinicama/mg

V broj mililitara otopine 0,1 N natrijevog hidroksida u minuti (izračun iz grafa)

N titar otopine natrijevog hidoksida

m masa u mg ispitne lipaze.

Jedinica lipaze definirana je kao količina enzima koja oslobađa 10 mikroekvivalenata kiseline u minuti.

▼ **M20**

▼ **M28***PRILOG IX.***Spektrofotometrijsko ispitivanje u ultraljubičastom području**

UVOD

Spektrofotometrijskim ispitivanjem u ultraljubičastom području mogu se dati informacije o kvaliteti masti, njezinoj očuvanosti i promjenama koje su uzrokovane tehnološkim procesima. Do apsorpcija na valnim duljinama utvrđenima u ovoj metodi dolazi zbog prisutnosti konjugiranih dienskih i trienskih sustava koji nastaju kao posljedica oksidacijskih procesa i/ili postupaka rafiniranja. Te se apsorpcije iskazuju kao specifične ekstinkcije $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (ekstinkcija 1 %-tnog masenog udjela otopine masti u određenom otapalu, u kivetu od 10 mm) što se uobičajeno označava s K (naziva se i „koeficijentom ekstinkcije”).

1. OPSEG

U ovom se Prilogu opisuje postupak provođenja spektrofotometrijske analize maslinovog ulja u ultraljubičastom području.

2. PRINCIP METODE

Uzorak se otapa u propisanom otapalu, a sposobnost apsorpcije otopine mjeri se na utvrđenim valnim duljinama u odnosu na čisto otapalo.

Specifične ekstinkcije na 232 nm i 268 nm u izo-oktanu ili na 232 nm i 270 nm u cikloheksanu izračunavaju se za koncentraciju 1 %-tnog masenog udjela u kivetu od 10 mm.

3. OPREMA

- 3.1. Spektrofotometar pogodan za mjerenja na valnim duljinama ultraljubičaste svjetlosti (220 nm do 360 nm), s mogućnošću očitavanja pojedinačnih nanometrijskih jedinica. Preporučuju se redovite provjere radi postizanja točnosti i obnovljivosti sposobnosti apsorpcije i ljestvica valnih duljina te za rasipnu svjetlost.

- 3.1.1. *Ljestvica valnih duljina:* Ona se može provjeriti upotrebom referentnog materijala koji se sastoji od filtra od optičkog stakla koje sadržava holmijev oksid ili otopinu holmijevog oksida (zapečaćen ili nezapečaćen) s jasnim apsorpcijskim frekvencijama. Referentni materijali namijenjeni su provjeri i baždarenju ljestvica valnih duljina vidljivih i ultraljubičastih spektrofotometara s nominalnim spektralnim frekvencijskim širinama od 5 nm ili manje. Mjerenja se provode u odnosu na zrak kao slijepu probu u intervalu valnih duljina od 640 do 240 nm, u skladu s uputama priloženim referentnim materijalima. Provođa se ispravljanje bazne linije s praznim putem snopa pri svakoj promjeni širine procjepa. Standardne valne duljine navedene su u certifikatu referentnog materijala.

- 3.1.2. *Ljestvica apsorpcije:* Ona se može provjeriti upotrebom komercijalno dostupnog zapečaćenog referentnog materijala koji se sastoji od kisele otopine kalijeva dikromata u određenim koncentracijama i potvrđenim vrijednostima apsorpcije pri njihovim λ_{max} (četiri otopine kalijeva dikromata u perklornoj kiselini zapečaćenog u četiri UV kvarcne kivete za mjerenje referentne vrijednosti linearnosti i fotometrijske točnosti u UV-području). Otopine kalijevog dikromata mjere se u odnosu na slijepu probu kiseline koja se primjenjuje nakon ispravljanja bazne linije u skladu s uputama priloženim referentnom materijalu. Vrijednosti apsorpcije navedene su u certifikatu referentnog materijala.

U cilju provjeravanja odziva fotoćelije i fotomultiplikatora druga je mogućnost postupiti na sljedeći način: odvagnuti 0,2000 g čistog kalijevog kromata za spektrofotometriju i otopiti ga u 0,05 mol/l otopini kalijevog hidroksida u građuiranoj tikvici volumena 1 000 ml i nadopuniti do oznake. Uzeti točno 25 ml dobivene otopine, staviti ju u građuiranu tikvicu volumena 500 ml i razrijediti do oznake upotrebljavajući istu otopinu kalijevog hidroksida.

▼ **M28**

Izmjeriti ekstinkciju tako dobivene otopine na 275 nm, upotrebljavajući otopinu kalijevo hidrokoksida kao referentnu. Ekstinkcija izmjerena upotrebom kivete od 1 cm treba biti $0,200 \pm 0,005$.

- 3.2. Pravokutne kvarcne kivete, s poklopcima, pogodne za mjerenja na valnim duljinama ultraljubičaste svjetlosti (220 do 360 nm) s duljinom optičke putanje od 10 mm. Kivete napunjene vodom ili drugim prikladnim otapalom ne bi trebale pokazivati međusobne razlike u ekstinkciji veće od 0,01 ekstinkcijskih jedinica.
- 3.3. Odmjerne tikvice od 25 ml s jednom oznakom, klase A.
- 3.4. Analitička vaga s mogućnošću očitavanja uz odstupanje do 0,0001 g

4. REAGENSI

Tijekom analize, osim ako nije drukčije navedeno, upotrebljavati isključivo reagensne priznate analitičke čistoće te destiliranu ili demineraliziranu vodu ili vodu jednakovrijedne čistoće.

Otapalo: Izo-oktan (2,2,4-trimetilpentan) za mjerenja na 232 nm i 268 nm i cikloheksan za mjerenja na 232 nm i 270 nm, sa sposobnošću apsorpcije manjom od 0,12 na 232 nm i manjom od 0,05 na 270 nm u odnosu na destiliranu vodu, izmjereno u kivetu od 10 mm.

5. POSTUPAK

- 5.1. Uzorak mora biti savršeno homogen i bez lebdećih nečistoća. U protivnom, mora ga se profiltrirati kroz papir na temperaturi od približno 30 °C.
- 5.2. Od tako pripremljenog uzorka precizno odvagnuti približno 0,25 g (uz odstupanje do 1 mg) tako pripremljenog uzorka u graduiranoj tikvici od 25 ml, nadopuniti propisanim otapalom do oznake i homogenizirati. Dobiivena otopina mora biti savršeno bistra. Ako je došlo do opalescencije ili zamućenosti, brzo profiltrirati kroz papir.

NAPOMENA: U pravilu je masa od 0,25 – 0,30 g dostatna za mjerenja sposobnosti apsorpcije djevičanskog ili ekstra djevičanskog maslinovog ulja na 268 nm i 270 nm. Za mjerenja na 232 nm uobičajeno je potrebno 0,05 g uzorka te se tako u pravilu pripremaju dvije različite otopine. Za mjerenja sposobnosti apsorpcije ulja komine maslina, rafiniranih maslinovih ulja i krivotvorenih maslinovih ulja, a zbog njihove veće sposobnosti apsorpcije, u pravilu je potrebna manja količina uzorka, npr. 0,1 g.

- 5.3. Prema potrebi ispraviti baznu liniju (220 – 290 nm) otapalom u obje kvarcne kivete (uzorak i referenca), potom napuniti kvarenu kivetu uzorka dobivenom ispitnom otopinom i izmjeriti ekstinkcije na 232, 268 ili 270 nm u odnosu na otapalo koje je upotrijebljeno kao referenca.

Očitane vrijednosti ekstinkcije moraju biti unutar intervala od 0,1 do 0,8 ili unutar linearnog raspona spektrofotometra koji treba provjeriti. Ako nije tako, mjerenja se moraju ponoviti upotrebljavajući, prema potrebi, otopine veće ili manje koncentracije.

- 5.4. Nakon mjerenja sposobnosti apsorpcije na 268 ili 270 nm izmjeriti sposobnost apsorpcije pri λ_{\max} , $\lambda_{\max} + 4$ i $\lambda_{\max} - 4$. Te se vrijednosti sposobnosti apsorpcije upotrebljavaju radi određivanja odstupanja u specifičnoj ekstinkciji (ΔK).

NAPOMENA: smatra se da λ_{\max} iznosi 268 nm za izo-oktan koji se upotrebljava kao otapalo te 270 nm za cikloheksan.

▼M28

6. ISKAZIVANJE REZULTATA
- 6.1. Zabilježiti specifične ekstinkcije (koeficijente ekstinkcije) na različitim valnim duljinama, izračunate kako slijedi:

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{c \times s}$$

pri čemu je:

$K\lambda$ = specifična ekstinkcija na valnoj duljini λ ;

$E\lambda$ = ekstinkcija mjerena na valnoj duljini λ ;

c = koncentracija otopine u g/100 ml;

s = duljina puta kvarcne kivete u cm;

iskazano s dva decimalna mjesta.

- 6.2. Odstupanje specifične ekstinkcije (ΔK)

Odstupanje apsolutne vrijednosti ekstinkcije (ΔK) iskazuje se kao:

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

pri čemu je K_m specifična ekstinkcija na valnoj duljini za maksimalnu apsorpciju na 270 nm i 268 nm ovisno o upotrijebljenom otapalu.

Rezultati trebaju biti iskazani s dva decimalna mjesta.

▼ **M28***PRILOG X.***ODREĐIVANJE METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM**

1. OPSEG

Ovim se Prilogom daju smjernice za određivanje plinskom kromatografijom slobodnih i vezanih masnih kiselina u biljnim mastima i uljima nakon njihovog pretvaranja u metilne estere masnih kiselina (engl. *fatty acid methyl esters* – FAME).

Vežane masne kiseline triacilglicerola (engl. *triacylglycerols* – TAGs) te, ovisno o metodi esterifikacije, slobodne masne kiseline (engl. *free fatty acids* – FFA) pretvaraju se u metilne estere masnih kiselina (FAME) koji se određuju kapilarnom plinskom kromatografijom.

Metodom koja je opisana u ovom Prilogu dozvoljava se određivanje FAME-a od C₁₂ do C₂₄, uključujući zasićene, *cis*- i *trans*-jednostruko nezasićene i *cis*- i *trans*-višestruko nezasićene metilne estere masnih kiselina.

2. PRINCIP

Plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography* – GC) upotrebljava se za kvantitativnu analizu FAME-a. Metilne estere masnih kiselina (FAME) priprema se u skladu s dijelom A. Zatim ih se injektira u injektor u kojem isparavaju. Odjeljivanje FAME-a izvršava se na analitičkoj koloni specifičnog polariteta i duljine. Plameno-ionizacijski detektor (engl. *Flame Ionisation Detector* – FID) upotrebljava se za uočavanje FAME-a. Uvjeti analize navedeni su u dijelu B.

Vodik ili helij mogu se upotrebljavati kao plin nosač (mobilna faza) u plinskoj kromatografiji FAME-a s FID-om. Vodik ubrzava odjeljivanje i daje oštrije pikove. Stacionarna faza je mikroskopski sloj tankog tekućeg filma na inertnoj čvrstoj površini od kvarca.

Kako prolaze kroz kapilarnu kolonu, hlapivi spojevi koje se analizira međusobno djeluju sa stacionarnom fazom ostavljajući premaz na unutarnjoj površini kolone. Zbog takvog različitog međusobnog djelovanja različitih spojeva oni eluiraju u različito vrijeme koje se naziva retencijskim vremenom spoja za dani skup analitičkih parametara. Usporedba retencijskih vremena upotrebljava se za identifikaciju različitih spojeva.

DIO A.

PRIPREMA METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA IZ MASLINOVOG ULJE I ULJA KOMINE MASLINA

1. OPSEG

U ovom se dijelu navodi način pripreme metilnih estera masnih kiselina. Njime su obuhvaćene metode pripreme metilnih estera masnih kiselina iz maslinovog ulja i ulja komine maslina.

2. PODRUČJE PRIMJENE

Priprema metilnih estera masnih kiselina iz maslinovog ulja i ulja komine maslina vrši se postupkom transesterifikacije s otopinom kalijeveg hidroksida u metanolu na sobnoj temperaturi. Pitanje potrebe za pročišćavanjem uzorka prije transesterifikacije ovisi o sadržaju slobodnih masnih kiselina u uzorku i analitičkom parametru koji treba odrediti, a koji je moguće odabrati u skladu sa sljedećom tablicom:

▼ **M28**

Kategorija ulja	Metoda
Djevičansko maslinovo ulje kiselosti $\leq 2,0$ %	1. Masne kiseline 2. Trans-masne kiseline 3. Δ ECN42 (nakon pročišćavanja silikagelom ekstrakcijom na čvrstoj fazi)
Rafinirano maslinovo ulje	
Maslinovo ulje koje se sastoji od rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja	
Rafinirano ulje komine maslina	
Ulje komine maslina	
Djevičansko maslinovo ulje kiselosti $> 2,0$ % Sirovo ulje komine maslina	1. Masne kiseline (nakon pročišćavanja silikagelom ekstrakcijom na čvrstoj fazi) 2. Trans-masne kiseline (nakon pročišćavanja silikagelom ekstrakcijom na čvrstoj fazi) 3. Δ ECN42 (nakon pročišćavanja silikagelom ekstrakcijom na čvrstoj fazi)

3. METODOLOGIJA

3.1. **Transesterifikacija s otopinom kalijevog hidroksida u metanolu na sobnoj temperaturi**3.1.1. *Princip*

Metilni esteri formiraju se transesterifikacijom s otopinom kalijevog hidroksida u metanolu, kao međuprodukti prije nego što nastupi saponifikacija.

3.1.2. *Reagensi*

3.1.2.1. Metanol koji ne sadržava više od 0,5 % (m/m) vode.

3.1.2.2. Heksan, kromatografske čistoće.

3.1.2.3. Heptan, kromatografske čistoće.

3.1.2.4. Dietilni eter, stabiliziran za analizu.

3.1.2.5. Aceton, kromatografske čistoće.

3.1.2.6. Otapalo za eluiranje za čišćenje ulja kolonskom/SPE kromatografijom, smjesa heksana/dietil etera 87/13 (v/v).

3.1.2.7. Kalijev hidroksid, otopina u metanolu koncentracije oko 2 mol/l: otopiti 11,2 g kalijevog hidroksida u 100 ml metanola.

3.1.2.8. Silikagel ulošci, 1 g (6 ml) za ekstrakciju na čvrstu fazu.

3.1.3. *Oprema*

3.1.3.1. Epruvete volumena 5 ml s navojnim čepom s PTFE spojem.

3.1.3.2. Graduirane ili automatske pipete od 2 ml i 0,2 ml.

▼ **M28**3.1.4. *Pročišćavanje uzoraka ulja*

Prema potrebi se uzorak pročišćava prolaskom ulja kroz silikagel uloške za ekstrakciju na čvrstu fazu. Silikagel uložak (3.1.2.8.) se stavi u vakuumski instrument za eluaciju i ispere pod vakuumom sa 6 ml heksana (3.1.2.2.); ispiranje se odvija bez vakuuma. Zatim se otopina ulja (približno 0,12 g) u 0,5 ml heksana (3.1.2.2.) stavi u kolonu. Kad otopina proдре u silikagel, eluira se pod vakuumom s 10 ml smjese heksana/dietil etera (87:13 v/v) (3.1.2.6.). Ukupni eluat se homogenizira i podjeli na dva po volumenu približno jednaka dijela. Alikvot se upari do suhoće rotirajućim isparivačem pod sniženim tlakom na sobnoj temperaturi. Ostatak se otopi u 1 ml heptana te je otopina spremna za analizu masnih kiselina plinskom kromatografijom. Drugi alikvot se upari, a ostatak otopi u 1 ml acetona za analizu triglicerida HPLC metodom, ako je potrebno.

3.1.5. *Postupak*

U epruvetu s navojnim čepom volumena 5 ml (3.1.3.1.) odvagati oko 0,1 g uzorka ulja. Dodati 2 ml heptana (3.1.2.2.) i protresti. Dodati 0,2 ml otopine kalijeveg hidroksida u metanolu (3.1.2.7.), zatvoriti čepom s PTFE spojem, čvrsto zatvoriti i jako tresti 30 sekundi. Ostaviti da se slegne dok se gornja otopina ne razbistri. Dekantirati gornji sloj koji sadrži metilne estere. Heptanska otopina spremna je za injektiranje u plinski kromatograf. Preporučuje se čuvanje otopine u hladnjaku do plinsko-kromatografske analize. Ne preporučuje se čuvanje otopine dulje od 12 sati.

DIO B.

ANALIZA METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM1. **OPSEG**

U ovom se dijelu daju opće smjernice za primjenu kapilarne plinske kromatografije radi utvrđivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava smjese metilnih estera masnih kiselina dobivenih u skladu s metodom utvrđenom u dijelu A.

Ovaj se dio ne primjenjuje na polimerizirane masne kiseline.

2. **REAGENSI**2.1. **Plin nosač**

Inertni plin (helij ili vodik), temeljito osušen, sa sadržajem kisika manjim od 10 mg/kg.

Napomena 1.: Vodikom se može udvostručiti brzina analize, no opasan je. Dostupni su sigurnosni uređaji.

2.2. **Pomoćni plinovi**

2.2.1. Vodik (čistoće $\geq 99,9$ %), bez organskih nečistoća.

2.2.2. Zrak ili kisik, bez organskih nečistoća.

2.2.3. Dušik (čistoće > 99 %).

2.3. **Referentni standard**

Smjesa metilnih estera čistih masnih kiselina ili metilnih estera masti poznatog sastava, po mogućnosti nalik onoj masne tvari koju se analizira. Cis-izomeri i trans-izomeri oktadecenoičnih, oktadekadienoičnih i oktadekatrienoičnih metilnih estera korisni su za identifikaciju trans-izomera nezasićenih kiselina.

Posebnu pažnju potrebno je posvetiti sprečavanju oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina.

▼ **M28**

3. OPREMA

Navedene upute odnose se na uobičajenu opremu koja se upotrebljava za plinsku kromatografiju, uključujući kapilarne kolone i plameno-ionizacijski detektor.

3.1. **Plinski kromatograf**

Plinski kromatograf treba sadržavati sljedeće elemente.

3.1.1. *Sustav za injektiranje*

Upotrijebiti sustav za injektiranje s kapilarnim kolonama, u kojem slučaju sustav za injektiranje treba biti izrađen posebno za upotrebu s takvim kolonama. Po vrsti injektor može biti s dijeljenjem uzorka ili bez dijeljenja uzorka u koloni.

3.1.2. *Peć*

Peć je u stanju zagrijati kapilarnu kolonu na temperaturu od najmanje 260 °C i održavati željenu temperaturu unutar 0,1 °C. Ovaj posljednji zahtjev posebno je važan kad se upotrebljava kvarcna cijev.

U svim se slučajevima preporučuje upotreba zagrijavanja programiranom temperaturom, a posebno za masne kiseline koje imaju manje od 16 atoma ugljika.

3.1.3. *Kapilarna kolona*

3.1.3.1. Cijev, izrađena od materijala koji je inertan u odnosu prema tvari koja će se analizirati (uobičajeno, staklo ili kvarc). Unutarnji promjer je između 0,20 i 0,32 mm. Unutarnju površinu obrađuje se na odgovarajući način (na primjer pripremanje površine, deaktiviranje) prije nanošenja premaza stacionarne faze. Za masne kiseline i cis- i trans-izomere masnih kiselina dostatna je duljina od 60 m.

3.1.3.2. Prikladne su i vezane odnosno umrežene stacionarne faze tipa polarni polisiloksan (cijanosilikoni).

Napomena 2.: Postoji opasnost od mogućnosti da polarni polisiloksani prouzroče poteškoće pri identificiranju i odjeljivanju linolenske kiseline i C₂₀ kiselina.

Premazi su tanki, odnosno, od 0,1 do 0,2 µm.

3.1.3.3. *Sastavljanje i kondicioniranje kolone*

Uvažavati normalne mjere predostrožnosti pri sastavljanju kapilarnih kolona, odnosno namještanje kolone u peći (nositelj), odabir i sastavljanje priključaka (čvrsto zabrtvljeni da ne bi došlo do curenja), pozicioniranje krajeva kolone u injektoru i na detektoru (smanjivanje slobodnog (neiskorištenog) volumena). Kolonu staviti pod struju plina nosača (na primjer 0,3 bar (30 kPa) za kolonu duljine 25 m i unutarnjeg promjera 0,3 mm).

Kolonu kondicionirati temperaturnim programiranjem peći na 3 °C/min od temperature okoline na temperaturu koja je 10 °C niža od granične temperature raspadanja stacionarne faze. Održavati ovu temperaturu peći jedan sat, dok se bazna linija ne stabilizira. Vratiti ju na 180 °C da bi radila u izotermnim uvjetima.

Napomena 3.: Odgovarajuće unaprijed kondicionirane kolone dostupne su u slobodnoj trgovini.

3.1.4. *Plameno-ionizacijski detektor i pretvarač s pojačalom*3.2. **Štrcaljka**

Štrcaljka ima maksimalni volumen 10 µl i graduirana je s podjelom po 0,1 µl.

3.3. **Sustav prikupljanja podataka**

Sustav prikupljanja podataka internetski povezan s detektorima i u kojem se upotrebljava računalni program prikladan za integraciju i normalizaciju pika.

▼ **M28**

4. POSTUPAK

Aktivnosti opisane u točkama od 4.1. do 4.3. odnose se na upotrebu plameno-ionizacijskog detektora.

4.1. Uvjeti ispitivanja

4.1.1. Odabir optimalnih radnih uvjeta za kapilarne kolone

Zbog učinkovitosti i propusnosti kapilarne kolone odjeljivanje sastojaka i trajanje analize uvelike ovise o brzini protoka plina nosača kroz kolonu. Stoga je potrebno optimizirati radne uvjete djelovanjem na ovaj parametar (ili, jednostavnije, na glavni gubitak kolone), ovisno o tome želi li se poboljšati odjeljivanje ili ubrzati analiza.

Sljedeći su se uvjeti pokazali prikladni za odjeljivanje FAME-ova (C_4 do C_{26}). Primjeri kromatograma prikazani su u Dodatku B:

Temperatura injektora:	250 °C
Temperatura detektora:	250 °C
Temperatura peći:	165 °C (8 min) do 210 °C na 2 °C/min
Plin nosač vodik:	pritisak na vrhu kolone, 179 kPa
Ukupni protok:	154,0 ml/min
Omjer razdvajanja:	1:100
Volumen injektiranja:	1 µl

4.1.2. Određivanje rezolucije (vidi Dodatak A)

Izračunati rezoluciju R dva susjedna pika I i II upotrebljavajući sljedeću formulu:

$$R = 2 \times ((d_{r(II)} - d_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ or } R = 2 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ (USP) (engl. United States Pharmacopeia),}$$

ili

$$R = 1,18 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)})/(\omega_{0,5(I)} + \omega_{0,5(II)})) \text{ (EP, BP, JP, DAB) (JP (engl. Japanese Pharmacopeia), EP (fr. Pharmacopée Européenne), BP (engl. British Pharmacopeia))}$$

pri čemu je:

$d_{r(I)}$ retencijska udaljenost pika I;

$d_{r(II)}$ retencijska udaljenost pika II;

$t_{r(I)}$ retencijsko vrijeme pika I;

$t_{r(II)}$ retencijsko vrijeme pika II;

$\omega_{(I)}$ širina baze pika I;

$\omega_{(II)}$ širina baze pika II;

$\omega_{0,5}$ širina pika određenog spoja, na srednjoj visini pika;

Ako je $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$, izračunati R upotrebljavajući sljedeće formule:

$$R = (d_{r(II)} - d_{r(I)})/\omega = (d_{r(II)} - d_{r(I)})/4\sigma$$

pri čemu je:

σ standardno odstupanje (vidi Dodatak A, sliku 1.).

▼ **M28**

Ako je udaljenost dr između dva pika $d_{r(II)} - d_{r(I)}$ jednaka 4σ , faktor rezolucije $R = 1$.

