

32002R0796

L 128/8

SLUŽBENI LIST EUROPSKIH ZAJEDNICA

15.5.2002.

UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 796/2002

od 6. svibnja 2002.

o izmjeni Uredbe (EEZ) br. 2568/91 o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize te dodatnih bilješki u Prilogu Uredbi Vijeća (EEZ) br. 2658/87 o tarifnoj i statističkoj nomenklaturi i o Zajedničkoj carinskoj tarifi

KOMISIJA EUROPSKIH ZAJEDNICA,

Uredbi (EEZ) br. 2568/91 i za ispravljanje određenih grešaka u tekstu navedene Uredbe.

uzimajući u obzir Ugovor o osnivanju Europske zajednice,

uzimajući u obzir Uredbu Vijeća br. 136/66/EEZ od 22. rujna 1966. o zajedničkoj organizaciji tržišta ulja i masti ⁽¹⁾, kako je zadnje izmijenjena Uredbom (EZ) br. 1513/2001 ⁽²⁾, a posebno njezin članak 35.a,

uzimajući u obzir Uredbu Vijeća (EEZ) br. 2658/87 od 23. srpnja 1987. o tarifnoj i statističkoj nomenklaturi i o Zajedničkoj carinskoj tarifi ⁽³⁾, kako je zadnje izmijenjena Uredbom (EZ) br. 578/2002 ⁽⁴⁾, a posebno njezin članak 9.,

budući da:

- (1) Uredbom Komisije (EEZ) br. 2568/91 od 11. srpnja 1991. o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize ⁽⁵⁾, kako je zadnje izmijenjena Uredbom (EZ) br. 2042/2001 ⁽⁶⁾, određene su fizičke, kemijske i organoleptičke karakteristike maslinovog ulja i ulja komine maslina te su utvrđene metode ocjenjivanja navedenih karakteristika. Od 1. studenoga 2001. definicija ulja komine maslina, navedena u točki 4. Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ, utvrđuje da određena ulja komine maslina odgovaraju maslinovim uljima lampante uz izuzetak određenih posebnih karakteristika.
- (2) Kako bi se razlikovala ulja dobivena centrifugiranjem ulja komine maslina i maslinovog ulja lampante u nedostatku analitičkog parametra, granične vrijednosti za vosak, sadržaj eritrodiola i uvaola ili ukupan sadržaj alifatskih alkohola treba odrediti da bi ih se moglo razlikovati neovisno o metodi proizvodnje. U tu svrhu treba odrediti metodu za određivanje ukupnog sadržaja alifatskih alkohola.
- (3) Uvođenje novih granica zahtijeva izmjenu dodatne bilješke 2. uz poglavlje 15. kombinirane nomenklature u Prilogu I. Uredbi (EEZ) br. 2658/87. Tu mogućnost također treba uzeti za brisanje članka 5. i Priloga XIV.

- (4) Kako bi se uskladile metode za pripremu metil estera masnih kiselina koji se koriste za analiziranje sadržaja masnih kiselina u ulju, tehnički razvoj u metodama analize omogućili su uporabu slobodne kiselosti ulja, tako da se niz metoda koje su sadržane u Prilogu X.B može smanjiti na dvije.
- (5) Oslanjajući se na iskustvo, Međunarodno vijeće za maslinovo ulje razvilo je novu metodu organoleptičkog ocjenjivanja djevičanskog ulja koja je jednostavnija i pouzdanija od one navedene u Prilogu XII. Uredbi (EEZ) br. 2568/91. Metodu predviđenu u Prilogu XII. treba stoga zamijeniti novom metodom organoleptičkog ocjenjivanja djevičanskog ulja.
- (6) Uporaba nove metode zahtijeva da bude dostupan novi postupak arbitraže za rješavanje slučajeva nepodudaranja između prijavljenih kategorija i kategorija koje je dodijelila ocjenjivačka komisija.
- (7) Kako bi se osiguralo da se analize obavljaju u ispravnim uvjetima i s obzirom na udaljenosti između regija, treba utvrditi različite rokove za slanje uzoraka u laboratorij nakon uzorkovanja, uzimajući u obzir vremenske uvjete u svakoj sezoni. S ciljem razvrstavanja ulja, rezultate analiza treba usporediti s granicama utvrđenim u Uredbi (EEZ) br. 2568/91, koje već uključuju granice ponovljivost i obnovljivosti za upotrijebljene metode analize.
- (8) Kako bi se dalo vremena za prilagodbu novim normama i za sastavljanje novih sredstava njihove primjene te kako bi se izbjeglo ometanje trgovinskih transakcija, izmjene ove Uredbe ne bi se trebale primjenjivati do 1. rujna 2002., a maslinovo ulje i ulje komine maslina pakirano za maloprodaju prije tog datuma treba se izuzeti.

⁽¹⁾ SL 172, 30.9.1966., str. 3025/66.⁽²⁾ SL L 201, 26.7.2001., str. 4.⁽³⁾ SL L 256, 7.9.1987., str. 1.⁽⁴⁾ SL L 97, 13.4.2002., str. 1.⁽⁵⁾ SL L 248, 5.9.1991., str. 1.⁽⁶⁾ SL L 276, 19.10.2001., str. 8.⁽⁹⁾ Mjere predviđene ovom Uredbom u skladu s mišljenjem Upravljačkog odbora za ulja i masti i Odbora za Carinski zakonik u pogledu pitanja koja ulaze u njihova područja odgovornosti,

DONIJELA JE OVU UREDBU:

Članak 1.

Uredba (EEZ) br. 2568/91 mijenja se kako slijedi:

1. U članku 2. stavku 1.:

(a) treća alineja zamjenjuje se sljedećim:

„— za određivanje sadržaja voska, metoda postavljena u Prilogu IV.,”;

(b) dodaje se sljedeća alineja:

„— određivanje sadržaja alifatskih alkohola, metoda postavljena u Prilogu XIX.,”.

2. Članak 2. stavak 2. zamjenjuje se sljedećim:

„2. Ocjenjivanje organoleptičkih karakteristika djevičanskih ulja od strane nacionalnih tijela ili njihovih predstavnika provode komisije organoleptičkih ocjenjivača koje su odobrile države članice.

Organoleptičke karakteristike ulja iz prvoga podstavka smatraju se u skladu s prijavljenom kategorijom ako komisija koju je odobrila država članica potvrdi razvrstavanje.

Ako komisija ne potvrdi prijavljenu kategoriju u pogledu organoleptičkih karakteristika, na zahtjev zainteresirane stranke nacionalna tijela ili njihovi predstavnici imaju dva protu-ocjenjivanja koja provode ostale odobrene komisije, najmanje jedna komisija odobrena od strane dotične države članice proizvođača. Dotične karakteristike smatraju se u skladu s prijavljenim karakteristikama ako najmanje dva protu-ocjenjivanja potvrde prijavljeno razvrstavanje. Ako to nije slučaj, zainteresirana stranka odgovorna je za troškove protu-ocjenjivanja.”

3. Drugi podstavak članka 2. stavka 3. zamjenjuje se sljedećim:

„Ne dovodeći u pitanje normu EN ISO 5555 i poglavlje 6. norme EN ISO 661, uzeti uzorci stavljaju se na tamno mjesto daleko od jakog izvora topline što je moguće brže i šalju se u laboratorij za analizu najkasnije:

— desetog radnog dana nakon što su uzeti, tijekom razdoblja od listopada do svibnja, i

— petog radnog dana nakon što su uzeti, tijekom razdoblja od lipnja do rujna.”

4. Sljedeći stavak dodaje se na kraju članka 2:

„5. S ciljem određivanja karakteristika maslinovog ulja metodama predviđenim u stavku 1., analiza rezultata izravno se uspoređuje s granicama utvrđenim u ovoj Uredbi.”

5. Članci 3. i 3.a se brišu.

6. Članak 3.b postaje članak 3.

7. Članak 4. stavak 1. zamjenjuje se sljedećim:

„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.”

8. Članak 5. se briše.

9. Prilozi se mijenjaju u skladu s Prilogom ovoj Uredbi.

Članak 2.

Dodatna bilješka 2. uz poglavlje 15. kombinirane nomenklature u Prilogu I. Uredbi (EEZ) br. 2658/87 mijenja se kako slijedi:

1. Točka BI. podtočka (a) zamjenjuje se sljedećim:

„(a) sadržaj voska ne veći od 300 mg/kg;”.

2. Točka BI. podtočka (g)(4) zamjenjuje se sljedećim:

„4. organoleptičke karakteristike koje prikazuju medijan mana veći od 6,0 u skladu s Prilogom XII. Uredbi (EEZ) br. 2568/91;”.

3. Točka BII. podtočka (g) zamjenjuje se sljedećim:

„(g) organoleptičke karakteristike koje prikazuju medijan mana manji od 6,0 u skladu s Prilogom XII. Uredbi (EEZ) br. 2568/91;”.

4. Točka D podtočka (b) zamjenjuje se sljedećim:

„(b) sadržaj eritrodiole i uvaole veći od 4,5 %;”.

Članak 3.

Ova Uredba stupa na snagu sedmog dana od dana objave u Službenom listu Europskih zajednica.

Primjenjuje se od 1. rujna 2002. na maslinovo ulje i ulje komine maslina pakirano za maloprodaju.

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

Sastavljeno u Bruxellesu 6. svibnja 2002.

Za Komisiju
Franz FISCHLER
Član Komisije

PRILOG

1. U sažetku Priloga Uredbi (EEZ) br. 2568/91:

(a) Prilog XIV.: Dodatne bilješke 2., 3. i 4. uz poglavlje 15. kombinirane nomenklature se briše.

(b) dodaje se sljedeće: „Prilog XIX.: Metoda za određivanje sadržaja alifatskih alkohola.”