Ako dva pika nisu u potpunosti razdvojena, tangente na točkama infleksije dva pika križaju se u točki C. Radi potpunog razdvajanja dva pika udaljenost između dva pika mora biti jednaka:

$$d_{r(II)} - d_{r(I)} = 6 \sigma \text{ iz čega je } R = 1,5 \text{ (vidi Dodatak A, sliku 3.)}$$

5. ISKAZIVANJE REZULTATA

5.1. **Kvalitativna analiza**

Identificirati pikove metilnog estera za uzorak iz kromatograma u Dodatku B., slici 1., ako je potrebno interpolacijom ili njihovom usporedbom s referentnim mješavinama smjesa metilnih estera (kako je navedeno u točki 2.3.).

5.2. **Kvantitativna analiza**5.2.1. *Određivanje sastava*

Izračunati odlomke mase w_i pojedinačnih metilnih estera masnih kiselina, iskazane kao maseni udio metilnih estera, kako slijedi:

5.2.2. *Metoda izračunavanja*5.2.2.1. *Općeniti slučaj*

Izračunati sadržaj danog sastojka i , iskazan kao maseni udio metilnih estera, određivanjem postotka kojega predstavlja površina odgovarajućeg pika u odnosu na zbroj površina svih pikova, upotrebljavajući sljedeću formulu:

$$w_i = (A_i/\Sigma A) \times 100$$

pri čemu je:

A_i površina ispod pika pojedinačnih metilnih estera masnih kiselina i ;

ΣA zbroj površina pod svim pikovima svih pojedinačnih metilnih estera masnih kiselina.

Rezultate se iskazuje s dva decimalna mjesta.

Napomena 4.: Za masti i ulja odlomak mase metilnih estera masnih kiselina jednak je odlomku mase triacilglicerola u gramima na 100 g. U slučajevima u kojima ova pretpostavka nije dopuštena, vidi točku 5.2.2.2.

5.2.2.2. *Upotreba korekcijskih faktora*

U određenim slučajevima, na primjer kad su prisutne masne kiseline s manje od osam atoma ugljika ili kiselina sa sekundarnim skupinama, vrše se korekcije površine s pomoću specifičnih korekcijskih faktora (F_{ci}). Te se faktore određuje za svaki pojedinačni instrument. U tu se svrhu upotrebljavaju prikladni referentni materijali čiji je sastav masnih kiselina odgovarajućeg raspona.

Napomena 5.: Ti korekcijski faktori nisu identični teoretskim korekcijskim faktorima FID-a koji su navedeni u Dodatku A s obzirom na to da uključuju i radnu učinkovitost sustava za injektiranje itd. Međutim, u slučaju većih razlika treba provjeriti radnu učinkovitost cijelog sustava.

▼M28

Za ovu referentnu smjesu maseni udio FAME i zadan je sljedećom formulom:

$$w_i = (m_i / \Sigma m) \times 100$$

pri čemu je:

m_i masa FAME i u referentnoj smjesi;

Σm zbroj masa raznih sastojaka kao FAME-ovi referentne smjese.

Iz kromatograma referentne smjese izračunati postotak po površini za FAME i kako slijedi:

$$w_i = (A_i / \Sigma A) \times 100$$

pri čemu je:

A_i površina FAME i u referentnoj smjesi;

ΣA zbroj svih površina svih FAME-ova referentne smjese.

Korekcijski faktor F_c tada je

$$F_c = (m_i \times \Sigma A) / (A_i \times \Sigma m)$$

Za uzorak maseni udio svakog FAME i je:

$$w_i = (F_i \times A_i) / \Sigma (F_i \times A_i)$$

Rezultate se iskazuje s dva decimalna mjesta.

Napomena 6.: Izračunata vrijednost odgovara masenom udjelu pojedinačnih masnih kiselina izračunatih kao triacilgliceroli na 100 g masti.

5.2.2.3. Upotreba internog standarda

U nekim analizama (na primjer gdje nisu sve masne kiseline kvantificirane, kao kad su prisutne kiseline sa četiri i šest ugljika zajedno s kiselinama sa 16 i 18 ugljika, ili kad je potrebno odrediti apsolutnu količinu masnih kiselina u nekom uzorku) potrebno je upotrebljavati interni standard. Često se upotrebljavaju masne kiseline s 5, 15 ili 17 ugljika. Potrebno je odrediti korekcijski faktor (ako postoji) za interni standard.

Maseni udio sastojka i , iskazan kao metilni esteri, zadan je formulom:

$$w_i = (m_{IS} \times F_i \times A_i) / (m \times F_{IS} \times A_{IS})$$

pri čemu je:

A_i je površina FAME i ;

A_{IS} je površina internog standarda;

F_i je korekcijski faktor masne kiseline i , iskazan kao FAME;

F_{IS} je korekcijski faktor internog standarda;

m je masa uzorka za ispitivanje u miligramima;

m_{IS} je masa internog standarda u miligramima.

Rezultate se iskazuje s dva decimalna mjesta.

▼ M28**6. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU**

U izvješću o ispitivanju navode se metode upotrijebljene za pripremu metilnih estera i za plinsku kromatografsku analizu. Sadržava i sve pojedinosti djelovanja koje nisu navedene u ovoj standardnoj metodi ili se smatraju opcionalnima zajedno s pojedinostima o bilo kojem događaju koji je mogao utjecati na rezultate.

Izvješće o ispitivanju uključuje sve informacije potrebne za potpunu identifikaciju uzorka.

7. PRECIZNOST**7.1. Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja**

Pojedinosti međulaboratorijskog ispitivanja o preciznosti metode navedene se u Prilogu C normi IOC/T.20/dok. br. 33. Vrijednosti izvedene iz ovog međulaboratorijskog ispitivanja možda neće biti primjenjive na raspon koncentracija i matrice koji se razlikuju od zadanih.

7.2. Ponovljivost

Apsolutna razlika između rezultata dvaju nezavisnih pojedinačnih ispitivanja koje je primjenom iste metode na jednakom ispitnom materijalu u istom laboratoriju u kratkom vremenskom intervalu izvršio isti analitičar upotrebljavajući istu opremu ne smije u više od 5 % slučajeva biti veća od r zadanog u tablicama 1. do 14. u Prilogu C normi IOC/T.20/dok. br. 33.

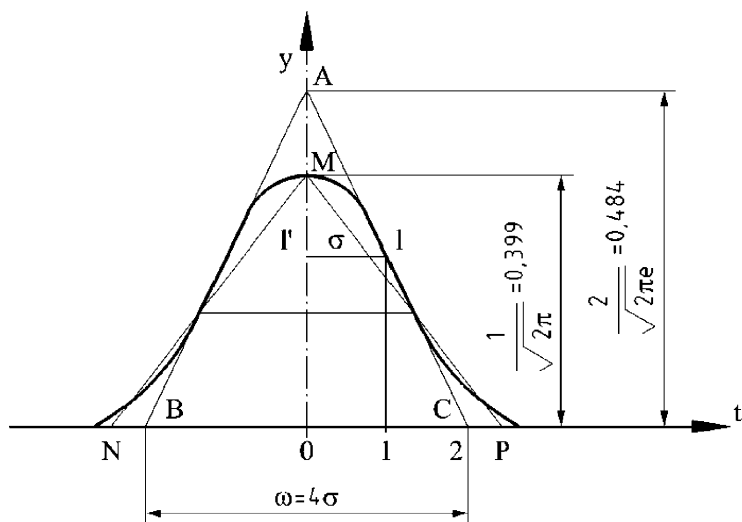
7.3. Obnovljivost

Apsolutna razlika između rezultata dvaju nezavisnih pojedinačnih ispitivanja koja su primjenom iste metode na jednakom ispitnom materijalu u različitim laboratorijima izvršili različiti analitičari upotrebljavajući različitu opremu ne smije u više od 5 % slučajeva biti veća od R zadanog u tablicama 1. do 14. u Prilogu C normi IOC/T.20/dok. br. 33.

▼ M28

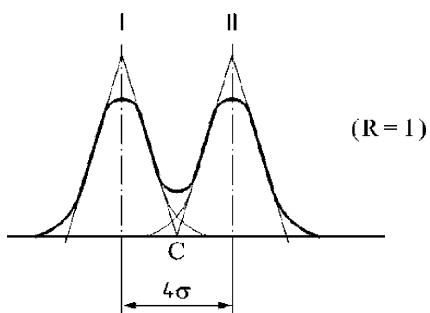
Dodatak A

Slika 1.

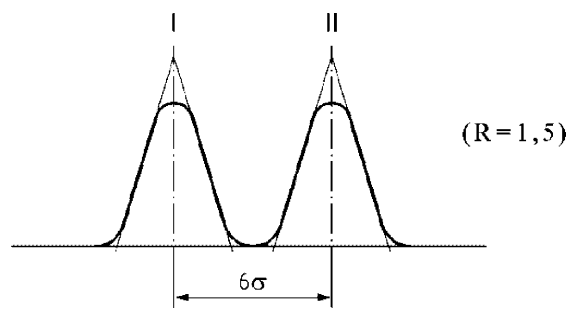


$\omega_{0,5}$ širinom na pola visine trokuta (ABC) i b širinom na pola visine trokuta (NPM).

Slika 2.



Slika 3.

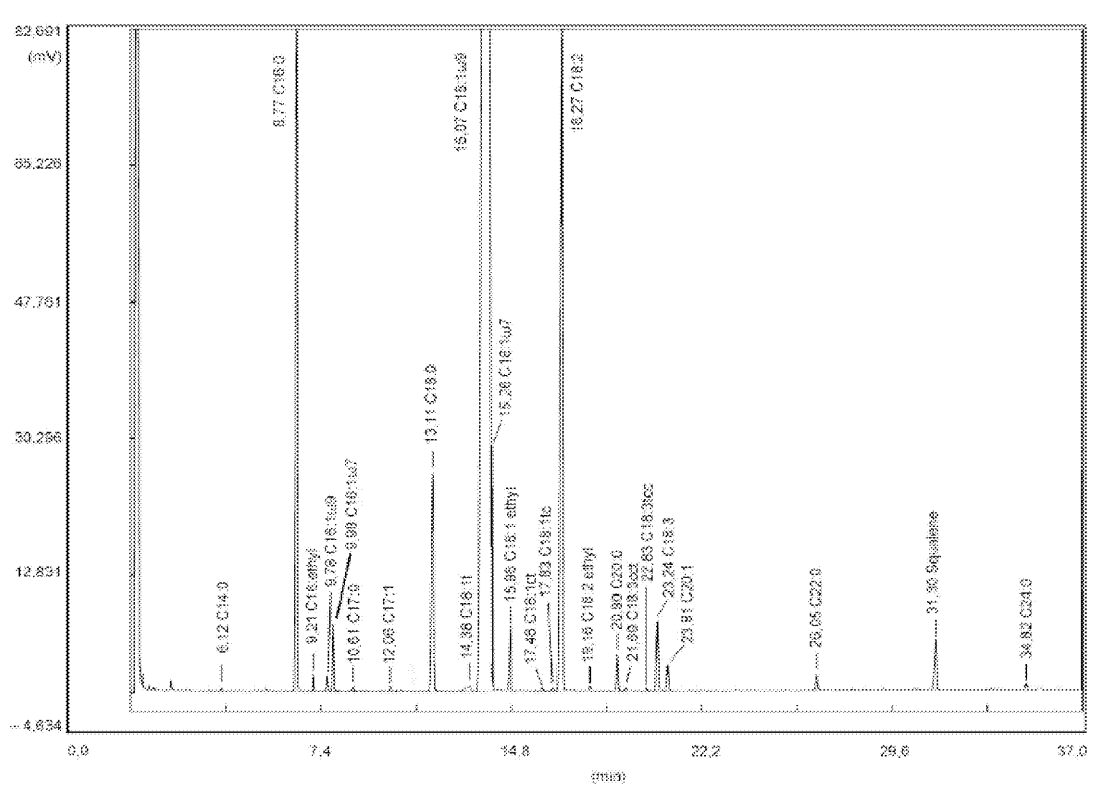


▼M28

Dodatak B

Slika 1.

Plinsko-kromatografski profil dobiven metodom hladne metilacije iz ulja komine maslina



Kromatografski pikovi odgovaraju metilnim i etilnim esterima, osim ako nije drukčije navedeno.



PRILOG XI.

**ODREĐIVANJE SADRŽAJA HLAPIVIH HALOGENIRANIH OTAPALA
U MASLINOVOM ULJU**

1. METODA
Analiza plinskom kromatografijom uz korištenje „head space” tehnike.
2. OPREMA
 - 2.1. Uređaj za plinsku kromatografiju opremljen detektorom zahvata elektrona (ECD).
 - 2.2. Uređaj „head space”.
 - 2.3. Staklena kolona za plinsku kromatografiju, duljine 2 m i promjera 2 mm, stacionarna faza faza OV 10110 % ili ekvivalent, na nositelju od kalcinirane, diatomejske zemlje, oprane kiselinom i silanizirane, veličine čestica 80 do 100 mesh.
 - 2.4. Nosač i pomoćni plin: dušik za plinsku kromatografiju, odgovarajući za detekciju zahvatom elektrona.
 - 2.5. Staklene tikvice od 10 do 15 ml, s teflonskim slojem i aluminijskim čepom kroz kojeg se može uvesti štrcaljka.
 - 2.6. Spojnice za hermetičko zatvaranje.
 - 2.7. Štrcaljka za plin između 0,5 i 2 ml.
3. REAGENSI
Standard: halogenirana otapala čiji stupanj čistoće odgovara za plinsku kromatografiju.
4. POSTUPAK
 - 4.1. Točno odvagajte oko 3 g ulja u staklenoj tikvici (koja se neće ponovno koristiti); hermetički ju začepite. Stavite ju u termostat na 70 °C na sat vremena. Koristeći štrcaljku pažljivo izuzmite između 0,2 i 0,5 ml „head space”-a (parne faze). Injektirajte ju u kolonu uređaja za plinsku kromatografiju namještenoj kako slijedi:
 - temperatura injektora: 150 °C,
 - temperatura kolone: 70 do 80 °C,
 - temperatura detektora: 200 do 250 °C.Mogu se koristiti i druge temperature pod uvjetom da rezultati ostanu ekvivalentni.
 - 4.2. Referentne otopine: pripremite standardne otopine koristeći rafinirano maslinovo ulje bez tragova otapala u koncentracijama u rasponu od 0,05 do 1 ppm (mg/kg) i koji odgovaraju pretpostavljenom sadržaju uzorka. Halogenirana otapala mogu se razrijediti korištenjem pentana.
 - 4.3. Kvantitativna prosudba: usporedite površine ili visine pikova uzorka i standardne otopine one koncentracije za koju pretpostavljate da je najpribližnija. Ako je odstupanje veće od 10 %, treba ponoviti analizu uz uspoređivanje s nekom drugom otopinom standarda dok odstupanje ne bude manje od 10 %. Sadržaj se određuje na temelju prosjeka elementarnih injiciranja.
 - 4.4. Iskazivanje rezultata: u ppm (mg/kg). Granica detekcije za ovu metodu je 0,01 mg/kg.

▼ M26

PRILOG XII.

POSTUPAK MEĐUNARODNOG VIJEĆA ZA MASLINE ZA
ORGANOLEPTIČKU OCJENJIVANJE DJEVIČANSKOG MASLINOVA
ULJA▼ M28

1. SVRHA I OPSEG

Svrha je međunarodne metode, koja je opisana u ovom Prilogu, određivanje postupka ocjenjivanja organoleptičkih svojstava djevičanskog maslinova ulja u smislu točke 1. dijela VIII. Priloga VII. Uredbi (EZ) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća ⁽¹⁾ te utvrđivanje metode za njegovu klasifikaciju na temelju tih svojstava. Sadržava i upute za neobvezno označivanje.

Opisana metoda primjenjuje se samo na djevičanska maslinova ulja i na klasifikaciju ili označivanje takvog ulja na temelju intenziteta uočenih mana i vočnosti koje je utvrdila skupina odabranih, obučeni i praćeni ocjenjivača koji sačinjavaju komisiju.

Norme IOC-a navedene u ovom Prilogu upotrebljavaju se u njihovoj posljednjoj dostupnoj verziji.

▼ M26

2. OPĆENITI TEMELJNI RJEČNIK SENZORNE ANALIZE

Vidi normu IOC/T.20/dok. br. 4. „Senzorska analiza: Opći osnovni rječnik”

3. SPECIFIČNI RJEČNIK

3.1. **Negativna svojstva**

Pljesnivo/blatno Aroma karakteristična za ulje dobiveno iz maslina koje su bile naslagane u hrpama ili uskladištene i kod kojih je došlo do visokog stupnja anaerobne fermentacije, ili ulje koje je ostalo u dodiru s talogom koji se stvara u podzemnim rezervoarima i spremnicima i koje je bilo izloženo i procesu anaerobne fermentacije.

Ustajalo-vlažno-zemljasto Aroma karakteristična za ulja dobivena iz plodova na kojima su se, zbog skladištenja u vlažnim uvjetima tijekom razdoblja od nekoliko dana, razvile brojne gljivice i kvasci ili za ulje dobiveno iz maslina koje su sakupljene s ostacima zemlje ili blata i nisu oprane.

Vinski-octikavo-kiselo-kiselkasto Aroma karakteristična za nekaulja koja podsjeća na vino ili ocat. Ovu je aromu uglavnom uzrokovao proces aerobne fermentacije u plodovima ili ostacima maslinova tijesta na neodgovarajuće očišćenim filter-slojnicama, što dovodi do stvaranja octene kiseline, etil acetata i etanola.

Užeglo Aroma ulja koja su bila izložena intenzivnim oksidacijskim procesima.

Smrznute masline (mokro drvo) Aroma karakteristična za ulja dobivena od maslina koje su bile smrznute na stablu.

⁽¹⁾ Uredba (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća od 17. prosinca 2013. o uspostavljanju zajedničke organizacije tržišta poljoprivrednih proizvoda i stavljanju izvan snage uredbi Vijeća (EEZ) br. 922/72, (EEZ) br. 234/79, (EZ) br. 1037/2001 i (EZ) br. 1234/2007 (SL L 347, 20.12.2013., str. 671.).

▼ **M28**3.1.1. *Ostala negativna svojstva*

<i>Zagrijano ili zagoreno</i>	Aroma karakteristična za ulja koja su bila izložena pretjeranom i/ili dugotrajnom zagrijavanju tijekom prerade, posebno u slučaju kad se miješanje provodilo u neprikladnim temperaturnim uvjetima.
<i>Sijeno-drvo</i>	Aroma karakteristična za neka ulja proizvedena od maslina koje su se posušile.
<i>Grubo</i>	Osjećaj gustoće i pastoznosti u ustima koji daju pojedina stara ulja.
<i>Strojno ulje</i>	Aroma ulja koja podsjeća na naftu, ulje za podmazivanje ili mineralno ulje.
<i>Biljna voda</i>	Aroma kakvu ulje poprima zbog dužeg dodira s biljnom vodom koja je podvrgnuta fermentacijskim procesima.
<i>Salamura</i>	Aroma ulja dobivenog iz maslina koje su čuvane u salamuri.
<i>Metalno</i>	Aroma koja podsjeća na metal. Karakteristična je za ulja koja su bila u dužem dodiru s metalnim površinama tijekom drobljenja, miješanja, prešanja ili skladištenja.
<i>Oporo</i>	Aroma karakteristična za ulje dobiveno iz maslina koje su prešane na novim filter-slojnicama. Aroma se može razlikovati ovisno o tome jesu li filter-slojnice napravljene od zelene trave esparto ili sušene trave esparto.
<i>Crvljivo</i>	Aroma karakteristična za ulje dobiveno iz maslina koje su napale ličinke maslinine muhe (<i>Bactrocera oleae</i>).
<i>Krastavac</i>	Aroma koja nastaje kad je ulje predugo hermetički zatvoreno, posebno u limenim spremnicima, a pripisuje se stvaranju 2,6 nonadienala.

3.2. **Pozitivna svojstva**

<i>Voćno</i>	Skup mirisnih osjeta koji ovisi o sorti karakterističan za ulje od zdravih i svježih maslina, bilo dozrelih ili nedozrelih. Zapaža se izravno i/ili u stražnjem dijelu nosa.
<i>Gorko</i>	Primarni okus karakterističan za ulje dobiveno od zelenih maslina ili maslina koje su tek počele mijenjati boju. Opaža se putem okruženih papila porodanih na jeziku u obliku slova „V”.
<i>Oštro</i>	Taktilni osjećaj peckanja svojstven uljima proizvedenima na početku godine usjeva, uglavnom još od nedozrelih maslina. Može se raspoznati po cijeloj usnoj šupljini, a posebno u grlu.

▼ **M29**3.3. **Neobvezna terminologija u svrhe označivanja**

Predsjednik komisije može na zahtjev izdati potvrdu da ocjenjivana ulja odgovaraju definicijama i intervalima koji na temelju intenziteta i percepcije svojstava odgovaraju isključivo sljedećim izrazima.

▼ **M29**

Pozitivna svojstva (voćno, gorko, oštro): prema intenzitetu percepcije:

— *Intenzivno*, kad je medijan svojstva veći od 6,

— *Srednje*, kad je medijan svojstva između 3 i 6,

— *Blago*, kad je medijan svojstva manji od 3.

Voćnost Skup mirisnih osjećaja karakterističan za ulja, koji ovisi o sorti masline i nastaje od zdravih i svježih maslina u kojima ne prevladava ni zelena ni zrela voćnost. Zapaža se izravno i/ili u stražnjem dijelu nosa.

Zelena voćnost Skup mirisnih osjećaja karakterističan za ulja, koji podsjeća na zeleno voće, ovisi o sorti masline i nastaje od zelenih, zdravih i svježih maslina. Zapaža se izravno i/ili u stražnjem dijelu nosa.

Zrela voćnost Skup mirisnih osjećaja karakterističan za ulja, koji podsjeća na zrelo voće, ovisi o sorti masline i nastaje od zdravih i svježih maslina. Zapaža se izravno i/ili u stražnjem dijelu nosa.

Skladno Ulje koje ne pokazuje neuravnoteženost, čime se misli na mirisno-okusni i osjetilni doživljaj gdje je medijan za svojstvo gorčine i medijan za svojstvo oštine veći od medijana voćnosti za najviše dvije točke.

Blago ulje Ulje čiji je medijan za svojstva gorčine i oštine 2 ili manji.

Popis izraza prema intenzitetu percepcije:

Izrazi za koje je potrebno dostaviti certifikat o organoleptičkom ocjenjivanju	Medijan svojstva
voćnost	—
zrela voćnost	—
zelena voćnost	—
blaga voćnost	manje od 3
srednja voćnost	između 3 i 6
intenzivna voćnost	više od 6
blaga zrela voćnost	manje od 3
srednja zrela voćnost	između 3 i 6
intenzivna zrela voćnost	više od 6
blaga zelena voćnost	manje od 3

▼ **M29**

Izrazi za koje je potrebno dostaviti certifikat o organoleptičkom ocjenjivanju	Medijan svojstva
srednja zelena voćnost	između 3 i 6
intenzivna zelena voćnost	više od 6
blaga gorčina	manje od 3
srednja gorčina	između 3 i 6
intenzivna gorčina	više od 6
blaga oštrina	manje od 3
srednja oštrina	između 3 i 6
intenzivna oštrina	više od 6
Skladno ulje	Medijan za svojstvo gorčine i medijan za svojstvo oštrine veći je od medijana voćnosti za najviše dvije točke.
Blago ulje	Medijan za svojstva gorčine i oštrine nije veći od 2

▼ **M26**

4. ČAŠA ZA ORGANOLEPTIČKO OCJENJIVANJE ULJA

Vidi normu IOC/T.20/dok. br. 5. „Čaša za organoleptičko ocjenjivanje ulja”.