2. Prilog I. zamjenjuje se sljedećim:

KARAKTERISTIKE MASLINOVOG ULJA

Kategorija	Kiselost (%) (*)	Peroksidni broj mEq/O ₂ /kg (*)	Halogenizirana otapala mg/kg (*) ⁽¹⁾	Voskovi mg/kg	Zasićene masne kiseline u položaju 2. na triglicerida (%)	Stigma-stadieni mg/kg ⁽²⁾	Razlika između HPLC ECN42i teoretskog izračuna ECN42	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	K ₂₇₀ s aluminijevim oksidom ⁽³⁾	Delta-K (*)	Organoleptička analiza medijana (Md) (*)	Organoleptička analiza medijana voćnosti (Mf) (*)
1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje	≤ 1,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Djevičansko maslinovo ulje	≤ 2,0	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Obično djevičansko maslinovo ulje	≤ 3,3	≤ 20	≤ 0,20	≤ 250	≤ 1,3	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,10	≤ 0,01	Md ≤ 6,0 - ⁽⁴⁾	—
4. Djevičansko maslinovo ulje lampante	≤ 3,3	≤ 20	≤ 0,20	≤ 300 ⁽⁵⁾	≤ 1,3	≤ 0,50	≤ 0,3	≤ 3,70	≤ 0,25	≤ 0,11	—	Md > 6	—
5. Rafinirano maslinovo ulje	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,40	≤ 1,20	—	≤ 0,16	—	—
6. Maslinovo ulje	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	≤ 350	≤ 1,5	—	≤ 0,3	≤ 3,30	≤ 1,00	—	≤ 0,13	—	—
7. Sirovo ulje komine maslina	> 0,5 (**)	—	—	> 350 ⁽⁶⁾	≤ 1,8	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—	—
8. Rafinirano ulje komine maslina	≤ 0,5	≤ 5	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,50	≤ 2,50	—	≤ 0,25	—	—
9. Ulje komine maslina	≤ 1,5	≤ 15	≤ 0,20	> 350	≤ 2,0	—	≤ 0,5	≤ 5,30	≤ 2,00	—	≤ 0,20	—	—

⁽¹⁾ Ukupna gornja granica za sastojke otkrivene detektorom zahvata elektrona.

Za pojedinačno detektirane spojeve gornja granica je 0,10 mg/kg.

⁽²⁾ Zbroj izomera koji se (ne)može odvojiti kapilarnom kolonom.

⁽³⁾ Da bi se provjerila prisutnost rafiniranog ulja, ako K₂₇₀ premaši granicu za dotičnu kategoriju, mora se ponovno odrediti nakon prelaska preko aluminijevog oksida.

⁽⁴⁾ Ako je medijan voćnosti 0, medijan mana mora biti jednak ili manji od 2,5.

⁽⁵⁾ Ulja sa sadržajem voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se maslinovim uljima lampante ako je ukupni udio alifatskih alkohola ≤ 350 mg/kg ili ako je udio eritrodiola i uvaola ≤ 3,5 %.

⁽⁶⁾ Ulja sa sadržajem voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se sirovim uljima komine maslina ako je ukupni udio alifatskih alkohola > 350 mg/kg i ako je udio eritrodiola i uvaola > 3,5 %.

Kategorija	Kiselinski sastav						Zbroj transolen-skih izomera (%)	Zbroj translinolnih i translinolenskih izomera (%)	Kolesterol (%)	Brasika-sterol (%)	Kampe-sterol (%)	Stigma-sterol (%)	Beta-sito-sterol ⁽¹⁾ (%)	Delta-7-stigmaste-noli (%)	Ukupni steroli (mg/kg)	Eritrodiol i uvaol (%) ^(**)
	Miri-stinska (%)	Linolenska (%)	Arahinska (%)	Eiko-zenska (%)	Behenska (%)	Lignoce-rinska (%)										
1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Djevičansko maslinovo ulje	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Obično djevičansko maslinovo ulje	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
4. Maslinovo ulje lampante	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽²⁾
5. Rafinirano maslinovo ulje	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Maslinovo ulje	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
7. Sirovo ulje komine maslina	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽³⁾
8. Rafinirano ulje komine maslina	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
9. Ulje komine maslina	≤ 0,05	≤ 0,9	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Delta-5,23-stigmastadienol + kolesterol + beta-sitosterol + sitosztanol + delta-5-avenasterol + delta-5-avenosterol + delta-5,24-stigmastadienol.

⁽²⁾ Ulja sa sadržajem voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se maslinovim uljima lampante ako je ukupni udio alifatskih alkohola ≤ 350 mg/kg ili ako je udio eritrodiola i uvaola ≤ 3,5 %.

⁽³⁾ Ulja sa sadržajem voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se sirovim uljima komine maslina ako je ukupni udio alifatskih alkohola > 350 mg/kg i ako je udio eritrodiola i uvaola > 3,5 %.

Bilješka:

(a) Rezultati testova moraju biti izraženi istim brojem decimalnih mjesta kojima je izražena svaka karakteristika.

Zadnja znamenka mora se uvećati za jednu jedinicu ako je znamenka koja slijedi veća od 4.

(b) Ako je neka od karakteristika izvan utvrđene granice, ulje se mora svrstati u drugu kategoriju ili deklarirati kao da nije usklađeno u smislu čistoće.

(c) Zvijezdica (*) nakon karakteristike označava, u pogledu kakvoće ulja, da:

— u slučaju maslinovog ulja lampante, utvrđene granice (osim K₂₃₂) ne moraju sve biti istodobno usklađene,

— u slučaju ostalih djevičanskih maslinovih ulja, neusklađenost s jednom ili više granica podrazumijeva promjenu kategorije unutar skupine djevičanskih maslinovih ulja.

(d) Ako je svojstvo označeno s dvije zvijezdice (**), znači da za sve vrste ulja komine maslina nije nužno da sva označena svojstva istodobno udovoljavaju propisanim vrijednostima."

3. Prilog X.B zamjenjuje se sljedećim:

„PRILOG X.B

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

Sljedeće dvije metode preporučuju se za pripremu metilnih estera masnih kiselina maslinovog ulja i ulja komine maslina:

Metoda A: Transesterifikacija hladnom otopinom kalijevog hidroksida u metanolu

Metoda B: Metilacija zagrijavanjem s natrijevim metilatom u metanolu, iza čega slijedi esterifikacija u kiselom mediju.

Svaka će se metoda primjenjivati prema analitičkom parametru koji se određuje i kategoriji ulja, kako je niže navedeno:

- (a) određivanje razlike između stvarnog i teoretskog sadržaja triglicerida s ECN42 (Δ ECN42):
- metoda A primjenjuje se na uzorke svih kategorija ulja nakon pročišćavanja ulja prolaskom kroz kolonu silikagela;
- (b) određivanje sastava masnih kiselina:
- metoda A primjenjuje se izravno na uzorke sljedećih kategorija ulja:
 - djevičansko maslinovo ulje čija je kiselost manja od 3,3 %,
 - rafinirano maslinovo ulje,
 - maslinovo ulje (mješavina djevičanskih maslinovih ulja i rafiniranog maslinovog ulja),
 - rafinirano ulje komine maslina,
 - ulje komine maslina (mješavina djevičanskih maslinovih ulja i rafiniranog ulja komine maslina),
 - metoda B primjenjuje se izravno na uzorke sljedećih kategorija ulja:
 - djevičansko maslinovo ulje čija je kiselost veća od 3,3 %,
 - sirovo ulje komine maslina;
- (c) određivanje trans izomera masnih kiselina:
- metoda A primjenjuje se izravno na uzorke sljedećih kategorija ulja:
 - djevičansko maslinovo ulje čija je kiselost manja od 3,3 %,
 - rafinirano maslinovo ulje,
 - maslinovo ulje (mješavina djevičanskih maslinovih ulja i rafiniranog maslinovog ulja),
 - rafinirano ulje komine maslina,
 - ulje komine maslina (mješavina djevičanskih maslinovih ulja i rafiniranog ulja komine maslina),
 - metoda B primjenjuje se na sljedeće kategorije ulja nakon pročišćavanja ulja prolaskom kroz kolonu silikagela:
 - djevičansko maslinovo ulje čija je kiselost veća od 3,3 %,
 - sirovo ulje komine maslina.

PROČIŠĆAVANJE UZORAKA ULJA

Kada je to potrebno, uzorci ulja pročišćavaju se prolaskom kroz kolonu silikagela, eluiranjem smjesom heksana i dietil etera (87:13, v/v) kako je opisano u IUPAC metodi 2.507.

Druga mogućnost je ekstrakcija na čvrstoj fazi uz upotrebu SPE silikagel kolona. SPE silikagel kolona (1 g, 6 ml) stavlja se u uređaj za eluiranje pod vakuumom i ispire sa 6 ml heksana. Vakuum se isključuje kako se kolona ne bi isušila, a zatim se u kolonu stavi otopina ulja (oko 0,12 g) u 0,5 ml heksana i uključi vakuum. Kad otopina prodre u silikagel, eluira se pod vakuumom s 10 ml smjese heksana/dietil etera (87:13 v/v). Ukupni eluat se homogenizira i podijeli na dva po volumenu približno jednaka dijela. Alikvot se upari do suha 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.

METODE PRIPREME METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA

1. **Metoda A: Transesterifikacija hladnom otopinom kalijevog hidroksida u metanolu**

1.1. **Svrha**

Ova brza metoda primjenljiva je na maslinova ulja i ulja komine maslina čija je kiselost manja od 3,3 %. Slobodne masne kiseline ne esterificiraju se kalijevim hidroksidom. Etilni esteri masnih kiselina transesterificiraju se sporije od gliceridnih estera i mogu se samo djelomično metilirati.