5. PROSTOR ZA ORGANOLEPTIČKO OCJENJIVANJE

Vidi normu IOC/T.20/Doc. br. 6. „Vodič za uređivanje prostora za organoleptičko ocjenjivanje”.

6. PRIBOR

The following accessories, which are required by tasters to perform their task properly, must be supplied in each booth and must be within easy reach: Da bi organoleptički ocjenjivači mogli pravilno provesti svoj zadatak, u svakom odjeljku nadohvat ruke treba se nalaziti sljedeći pribor:

- čaše (standardizirane) koje sadrže uzorke označene šifrom, ostavljene poklopljenima satnim stakalcem na temperaturi $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
- obrazac za ocjenjivanje (vidi Sliku 1.) u tiskanom obliku ili u elektronskom obliku pod uvjetom da su zadovoljeni uvjeti obrasca za prosudbu i, ako je potrebno, s uputama za njegovo korištenje;
- kemijska olovka ili neizbrisiva tinta;
- pladnjevi s kriškama jabuke i/ili vodom, gaziranom vodom i/ili prepečenjem;
- čaša vode sobne temperature;
- list u kojem se podsjeća na opća pravila navedena u odjeljcima 8.4. i 9.1.1.;
- pljuvačnice.

▼ M26**7. PREDSEDNIK KOMISIJE I OCJENJIVAČI****7.1. Predsjednik komisije**

Predsjednik komisije treba biti odgovarajuće osposobljen sa stručnim poznavanjem vrsti ulja s kojima će se susretati tijekom svojeg rada. On je ključna osoba u komisiji i odgovoran je za njezinu organizaciju i djelovanje.

Rad predsjednika komisije zahtijeva osnovnu obuku o alatima senzorske analize, senzorske vještine, pedantnost prilikom pripremanja, organizacije i ocjenjivanja te vještinu i strpljivost potrebne za planiranje i provođenje ocjenjivanja na znanstveni način.

On je jedina osoba odgovorna za odabir, obuku i nadzor ocjenjivača s ciljem potvrđivanja njihove razine sposobnosti. Predsjednik je stoga odgovoran za procjenu ocjenjivača koji uvijek trebaju biti objektivni i za koje moraju razviti posebne postupke koji se temelje na testovima i čvrstim kriterijima prihvatanja i odbijanja. Vidi normu IOC/T.20/Doc. br. 14. „Vodič za odabir, obuku i nadzor kvalificiranih ocjenjivača djevičanskog maslinova ulja.”

Predsjednici komisije odgovorni su za rad komisije i stoga i za njezino ocjenjivanje za koje moraju dati pouzdan i objektivan dokaz. U svakom slučaju, oni u svakom trenutku moraju dokazati da su metoda i ocjenjivači pod kontrolom. Preporučuje se periodička kalibracija komisije (IOC/T.20/dok. br. 14, § 5.).

Oni snose krajnju odgovornost za čuvanje evidencije komisije. Ta evidencija uvijek mora biti sljediva. Oni moraju ispuniti zahtjeve za osiguravanje i kvalitetu utvrđene u međunarodnim normama za senzorsku analizu i u svakom trenutku osigurati anonimnost uzoraka.

Oni su odgovorni za inventuru i osiguravanje da su aparatura i oprema potrebni za ispunjenje zahtjeva iz specifikacija ove metode odgovarajuće čisti i održavani i o tome moraju oditi pisane dokaze, kao i o usklađenosti s uvjetima ocjenjivanja.

Oni su odgovorni za primanje i čuvanje uzoraka po njihovom dolasku u laboratorij, kao i o njihovom čuvanju nakon ocjenjivanja. Pri tome oni u svakom trenutku osiguravaju anonimnost i ispravno skladištenje uzoraka zbog čega moraju razviti pisane postupke kako bi se osiguralo da čitav proces bude sljediv i osiguran.

Nadalje, odgovorni su za pripremanje i kodiranje uzoraka i njihovu podjelu organoleptičkim ocjenjivačima u skladu s odgovarajućim načinom ispitivanja koji odgovara prethodno utvrđenim protokolima, kao i za prikupljanje i statističku obradu podataka dobivenih od ocjenjivača.

Oni su nadležni za razvoj i izradu nacрта svih drugih postupaka koji bi mogli biti potrebni za nadopunu ove norme i za osiguravanje ispravnog rada komisije.

Oni moraju tražiti načine za usporedbu rezultata komisije s onima koje su dobili od drugih komisija koje su obavile analizu djevičanskog maslinova ulja kako bi potvrdili da komisija radi ispravno.

▼ M26

Dužnost je predsjednika komisije i motiviranje članova komisije poticanjem interesa, radoznalosti i natjecateljskog duha među njima. U tu svrhu preporučuje im se da osiguraju neometani dvostrani protok informacija s članovima komisije informirajući ih o svim zadacima koje obavljaju i o dobivenim rezultatima. Uz to, oni trebaju osigurati da neće odati svoje mišljenje i trebaju spriječiti moguće voditelje da svoje kriterije nametnu drugim ocjenjivačima.

Trebaju dovoljno rano okupiti ocjenjivače i odgovoriti na sve upite koji se odnose na provođenje ocjenjivanja, notrebaju se suzdržati od izražavanja svog mišljenja o predmetnom uzorku.

▼ M287.1.1. *Zamjenik predsjednika komisije*

Zbog opravdanih razloga predsjednika komisije može zamijeniti njegov zamjenik koji može preuzeti zadatke koji se odnose na provedbu ocjenjivanja. Taj zamjenik mora posjedovati sve bitne vještine koje su potrebne za obavljanje funkcije predsjednika komisije.

7.2. **Ocjenjivači**

Osobe koje kao organoleptički ocjenjivači sudjeluju u organoleptičkim ocjenjivanjima maslinovih ulja moraju to činiti dobrovoljno. Stoga se kandidatima preporučuje da svoj zahtjev podnesu pisanim putem. Kandidate odabire, obučava i nadzire predsjednik komisije u skladu s njihovim sposobnostima razlikovanja sličnih uzoraka; treba imati na umu da će se njihova preciznost poboljšati daljnjom obukom.

Ocjenjivači moraju djelovati kao pravi senzorski promatrači, ostavljajući postrance svoje osobne sklonosti i izvještavajući isključivo o osjećajima koje percipiraju. Zbog toga uvijek moraju raditi u tišini, opušteno i bez žurbe, usmjeravajući pažnju što je više moguće na uzorak koji ocjenjuju.

Za svako organoleptičko ocjenjivanje potrebno je između 8 i 12 ocjenjivača iako je dobro imati nekoliko rezervnih ocjenjivača u slučaju moguće odsutnosti nekih ocjenjivača.

▼ M26

8. UVJETI TESTIRANJA

8.1. **Prikaz uzorka**

Uzorak ulja za analizu dijeli se u standardiziranim čašama za ocjenjivanje u skladu s normom IOC/T.20/dok. br. 5 „Čaša za organoleptičko ocjenjivanje ulja”.

Čaša treba sadržavati 14–16 ml ulja, ili između 12,8 i 14,6 g ako se uzorci moraju vagati, i biti poklopljena satnim stakalcem.

Svako se staklo označava šifrom koja se sastoji od nasumično odabranih brojeva ili kombinacije slova i brojeva. Šifra se bilježi na temelju bezmirisnog sustava.

8.2. **Testiranje i temperatura uzorka**

Za vrijeme trajanja testiranja uzorci ulja za ocjenjivanje čuvaju se u čašama na $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Ta je temperatura odabrana zato što je na njoj lakše promatrati organoleptičke razlike nego na sobnoj temperaturi i zato što pri nižim temperaturama aromatski sastojci svojstveni tim uljima slabo hlape, a više temperature dovode do stvaranja hlapivih sastojaka tipičnih za zagrijana ulja. Vidi normu IOC/T.20/dok. br. 5. „Čaša za organoleptičko ocjenjivanje ulja” za metodu koja se mora koristiti za zagrijavanje uzoraka dok su u čaši.

▼ M26

Prostor za testiranje mora biti sobne temperature između 20° i 25 °C (vidi IOC/T.20/dok. br. 6.).

8.3. Vrijeme testiranja

Jutro je najbolje vrijeme za testiranje ulja. Dokazano je da tijekom dana postoje optimalna razdoblja za osjetila okusa i mirisa. Prije obroka povećava se osjetljivost na podražaje mirisa i okusa, dok se nakon njih ta percepcija smanjuje.

Međutim, s ovim kriterijem ne treba pretjerivati do te mjere da glad počne ometati ocjenjivače u smislu smanjivanja njihove sposobnosti razlikovanja; stoga se preporučuje da se sesije za testiranje održavaju između 10 i 12 sati ujutro.

8.4. Ocjenjivači: opća pravila ponašanja

Preporuke u nastavku odnose se na ponašanje ocjenjivača tijekom njihova rada.

Kad ih predsjednik komisije pozove da sudjeluju u ocjenjivanju, ocjenjivači trebaju moći sudjelovati u unaprijed određeno vrijeme i trebaju se pridržavati sljedećega:

- Ne smiju pušiti barem 30 minuta prije vremena određenog za testiranje.
- Ne smiju prethodno koristiti nikakav parfem, kozmetički preparat niti sapun čiji bi se miris mogao zadržati do vremena testiranja. Trebaju koristiti neparfimirani ili blago parfimirani sapun za pranje ruku koji nakon tog trebaju isprati i osušiti onoliko puta koliko je potrebno da bi se uklonili svi mirisi.
- Moraju postiti barem jedan sat prije početka testiranja.
- Ako osjete da se fizički ne osjećaju dobro, a posebno ako su im zahvaćena osjetila mirisa ili okusa, ili ako se zbog nekog psihološkog čimbenika ne može koncentrirati na posao, organoleptički ocjenjivači odustat će od testiranja i o tome izvijestiti predsjednika komisije.
- Nakon što su udovoljili svim gore navedenim uvjetima, ocjenjivači mirno i u tišini zauzimaju svoje mjesto u dodijeljenom im odjeljku za testiranje.
- Pažljivo će pročitati upute koje se nalaze na obrascu za ocjenjivanje i neće početi s ocjenjivanjem uzoraka sve dok nisu u potpunosti pripremljeni za zadatak koji trebaju ispuniti (opušteno i bez žurbe). Pojavi li se ikakva nedoumica, trebaju nasamo razgovarati s predsjednikom ocjenjivačke komisije.
- Za vrijeme zadatka trebaju biti tihi.
- Njihovi mobilni telefoni moraju cijelo vrijeme biti isključeni kako bi se spriječilo ometanje koncentracije i rada njihovih kolega.

9. POSTUPAK ZA ORGANOLEPTIČKO OCJENJIVANJE I KLASIFIKACIJU DJEVIČANSKOG MASLINOVA ULJA**9.1. Tehnika kušanja****▼ M29**

- 9.1.1. Ocjenjivači trebaju uzeti čašu, koju pritom trebaju držati poklopljenom staklenim poklopcem, i lagano je nagnuti; zatim je u tom položaju trebaju potpuno zarotirati tako da tekućina obloži čim veću unutarnju površinu čaše. Nakon što je ovaj korak završen, trebaju otklopiti čašu i mirisati uzorak polaganim i dubokim udisajima kako bi ocijenili ulje. Mirisanje ne bi trebalo trajati dulje od 30 sekundi. Ako u tom roku ne dođu do zaključka, prije novog pokušaja trebaju se nakratko odmoriti.

▼ **M29**

Nakon završetka testiranja mirisa ocjenjivači trebaju ocijeniti osjećaje izazvane u usnoj šupljini (cjelokupni retronazalni doživljaj dobiven mirisom, okusom i dodirrom). U tu svrhu trebaju uzeti mali gutljaj ulja od približno 3 ml. Iznimno je važno ulje rasporediti po cijeloj usnoj šupljini, od prednjeg dijela usta i jezika, sa strane i do stražnjeg dijela pa sve do nepca i grla jer je poznato da intenzitet percepcije okusa i osjetilnog doživljaja varira ovisno o dijelu jezika, nepca i grla.

Treba istaknuti da je od ključne važnosti rasporediti dovoljnu količinu ulja vrlo polako preko stražnje strane jezika prema grlu i da se istodobno ocjenjivač koncentrira na redosljed kojim se javljaju gorki i oštri podražaji. U protivnome bi oba ta podražaja kod nekih ulja mogla proći nezamijećeno ili bi pak podražaj oštine mogao prikriti gorčinu.

Uvlačenje kratkih uzastopnih udisaja kroz usta omogućava organoleptičkom ocjenjivaču ne samo da dobro rasporedi uzorak po cijeloj usnoj šupljini, već i da zapazi hlapive aromatske sastojke u stražnjem dijelu nosa forsirajući upotrebu ovog kanala.

Bilješka: Ako ocjenjivači ne uoče voćnost u uzorku, a intenzitet negativnog svojstva na kojem se temelji klasifikacija iznosi najviše 3,5, predsjednik komisije može odlučiti da će za ocjenjivače organizirati ponovnu analizu uzorka na temperaturi okoline (COI/T.20/Doc. No 6/Rev. 1, rujan 2007., odjeljak 3. – Opće specifikacije za uređivanje prostora za organoleptičko ocjenjivanje) uz određivanje konteksta i pojma temperature okoline. Kada uzorak dosegne sobnu temperaturu, ocjenjivači bi ga trebali ponovno ocijeniti isključivo kako bi provjerili zapaža li se voćnost. Ako je tako, trebali bi označiti njezin intenzitet na ljestvici.

Trebalo bi razmotriti i osjetilni doživljaj oštine. U tu se svrhu preporučuje progutati ulje.

▼ **M26**

9.1.2. Prilikom organoleptičkog ocjenjivanja djevičanskog maslinova ulja preporučuje se ocjenjivanje najviše ČETIRI UZORKA u svakoj sesiji s najviše tri sesije dnevno kako bi se izbjegli kontrastni učinci koji bi mogli nastati neposrednim kušanjem drugih uzoraka.

Budući da uzastopno ocjenjivanje dovodi do zamora ili smanjuje osjetljivost, potrebno je koristiti neko sredstvo koje će iz usta odstraniti ostatke ulja iz prethodnog ocjenjivanja.

Preporučuje se mala kriška jabuke koju se nakon žvakanja može ispljunuti u pljuvačnicu. Nakon tog se usta isperu s malo vode sobne temperature. Između završetka jedne sesije i početka druge mora proteći barem 15 minuta.

9.2. Način na koji ocjenjivači upotrebljavaju obrazac za ocjenjivanje

Obrazac za ocjenjivanje koji koriste ocjenjivači detaljno je prikazan na Slici 1. ovog Priloga.

Svaki ocjenjivač u komisiji treba pomirisati i zatim kušati ⁽¹⁾ razmatrano ulje. Oni zatim na skali od 10 cm prikazanoj na predmetnom obrascu za ocjenjivanje označavaju intenzitet svakog negativnog i pozitivnog svojstva.

⁽¹⁾ Mogu odustati od kušanja ulja kad primijete bilo kakvo intenzivno negativno svojstvo izravno njuhom kada će tu iznimnu okolnost zabilježiti na obrascu za ocjenjivanje.

▼ M26

Ako ocjenjivač zamijeti negativna svojstva koja nisu navedena u odjeljku 4., navodi ih pod naslovom „ostalo” koristeći izraz ili izraze koji najpreciznije opisuju ta svojstva.

▼ M28**9.3. Način na koji predsjednik komisije upotrebljava podatke**

Predsjednik komisije skuplja obrasce za ocjenjivanje koje je ispunio svaki ocjenjivač i pregledava intenzitete označene za pojedina svojstva. Ako uoče ikakvu nepravilnost, pozivaju ocjenjivača da ponovno pregleda svoj obrazac za ocjenjivanje i, ako je potrebno, ponovi ocjenjivanje.

Predsjednik komisije unosi podatke ocjenjivanja od svakog člana komisije u računalni program poput onoga propisanog normom IOC/T.20/dok. br. 15 radi statističkog izračunavanja rezultata analize, na temelju izračuna njihovog medijana. Vidi točku 9.4. i Dodatak ovom Prilogu. Podaci za dotični uzorak upisuju se s pomoću matrice koja se sastoji od 9 stupaca koji predstavljaju 9 senzornih svojstava i n linija koje predstavljaju n članova komisije.

Kad se zamijeti mana i nju pod naslov „Ostalo” navede najmanje 50 % članova komisije, predsjednik komisije izračunava medijan te mane i izrađuje odgovarajuću klasifikaciju.

Vrijednost grubog koeficijenta varijacije kojim se utvrđuje klasifikacija (nedostatak najvećeg intenziteta i svojstva voćnosti) ne smije biti veća od 20 %.

U suprotnom predsjednik komisije mora ponoviti ocjenjivanje specifičnog uzorka u drugoj sesiji ocjenjivanja.

Ako se to često događa, predsjedniku komisije preporučuje se da ocjenjivačima pruži dodatnu obuku (IOC/T.20/dok. br. 14, § 5) i da upotrijebi indeks ponovljivosti i indeks odstupanja kako bi provjerio rad komisije (IOC/T.20/dok. br. 14, § 6).

▼ M29**9.4. Klasifikacija ulja**

Ulje se razvrstava kako slijedi u skladu s medijanom mana i medijanom svojstva voćnosti. Medijan mana definiran je kao medijan mane koja se osjeća najvećim intenzitetom. Medijan mana i medijan svojstva voćnosti iskazuju se do jednog decimalnog mjesta.

Ulje se razvrstava uspoređujući vrijednost medijana mana i medijana svojstva voćnosti s referentnim intervalima navedenima u nastavku. U obzir je uzeta i pogreška metode pri utvrđivanju ograničenja tih intervala koji se stoga smatraju apsolutnima. Programskim paketima omogućuje se prikaz razvrstavanja u obliku statističke tablice ili grafa.

(a) ekstra djevičansko maslinovo ulje: medijan mana je 0, a medijan svojstva voćnosti je iznad 0;

(b) djevičansko maslinovo ulje: medijan mana je iznad 0, ali ne veći od 3,5 i medijan svojstva voćnosti je iznad 0;

(c) djevičansko maslinovo ulje lampante: medijan mana je iznad 3,5 ili medijan mana je 3,5 ili manji, a medijan voćnosti je jednak 0.

▼ **M29**

Bilješka 1.: Kad je medijan svojstva oštine i/ili gorčine veći od 5,0, predsjednik komisije to navodi na potvrdu o ocjenjivanju.

Za ocjenjivanja koja su namijenjena nadziranju sukladnosti provodi se jedno ispitivanje. U slučaju protuoocjenjivanja moraju se organizirati dvije usporedne analize u različitim sesijama. Rezultati dvije usporedne analize moraju biti statistički homogeni. (vid točku 9.5.). Ako to nije slučaj, uzorak se mora ponovno dvaput analizirati. Konačna vrijednost medijana svojstava na kojima se temelji klasifikacija izračunan će se na temelju prosjeka oba medijana.

9.5. **Kriteriji za prihvaćanje i odbacivanje dvije usporedne analize**

Normalizirana pogreška koja je definirana u nastavku upotrebljava se kako bi se utvrdilo jesu li rezultati dvije usporedne analize homogeni ili statistički prihvatljivi:

$$E_n = \frac{|Me_1 - Me_2|}{\sqrt{U_1^2 + U_2^2}}$$

Pri tome su Me_1 i Me_2 medijani dvije usporedne analize (prve i druge analize), a U_1 i U_2 proširene nesigurnosti dobivene za dvije vrijednosti, izračunane kako slijedi i kako je utvrđeno u Dodatku:

$$U_1 = c \times s^* \text{ i } s^* = \frac{(CV_r \times Me_1)}{100}$$

Za proširenu nesigurnost, $c = 1,96$; prema tome:

$$U_1 = 0,0196 \times CV_r \times Me_1$$

pri čemu je CV_r grubo koeficijent varijacije.

Kako bi se moglo tvrditi da dvije dobivene vrijednosti nisu statistički različite, E_n mora iznositi najviše 1,0.

▼ **M26***Dodatak***Metoda izračuna medijana i intervala pouzdanosti****Medijan**

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

Medijan se definira kao realni broj X_m za koji vrijedi da je vjerojatnost (p) da vrijednosti raspodjele (X) budu niže od tog broja (X_m) manja ili jednaka 0,5 i da je istovremeno vjerojatnost (p) da vrijednosti raspodjele (X) budu manje ili jednake X_m veća ili jednaka 0,5. Praktičnija definicija glasi da je medijan 50-i postotnik unutar distribucije brojeva u rastućem nizu. Jednostavnijim riječima, to je središnja točka posloženog skupa neparnih brojeva ili prosjek dvije središnje točke u posloženom skupu parnih brojeva.

Gruba standardna devijacija

Kako bi došli do pouzdanog procjenjivanja varijabilnosti oko prosjeka, potrebno je pozvati se na grubu standardnu devijaciju kako se procjenjuje prema Stuartu i Kendallu (4). Formula daje asimptotsku grubu standardnu devijaciju, tj. grubu procjenu varijabilnosti razmatranih podataka pri čemu je N broj očitavanja, a IQR međukvartilni interval koji obuhvaća točno 50 % slučajeva u dotičnoj raspodjeli vjerojatnosti.

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

Međukvartilni interval izračunava se izračunom najveće razlike između 75-tog i 25-tog postotnika.

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

Pri čemu je postotnik ona vrijednost X_{pc} za koju vrijedi da je vjerojatnost (p) da vrijednosti raspodjele budu manje od X_{pc} niža ili jednaka specifičnom postotku i da je istovremeno vjerojatnost (p) da vrijednosti raspodjele budu manje ili jednake X_{pc} veća ili jednaka tom specifičnom postotku. Postotak ukazuje na odabrani dio distribucije. U slučaju medijana on iznosi 50/100.

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

Radi praktičnosti, postotnik je ona vrijednost raspodjele koja odgovara specifičnoj površini ispod krivulje distribucije ili gustoće. Na primjer, 25. postotnik predstavlja vrijednost distribucije koja odgovara površini od 0,25 ili 25/100.

U ovoj su metodi postotnici izračunati na temelju stvarnih vrijednosti koje se pojavljuju u matrici podataka (postupak izračuna postotnika).

Grubi koeficijent varijacije (%)

$CV_r\%$ predstavlja čisti broj koji ukazuje na postotak varijabilnosti analiziranog skupa brojeva. Iz tog je razloga on posebno koristan za ispitivanje pouzdanosti ocjenjivača u komisiji.

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

▼ M26**Intervali pouzdanosti medijana od 95 %**

Intervali pouzdanosti od 95 % (vrijednost greške prve vrste koja iznosi 0,05 ili 5 %) predstavlja interval unutar kojeg bi vrijednost medijana mogla varirati kada bi bilo moguće ocjenjivanje ponoviti bezbroj puta. Praktično predstavlja interval varijabilnosti ocjenjivanja u danim uvjetima rada krenuvši od pretpostavke da ga je moguće ponoviti mnogo puta. Kao i kod $CVr\%$, interval pomaže u procjeni pouzdanosti ocjenjivanja.

$$C.I._{gornji} = Me + (c \times s^*)$$

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

pri čemu je $C = 1,96$ za interval pouzdanosti na razini od 95 %.

Primjer izračuna naveden je u Prilogu I. normi IOC/T 20/dok. br. 15.

Literatura

- (1) Wilkinson, L., 1990. Systat: The system for statistics. Evanston, IL.SYSTAT Inc.
- (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.
- (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/dok. br. 1., rujan 2007, Vodič za akreditaciju laboratorija za senzorsko ocjenjivanje posebno u vezi s djevičanskim maslinovim uljem u skladu s normom ISO/IEC 17025:2005.
- (7) IOC/T.20/dok. br. 14.
- (8) IOC/T.20/dok. br. 15.
- (9) ISO/IEC 17025:05.

▼ M20

▼ M19

▼ B*PRILOG XV.*

1. SADRŽAJ ULJA U KOMINI MASLINA

1.1. **Oprema**

- primjeren uređaj za ekstrakciju opremljen tikvicom s okruglim dnom volumena 200 – 250 ml,
- električno grijana kupelj (primjerice, pješčana kupelj ili vodena kupelj) ili grijaća ploča,
- analitička vaga,
- sušionik postavljen na maksimalnu temperaturu od 80 °C
- električno grijani sušionik s ugrađenim termostatom postavljenim na 103 ± 2 °C, koji se može pročistiti strujom zraka, ili kojim se može rukovati pri sniženoj tlaku,
- mehanički mlinac koji se lako čisti te koji omogućava mljevenje komine maslina bez povećanja njezine temperature ili bilo koje druge promjene sadržaja vlage, hlapivih tvari ili tvari koje se ekstrahiraju heksanom,
- čahura za ekstrakciju i vata ili filter-papir s kojeg su već odstranjene tvari koje se mogu ekstrahirati heksanom,
- eksikator,
- sito s otvorima promjera 1 mm,
- male čestice prethodno osušenog kamena plovučca.

1.2. **Reagensi**

Normalni heksan tehničkog stupnja čistoće, iza kojega, nakon što je potpuno ispario, suhi ostatak mora biti manji od 0,002 g na 100 ml.

2. **POSTUPAK**2.1. **Pripremanje uzorka za ispitivanje**

Ako je potrebno, za mljevenje laboratorijskog uzorka upotrijebite prethodno dobro očišćeni mehanički mlinac da uzorak usitnite dovoljno da čestice mogu proći kroz sito.

Upotrijebite otprilike jednu dvadesetinu uzorka da biste obavili postupak čišćenja mlinca, samljeveni materijal bacite, a ostatak sameljite i sakupite, pažljivo promiješajte i odmah ga analizirajte.

2.2. **Uzorak za ispitivanje**

Odmah nakon mljevenja za analizu odvagajte otprilike 10 g uzorka s dopuštenim odstupanjem od 0,01 g.

2.3. **Pripremanje čahure za ekstrakciju**

Uzorak za ispitivanje stavite u čahuru za ekstrakciju i začepite vatom. Ako koristite filter-papir, uzorak za ispitivanje umotajte u njega.

2.4. **Prethodno sušenje**

Ako je komina masline vrlo vlažna (odnosno, ako je sadržaj vlage i hlapivih tvari viši od 10 %), provedite prethodno sušenje tako da napunite čahuru za ekstrakciju (ili filter-papir) na odgovarajuće vrijeme stavite u sušionik u kojemu temperatura nije viša od 80 °C, a s ciljem smanjivanja sadržaja vlage i hlapivih tvari na manje od 10 %.

▼B**2.5. Pripremanje tikvice s okruglim dnom**

Odmjerite, uz odstupanje do 1 mg, tikvicu u kojoj se nalaze jedna ili dvije čestice plovućca, prethodno osušenu u sušioniku na 103 ± 2 °C, a nakon toga ohlađenu u eksikatoru ne kraće od jednog sata.

2.6. Početna ekstrakcija

Čahuru za ekstrakciju (ili filter-papir) u kojoj je uzorak za ispitivanje umetnite u uređaj za ekstrahiranje. U tikvicu ulijte potrebnu količinu heksana. Spojite tikvicu s uređajem za ekstrahiranje i sve zajedno stavite na električno grijanu kupelj. Stupanj zagrijavanja prilagodite na takav način da brzina refluksa ne bude sporija od tri kapi u sekundi (umjereno, ne snažno ključanje). Nakon četiri sata ekstrahiranja pustite da se ohladi. Izvadite čahuru za ekstrakciju iz uređaja za ekstrahiranje i postavite je u struju zraka s ciljem odstranjivanja većine otapala.

2.7. Druga ekstrakcija

Sadržaj čahure za ekstrakciju istresite u mikro-drobiticu i sameljite ga čim je sitnije moguće. Vratite svu samljevenu mješavinu u čahuru (bez rasipanja) i postavite je natrag u uređaj za ekstrahiranje.

Nastavite s ekstrahiranjem tijekom sljedeća dva sata koristeći istu tikvicu s okruglim dnom koja je sadržavala inicijalni ekstrakt.

Dobivena otopina u tikvici za ekstrahiranje mora biti bistra. Ako nije, profiltrirajte je kroz filter-papir te prvotnu tikvicu i filter-papir nekoliko puta isperite heksanom. Sakupite filtrat i otopinu za ispiranje u drugu tikvicu s okruglim dnom koja je prethodno bila osušena i izvagana uz odstupanje do 1 mg.

2.8. Odstranjivanje otapala i vaganje ekstrakta

Veći dio otapala odstranite destilacijom na električno grijanoj kupelji. Sve preostale tragove otapala odstranite zagrijavanjem tikvice u sušioniku na 103 ± 2 °C tijekom 20 minuta. Postupak odstranjivanja pospješite bilo upuhivanjem zraka, ili pak, što je preporučljivo, nekog inertnog plina, u određenim vremenskim intervalima ili korištenjem sniženog tlaka.

Ostavite tikvicu da se hladi u eksikatoru ne kraće od jednog sata i zatim je izvažite s odstupanjem do 1 mg.

Ponovo zagrijavajte 10 minuta u istim uvjetima, ohladite u eksikatoru i izvažite.

Razlika između dvaju vaganja ne smije biti veća od 10 mg. Ako je razlika veća, ponovo zagrijavajte u razdobljima od 10 minuta, iza kojih slijede hlađenje i vaganje, sve dok razlika ne bude iznosila 10 mg ili manje. Zabilježite masu dobivenu posljednjim vaganjem tikvice.

Provedite dva usporedna određivanja.

3. ISKAZIVANJE REZULTATA**3.1. Metoda izračunavanja i formula**

(a) Ekstrakt, iskazan kao postotak u odnosu na masu zaprimljenog proizvoda, jednak je:

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

▼ B

pri čemu je: S = maseni udjel ekstrakta u odnosu na zaprimljeni proizvoda,

m_0 = masa uzorka, u gramima,

m_1 = masa ekstrakta nakon sušenja, u gramima.

Za rezultat uzmite aritmetičku sredinu dvaju usporednih određivanja, pod uvjetom da su ispunjeni zahtjevi za ponovljivost.

Rezultat iskažite jednim decimalnim mjestom.

- (b) Ekstrakt se iskazuje na temelju suhe tvari, korištenjem sljedeće formule:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{postotak ulja u ekstraktu na temelju suhe tvari,}$$

pri čemu je: S = postotak ekstrakta u smislu zaprimljenog proizvoda (vidjeti točku (a)),

U = njegov sadržaj vlage i hlapivih tvari.

3.2. Ponovljivost

Razlika između dvaju usporednih određivanja koje isti analitičar provodi istodobno, ili neposredno jedno za drugim, ne smije biti viša od 0,2 g ekstrakta heksana na 100 g uzorka.

Ako ovaj uvjet nije ispunjen, ponovite analizu na druga dva dijela uzorka za ispitivanje. Ako i u tom slučaju razlika bude viša od 0,2 g, kao rezultat uzmite aritmetičku sredinu četiriju određivanja.



PRILOG XVI.

ODREĐIVANJE JODNOG BROJA

1. OPSEG

Ovom Međunarodnom normom utvrđuje se metoda za određivanje jodnog broja u mastima životinjskog i biljnog podrijetla te uljima, u daljnjem tekstu: masti.

2. DEFINICIJA

Za potrebe ove Međunarodne norme primjenjuje se sljedeća definicija:

2.1. *Jodni broj* označava masu joda koju je uzorak apsorbirao u radnim uvjetima koji su utvrđeni ovom Međunarodnom normom.

Vrijednost jodnog broja iskazuje se u gramima joda na 100 g uzorka.

3. PRINCIP

Dio uzorka za ispitivanje rastopi se u otapalu uz dodatak Wijsova reagensa. Nakon određenog vremena dodaju se otopina kalijevog jodida i voda, a oslobođeni se jod titrira otopinom natrijevog tiosulfata.

4. REAGENSI

Svi reagensi moraju biti prihvaćene analitičke čistoće.

4.1. *Voda*, sukladna zahtjevima norme ISO 3693, 3. stupanj.4.2. *Kalijev jodid*, otopina 100 g/l, koja ne sadrži jodate niti slobodni jod.4.3. *Škrob*, otopina.

5 g topivog škroba pomiješajte s 30 ml vode, pa ovu mješavinu dodajte u 1 000 ml kipuće vode, pustite da vrije tri minute i zatim ostavite da se ohladi.

4.4. *Natrijev tiosulfat*, standardna volumetrijska otopina koncentracije $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$, koja je standardizirana ne dulje od sedam dana prije uporabe.4.5. *Otapalo* pripremljeno miješanjem jednakih volumena cikloheksana i octene kiseline.4.6. *Wijsov reagens*, sadrži jodni monoklorid u octenoj kiselini. Treba koristiti Wijsov reagens koji je dostupan u slobodnoj trgovini.

5. OPREMA

Uobičajena laboratorijska oprema, a posebno sljedeća:

5.1. *Staklene odmjerne posudice*, pogodne za dio uzorka za ispitivanje i njegovo raspoređivanje u tikvice (6.2).5.2. *Erlenmeyerove tikvice*, volumena 500 ml, s čepovima od brušenog stakla i potpuno suhe.

6. PRIPREMANJE UZORKA ZA ISPITIVANJE

Homogenizirani uzorak osuši se iznad natrijevog sulfata i filtrira.

7. POSTUPAK

7.1. Uzorak za ispitivanje

Masa uzorka za ispitivanje razlikuje se ovisno o njegovu očekivanom jodnom broju, kao što je prikazano u tablici 1.

▼B**Tablica 1.**

Očekivani jodni broj	Masa dijela uzorka za ispitivanje (g)
manje od 5	3,00
5 do 20	1,00
21 do 50	0,40
51 do 100	0,20
101 do 150	0,13
151 do 200	0,10

Uzorak odmjerite u staklenoj odmjernoj posudici (5.1.) uz odstupanje do 0,1 mg.

7.2. Određivanje

Dio uzorka za ispitivanje stavite u tikvicu volumena 500 ml (6.2.). Dodajte 20 ml otapala (4.5.) da bi se rastopila mast. Dodajte točno 25 ml Wijsova reagensa (4.6.), umetnite čep, zavrtite sadržaj i stavite tikvicu na tamno mjesto. Za Wijsov reagens ne smije se koristiti usna pipeta!

Na sličan način pripremite slijepu probu s otapalom i reagensom, ali bez dijela uzorka za ispitivanje.

Za uzorke koji imaju jodni broj manji od 150 ostavite tikvice u tami sat vremena; za one čiji je jodni broj viši od 150 i za polimerizirane proizvode ili u značajnoj mjeri oksidirane proizvode, ostavite u tami dva sata.

Po isteku zadanog vremena u svaku tikvicu dodajte po 20 ml otopine kalijeveg jodida (4.2.) i 150 ml vode (4.1.).

Titrirajte standardnom volumetrijskom otopinom natrijevog tiosulfata (4.4.) sve dok žuta boja koju daje jod gotovo u potpunosti ne nestane. Dodajte nekoliko kapi otopine škroba (4.3.) i nastavite titrirati sve dok neposredno nakon vrlo energičnog protresanja ne nestane plava boja.

Bilješka: Dopušteno je potenciometrijsko titriranje za određivanje završne točke.

7.3. Broj određivanja

Provedite dvostruko određivanje na istom uzorku za ispitivanje.

8. ISKAZIVANJE REZULTATA

Jodni broj zadan je sljedećom jednadžbom:

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

pri čemu je:

c = brojčana vrijednost točne koncentracije, iskazana u molima po litri, upotrijebljene standardne volumetrijske otopine natrijevog tiosulfata (4.4.);

V_1 = brojčana vrijednost volumena, u mililitrima, standardne volumetrijske otopine natrijevog tiosulfata (4.4.) koja je korištena za slijepu probu;

▼B

V_2 = brojčana vrijednost volumena, u mililitrima, standardne volumetrijske otopine natrijevog tiosulfata (4.4.) koja je korištena za određivanje;

m = brojčana vrijednost mase, u gramima, uzorka za ispitivanje (7.1.).

Za rezultat uzmite aritmetičku sredinu dvaju određivanja, pod uvjetom da su ispunjeni zahtjevi za ponovljivost (9.2.).

▼ **M11***PRILOG XVII.:***METODA ZA ODREĐIVANJE STIGMASTADIENA U BILJNIM ULJIMA**

1. CILJ
Određivanje stigmastadiena u biljnim uljima koja sadrže niske koncentracije tih ugljikovodika, posebno u djevičanskom maslinovom ulju i sirovom ulju komine maslina.
2. OPSEG
Taj se standard može primijeniti na sva biljna ulja, iako su mjerenja pouzdana samo u slučaju kada sadržaj tih ugljikovodika iznosi od 0,01 do 4,0 mg/kg. Ta je metoda posebno primjerena za otkrivanje prisutnosti rafiniranih biljnih ulja (maslinovog, ulja komine maslina, suncokretovog, palminog itd.) u djevičanskom maslinovom ulju budući da rafinirana ulja sadrže stigmastadiene, za razliku od djevičanskih ulja.
3. PRINCIP
Izdvajanje neosapunjive tvari. Odvajanje frakcije steroidalnih ugljikovodika kromatografijom na koloni sa silika-gelom i analiza kapilarnom plinskom kromatografijom.
4. OPREMA
 - 4.1. Tikvica volumena 250 ml za uporabu s povratnim hladilom.
 - 4.2. Lijeveci za odjeljivanje volumena 500 ml.
 - 4.3. Tikvica okruglog dna volumena 100 ml.
 - 4.4. Rotirajući isparivač
 - 4.5. Staklena kromatografska kolona (unutarnjega promjera 1,5 do 2,0 cm i dužine 50 cm) s teflonskim ventilom i zatvaračem od staklene vune ili pločicom od sinter-stakla na dnu. Za pripremu kolone sa silika-gelom u kromatografsku kolonu treba uliti heksan do razine od 5 cm od dna te napuniti emulzijom silika-gela u heksanu (15 g u 40 ml) uz pomoć dodatka heksana. Pričekati da se staloži te primjenom laganih vibracija dovršiti taloženje. Dodati bezvodni natrijev sulfat do razine od približno 0,5 cm i konačno eluirati višak heksana.
 - 4.6. Plinski kromatograf s plameno-ionizacijskim detektorom, injektor s dijeljenjem uzorka ili injektorom koji omogućava izravno ubrizgavanje na početak (hladne) kolone (*cold on-column*) i peći s mogućnošću podešavanja temperature na ± 1 °C.
 - 4.7. Kvarcna kapilarna kolona za plinsku kromatografiju (unutarnjega promjera 0,25 ili 0,35 mm i dužine 25 m) obložena s 5 %-tnom fenilmetilsilikonskom fazom debljine sloja od 0,25 mm.

Napomena 1.:

Mogu se upotrijebiti i druge kolone slične ili niže polarnosti.

- 4.8. Snimač-integrator s mogućnošću uporabe integracijskoga načina dolina-dolina (*valley-valley*).
- 4.9. Mirkoštrcaljka od 5 do 10 ml za plinsku kromatografiju s neodvojivom iglom.
- 4.10. Električni pokrivač ili grijaća ploča.

▼ M11

5. REAGENSI

Svi reagensi trebaju biti analitičke kvalitete, osim ako je drukčije određeno. Voda koja se koristi treba biti destilirana ili barem jednake čistoće.

- 5.1. Heksan ili smjesa alkana intervala vrelišta od 65 do 70 °C, destilirani s kolonom za ispravljanje.

Napomena 2.:

Otapalo se mora destilirati kako bi se odstranile nečistoće.

- 5.2. 96 %-tni v/v etanol.

- 5.3. Bezvodni natrijev sulfat

- 5.4. 10 %-tna alkoholna otopina kalijevoga hidroksida. Dodati 10 ml vode u 50 g kalijevoga hidroksida, promiješati, a zatim tu smjesu otopiti u etanolu tako da ukupni volumen bude 500 ml.

Napomena 3.:

Alkoholna otopina kalijevog hidroksida stajanjem posmeđi. Treba se svakodnevno pripremati iznova te je treba čuvati u dobro zatvorenim bocama od tamnoga stakla.

- 5.5. Silika-gel 60 za kromatografiju na koloni, 70 do 230 mesh, (Merck, referenca 7734 ili slično).

Napomena 4.:

Silika-gel se obično može izravno upotrebljavati bez ikakve obrade. Međutim, određene serije silika-gela mogu imati nisku aktivnost te time uzrokovati slabije kromatografsko odvajanje. U tim okolnostima silika-gel treba obraditi na sljedeći način: aktivirati silika-gel zagrijavanjem na 550 °C najmanje četiri sata. Nakon zagrijavanja staviti silika-gel u eksikator dok se hladi, a zatim ga premjestiti u začepljenu tikvicu. Dodati 2 % vode i protresti smjesu sve dok u njoj više nema vidljivih grudica i ona postane sipka.

U slučaju da serije silika-gela uzrokuju kromatograme s pikovima koji se preklapaju, silika-gel treba obraditi na gore navedeni način. Alternativa bi mogla biti uporaba ekstra čistog silika-gela 60 (Merck, referenca 7754).

- 5.6. Ishodišna otopina (200 ppm) kolesta-3,5-diena (Sigma, 99 %-tne čistoće) u heksanu (10 mg u 50 ml).

- 5.7. Standardna otopina kolesta-3,5-diena u heksanu koncentracije 20 ppm, dobivena razrjeđivanjem gore navedene otopine.

Napomena 5.:

Otopine pod 5.6 i 5.7. stabilne su najmanje četiri mjeseca ako se čuvaju na temperaturi nižoj od 4 °C.

- 5.8. Otopina n-nonakozana u heksanu približne koncentracije 100 ppm.

- 5.9. Plin nosač za kromatografiju: helij ili vodik 99,9990 %-tne čistoće.

- 5.10. Pomoćni plinovi za plameno-ionizacijski detektor: vodik 99,9990 %-tne čistoće i pročišćeni zrak.

▼ M11**6. POSTUPAK****6.1. Priprema neosapunjive tvari**

- 6.1.1. Izvagati $20 \pm 0,1$ g ulja u tikvicu od 250 ml (4.1.), dodati 1 ml standardne otopine kolesta-3,5-diena ($20 \mu\text{g}$) i 75 ml alkoholne otopine kalijeveg hidroksida koncentracije 10 %, postaviti na povratno hladilo i zagrijati na lagano vrenje 30 minuta. Odvojiti tikvicu s uzorkom od izvora topline i pustiti otopinu da se lagano ohladi (ne smije se potpuno ohladiti jer će se uzorak staložiti). Dodati 100 ml vode i otopinu uz pomoć 100 ml heksana prelići u lijevak za odjeljivanje (4.2.). Smjesu snažno tresti 30 sekundi i ostaviti da se odvoji.

Napomena 6.:

Ako se pojavi emulzija koja brzo ne nestane, dodati malu količinu etanola.

- 6.1.2. Premjestiti donju vodenu fazu u drugi lijevak za odjeljivanje i opet je ekstrahirati s 100 ml heksana. Vodenu fazu još jednom odliti i tri puta isprati heksanske ekstrakte (pomiješane u još jednom lijevku za odjeljivanje), svaki put sa 100 ml smjese vode i etanola (1:1), dok se ne postigne neutralni pH faktor.
- 6.1.3. Heksansku otopinu prelići preko bezvodnog natrijevog sulfata (50 g), isprati s 20 ml heksana i heksan ispariti u rotirajućem isparivaču na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ pod sniženim tlakom dok se ne osuši.

6.2. Odvajanje frakcije steroidnih ugljikovodika

- 6.2.1. Taj talog prenijeti na kolonu za frakcije dodavanjem dva puta po 1 ml heksana, pustiti da se razina otopine spusti na vrh natrijevog sulfata kako bi se dobio uzorak na koloni te započeti kromatografsku eluciju s heksanom protoka od približno 1 ml/min . Zanimariti prvih 25 do 30 ml eluata i zatim skupiti sljedećih 40 ml frakcije. Nakon prikupljanja frakciju premjestiti u tikvicu okruglog dna volumena 100 ml (4.3.).

Napomena 7.:

Prva frakcija sadrži zasićene ugljikovodike (slika 1 a), a druga frakcija steroidne ugljikovodike. Daljnjom se elucijom dobivaju skvalen i skvalenu srodni spojevi. Kako bi se postiglo dobro odvajanje zasićenih od steroidnih ugljikovodika potrebna je optimizacija frakcijskih volumena. Radi toga, volumen prve frakcije treba biti tako podešen da pri analizi druge frakcije pikovi koji predstavljaju zasićene ugljikovodike budu niski (pogledati sliku 1 c); ako se ne pojave, ali intenzitet standardnog pika bude nizak, volumen treba smanjiti. Uostalom, potpuno odvajanje sastojaka prve i druge frakcije nije potrebno; budući da se pikovi u analizi plinskom kromatografijom ne preklapaju ako se uvjeti plinske kromatografije prilagode kako je navedeno pod 6.3.1. Optimiranje volumena druge frakcije općenito nije potrebno budući da postoji dobro odvajanje kod daljnjih sastojaka. Ipak, prisutnost velikog pika s otprilike 1,5 minuta kraćim retencijskim vremenom od standardnog nastaje zbog skvalena i ukazuje na loše odvajanje.

- 6.2.2. Ispariti drugu frakciju u rotirajućem isparivaču na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ pod sniženim tlakom dok se ne osuši te nastali talog odmah rastopiti u 0,2 ml heksana. Otopinu do analize čuvati u hladnjaku.

Napomena 8.:

Talozi pod 6.1.3. i 6.2.2. ne smiju se čuvati u suhom stanju niti na sobnoj temperaturi. Čim se dobiju treba im dodati otapalo, a ta se otopina treba čuvati u hladnjaku.

▼ **M11****6.3. Plinska kromatografija**

6.3.1. Radni uvjeti za injektiranje s razdvajanjem:

- temperatura injektora: 300 °C,
- temperatura detektora: 320 °C,
- snimač-integrator: parametri integracije trebaju biti namješteni tako da omogućuju točnu procjenu područja. Preporučuje se integracijski način dolina-dolina (*valley-valley*),
- osjetljivost: otprilike 16 puta veća od najmanje atenuacije,
- količina ubrizgane otopine: 1 µl,
- podešavanje temperature peći: početno šest minuta na 235 °C, a zatim temperatura raste za 2 °C/min do 285 °C,
- injektor s razdvojnikom protoka 1: 15,
- plin nosač: helij ili vodik pri tlaku od 120 kPa.

Ti se uvjeti mogu prilagoditi u skladu s karakteristikama kromatografa i kolone da bi se dobili kromatogrami koji udovoljavaju sljedećim zahtjevima: pik unutarnjeg standarda mora se pojaviti u roku od 5 minuta od vremena koje je navedeno pod 6.3.2.; pik unutarnjeg standarda treba dosezati barem 80 % punog raspona.

Sustav plinske kromatografije mora se provjeriti ubrizgavanjem smjese ishodišne otopine kolestadiena i (5.6.) i n-nonakozana (5.8.). Pik kolesta-3,5-diena treba se pojaviti prije pika n-nonakozana (slika 1 c); u slučaju da se to ne dogodi, mogu se poduzeti dvije mjere: sniziti temperaturu peći i/ili upotrijebiti kolonu niže polarnosti.

6.3.2. Identificiranje pikova

Pik unutarnjeg standarda pojavljuje se nakon približno 19 minuta, dok je relativno retencijsko vrijeme 3,5-stigmastadiena 1,29 (vidjeti sliku 1 b). 3,5-stigmastadien pojavljuje se s malim količinama svog izomera te obično zajedno eluiraju kao jedan kromatografski pik. Međutim, ako je kolona previše polarna ili ima visoku razlučivost, izomer se može pojaviti kao mali pik ispred i blizu pika 3,5-stigmastadiena (slika 2). Da bi se osigurala elucija stigmastadiena kao jednog pika, preporučuje se zamijeniti kolonu onom manje polarnom ili kolonom s većim unutarnjim promjerom.