1.2. Princip

Metilni esteri formiraju se transesterifikacijom s otopinom kalijevog hidroksida u metanolu, kao međuprodukti prije nego što nastupi saponifikacija (glava 5. u ISO-5509:2000, glava 5. u IUPAC metodi 2.301).

1.3. Reagensi

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

Heptan, kromatografske čistoće.

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

1.4. Oprema

Epruvete volumena 5 ml s navojnim čepom s PTFE spojem

Kalibrirane ili automatske pipete od 2 ml i 0,2 ml.

1.5. Postupak

U epruvetu s navojnim čepom volumena 5 ml odvagati oko 0,1 g uzorka ulja. Dodati 2 ml heptana i protresti. Dodati 0,2 ml 2 mol/l otopine kalijevog hidroksida u metanolu, 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.

2. Metoda B: Metilacija zagrijavanjem s otopinom natrijevog metilata u metanolu, iza čega slijedi esterifikacija u kiselom mediju**2.1. Svrha**

Ova metoda primjenljiva je na maslinova ulja i ulja komine maslina čija je kiselost veća od 3,3 %.

2.2. Princip

Neutralizacija slobodnih masnih kiselina i alkalna metanoliza glicerida, iza čega slijedi esterifikacija masnih kiselina u kiselom mediju (glava 4.2. u IUPAC metodi 2.301).

2.3. Reagensi

— heptan, kromatografske čistoće.

— metanol koji ne sadrži više od 0,05 % (m/m) vode.

— 0,2 mol/l otopina natrijevog metilata u metanolu: otopiti 5 g natrija u 1 000 ml metanola (može se pripremiti od otopina dostupnih na tržištu),

— fenoltalein, 0,2 %-tna metanolna otopina,

— sumporna kiselina, 1 mol/l u metanolnoj otopini: u 100 ml metanola dodati 3 ml 96 %-tne sumporne kiseline,

— zasićena otopina natrijevog klorida u vodi.

2.4. Oprema

— volumetrijske tikvice ravnog dna volumena 50 ml s dugim, uskim vratom od brušenog stakla,

— povratno hladilo: zračno hladilo (dugo 1 m) s brušenim spojevima prikladnim za grlo tikvice,

— kuglice za vrenje,

— stakleni lijevak.

2.5. Postupak

Oko 0,25 g uzorka ulja prenese se u volumetrijsku tikvicu s brušenim grlom volumena 50 ml. Uz pomoć lijevka dodati 10 ml 0,2 mol/l otopine natrijevog metilata u metanolu i kuglice za vrenje. Spojiti povratno hladilo, protresti i zagrijati do vrenja. Otopina treba postati bistra, što se obično dogodi za oko 10 minuta. Reakcija je završena nakon 15 minuta. Tikvicu ukloniti s izvora topline, pričekati da prestane vraćanje kondenzata, ukloniti hladilo i dodati dvije kapi otopine fenoltaleina. Dodati nekoliko ml 1 mol/l otopine sumporne kiseline u metanolu dok otopina ne postane bezbojna, a zatim doda 1 ml u suvišku. Spojiti hladilo i staviti da ponovo vrije 20 minuta. Ukloniti s izvora topline i ohladiti tikvicu pod mlazom tekuće vode. Ukloniti hladilo, dodati 20 ml zasićene otopine natrijevog klorida i protresti. Dodati 5 ml heptana, začepiti tikvicu i snažno tresti 15 sekundi.

Ostaviti da se slegne dok se faze ne razdvoje. Ponovo dodati zasićenu otopinu natrijevog klorida dok vođeni sloj ne dosegne donji rub grla tikvice. Gornji sloj koji sadrži metilne estere ispunjava grlo tikvice. Ova je otopina spremna za injektiranje u plinski kromatograf.

Upozorenje: Metilacija metodom B mora se raditi u digestoru.

2.6. **Alternative metilaciji prema Metodi B**

2.6.1. *Metoda C*

2.6.1.1. Princip

Masna tvar koja se analizira tretira se metanol-solnom kiselinom, u zatvorenoj kapsuli, pri 100 °C.

2.6.1.2. Oprema

- čvrsta staklena kapsula volumena približno 5 ml (duljine 40 do 45 mm, promjera 14 do 16 mm).
- kalibrirane pipete volumena 1 i 2 ml.

2.6.1.3. Reagensi

2 %-tna otopina solne kiseline u metanolu. Priprema se od plinovite solne kiseline i bezvodnog metanola (bilješka 1).

Heksan, kromatografske čistoće.

Bilješka 1: Mogu se koristiti otopine klorovodika u metanolu dostupne na tržištu. Male količine plinovite solne kiseline mogu se pripremiti u laboratoriju jednostavnim izlučivanjem iz otopine dostupne na tržištu ($\rho = 1,18$), kapanjem koncentrirane sumporne kiseline. Budući se solna kiselina vrlo brzo apsorbira u metanolu, preporučuje se poduzimanje uobičajenih mjera predostrožnosti prilikom njezina otapanja, primjerice, plin se uvodi kroz mali okrenuti lijevak čiji rub jedva dodiruje površinu tekućine. Velike količine otopine solne kiseline u metanolu mogu se pripremiti unaprijed, budući da se savršeno čuva u bocama sa staklenim čepom, pohranjenima na tamnom mjestu. Kao druga mogućnost, ovaj se reagens može pripremiti otapanjem acetil klorida u bezvodnom metanolu.