Napomena 9.:

Stigmastadieni za referencu mogu se dobiti analizom rafiniranog biljnog ulja uz uporabu manje količine uzorka (1 do 2 g). Stigmastadieni tvore istaknut i lako uočljiv pik.

6.3.3. Kvantitativna analiza

Sadržaj se stigmastadiena određuje na temelju formule:

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

▼ M11

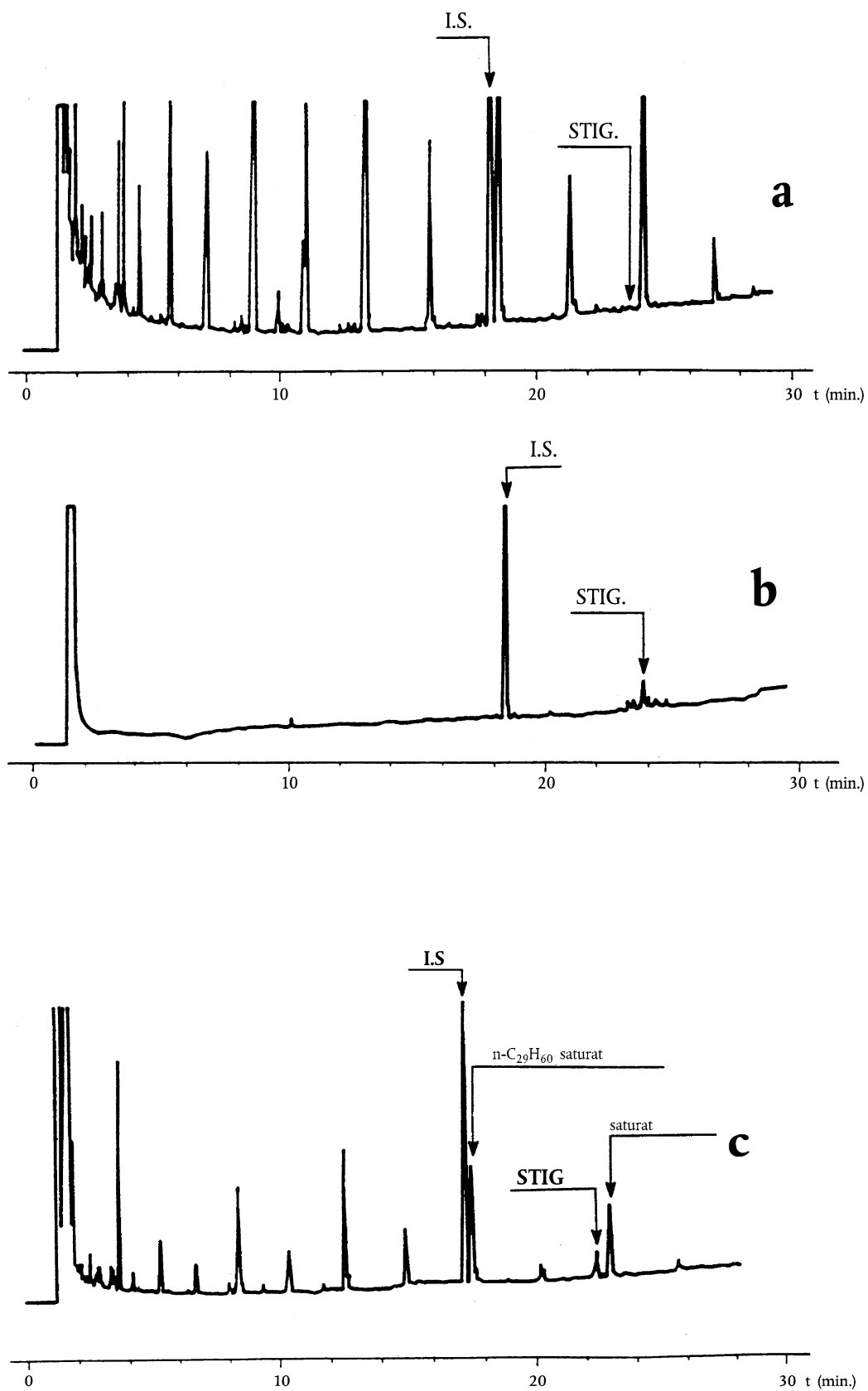
gdje je: A_s = područje stigmastadienskoga pika (ako se pik razdvoji na dva izomera, zbroj područja oba vrha),

A_c = područje unutarnjeg standarda (kolestadien),

M_c = masa dodanog standarda u mikrogramima,

M_o = masa korištenog ulja u gramima.

Granica detekcije: približno 0,01 mg/kg.

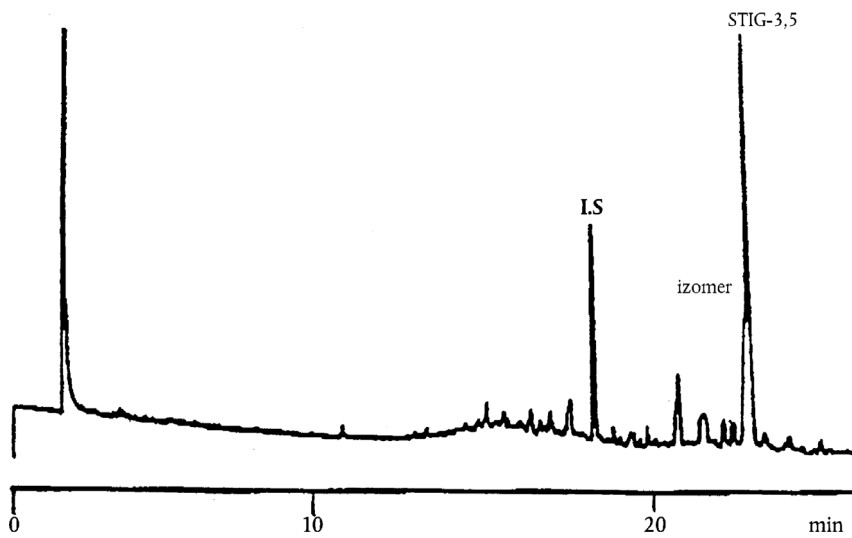
▼ M11

Slika 1

Plinski kromatogrami dobiveni analizom uzoraka maslinovog ulja na kvarcnoj kapilarnoj koloni (unutarnjeg promjera 0,25 mm i dužine 25 m) obloženoj s 5 %-tnom fenilmetilsilikonskom fazom debljine sloja od 0,25 mm.

▼ M11

- (a) Prva frakcija (30 ml) djevičanskog ulja s dodatkom standarda.
- (b) Druga frakcija (40 ml) maslinovog ulja koje sadrži 0,10 mg/kg stigmastadiena.
- (c) Druga frakcija (40 ml) koja sadrži mali postotak prve frakcije.

**Slika 2**

Plinski kromatogram dobiven analizom uzoraka rafiniranog maslinovog ulja na stupcu DB-5 i koji pokazuje izomer 3,5-stigmastadiena.

▼ **M25***PRILOG XVIII.***ODREĐIVANJE RAZLIKE IZMEĐU STVARNE I TEORETSKE KOLIČINE TRIACILGLICEROLA S ECN 42**

1. OPSEG

Određivanje apsolutne razlike između eksperimentalnih vrijednosti triacilglicerola (TAG) s ekvivalentnim ugljikovim brojem 42 (ECN₄₂^{HPLC}) dobivenog određivanjem u ulju visoko djelotvornom tekućinskom kromatografijom i teoretske vrijednosti TAG-a s ekvivalentnim ugljikovim brojem 42 (ECN 42^{teoretski}) izračunato na temelju sastava masnih kiselina.

2. PODRUČJE PRIMJENE

Ova se norma primjenjuje na maslinova ulja. Metoda se primjenjuje za dokazivanje prisutnosti malih količina sjemenskih ulja (bogatih linolnom kiselinom) u svim kategorijama maslinovih ulja.

3. PRINCIP

Udio triacilglicerola s ECN 42 određen HPLC metodom i teoretski udio triacilglicerola s ECN 42 (izračunan na temelju sastava masnih kiselina utvrđenog plinsko-tekućinskom kromatografijom) podudaraju se unutar određenih granica za čista ulja. Razlika veća od vrijednosti utvrđenih za pojedine vrste ulja ukazuju na to da ulje sadrži sjemenska ulja.

4. METODA

Metoda izračunavanja teoretskog udjela triacilglicerola s ECN 42 te razlike između teoretskog udjela i rezultata dobivenih HPLC metodom, u osnovi predstavlja uspoređivanje analitičkih podataka dobivenih pomoću drugih metoda. Mogu se razlikovati tri faze: određivanje sastava masnih kiselina kapilarnom plinskom kromatografijom, izračunavanje teoretskog sastava triacilglicerola s ECN 42 te određivanje triacilglicerola s ECN 42 HPLC metodom.

4.1. **Aparatura**

4.1.1. Tikvice s okruglim dnom, 250 i 500 ml.

4.1.2. Laboratorijske čaše, 100 ml.

4.1.3. Staklena kromatografska kolona unutarnjeg promjera 21 mm, duljine 450 mm, s pipcem i normiranim konusnim nastavkom (s unutarnje strane) pri vrhu.

4.1.4. Lijeveci za odjeljivanje od 250 ml, s normiranim konusnim nastavkom (s vanjske strane) na dnu, prikladni za spajanje na vrh kolone.

4.1.5. Stakleni štapić duljine 600 mm.

4.1.6. Stakleni lijevak promjera 80 mm.

4.1.7. Odmjerne tikvice od 50 ml.

4.1.8. Odmjerne tikvice od 20 ml.

4.1.9. Rotirajući uparivač.

4.1.10. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti koji omogućuje termostatsku kontrolu temperature kolone.

4.1.11. Jedinica za injektiranje 10 µl.

4.1.12. Detektor: diferencijalni refraktometar. Osjetljivost na punoj skali treba biti najmanje 10⁻⁴ jedinica indeksa refrakcije.

▼ **M25**

4.1.13. Kolona: cijev od nehrđajućeg čelika duljine 250 mm i unutarnjeg promjera 4,5 mm, napunjena zncima silikagela promjera 5 µm s 22 do 23 % ugljika u obliku oktadecilsilana.

4.1.14. Softver za obradu podataka.

4.1.15. Posude od oko 2 ml, s teflonskim zatvaračima i čepovima s navojem.

4.2. **Reagensi**

Reagensi moraju biti analitičke čistoće. Otapala za eluiranje moraju biti takva da se mogu nekoliko puta reciklirati, a da to ne utječe na odvajanja, i iz njih moraju biti odstranjeni svi plinovi.

4.2.1. Petroleter 40 do 60 °C za kromatografiju ili heksan.

4.2.2. Svježe destiliran etil eter bez peroksida.

4.2.3. Otapalo za eluiranje za čišćenje ulja kolonskom kromatografijom, smjesa petroletera/etil etera 87/13 (v/v).

4.2.4. Silikagel, 70-230 mesha, tip Merck 7734, sa standardiziranim udjelom vode od 5 % (w/w/).

4.2.5. Staklena vuna.

4.2.6. Aceton za HPLC.

4.2.7. Acetonitril ili propionitril za HPLC.

4.2.8. Otapalo za eluiranje za HPLC: acetonitril + aceton (omjere treba prilagoditi tako da se postigne željeni stupanj razdvajanja; započinje se sa smjesom 50:50) ili propionitril.

4.2.9. Otapalo za rastapanje: aceton.

4.2.10. Referentni trigliceridi: mogu se koristiti trigliceridi dostupni na tržištu (tripalmitin, triolein itd.) u kojem se slučaju vremena zadržavanja bilježe u skladu s ekvivalentnim ugljikovim brojem ili se pak mogu koristiti referentni kromatogrami dobiveni iz sojinog ulja, smjese soja i maslinova ulja u omjeru 30:70 te čistog maslinovog ulja (vidjeti napomene 1. i 2. te slike 1. do 4.).

4.2.11. 6-mililitarska kolona za ekstrakciju na čvrstoj fazi, s fazom 1 g silikagela.

4.3. **Priprema uzoraka**

Budući da niz interferentnih tvari može dovesti do lažnih pozitivnih rezultata, uzorak se svaki put mora pročititi prema IUPAC metodi br. 2.507 koja se koristi za određivanje polarnih tvari u oksidiranim uljima.

4.3.1. *Priprema kromatografske kolone*

Napuniti kolonu (4.1.3.) s oko 30 ml otapala za eluiranje (4.2.3.), a zatim u kolonu unijeti malo staklene vune (4.2.5.) gurajući je do dna kolone staklenim štapićem (4.1.5.).

U laboratorijskoj čaši od 100 ml pripremiti suspenziju 25 g silikagela (4.2.4.) u 80 ml elucijske mješavine (4.2.3.) te je prebaciti u kolonu pomoću staklenog lijevka (4.1.6.).

Kako bi se osiguralo da je silikagel u potpunosti prenesen u kolonu, čaša se nekoliko puta ispere smjesom otapala za eluiranje, prebacujući i to u kolonu.

Otvaranjem pipca pri dnu kolone, otapalo se ispusti do visine od 1 cm iznad površine silikagela.

▼ **M25**4.3.2. *Kromatografija na koloni*

S točnošću od 0,001 g odvagati 2,5 ± 0,1 g prethodno filtriranog, homogeniziranog i osušenog ulja, ako je potrebno, u odmjernu tikvicu volumena 50 ml (4.1.7.).

Otopiti u oko 20 ml otapala za eluiranje (4.2.3.). Ako je potrebno, lagano zagrijati da bi se lakše otopilo. Ohladiti na sobnu temperaturu i prilagoditi volumen otapalom za eluiranje.

Pomoću volumetrijske pipete unijeti 20 ml otapala u kolonu pripremljenu u skladu s 4.3.1., otvoriti pipac i pustiti da otopina eluira do razine sloja silikagela.

Potom eluirati sa 150 ml otapala za eluiranje (4.2.3.), prilagodavajući protok otapala na oko 2 ml/min (za 150 ml treba 60 do 70 minuta da prođe kroz kolonu).

Eluat se skuplja u tikvicu okruglog dna volumena 250 ml (4.1.1.) prethodno tariranu u peći i točno izvaganu. Otapalo se ukloni na rotirajućem vakuum uparivaču (4.1.9.) te zatim izvaže ostatak u tikvici koji će se koristiti za pripremu otopine za HPLC analizu i za pripremu metil estera.

Udio sakupljenog uzorka iz kolone mora biti najmanje 90 % za kategorije ekstra djevičanskog, djevičanskog, običnog i rafiniranog maslinovog ulja te najmanje 80 % za maslinovo ulje lampante i ulje komine maslina.

4.3.3. *Čišćenje s ekstrakcijom na čvrstoj fazi*

Kolona sa silikagelom za ekstrakciju na čvrstoj fazi aktivira se sa 6 ml heksana (4.2.3.) u vakuumu, izbjegavajući isušenje.

S točnošću od 0,0001 g izvagati 0,12 g u posudi od 2 ml (4.1.15.) i otopiti s 0,5 ml heksana (4.2.3.).

Otopinu unijeti u kolonu za ekstrakciju na čvrstoj fazi i eluirati s 10 ml heksana-dietil etera (87:13 v/v) (4.2.3.) pod vakuumom.

Sakupljena frakcija se u rotacijskom isparivaču (4.1.9.) upari do suhoće pod sniženim tlakom na sobnoj temperaturi. Ostatak se otopi u 2 ml acetona (4.2.6.) za analizu triacilglicerola (TAG).

4.4. **Analiza HPLC metodom**4.4.1. *Priprema uzoraka za kromatografiju*

5 %-tna otopina uzorka koji će se analizirati priprema se vaganjem 0,5 ± 0,001 g uzorka u odmjernoj tikvici od 10 ml te nadopunjavanjem do 10 ml otapalom (4.2.9.).

4.4.2. *Postupak*

Postaviti sustav za kromatografiju. Upumpati otapalo za eluiranje (4.2.8.) brzinom od 1,5 ml/min da bi se pročistio cijeli sustav. Pričekati dok se ne dobije stabilna bazna linija.

Injektirati 10 µl uzorka pripremljenog kao u točki 4.3.

4.4.3. *Izračunavanje i izražavanje rezultata*

Koristiti metodu normalizacije površine, odnosno, pretpostavlja se da zbroj površina pikova koji odgovaraju TAG-ovima od ECN42 do ECN52 iznosi 100 %.

Izračunati relativni postotak svakog triglicerida pomoću formule:

$$\% \text{ triglicerida} = \text{površina pika} \times 100 / \text{zbroj površina pikova}.$$

Rezultate treba izraziti s najmanje dva decimalna mjesta.

Vidjeti napomene 1. do 4.

▼ **M25**4.5. **Izračun sastava triacilglicerola (Mol %) na temelju podataka o sastavu masnih kiselina (% površina)**4.5.1. *Određivanje sastava masnih kiselina*

Sastav masnih kiselina utvrđuje se u skladu s normom ISO 5508 pomoću kapilarne kolone. Metil esteri pripremaju se na temelju COI/T.20/dok. br. 24.

4.5.2. *Masne kiseline koje se uzimaju u obzir za izračunavanje*

Gliceridi se grupiraju prema njihovom ekvivalentnom broju ugljika (ECN), uzimajući u obzir sljedeće ekvivalentnosti između ECN-a i masnih kiselina. U obzir se uzimaju samo masne kiseline sa 16 i 18 atoma ugljika jer su samo one bitne za maslinovo ulje. Masne kiseline bi trebalo normalizirati do 100 %.

Masna kiselina (MK)	Kratice	Molekularna masa (Mm)	ECN
Palmitinska kiselina	P	256,4	16
Palmitoleinska kiselina	Po	254,4	14
Stearinska kiselina	S	284,5	18
Oleinska kiselina	O	282,5	16
Linolna kiselina	L	280,4	14
Linolenska kiselina	Ln	278,4	12

4.5.3. *Preračunavanje površina (%) u molove za sve masne kiseline (1)*

$$\text{Mol P} = \frac{\% \text{ površine P}}{\text{MM P}} \quad \text{Mol S} = \frac{\% \text{ površine S}}{\text{MM S}} \quad \text{Mol Po} = \frac{\% \text{ površine Po}}{\text{MM Po}}$$

$$\text{Mol O} = \frac{\% \text{ površine O}}{\text{Mm O}} \quad \text{Mol L} = \frac{\% \text{ površine L}}{\text{Mm L}} \quad \text{Mol Ln} = \frac{\% \text{ površine Ln}}{\text{Mm Ln}}$$

4.5.4. *Normalizacija masnih kiselina na 100 % (2)*

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

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

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

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

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

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

Kao rezultat se dobiva udio svake masne kiseline u molnim postocima s obzirom na sve položaje u triacilgliceridima (1,2,3-).

Zatim se izračunava zbroj zasićenih masnih kiselina P i S (ZMK) te nezasićenih masnih kiselina Po, O, L i Ln (NMK) (3):

$$\text{Mol \% ZMK} = \text{Mol \% P} + \text{Mol \% S}$$

$$\text{Mol \% NMK} = 100 - \text{Mol \% ZMK}$$

▼ **M25**4.5.5. *Izračunavanje sastava masnih kiselina na 2- i 1, 3-položaju TAG-a*

Masne kiseline raspoređene su u tri skupine kako slijedi: dvije istovjetne skupine za 1- i 3- položaj te jedna za 2-položaj, s različitim koeficijentima za zasićene (P i S) i nezasićene masne kiseline (Po, O, L i Ln).

4.5.5.1. Zasićene masne kiseline na 2-položaju [P(2) i S(2)] (4):

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

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

4.5.5.2. Nezasićene masne kiseline na 2-položaju [Po(2), O(2), L(2) i Ln(2)] (5):

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

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

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

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

4.5.5.3. Masne kiseline u 1,3-položajima [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) i Ln(1,3)] (6):

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

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

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

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

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

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

4.5.6. *Izračunavanje triacilglicerola*

4.5.6.1. TAG s jednom masnom kiselinom (AAA, ovdje LLL, PoPoPo) (7)

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

4.5.6.2. TAG s dvije masne kiseline (AAB, ovdje PoPoL, PoLL) (8)

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

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

▼ **M25**

4.5.6.3. TAG s tri različite masne kiseline (ABC, ovdje OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln) (9)

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

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

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

4.5.6.4. Triacilgliceroli s ECN 42

Sljedeći triacilgliceroli s ECN 42 uzimaju su u obzir prema jednadžbama 7, 8 i 9, redosljedom očekivanog eluiranja pri analizi HPLC metodom (obično samo tri pika):

LLL

PoLL i pozicijski izomer LPoL

OLLn i pozicijski izomeri OLnL i LnOL

PoPoL i pozicijski izomer PoLPo

PoOLn i pozicijski izomeri OPoLn i OLnPo

PLLn i pozicijski izomeri LLnP i LnPL

PoPoPo

SLnLn i pozicijski izomer LnSLn

PPoLn i pozicijski izomeri PLnPo i PoPLn

Triacilgliceroli s ECN 42 izraženi su kao zbroj ovih devet triacilglicerola, uključujući njihove pozicijske izomere. Rezultate treba izraziti s najmanje dva decimalna mjesta.

5. OCJENJIVANJE REZULTATA

Izračunati teoretski udio uspoređuje se s udjelom utvrđenim HPLC analizom. Ako je apsolutna razlika koju dobijemo kad od podataka HPLC oduzmemo teoretske podatke veća od vrijednosti navedenih za odgovarajuću kategoriju ulja u normi, uzorak sadrži sjemensko ulje.

Rezultati se izražavaju s dva decimalna mjesta.

6. PRIMJER (BROJEVI SE ODNOSE NA ODJELJKE U TEKSTU METODE)

— 4.5.1. *Izračunavanje molarnih % masnih kiselina iz podataka dobivenih plinsko-tekućinskom kromatografijom (normalizirana površina %)*

Plinsko-tekućinskom kromatografijom dobivaju se sljedeći podaci o sastavu masnih kiselina:

MK	P	S	Po	O	L	Ln
Mm	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
% površine	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼ **M25**

— 4.5.3. *Preračunavanje % površina u molove za sve masne kiseline (vidjeti formulu (1))*

$$\text{Mol P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ mola P}$$

$$\text{Mol S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ mola S}$$

$$\text{Mol Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ mola Po}$$

$$\text{Mol O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ mola O}$$

$$\text{Mol L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ mola L}$$

$$\text{Mol Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ mola Ln}$$

$$\text{Ukupno} = 0,35821 \text{ Mol TAG}$$

— 4.5.4. *Normalizacija masnih kiselina na 100 % (vidjeti formulu (2))*

$$\text{Mol \% P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ mola P} * 100}{0,35821 \text{ mola}} = 10,887 \%$$

$$\text{Mol \% S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ mola S} * 100}{0,35821 \text{ mola}} = 2,942 \%$$

$$\text{Mol \% Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ mola Po} * 100}{0,35821 \text{ mola}} = 1,097 \%$$

$$\text{Mol \% O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ mola O} * 100}{0,35821 \text{ mola}} = 74,116 \%$$

$$\text{Mol \% L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ mola L} * 100}{0,35821 \text{ mola}} = 9,955 \%$$

$$\text{Mol \% Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ mola Ln} * 100}{0,35821 \text{ mola}} = 1,002 \%$$

$$\text{Ukupno Mol \%} = 100 \%$$

Zbroj zasićenih i nezasićenih masnih kiselina na 1,2,3-položaju TAG (vidjeti formulu (3)):

$$\text{mola \% ZMK} = 10,887 \% + 2,942 \% = \mathbf{13,829 \%}$$

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

— 4.5.5. *Izračunavanje sastava masnih kiselina na 2- i 1,3-položaju TAG*

— 4.5.5.1. *Zasićene masne kiseline na 2-položaju [P(2) i S(2)] (vidjeti formulu (4))*

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

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

— 4.5.5.2. *Nezasićene masne kiseline na 2-položaju [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) i Ln(1,3)] (vidjeti formulu (5))*

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

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

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

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

▼ **M25**

- 4.5.5.3. Masne kiseline na 1,3-položajima [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) i Ln(1,3)] (vidjeti formulu (6))

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

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

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

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

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

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

- 4.5.6. *Izračunavanje triacilglicerola*

Iz izračunatog sastava masnih kiselina na sn-2- i sn-1,3-položajima:

MK u	1,3-položaju	2-položaju
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 %
Zbroj	100,0 %	100,0 %

izračunavaju se sljedeći triacilgliceroli:

LLL

PoPoPo

PoLL s jednim pozicijskim izomerom

SLnLn s jednim pozicijskim izomerom

PoPoL s jednim pozicijskim izomerom

PPoLn s dva pozicijska izomera

OLLn s dva pozicijska izomera

PLLn s dva pozicijska izomera

PoOLn s dva pozicijska izomera

- 4.5.6.1. TAG s jednom masnom kiselinom (LLL, PoPoPo) (vidjeti formulu (7))

$$\text{Mol \% LLL} = \frac{9,204 \% * 11,457 \% * 9,204 \%}{10\ 000} = \mathbf{0,09706 \text{ Mol LLL}}$$

$$\text{Mol \% PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 1,015 \%}{10\ 000} = \mathbf{0,00013 \text{ Mol PoPoPo}}$$

▼ **M25**

— 4.5.6.2. TAG s dvije masne kiseline (PoLL, SLnLn, PoPoL) (vidjeti formulu (8))

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

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

0,03210 Mol PoLL

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

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

0,00094 Mol SLnLn

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

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

0,00354 Mol PoPoL

— 4.5.6.3. TAG s tri različite masne kiseline (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) Vidjeti formulu (9)

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

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

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

0,00761 Mol PPLn

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

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

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

0,43655 Mol OLLn

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

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

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

0,06907 Mol PLLn

▼ **M25**

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

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

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

0,04812 Mol PoOLn

ECN42 = 0,69512 Mol TAG

Napomena 1.: Redosljed eluiranja može se odrediti izračunavanjem ekvivalentnog broja ugljika, što se najčešće definira izrazom $ECN = CN - 2n$, pri čemu je CN broj atoma ugljika, a n broj dvostrukih veza; preciznije se može izračunati tako da se u obzir uzme izvor dvostruke veze. Ako su n_o , n_l i n_{ln} brojevi dvostrukih veza koje se pripisuju oleinskoj, linolnoj i linolenskoj kiselini, ekvivalentni broj ugljika se može izračunati pomoću izraza:

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

pri čemu se koeficijent d_o , d_l i d_{ln} može izračunati pomoću referentnih triglicerida. U uvjetima propisanim ovom metodom, približno vrijedi sljedeći odnos:

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

Napomena 2.: S nekoliko je referentnih triglicerida također moguće izračunati rezoluciju u odnosu na triolein:

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

primjenom korigiranog (smanjenog) vremena zadržavanja $RT^1 = RT - RT \text{ otapalo}$

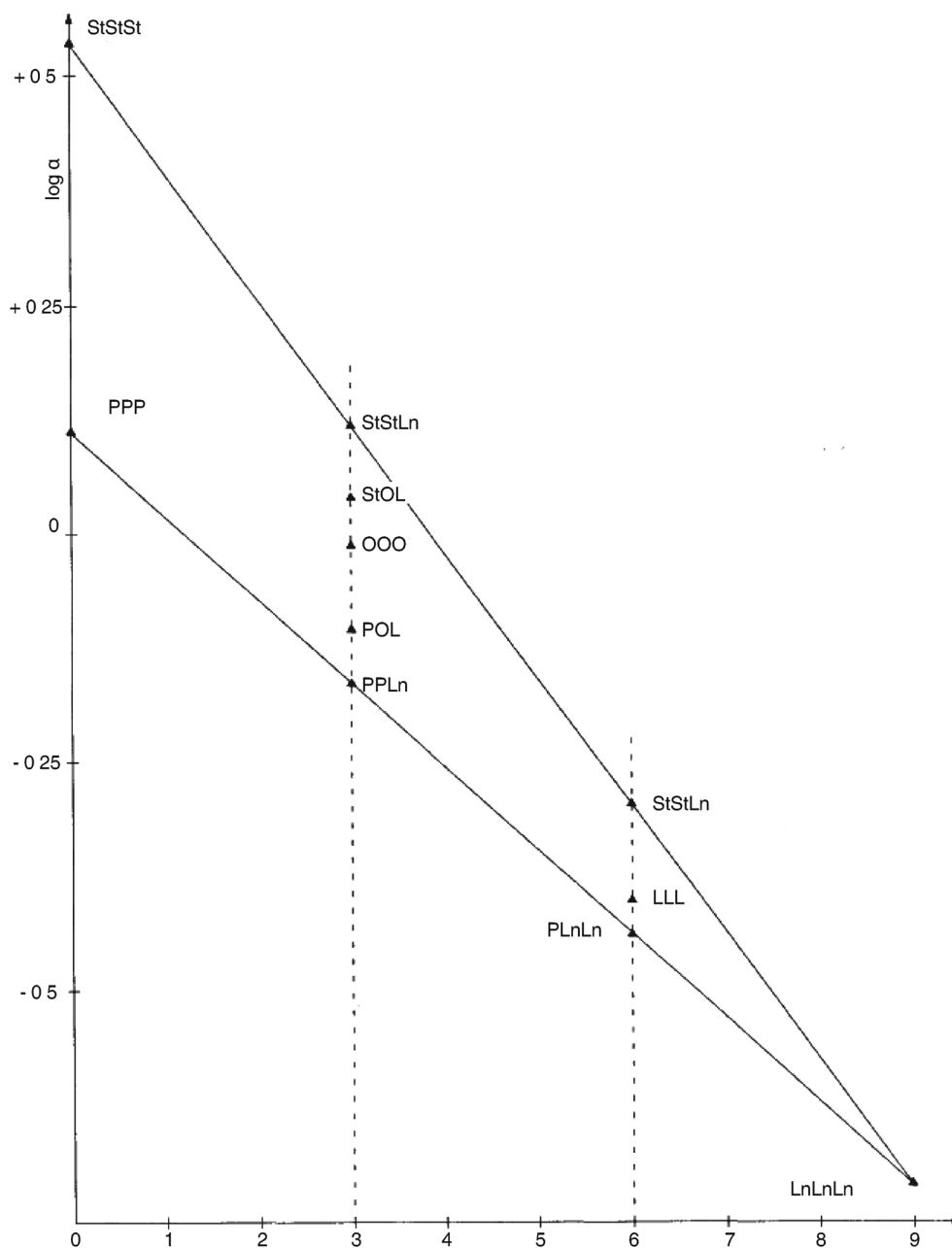
Graf log α u ovisnosti o f (broj dvostrukih veza) omogućuje određivanje vremena zadržavanja za sve trigliceride masnih kiselina koji su prisutni u referentnim trigliceridima — vidjeti sliku 1.

Napomena 3.: Učinkovitost kolone mora omogućiti jasno odvajanje pika trilinoleina od pikova triglicerida sa susjednim RT. Eluiranje se provodi do pika ECN 52.

Napomena 4.: Ispravno određivanje površina svih pikova važnih za analizu je osigurano ako drugi pik koji odgovara ECN 50 doseže 50 % pune skale pisača.

▼ M25

Slika 1.

Graf ovisnosti $\log \alpha$ o f (broj dvostrukih veza)

Broj dvostrukih veza

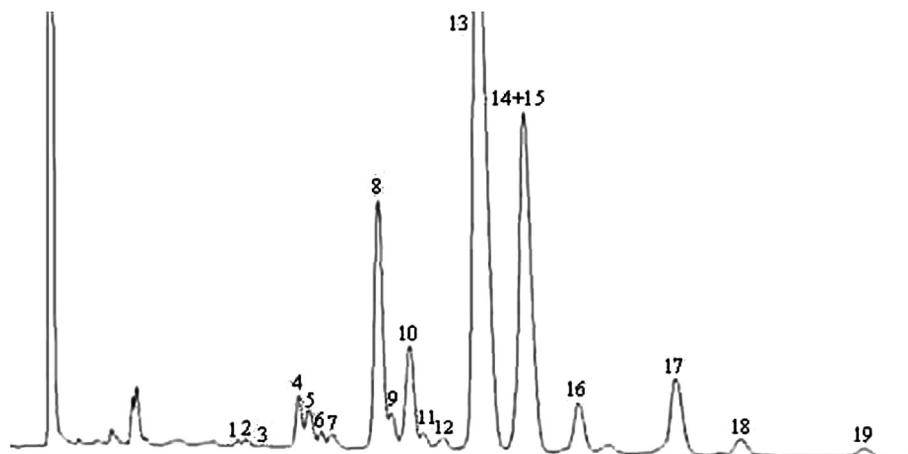
La: laurinska kiselina; My: miristinska kiselina; P: palmitinska kiselina; St: stearinska kiselina; O: oleinska kiselina; L: linolna kiselina; Ln: linolenska kiselina

▼ **M25**

Slika 2.

Maslinovo ulje s niskim udjelom linolne kiseline

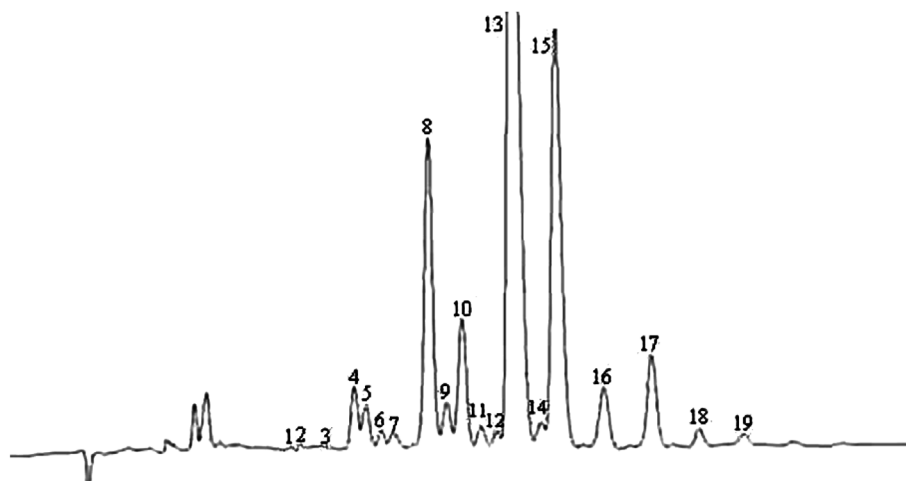
(a)



S otapalom: Aceton/Acetonitril.

PROFIL a: Glavne komponente kromatografskih pikova: **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)



S otapalom: Propionitril

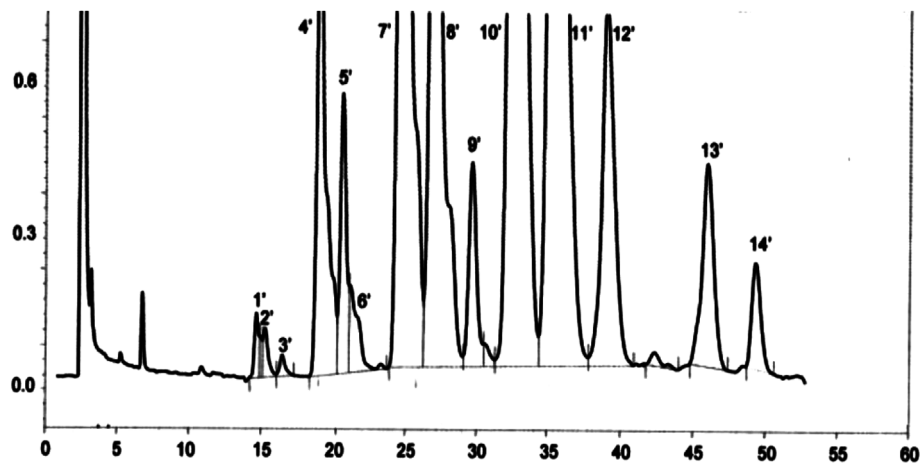
PROFIL b: Glavne komponente kromatografskih pikova: **ECN42**: (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPoPo + PPoL; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP;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

▼ M25

Slika 3.

Maslinovo ulje s visokim udjelom linolne kiseline

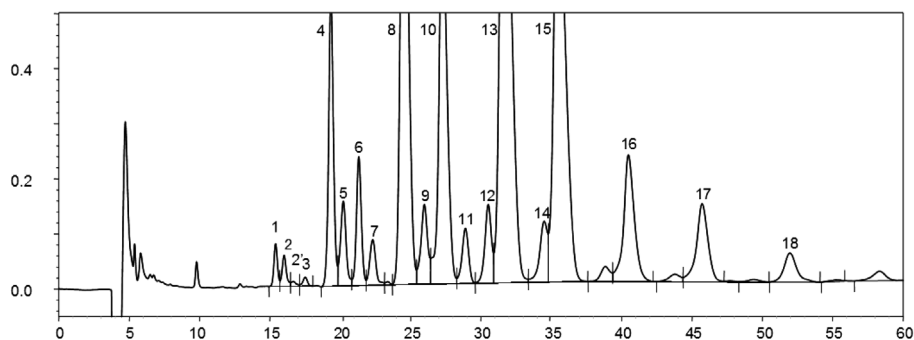
(a)



S otapalom: Aceton/Acetonitril (50:50).

Profil a: Glavne komponente kromatografskih pikova: **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)



S otapalom: Propionitril.

Profil b: Glavne komponente kromatografskih pikova: **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***PRILOG XIX.*▼ **M28****ODREĐIVANJE SADRŽAJA ALIFATSKIH I TRITERPENSKIH ALKOHOLA KAPILARNOM PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM**

1. PREDMET

Ovim se Prilogom opisuje metoda za određivanje sadržaja alifatskih i triterpenskih alkohola u uljima i mastima.

▼ **M19**

2. PRINCIP METODE

Masna tvar s dodatkom 1-eikosanola koji služi kao interni standard saponificira se otopinom kalijevog hidroksida u etanolu i zatim se neosapunjiva tvar ekstrahira dietilnim eterom. Alkoholna se frakcija odjeljuje od neosapunjive tvari tankoslojnom kromatografijom na bazičnoj podlozi od silikagela; alkoholi koji se dobiju sa silikagela transformiraju se u trimetilsilil etera i analiziraju kapilarnom plinskom kromatografijom.

3. OPREMA

- 3.1. Tikvica okruglog dna volumena 250 ml s povratnim hladilom i nastavcima od brušenog stakla.
- 3.2. Lijevak za odjeljivanje volumena 500 ml.
- 3.3. Tikvice okruglog dna volumena 250 ml.
- 3.4. Kromatografska komora za tankoslojnu kromatografiju, za staklene ploče veličine 20 × 20 cm.
- 3.5. Ultraljubičasta svjetiljka valne duljine 366 ili 254 nm.
- 3.6. Mikroštrcaljke od 100 µl i 500 µl.
- 3.7. Cilindrični lijevak za filtriranje s poroznom pločom G3 (poroznost 15-40 µm), promjera približno 2 cm i dubine približno 5 cm, s nastavkom prikladnim za filtriranje pod vakuumom i 12/21 s muškim spojem od brušenog stakla.
- 3.8. Vakuumska tikvica volumena 50 ml, s 12/21 ženskim spojem od brušenog stakla za korištenje s lijevkom za filtriranje (3.7.).
- 3.9. Epruveta volumena 10 ml s konusnim dnom i nepropusnim čepom.
- 3.10. Plinski kromatograf za korištenje s kapilarnom kolonom i opremljen sustavom za razdvajanje koji se sastoji od:
 - 3.10.1. termostatske komore za kolone (peć), koja može održavati željene temperature uz točnost ± 1 °C;
 - 3.10.2. jedinica za injektiranje s mogućnošću podešavanja temperature, s elementom za uparavanje od persilaniziranog stakla;
 - 3.10.3. plameno-ionizacijski detektor i mjerni pretvarač s pojačalom;
 - 3.10.4. snimač-integrator koji se može povezati s pretvaračem s pojačalom (3.10.3.), s vremenom reakcije koje nije dulje od jedne sekunde i s varijabilnom brzinom papira.
- 3.11. staklena ili kvarcna kapilarna kolona duljine 20 do 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 do 0,32 mm, s SE-52, SE-54 ili drugom odgovarajućom tekućom fazom, ravnomjerne debljine filma između 0,10 i 0,30 µm.
- 3.12. Mikroštrcaljka za plinsku kromatografiju volumena 10 µl, s tvrdom iglom.
- 3.13. Analitička vaga osjetljivosti 1 mg (s podjelom od 0,1 mg).

▼ M19

4. REAGENSI
- 4.1. Kalijev hidroksid, približno 2 mol/l otopina u etanolu: 130 g kalijevog hidroksida (minimalne koncentracije 85 %) otopi se uz hlađenje u 200 ml destilirane vode i zatim nadopuni etanolom do jedne litre. Otopina se treba čuvati u dobro začepljenoj boci od tamnog stakla.
- 4.2. Dietilni eter, analitičke čistoće.
- 4.3. Bezvodni natrijev sulfat, analitičke čistoće.
- 4.4. Staklene ploče sa slojem silikagela, bez indikatora fluorescencije, debljine 0,25 ml (na tržištu su dostupne ploče spremne za uporabu).
- 4.5. Kalijev hidroksid, približno 0,2 mol/l otopina u etanolu: 13 g kalijevog hidroksida otopi se u 20 ml destilirane vode i zatim nadopuni etanolom do jedne litre.
- 4.6. Benzen, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
- 4.7. Aceton, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
- 4.8. Heksan, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
- 4.9. Dietilni eter, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
- 4.10. Kloroform, za kromatografiju.

▼ M28

- 4.11. Referentna otopina za tankoslojnu kromatografiju: C₂₀-C₂₈ alkohola 0,5 % u kloroformu ili alkoholna frakcija dobivena kako je navedeno u točki 5.2. od neosapunjivih tvari ulja komine maslina.

▼ M19

- 4.12. 0,2 %-tna otopina 2',7'-diklorfluoresceina u etanolu. Može se učiniti blago lužnatim dodavanjem nekoliko kapi otopine 2 mol/l kalijevog hidroksida.
- 4.13. Bezvodni piridin, za kromatografiju.
- 4.14. Heksametildisilazan.
- 4.15. Trimetilklorosilan.
- 4.16. Standardne otopine trimetilsilil etera alifatskih alkohola od C₂₀ do C₂₈. Mogu se pripremiti iz mješavina čistih alkohola, neposredno prije upotrebe.
- 4.17. 0,1 %-tna (m/v) otopina 1-eikosanola u kloroformu (interni standard).
- 4.18. Plin nosač: vodik ili helij, kromatografske čistoće.
- 4.19. Pomoćni plin: dušik, kromatografske čistoće.

5. POSTUPAK**5.1. Priprava neosapunjive tvari**

- 5.1.1. Pomoću mikroštrcaljke od 500 µl u tikvicu okruglog dna volumena 250 ml ubrizgati volumen 0,1 %-tne otopine 1-eikosanola u kloroformu (4.17.), koji sadrži udio 1-eikosanola približno jednak 10 % sadržaja alifatskih alkohola u dijelu uzorka koji se uzima za analizu. Na primjer, za 5 g uzorka dodaje se 250 µl 0,1 %-tne otopine 1-eikosanola u slučaju maslinovog ulja i 1 500 µl u slučaju ulja komine maslina.

Upariti do suha u struji dušika i zatim izvagati točno 5 g suhog filtriranog uzorka u istu tikvicu.

▼ **M19**

5.1.2. Dodati 50 ml 2 mol/l otopine kalij hidroksida u etanolu, pričvrstiti povratno hladilo i zagrijavati na parnoj kupelji do točke slabog vrenja, uz neprekidno miješanje tijekom zagrijavanja, dok se ne završi saponifikacija (otopina postaje bistra). Zagrijavanje nastaviti još sljedećih 20 minuta i zatim kroz hladilo dodati 50 ml destilirane vode. Hladilo se zatim odvoji i tikvica ohladi na približno 30 °C.

5.1.3. Sadržaj tikvice kvantitativno prenijeti u lijevak za odjeljivanje volumena 500 ml dodajući destiliranu vodu nekoliko puta, tako da se ukupno doda približno 50 ml destilirane vode. Dodati približno 80 ml dietilnog etera, snažno tresti približno 30 sekundi i odložiti da se slegne (bilješka 1).

Odvojiti donju vodenu fazu sakupljajući je u drugom lijevku za odjeljivanje. Na vodenoj fazi na isti se način provode daljnje dvije ekstrakcije, uz korištenje 60 do 70 ml dietilnog etera za svaku.

Bilješka 1: Ako se stvori emulzija, može se ukloniti prskanjem malim količinama etanola ili metanola.

5.1.4. Ekstrakte dietilnog etera miješati u lijevku za odjeljivanje i isprati destiliranom vodom (po 50 ml) dok voda kojom se ispiralo ne pokaže neutralnu reakciju.

Vodu od ispiranja odbaciti, a eter-fazu osušiti bezvodnim natrijevim sulfatom i profiltrirati u prethodno izvaganu tikvicu volumena 250 ml, uz ispiranje lijevka i filtra malim količinama dietilnog etera koje se dodaju na ukupnu količinu.

5.1.5. Eter destilirati do volumena od nekoliko ml te zatim sušiti pod blagim vakuumom ili pod strujom dušika, sušenje se završava u peći na 100 °C približno četvrt sata te zatim važe nakon hlađenja u eksikatoru.

5.2. Odjeljivanje alkoholnih frakcija

5.2.1. Priprema osnovnih ploča za tankoslojnu kromatografiju: silikagel ploče (4.4) potpuno se uranjaju u otopinu kalijeveg hidroksida, koncentracije 0,2 mol/l (4.5.), na 10 sekundi te zatim ostave da se suše dva sata u digestoru i konačno stave u peč na 100 °C sat vremena.

Ploče se izvade iz peći i pohranjuju u eksikator s kalcijevim kloridom do upotrebe (ploče obrađene na ovaj način moraju se upotrijebiti u roku od 15 dana).

Bilješka 2: Kada se koriste osnovne silikagel ploče za odvajanje alkoholnih frakcija, nije potrebno tretirati neosapunjive tvari aluminijevim oksidom. Na taj se način svi kiseli sastojci (masne kiseline i drugi) zadržavaju na početku, čime se dobiva vrpca alifatskog alkohola i vrpca terpenskog alkohola, a obje se značajno razlikuju od vrpce sterola.

5.2.2. U komoru za razvijanje ploča unijeti mješavinu heksana i dietilnog etera u volumenom omjeru 65/35 (v/v), do razine od približno 1 cm ⁽¹⁾.

Komora se zatvara odgovarajućim poklopcem i ostavlja pola sata kako bi se uspostavila ravnoteža između pare i tekućine. Trake filter-papira namočene u eluens mogu se pričvrstiti na unutarnju površinu komore kako bi se skratilo vrijeme razvijanja za otprilike jednu trećinu i dobila jednoličnija, pravilna elucija komponenata.

⁽¹⁾ Posebno u tim slučajevima, za eluiranje se mora koristiti smjesa benzena i acetona u omjeru 95:5 (v/v), kako bi se dobilo jasno odvajanje vrpce.

▼ M19

Bilješka 3: Otopina za razvijanje mora se zamijeniti za svaku analizu kako bi se postigli ponovljivi uvjeti razvijanja.