2.6.1.4. Postupak

- U staklenu kapsulu staviti 0,2 g masne tvari, prethodno osušene na natrijevom sulfatu i profiltrirana, i 2 ml otopine solne kiseline u metanolu. Kapsula se treba zataliti.
- Kapsulu uroniti u vodu temperature 100 °C na 40 minuta.
- Kapsulu ohladiti pod mlazom tekuće vode, otvoriti, dodati 2 ml destilirane vode i 1 ml heksana.
- Centrifugirati i odstraniti heksansku fazu koja je spremna za uporabu.

2.6.2. *Metoda D*

2.6.2.1. Princip

Masna tvar koja se analizira zagrijava se pod povratnim hladilom s metanol-heksan-sumpornom kiselinom. Dobiveni metilni esteri ekstrahiraju se petroleterom.

2.6.2.2. Oprema

- Epruveta volumena približno 20 ml, sa zračnim povratnim hladilom duljine oko 1 m, sa spojevima od brušenog stakla.
- Kalibrirana pipeta volumena 5 ml.
- Ljevak za odjeljivanje volumena 50 ml.
- Odmjerne posude 10 ml i 25 ml.
- Epruvete volumena 15 ml s konusnim dnom.

2.6.2.3. Reagensi

- Reagens za metilaciju: bezvodna metanol-heksan-koncentrirana sumporna kiselina ($\rho = 1,84$) u omjeru 75:25:1 (v/v/v).

— Petroleter, 40 do 60 °C.

— Bezvodni natrijev sulfat.

2.6.2.4. Postupak

U epruvetu volumena 20 ml staviti 0,1 g ulja i dodati 5 ml reagensa za metilaciju.

Spojiti povratno hladilo i zagrijavati 30 minuta u kipućoj vodenoj kupelji (bilješka 2).

Mješavinu kvantitativno prenijeti u lijevak za odjeljivanje volumena 50 ml, pomoću 10 ml destilirane vode i 10 ml petroletera. Snažno protresti i ostaviti da se faze odijele, odstraniti vodenu fazu i isprati sloj etera dva puta s po 20 ml destilirane vode. U lijevak za odjeljivanje dodati malu količinu bezvodnog natrijevog sulfata, protresti, pustiti nekoliko minuta da se slegne i profiltrirati, skupljajući filtrat u epruvetu volumena 15 ml s konusnim dnom.

Otapalo isprati iznad vodene kupelji u struji dušika.

Bilješka 2: Da biste kontrolirali točku vrelišta, u epruvetu ubacite stakleni štapić i ograničite temperaturu vodene kupelji na 90 °C.

3. **Parametri preciznosti**

Statističku ocjenu preciznosti metoda A i B objavilo je Međunarodno vijeće za maslinovo ulje u svojoj metodi COI/T.20/CO. Br. 24.

PREPORUKE ZA PLINSKO-KROMATOGRAFSKU ANALIZU ESTERA MASNIH KISELINA IZ ULJA OD PLODA I KOMINE MASLINA

1. **Postupak**

Plinsko-kromatografska analiza otopina masnih estera u heptanu vrši se u skladu s normom ISO 5508 uz upotrebu kapilarne kolone (duljine 50 m, unutarnjeg promjera 0,25 ili 0,32 mm) impregnirane cijanopropil-silikonskom fazom kako je navedeno za određivanje trans izomera masnih kiselina (COI/T.20/Doc. Br. 17).

Na slici 1. prikazan je tipični plinsko-kromatografski profil ulja komine maslina s metilnim i etilnim esterima masnih kiselina te trans izomerima metilnih estera.

2. **Izračunavanje**

2.1. Za izračunavanje sastava masnih kiselina i ΔECN42 u obzir se uzimaju sve navedene masne kiseline:

Miristinska (C14:0).

Palmitinska (C16:0). Suma površina pikova koji odgovaraju metilnim i etilnim esterima.

Palmitoleinska (C16:1). Suma površina pikova koji odgovaraju ω9 i ω7 izomerima metilnih estera.

Heptadekanska/Margarinska (C17:0).

Heptadecenska/Margaroleinska (C17:1).

Stearinska (C18:0).

Oleinska (C18:1). Suma površina pikova koji odgovaraju ω9 i ω7 izomerima metilnih estera, etilnim esterima i trans izomerima metilnih estera.

Linolna (C18:2). Suma površina pikova koji odgovaraju metilnim i etilnim esterima i trans izomerima metilnih estera.

Arahinska (C20:0).

Linolenska (C18:3). Suma površina pikova metilnih estera i trans izomera metilnih estera.

Eikozenska (C20:1).

Behenska (C22:0).

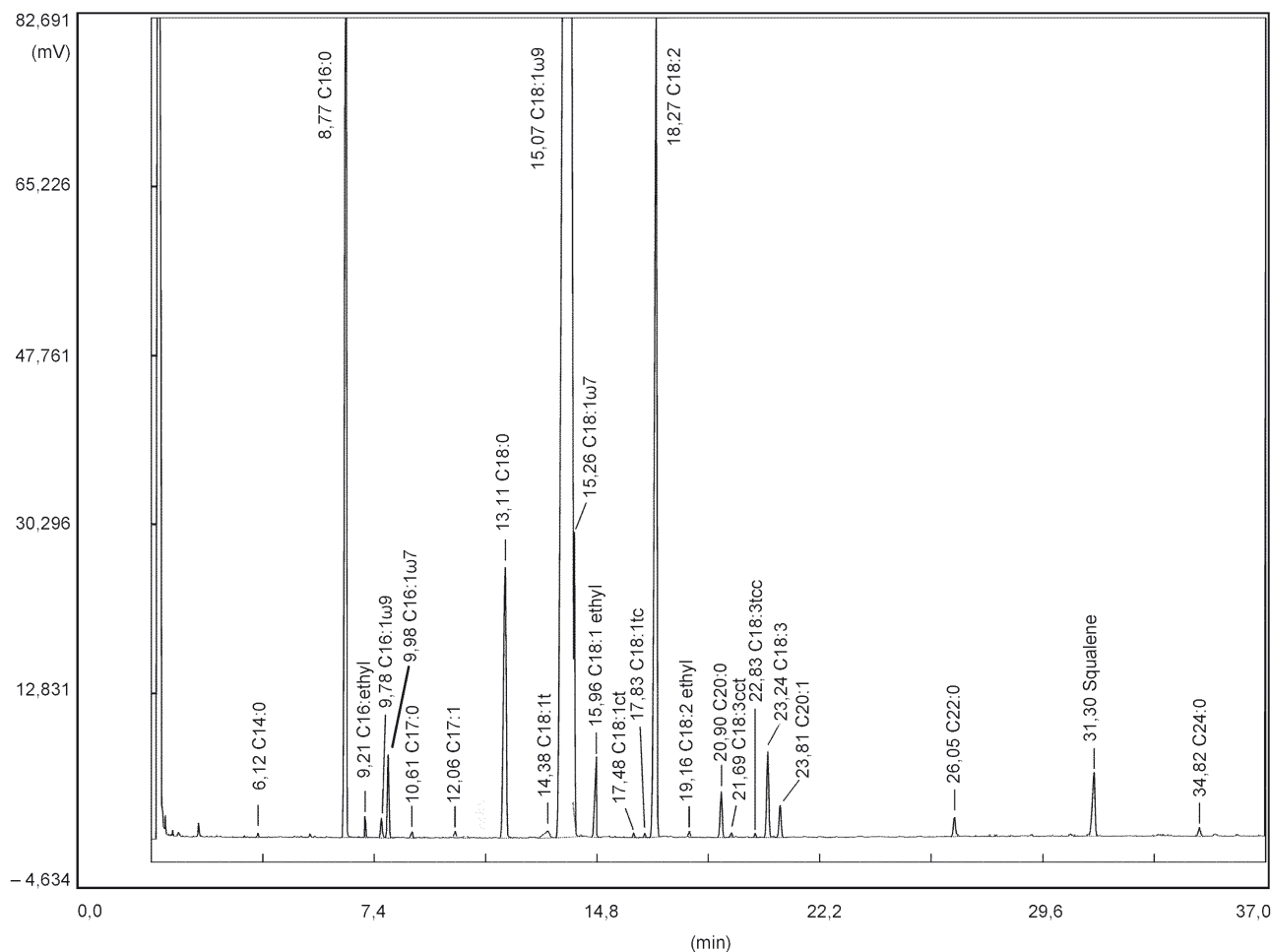
Lignocerinska (C24:0).

Skvalen se ne uzima u obzir za izračunavanje ukupne površine.

2.2. Za izračunavanje postotka trans-C18:1 koristi se pik koji odgovara metilnim esterima ove masne kiseline. Za sumu [trans-C18:2 + trans-C18:3], zbrajaju se svi pikovi koji odgovaraju trans izomerima ovih dviju masnih kiselina. Za izračunavanje ukupne površine, uzimaju se u obzir svi pikovi navedeni u točki 2.1. (vidjeti COI/T.20/Doc. Br. 17).

Izračunavanje postotka svake masne kiseline vrši se prema formuli:

$$\% X = (\text{Area } X \times 100) / (\text{total area})$$



Slika 1: Plinsko-kromatografski profil dobiven metodom hladne metilacije iz ulja komine maslina. Kromatografski pikovi odgovaraju metilnim i etilnim esterima, ako nije drukčije naznačeno."

4. Prilog XII. zamjenjuje se sljedećim:

„PRILOG XII.