- 5.2.3. Pripremi se približno 5 %-tna otopina neosapunjivih tvari (5.1.5) u kloroformu i, pomoću mikroštrcaljke od 100 µl, nanese 0,3 ml te otopine u što tanjoj i jednoličnijoj liniji na TLC ploču približno 2 cm od donjeg ruba TLC ploče. U ravnini originalnog sloja, nanosi se 2 do 3 µl referentne otopine alifatskih alkohola (4.11.) radi identificiranja vrpce alifatskog alkohola nakon završetka razvijanja.
- 5.2.4. Ploča se smjesti u komoru za razvijanje pripremljenu kako je opisano u 5.2.2. Temperaturu okoliša treba održavati između 15 i 20 °C. Komora se odmah zatvara poklopcem i ostavi da eluira dok prednji dio otapala ne dosegne približno 1 cm od gornjeg ruba ploče.

Ploča se zatim izvadi iz komore za razvijanje, a otapalo isparuje pod strujom vrućeg zraka ili se ploča ostavlja neko vrijeme u digestoru.

▼ M28

- 5.2.5. Ploča se blago i jednoliko pošprica otopinom 2',7'diklorfluoresceina kad se promatra pod ultraljubičastim svjetlom. Vrpce alifatskih alkohola moguće je identificirati usporedbom sa slojem dobivenim od referentne otopine: rubovi vrpce označe se crnom olovkom; označavajući zajedno vrpce alifatskih alkohola i vrpce terpenkih alkohola neposredno iznad nje (napomena 4.)

Napomena 4.: Vrpce alifatskih alkohola i terpenkih alkohola uzimaju se zajedno zbog mogućih migracija nekih alifatskih alkohola u vrpce triterpenkih alkohola. Primjer odjeljivanja tankoslojnom kromatografijom prikazan je na slici 1. Dodatak.

- 5.2.6. Silikagel koji se nalazi u označenom području sastrugati s pomoću metalne spatule. Tako dobiveni fino usitnjeni materijal unijeti u lijevak za filtriranje (3.7.). Dodati 10 ml vrućeg kloroforma, pažljivo izmiješati metalnom spatulom i filtrirati pod vakuumom, skupljajući filtrat u Erlenmeyerovu tikvicu (3.8.) spojenu na lijevak za filtriranje.

Silikagel u tikvici isprati tri puta dietilnim eterom (približno 10 ml svaki put), skupljajući filtrat u istu tikvicu spojenu na lijevak. Filtrat ispariti do volumena od 4 do 5 ml, prenijeti preostalu otopinu u prethodno izvaغانu epruvetu volumena 10 ml (3.9.), sušiti laganim zagrijavanjem pod blagom strujom dušika, otopiti s nekoliko kapi acetona, ponovo sušiti, staviti u peć na 105 °C približno 10 minuta, ostaviti da se ohladi u eksikatoru i izvagati.

Ostatak unutar epruvete sastoji se od alkoholne frakcije.

▼ M19**5.3. Pripremanje trimetilsilil etera**

- 5.3.1. Reagens za silaniziranje, koji se sastoji od mješavine piridina, heksametil-disilazana i trimetilklorosilana u volumnom omjeru 9:3:1 (v/v/v) (bilješka 5.), u omjeru od po 50 µl na svaki miligram alifatskih alkohola, dodaje se u epruvetu koja sadrži alkoholnu frakciju, tako da se izbjegne bilo kakva apsorpcija vlage (bilješka 6).

▼ **M19**

Bilješka 5: Otopine spremne za uporabu dostupne su u slobodnoj trgovini. Također su dostupni drugi reagensi za silaniziranje kao što su npr. bis-trimetilsililtrifluoracetamid + 1 % trimetil klorosila, za miješanje s jednakim volumenom bezvodnog piridina.

Bilješka 6: Normalno je da dođe do blage opalescencije koja neće utjecati na rezultat. Stvaranje bijelog flokulata ili pojava ružičastog obojenja upućuju na prisutnost vlage ili propadanje reagensa. U tom slučaju ispitivanje treba ponoviti.

- 5.3.2. Epruvetu treba začepiti i pažljivo protresti (bez preokretanja) dok se alifatski alkoholi potpuno ne otope. Ostavi se da stoji najmanje 15 minuta na sobnoj temperaturi i zatim centrifugira nekoliko minuta. Bistra otopina spremna je za analizu plinskim kromatografom.

5.4. **Analiza plinskim kromatografom**

5.4.1. Preliminarni postupci, punjenje kolone

- 5.4.1.1. Kolona se učvrsti u plinski kromatograf, priključujući početak kolone na injektor spojen sa sustavom razdvajanja, a kraj kolone na detektor. Provesti opću provjeru sklopa plinskog kromatografa (čvrstoću spoja (brtvljenja) plinskih priključaka, učinkovitost detektora, učinkovitost sustava razdvajanja i sustava za bilježenje itd.).

- 5.4.1.2. Ako se kapilarna kolona koristi prvi put, preporučuje se da ju se podvrgne kondicioniranju. Kroz kapilarnu kolonu pusti se da proteče malo plina nosača, a zatim se sklop plinskog kromatografa uključi i postupno ga se zagrijava dok se ne postigne temperatura koja je najmanje 20 °C iznad radne temperature (vidjeti bilješku 7.). Ta se temperatura treba održavati ne kraće od dva sata, zatim se sklop dovede na radne uvjete (reguliranje protoka plina, paljenje plamena dijeljenja, spoj na elektronički uređaj za bilježenje, prilagođavanje temperature komore (peći) kapilarne kolone, detektor i injektor, i tako dalje), a signal se prilagođava na osjetljivost koja je najmanje dvostruko viša od najviše razine predviđene za provođenje analize. Bazna linija za praćenje treba biti linearna, bez pikova ikakve vrste i ne smije pokazivati nikakve znakove otklona. Negativan pravocrtni otklon ukazuje na to da spojevi kolone nisu savršeno čvrsti (zabrtvljeni), dok pozitivan otklon ukazuje na to da kolona nije dostatno kondicionirana.

Napomena 7: Temperatura kondicioniranja mora biti najmanje 20 °C niža od maksimalne temperature predviđene za primijenjenu tekuću fazu.

5.4.2. Odabir radnih uvjeta

5.4.2.1. Opći radni uvjeti su sljedeći:

— temperatura kolone: inicijalna izoterma postavlja se na 180 °C osam minuta, a zatim se programira na povećanje od 5 °C/min dok ne dosegne 260 °C i daljnjih 15 minuta pri 260 °C,

— temperatura isparivača: 280 °C

— temperatura detektora: 290 °C

— linearna brzina plina nosača: helij 20 do 35 cm/s, vodik 30 do 50 cm/s,

— omjer razdvajanja: 1:50 do 1:100,

— osjetljivost instrumenta: 4 do 16 puta veća od minimalne atenuacije,

▼ M19

- osjetljivost bilježenja: 1 do 2 mV pune skale,
- brzina papira: 30 do 60 cm/h,
- količina injektirane tvari: 0,5 do 1 µl TMSE otopine,

Gore navedeni uvjeti mogu se modificirati u skladu s karakteristikama kolone i plinskog kromatografa kako bi se dobili kromatogrami koji udovoljavaju sljedećim uvjetima:

- retencijsko vrijeme alkohola C₂₆ treba biti 18 ± 5 minuta,
- pik alkohola C₂₂ treba biti 80 ± 20 % vrijednosti pune skale za maslinovo ulje, odnosno 40 ± 20 % vrijednosti pune skale za sjemensko ulje.

- 5.4.2.2. Gore navedeni zahtjevi provjeravaju se ponovljenim injektiranjem standardne TMSE mješavine alkohola i radni uvjeti se prilagođavaju kako bi se postigli najbolji mogući rezultati.
- 5.4.2.3. Parametri za integriranje pikova određuju se na takav način da se postigne ispravna procjena površine pikova koje se analizira.
- 5.4.3. Postupak analize
- 5.4.3.1. Korištenjem mikroštrcaljke volumena 10 µl unosi se 1 µl heksana, za kojim slijedi 0,5 µl zraka, a nakon toga 0,5 do 1 µl otopine uzorka. Pritom klip mikroštrcaljke treba podignuti da bi se igla ispraznila. Igla se uvodi kroz membranu sklopa za injektiranje; nakon jedne do dvije sekunde otopina se brzo injektira, a nakon približno pet sekundi igla se polako izvlači.
- 5.4.3.2. Bilježenje treba provoditi sve dok se TMSE prisutnih alifatskih alkohola u potpunosti ne eluira. Bazna linija treba u svakom trenutku odgovarati zahtjevima točke 5.4.1.2.

▼ M28

- 5.4.4. Identificiranje pikova.

Identificiranje pojedinačnih pikova provodi se u skladu s retencijskim vremenima i uspoređivanjem sa standardnom TMSE smjesom koju se analizira pri jednakim uvjetima.
Primjeri kromatograma alkoholne frakcije rafiniranog maslinovog ulja prikazani su na slikama 2. i 3. Dodatka.

▼ M19

- 5.4.5. Kvantitativna ocjena

- 5.4.5.1. Površine pikova 1-eikosanola i alifatskih alkohola C₂₂, C₂₄, C₂₆ i C₂₈ izračunavaju se elektroničkom integracijom.

- 5.4.5.2. Sadržaj svakog alifatskog alkohola, iskazan u mg/1 000

g masne tvari, izračunava se kako slijedi:

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

pri čemu je:

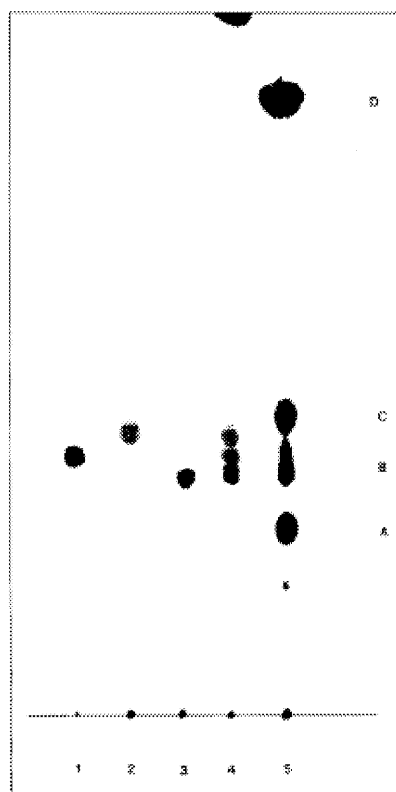
- A_x = površina pika alkohola x
 A_s = površina 1-eikosanola
 m_s = masa 1-eikosanola u miligramima
 m = masa uzorka u gramima

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

Iskazuje se sadržaj pojedinih alifatskih alkohola u mg/1 000 g masne tvari i zbroj „ukupnih alifatskih alkohola”.

▼ M28*Dodatak***Primjer odjeljivanja tankoslojnom kromatografijom i primjeri kromatograma***Slika 1.*

Ploče za tankoslojnu kromatografiju neosapunjive frakcije maslinovog ulja eluirane heksanom/dietilnim eterom (65/35)

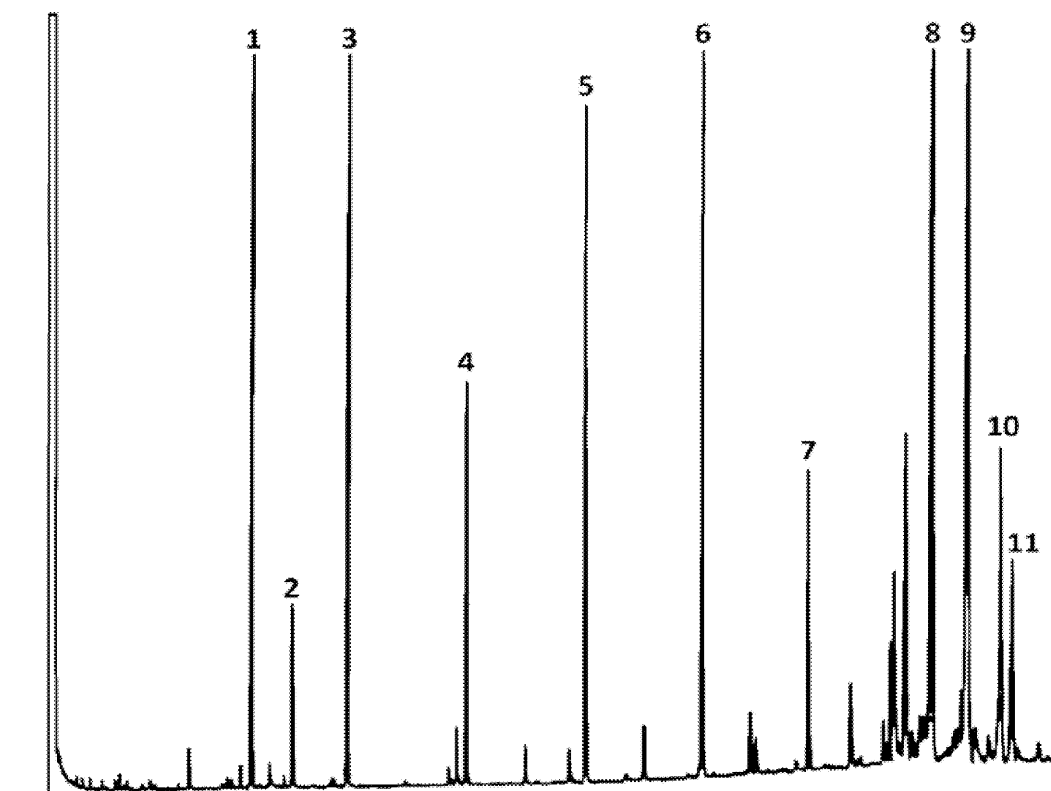


- | | | | |
|---|--|---|-----------------------|
| 1 | Alkohol C ₂₆ | A | Steroli |
| 2 | Alkohol C ₃₀ | B | Alifatski alkoholi |
| 3 | Alkohol C ₂₀ | C | Triterpenski alkoholi |
| 4 | Alkoholne mješavine C ₂₀₋₂₂₋₂₆₋₃₀ | D | Skvalen |
| 5 | Ekstra djevičansko neosapunjivo | | |

▼ M28

Slika 2.

Kromatogram alkoholne frakcije rafiniranog maslinovog ulja



1 = Fitol

2 = Geranilgeraniol

3 = Alkohol C₂₀ (IS)4 = Alkohol C₂₂5 = Alkohol C₂₄6 = Alkohol C₂₆7 = Alkohol C₂₈

8 = Cikloartenol

9 = 24-metilencikloartenol

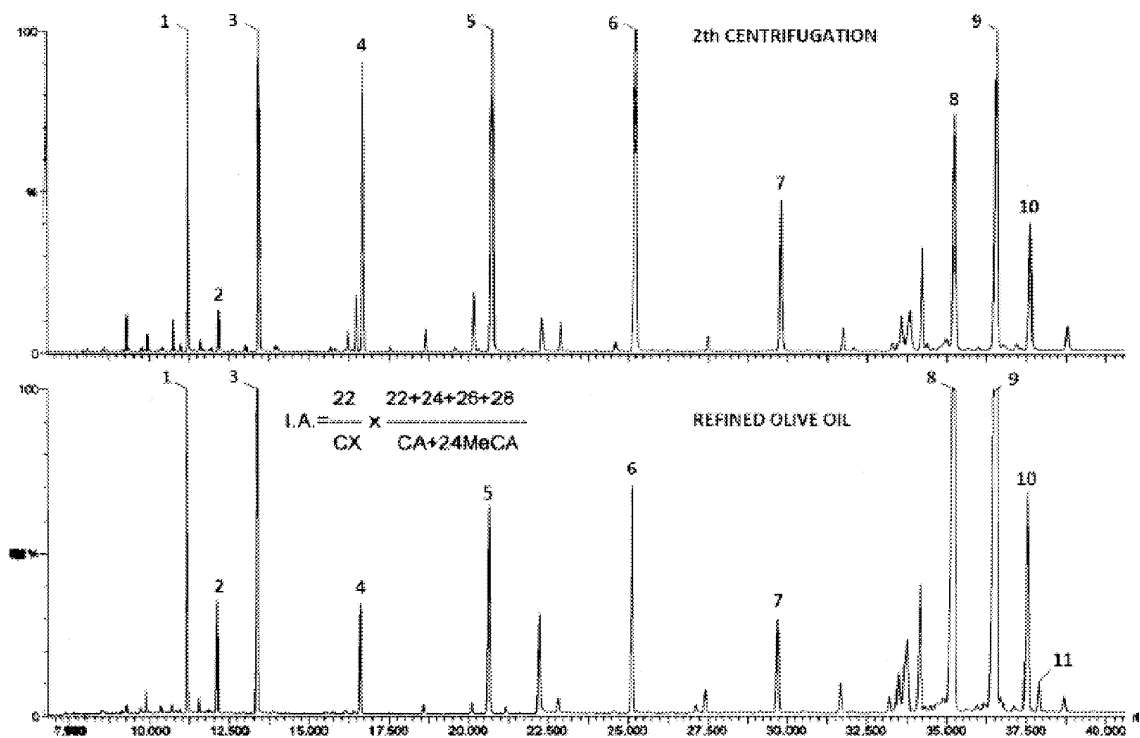
10 = Citrostadienol

11 = Ciklobranol

▼ M28

Slika 3.

Alifatski i triterpenski alkoholi u rafiniranom maslinovom ulju i maslinovom ulje koje je podvrgnuto dvostrukom centrifugiranju



- | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 1 = Fitol | 5 = Alkohol C ₂₄ | 9 = 24-metilcikloartenol (24MeCA) |
| 2 = Geranilgeraniol (CX) | 6 = Alkohol C ₂₆ | 10 = Citrostadienol |
| 3 = Alkohol C ₂₀ | 7 = Alkohol C ₂₈ | 11 = Ciklobranol |
| 4 = Alkohol C ₂₂ | 8 = Cikloartenol (CA) | |

▼ **M23***PRILOG XX.***Metoda određivanja udjela voskova, metil estera masnih kiselina i etil estera masnih kiselina kapilarnom plinskom kromatografijom**

1. SVRHA

Ovom se metodom određuje udjel voskova, metil estera masnih kiselina i etil estera masnih kiselina u maslinovim uljima. Pojedini voskovi i alkil esteri razdvajaju se prema broju ugljikovih atoma. Ova se metoda preporuča kao sredstvo za razlikovanje maslinovog ulja i ulja komine maslina te kao parametar kakvoće ekstra djevičanskih maslinovih ulja omogućavajući otkrivanje krivotvorenih mješavina ekstra djevičanskih maslinovih ulja s uljima niže kakvoće, bilo da su djevičanska, od komine maslina ili neka dezodorirana ulja.

2. PRINCIP

Dodavanje ulju odgovarajućih internih standarda i frakcioniranje pomoću kromatografske kolone punjene hidratiziranim silikagelom. Obnova frakcije koja je eluirana pod uvjetima ovog testiranja (polarnost niža od polarnosti triglicerida) i neposredna analiza kapilarnom plinskom kromatografijom.

3. APARATI

3.1. **Erlenmeyerova tikvica, 25 ml.**3.2. **Staklena kolona** za tekućinsku kromatografiju, unutarnjeg promjera 15 mm, duljine 30-40 cm, s odgovarajućim pipcem.3.3. **Plinski kromatograf** s kapilarnom kolonom, opremljen sustavom za izravno injektiranje uzorka u kolonu, koji se sastoji od:3.3.1. **Termostatska komora s regulatorom temperature.**3.3.2. **Hladni injektor** za izravno unošenje uzorka u kolonu.3.3.3. **Plameno-ionizacijski detektor i pretvarač-pojačalo.**3.3.4. **Pisač-integrator** (Napomena 1.) za uporabu s pretvaračem-pojačalom (točka 3.3.3.), s vremenom odziva manjim od 1 sekunde i promjenjivom brzinom papira.

Napomena 1: Također je moguće koristiti računalne sustave ako se podaci o plinskoj kromatografiji unose putem osobnog računala.

3.3.5. **Kapilarna kolona, lijevani silicijev dioksid (za analizu voskova i metil i etil estera)**, dužine 8-12 m, unutarnjeg promjera 0,25-0,32 mm, iznutra ravnomjerno obložene tekućom fazom (Napomena 2.) slojem debljine 0,10-0,30 μm .

Napomena 2: Na tržištu postoje tekuće faze pogodne za ovu namjenu poput SE52, SE54 itd.

3.4. **Mikrošprica**, od 10 μl , za izravno unošenje uzorka u kolonu, s čvrsto fiksiranom iglom.3.5. **Elektrovibrator.**3.6. **Rotacijski vakuum-uparivač.**3.7. **Visokotemperaturna peć (mufolna peć).**3.8. **Analitička vaga** osjetljivosti od $\pm 0,1$ mg.

▼ **M23**

3.9. Uobičajeno laboratorijsko stakleno suđe.

4. REAGENSI

4.1. **Silikagel** veličine zrna 60-200 µm. Staviti silikagel u mufolnu peć na 500 °C najmanje 4 sata. Nakon hlađenja dodati 2 % vode na količinu silikagela. Dobro protresti kako bi se suspenzija homogenizirala i držati na tamnom mjestu najmanje 12 sati prije upotrebe.

4.2. **n-heksan**, kromatografski stupanj ili stupanj ostatka (mora se provjeriti čistoća).

UPOZORENJE - Para se može zapaliti. Držite se podalje od izvora topline, iskrenja ili golog plamena. Uvijek provjerite jesu li boce dobro zatvorene. Osigurajte pravilno provjetranje tijekom uporabe. Treba izbjegavati nakupljanje pare i otkloniti eventualne opasnosti od požara, poput grijača ili električnih aparata koji nisu proizvedeni od nezapaljivog materijala. Opasno je ako se para udiše jer može izazvati oštećenje živčanih stanica. Treba izbjegavati udisanje pare. Ako je potrebno koristite odgovarajuće aparate za disanje. Treba izbjegavati dodir s očima i kožom.

4.3. **Etil eter, za kromatografiju**

UPOZORENJE - Visoko zapaljiv i umjereno toksičan, iritira kožu. Poguban ako se udiše. Može dovesti do oštećenja očiju. Učinci mogu biti odgođeni. To može stvoriti eksplozivne peroksidge. Pare se mogu zapaliti. Držite se podalje od izvora topline, iskrenja ili golog plamena. Uvijek provjerite jesu li boce dobro zatvorene. Osigurajte pravilno provjetranje tijekom uporabe. Treba izbjegavati nakupljanje pare i otkloniti eventualne ugroze od požara, poput grijača ili električnih aparata koji nisu proizvedeni od nezapaljivog materijala. Ne isparavajte do suhog ili gotovo suhog. Dodavanje vode ili odgovarajuće reducirajuće tvari može smanjiti stvaranje peroksidge. Nemojte piti. Treba izbjegavati udisanje pare. Izbjegavajte duži ili višekratni dodir s kožom.

4.4. **n-heptan**, za kromatografiju, ili **izo-oktan**

UPOZORENJE - Nezapaljiv. Opasan ako se udiše. Držite se podalje od izvora topline, iskrenja ili golog plamena. Uvijek provjerite jesu li boce dobro zatvorene. Osigurajte pravilno provjetranje tijekom uporabe. Treba izbjegavati udisanje pare. Izbjegavajte duži ili višekratni dodir s kožom.

4.5. **Standardna otopina lauril arahidata** (*Napomena 3.*), koncentracije 0,05 % (m/V) u heptanu (interni standard za voskove).

Napomena 3.: Također je moguće koristiti palmitil palmitat, miristil stearat ili arahidil laureat.

4.6. **Standardna otopina metil heptadekanoata, koncentracije 0,02 % (m/V) u heptanu (interni standard za metil i etil estere).**

4.7. **Sudan 1 (1-fenil-azo-2-naftol).**

▼ **M23****4.8. Plin nositelj: vodik ili helij, čistoće za plinsku kromatografiju.****UPOZORENJE**

Vodik. Pod pritiskom vrlo zapaljiv. Držati podalje od izvora topline, iskrenja ili golog plamena. Uvijek provjerite je li ventil boce dobro zatvoren kada nije u uporabi. Uvijek koristite ventil s reduktorom tlaka. Smanjite napetost opruge reduktora prije otvaranja ventila na boci. Kada otvarate ventil nemojte stajati ispred otvora za ispuštanje iz boce. Osigurajte pravilno provjetranje tijekom uporabe. Ne prenosite plin iz jedne boce u drugu. Nemojte miješati plin u boci. Osigurajte da se boce ne mogu prevrnuti. Držite ih dalje od sunčeve svjetlosti i izvora topline. Pohranite u okruženju bez korozije. Ne koristite oštećene ili neoznačene boce.

Helij. Komprimirani plin pod visokim tlakom. Smanjuje količinu kisika za disanje. Držite boce zatvorenima. Osigurajte pravilno provjetranje tijekom uporabe. Ne ulazite u skladište ako nije pravilno provjetreno. Uvijek koristite ventil s reduktorom tlaka. Smanjite napetost opruge reduktora prije otvaranja ventila na boci. Ne prenosite vodik iz jedne boce u drugu. Osigurajte da se boce ne mogu prevrnuti. Kada otvarate ventil nemojte stajati ispred otvora boce. Držite ih dalje od sunčeve svjetlosti i izvora topline. Pohranite ih u okruženju otpornom na koroziju. Ne koristite oštećene ili neoznačene boce. Nemojte udisati. Koristite isključivo za tehničke namjene.

4.9. Pomoćni plinovi:

— čisti vodik, za plinsku kromatografiju,

— čisti zrak, za plinsku kromatografiju.

UPOZORENJE

Zrak. Komprimirani plin pod visokim tlakom. Koristiti s oprezom u prisutnosti zapaljivih tvari budući da je temperatura samozapaljenja većine organskih spojeva u zraku znatno niža pod visokim tlakom. Uvijek provjerite je li ventil boce dobro zatvoren kada nije u uporabi. Uvijek koristite ventil s reduktorom tlaka. Smanjite napetost opruge reduktora prije otvaranja ventila na boci. Kada otvarate ventil nemojte stajati ispred otvora boce. Ne prenosite plin iz jedne boce u drugu. Nemojte miješati plin u boci. Osigurajte da se boce ne mogu prevrnuti. Držite ih dalje od sunčeve svjetlosti i izvora topline. Pohranite ih u okruženju bez korozije. Ne koristite oštećene ili neoznačene boce. Zrak namijenjen u tehničke svrhe ne smije se koristiti za udisanje ili aparate za disanje.

5. POSTUPAK**5.1. Priprema kromatografske kolone**

Otopiti 15 g silikagela (točka 4.1.) u n-heksanu (točka 4.2.) i unijeti u kolonu (točka 3.2.). Ostaviti da se istaloži. Dovršiti taloženje pomoću elektrovibratora da se dobije ujednačeniji kromatografski sloj. Isprati s 30 ml n-heksana da se uklone sve nečistoće. Na vagi odvagati točno 500 mg uzorka u Erlenmeyerovu tikvicu zapremnine 25 ml (točka 3.1.), koristeći analitičku vagu (točka 3.8.), dodati odgovarajući udio internog standarda (točka 4.5.) prema pretpostavljenom udjelu voska. Na primjer, za maslinovo ulje dodati 0,1 mg lauril arahidrata, a za ulje od komine masline 0,25 do 0,50 mg i 0,05 mg metil heptadekanoata za ulja masline (točka 4.6.).

▼ **M23**

Pripravljeni uzorak prenijeti u kromatografsku kolonu pomoću dva puta po 2 ml n-heksana (točka 4.2.).

Otapalo ispuštati dok ne dostigne 1 mm iznad gornje razine absorbenta. Ispirati dalje mješavinom n-heksana/etilnog etera (omjer 99:1) i sakupiti 220 ml pri brzini protoka od oko 15 kapi svakih 10 sekundi. **(Ova frakcija sadrži metil i etil estere i voskove).** (Napomena 4.) (Napomena 5.).

Napomena 4.: Mješavina n-heksana/etilnog etera (99:1) mora se prirediti svakodnevno.

Napomena 5.: Za vizualnu provjeru ispravnog eluiranja voskova, uzorku otopine može se dodati 100 µl 1 %-tne otopine Sudana 1 u mješavini.

S obzirom da bojilo ima retenciju između voskova i triglicerida, kada obojenje dostigne dno kromatografske kolone, eluiranje treba obustaviti jer su svi voskovi eluirali.

Iz tako dobivene frakcije u rotacijskom vakuum-uparivaču ispariti gotovo cijelo otapalo. Preostala 2 ml otapala treba odstraniti pomoću blagog protoka dušika. Sakupljenu frakciju koja sadrži metil i etil estere razrijediti s 2-4 ml n-heptana ili izo-okšana.

5.2. Analiza plinskom kromatografijom

5.2.1. Pripremni radovi

Postaviti kolonu na plinski kromatograf (točka 3.3.) povezivanjem ulaznog otvora na sustav neposredno na koloni i izlaznog otvora na detektor. Obaviti provjeru plinskog kromatografa (protok plina, rad detektora i pisača itd.).

Ako se kolona koristi prvi put, potrebno ju je najprije kondicionirati. Pustiti da kroz kolonu prođe malo plina, potom uključiti plinski kromatograf. Postepeno zagrijavati tako da se za 4 sata postigne temperatura od 350 °C.

Održavati temperaturu najmanje dva sata, a zatim uređaj podesiti na radne uvjete (postaviti protok plina, zapaliti plamen, povezati na elektronički pisač (točka 3.3.4.), postaviti temperaturu komore za kolonu, regulirati detektor itd.). Zabilježiti signal pri osjetljivosti koja je najmanje dvostruka od one koju zahtijeva analiza. Bazna linija mora biti linearna, bez pikova ili odstupanja.

Negativno odstupanje ukazuje da kolona nije ispravno spojena, dok pozitivno odstupanje ukazuje da kolona nije dovoljno kondicionirana.

5.2.2. Izbor radnih uvjeta za voskove i metil i etil estere (Napomena 6.).

Radni uvjeti su općenito sljedeći:

— Temperatura kolone:

20 °C/min 5 °C/min

Početno 80 °C (1 min.) ————— 140 °C ————— 335 °C
(20),

— Temperatura detektora: 350 °C,

— Količina injektiranog uzorka: 1 µl otopine u n-heptanu (2-4 ml),

▼ M23

- Plin nositelj: helij ili vodik pri optimalnoj linearnoj brzini za odabrani plin (vidjeti Dodatak A),
- Osjetljivost instrumenta:: pogodno za ispunjenje gore navedenih uvjeta.

Napomena 6: Zahvaljujući visokoj konačnoj temperaturi, dozvoljeno je pozitivno odstupanje od najviše 10 % vrijednosti pune skale.

Uvjete se može promijeniti prema karakteristikama kolone i plinskog kromatografa kako bi se postiglo razdvajanje svih voskova i metil i etil estera masnih kiselina kao i zadovoljavajuće razdvajanje pikova (vidjeti slike 2., 3. i 4.) i vrijeme zadržavanja koje za interni standard lauril arahidata iznosi 18 ± 3 minute. Glavni pik koji pripada voskovima mora dostizati najmanje 60 % vrijednosti pune skale, dok interni standard metilnog heptadekanoata za metil i etil estere mora dosegnuti vrijednost pune skale.

Integracijski parametri pikova moraju biti utvrđeni tako da se dobije ispravna ocjena površina pikova.

5.3. Provođenje analize

Mikrošpicom od 10 μ l uzeti 10 μ l otopine, povući klip šprice tako da igla bude prazna. Staviti iglu u injektor i nakon 1-2 sekunde brzo ubrizgati. Nakon 5 sekundi polagano izvući iglu.

Registrirati kromatogram sve dok voskovi ili stigmastadieni potpuno ne eluiraju, ovisno o frakciji koja se analizira.

Bazna linija mora stalno zadovoljavati tražene uvjete.

5.4. Identifikacija pikova

Identifikacija pojedinih pikova mora se temeljiti na vremenu zadržavanja, usporedbom s poznatim vremenima zadržavanja mješavina voskova analiziranih pod istim uvjetima. Identifikacija alkil estera vrši se iz mješavina metil i etil estera glavnih masnih kiselina u maslinovim uljima (palmitin-skih i oleinskih).

Slika 1. prikazuje kromatogram voskova djevičanskog maslinovog ulja. Slike 2. i 3. prikazuju kromatograme dvije vrste ekstra djevičanskog maslinova ulja u maloprodaji, od kojih jedno posjeduje metil i etil estere, a drugo ne. Na slici 4. su kromatogrami ekstra djevičanskog maslinovog ulja vrhunske kakvoće i istog tog ulja pomiješanog s 20 % dezodoriranog ulja.

5.5. Određivanje udjela voskova

Pomoću integratora izračunani površine pikova internog standarda lauril arahidata i alifatskih estera C₄₀ do C₄₆.

Udio ukupnih voskova izračunavamo dodavanjem svakog pojedinog voska u mg/kg ulja, kako slijedi:

$$\text{Voskovi, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

▼ M23

gdje je:

A_x = površina pika pojedinog estera, računalnim izračunom

A_s = površina pika internog standarda lauril arahidata, računalnim izračunom

m_s = masa dodanog internog standarda lauril arahidata, u miligramima

m = masa uzorka za analizu, u gramima.

5.5.1. Kvantitativna analiza metil i etil estera

Pomoću integratora izračunani površine pikova internog standarda metil heptadekanoata, masnih kiselina metil estera C_{16} i C_{18} i masnih kiselina etil estera C_{16} i C_{18} .

Izračunati udio svakog alkil estera u mg/kg ulja, kako slijedi:

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

gdje je:

A_x = površina pika pojedinog C_{16} i C_{18} estera, računalnim izračunom

A_s = površina pika internog standarda metil heptadekanoata, računalnim izračunom

m_s = masa dodanog internog standarda metil heptadekanoata, u miligramima

m = masa uzorka za izračun, u gramima.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

Ukupan udio različitih voskova C_{40} do C_{46} (*Napomena 7.*) izražava se u miligramima po kilogramu ulja.

Ukupan udio metil estera i etil estera C_{16} do C_{18} i njihov zbroj.

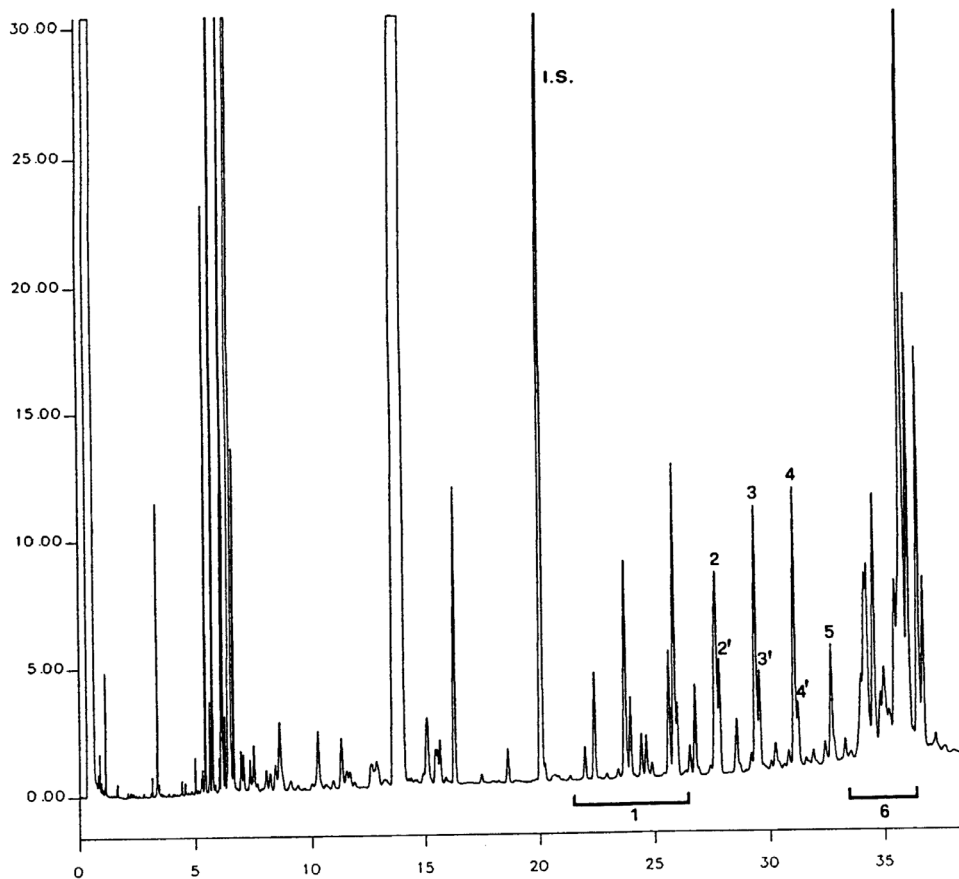
Rezultati trebaju biti izraženi najbliže moguće odnosu mg/kg.

Napomena 7.: Komponente koje treba kvantificirati odnose se na pikove s parnim brojevima ugljika između estera C_{40} - C_{46} , kao primjer može se koristiti kromatogram voskova maslinovog ulja prikazan na priloženoj slici. Ako se C_{46} ester pojavi dva puta, preporuča se da se za njegovu identifikaciju analizira frakcija voskova ulja komine masline gdje je pik C_{46} jednostavno identificirati jer je očigledno najveći.

Treba izraziti omjer između etil estera i metil estera.

▼ M23

Slika 1.

Primjer plinskog kromatograma frakcije voska maslinovog ulja ⁽¹⁾

Pikovi s vremenom zadržavanja metil i etil estera masnih kiselina 5-8 minuta.

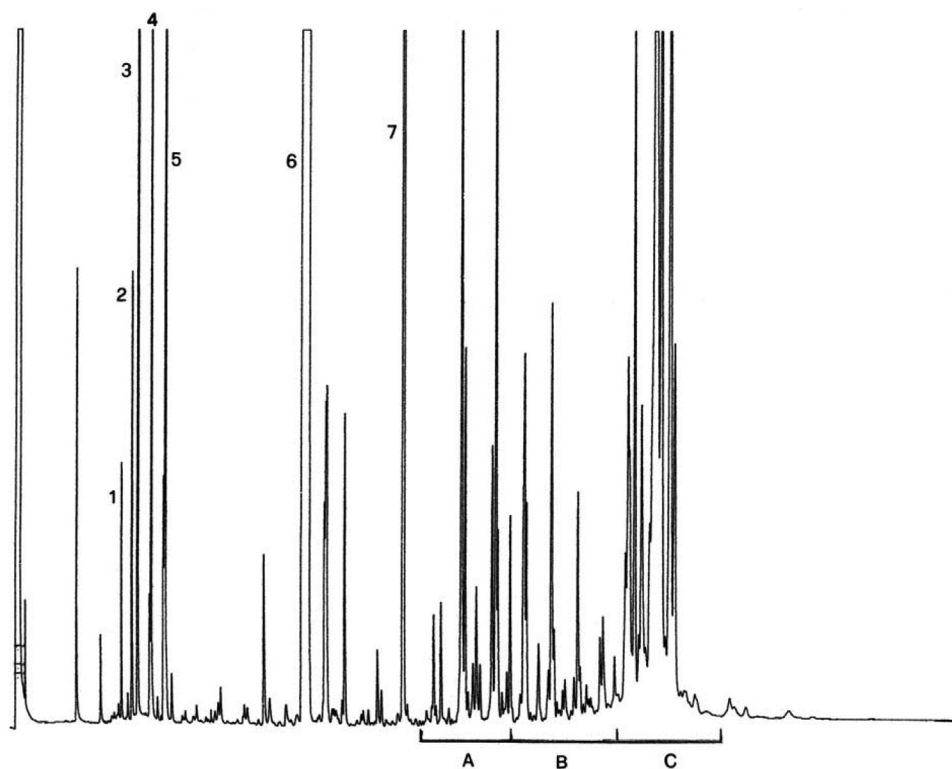
Legenda:

- I.S. = lauril arahidat
- 1 = diterpenski esteri
- 2 + 2' = esteri C₄₀
- 3 + 3' = esteri C₄₂
- 4 + 4' = esteri C₄₄
- 5 = esteri C₄₆
- 6 = sterolni esteri i triterpenski alkohol

⁽¹⁾ Nakon eluiranja sterolnih estera, kromatogram ne smije pokazivati signifikantne pikove (trigliceridi).

▼ **M23**

Slika 2.

Metil esteri, etil esteri i voskovi u djevičanskom maslinovom ulju

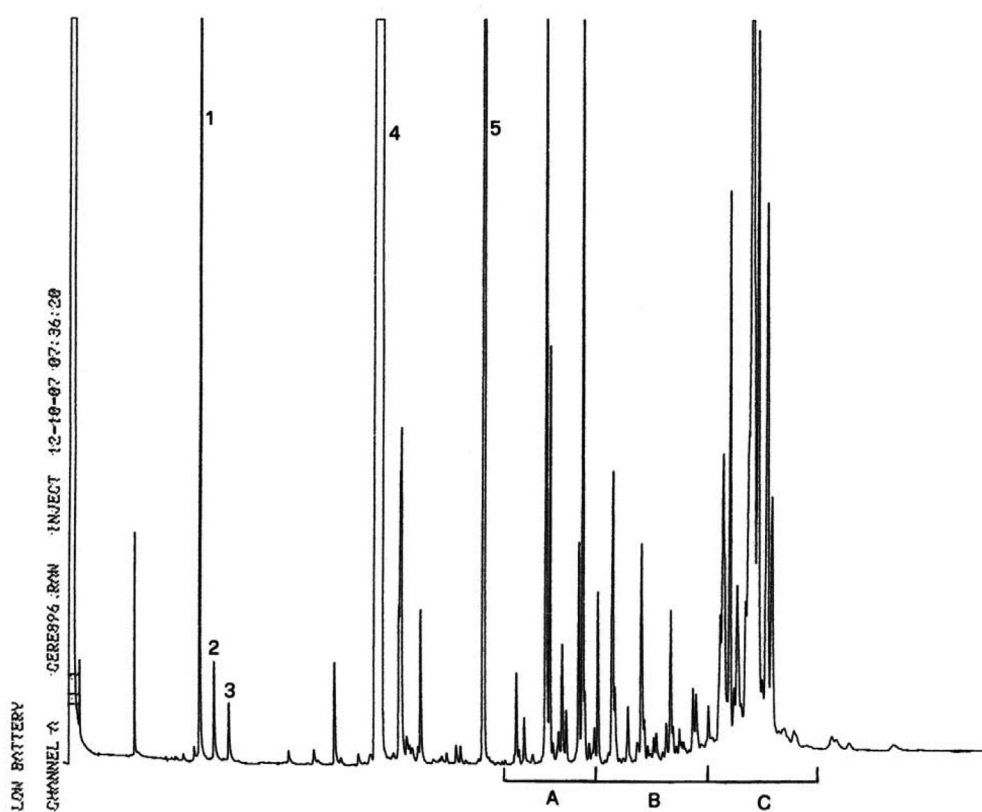
Legenda:

- 1 - Metil C₁₆
- 2 - Etil C₁₆
- 3 - Metil heptadekanoat I.S.
- 4 - Metil C₁₈
- 5 - Etil C₁₈
- 6 - Skvalen
- 7 - Lauril arahidat I.S.
- A - Diterpenski esteri
- B - Voskovi
- C - Sterolni esteri i triterpenski esteri

▼ M23

Slika 3.

Metil esteri, etil esteri i voskovi u ekstra djevičanskom maslinovom ulju



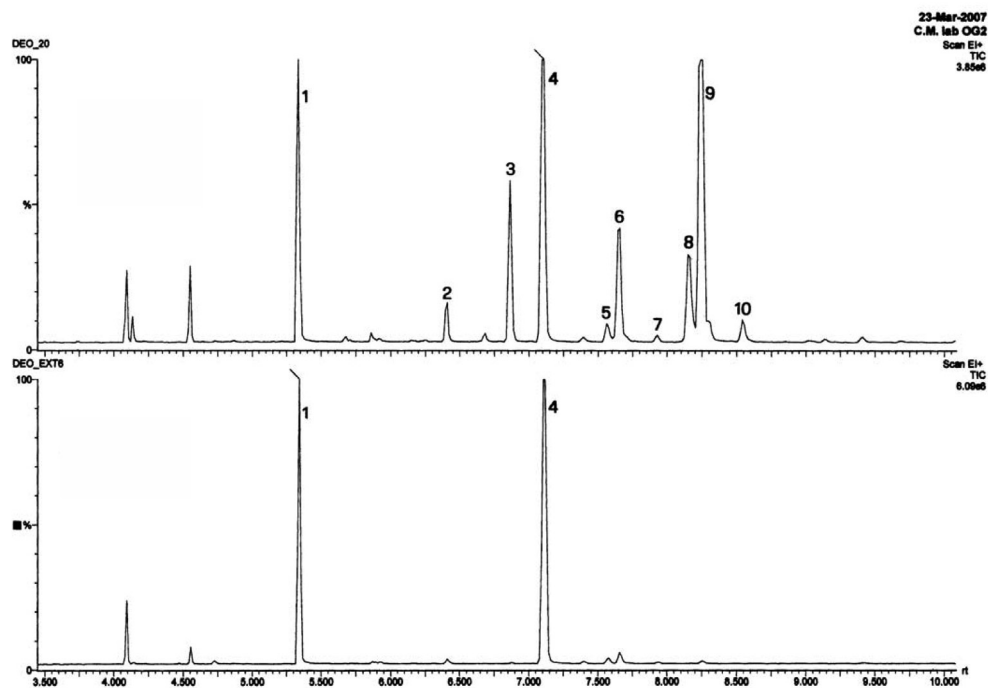
Legenda:

- 1 - Metil heptadekanoat I.S.
- 2 - Metil C₁₈
- 3 - Etil C₁₈
- 4 - Skvalen
- 5 - Lauril arahidat I.S.
- A - Diterpenski esteri
- B - Voskovi
- C - Sterolni esteri i triterpenski esteri

▼ M23

Slika 4.

Dio kromatograma ekstra djevičanskog maslinovog ulja i istog ulja miješanog s dezodoriranim uljem



Legenda:

- 1 – Metil miristat I.S.
- 2 – Metil palmitat
- 3 – Etil palmitat
- 4 – Metil heptadekanoat I.S.
- 5 – Metil linoleat
- 6 – Metil oleat
- 7 – Metil stearat
- 8 – Etil linoleat
- 9 – Etil oleat
- 10 – Etil stearat

▼ M23*Dodatak A***Određivanje linearne brzine plina**

U plinski kromatograf podešen na normalne radne uvjete injektira se 1 do 3 μl metana (ili propana). Mjeri se vrijeme koje je potrebno plinu da prođe kroz kolonu, od trenutka injektiranja do pojave pika (t_M).

Linearna brzina, u cm/s , dana je formulom L/t_M , gdje je L duljina kolone u cm , a t_M vrijeme je izmjereno u sekundama.

▼ M28

PRILOG XXI.

Rezultati provjera sukladnosti provedenih na maslinovim uljima iz članka 8. stavka 2.

				Označivanje						Kemijski parametri			Senzorska svojstva ⁽⁴⁾			Konačan zaključak	
Uzorak	Kategorija	Zemlja podrijetla	Mjesto inspekcijskog nadzora ⁽¹⁾	Pravni naziv	Oznaka izvornosti	Uvjeti skladištenja	Pogrešne informacije	Čitljivost	U/NU ⁽³⁾	Parametri izvan graničnih vrijednosti DA/NE	Ako je tako, navedite koji ⁽²⁾	U/NU ⁽³⁾	Medijan mana	Medijan voćnosti	U/NU ⁽³⁾	Potrebna mjera	Sankcija

⁽¹⁾ Unutarnje tržište (uljara, punitelji u boce, faza maloprodaje), izvoz, uvoz.

⁽²⁾ Svaka karakteristika maslinovog ulja navedena u Prilogu I. ima oznaku.

⁽³⁾ Usklađeno/neusklađeno.

⁽⁴⁾ Nije potrebno za maslinovo ulje i ulje komine maslina.