ORGANOLEPTIČKA PROCJENA DJEVIČANSKIH MASLINOVIH ULJA

1. SVRHA I PRIMJENA

Ovim se Prilogom utvrđuju kriteriji potrebni za organoleptičku procjenu djevičanskog ulja definiranu pod 1. u Prilogu Uredbi br. 136/66/EEZ i opisuje se metoda njihovog razvrstavanja s obzirom na karakteristike.

Ova se metoda može upotrebljavati samo za razvrstavanje djevičanskih ulja na temelju voćnosti i intenziteta mana koje obavlja skupina odabranih organoleptičkih ocjenjivača, koji čine komisiju u skladu s odjeljkom 4.

2. OPĆENITO

Za opći osnovni rječnik, prostor za ocjenjivanje, opću metodologiju i čaše za organoleptičko ocjenjivanje preporučuje se sukladnost s odredbama Međunarodnog vijeća za maslinovo ulje.

3. SPECIFIČNI RJEČNIK

3.1. Pozitivna svojstva

Voćno: ukupnost mirisnih svojstava (ovisno o sorti) karakterističnih za ulje od zdravih i svježih plodova, bilo zelenih ili zrelih, zapaženih izravno ili neizravno (retronazalno).

Gorko: karakterističan okus ulja dobivenog od zelenih ili djelomično obojenih maslina.

Pikantno: taktilni osjet peckanja svojstven uljima proizvedenim na početku sezone, uglavnom od još nedozrelih maslina.

3.2. Negativna svojstva

Pljesnivo: karakteristična aroma ulja dobivenog maslina koje su bile uskladištene u hrpama kod kojih je došlo do visokog stupnja anaerobne fermentacije.

Pljesnivo/vlažno: karakteristična aroma ulja od maslina na kojima je došlo do značajnog razvoja plijesni i kvasaca kao posljedica čuvanja u vlažnim uvjetima više dana.

Blatno: aroma karakteristična za ulje koje je dobiveno dekantiranjem iz spremnika i podzemnih rezervoara u kojima se stvorio talog.

Kiselo/octeno: karakteristična aroma nekih ulja koja podsjeća na vino ili ocat, uglavnom zbog stvaranja octene kiseline, etil acetata i etanola fermentacijom maslina.

Metalno: aroma koja podsjeća na metal, karakteristično je za ulja koja su duže vrijeme bila izložena dodiru s metalnim površinama tijekom drobljenja, miješenja, prešanja ili skladištenja.

Užeglo: aroma ulja koja su oksidirala.

Zagrijano ili zagoreno: karakteristična aroma uzrokovana pretjeranim i/ili dugotrajnim zagrijavanjem tijekom prerade, a posebno miješenjem maslinovog tijesta u neprikladnim temperaturnim uvjetima.

Sijeno/drvo: karakteristična aroma nekih ulja dobivenih od sasušanih maslina.

Grubo: dojam gustoće i pastoznosti u ustima koji daju pojedina stara ulja.

Strojno ulje: aroma ulja koja podsjeća na naftu, odnosno na mineralno ulje ili mast za podmazivanje.

Biljna voda: aroma koju poprimaju ulja koja su bila u dužem dodiru s biljnom vodom.

Salamura: aroma ulja dobivenog od maslina koje su prije prerade čuvane u slanoj otopini.

Oporo: aroma karakteristična za ulja dobivena od maslina prešanih između novih filter slojnicama od biljnih vlakana. Različit je ovisno o tome jesu li filter slojnice sačinjene od zelene trave esparto ili sušene trave esparto.

Zemljasto: aroma ulja dobivenog od maslina sakupljenih sa zemljom ili blatnjavih i neopranih maslina.

Crvljivo: aroma ulja dobivenog od maslina jako napadnutih ličinkama maslinove muhe (*Bactrocera oleae*).

Krastavci: aroma karakteristična za ulja predugo čuvana u hermetički zatvorenim spremnicima, posebno limenim, a pripisuje se stvaranju 2,6-nonadienala.

4. KOMISIJA

Komisiju imenuje država članica i sastoji se od predsjednika komisije i osam do dvanaest ocjenjivača. Međutim, za tržišnu godinu 2001./02., panel se može sastojati od manje od osam ocjenjivača.

Predsjednik komisije treba biti izvježbani stručnjak s dobrim poznavanjem različitih vrsti ulja. On ili ona odgovoran je za komisiju i njegovu organizaciju i djelovanje, uključujući pripremu, šifriranje i dostavljanje uzoraka ocjenjivačima te za prikupljanje i obradu podataka.

On ili ona odabire ocjenjivače, brine se za njihovu obuku i provjerava njihovu sposobnost s ciljem održavanja na prikladnoj razini.

Ocjenjivači moraju biti odabrani i obučeni na temelju svojih sposobnosti razlikovanja sličnih uzoraka. Potrebno je pridržavati se priručnika Međunarodnog vijeća za maslinovo ulje o odabiru, obuci i nadzoru kvalificiranih organoleptičkih ocjenjivača djevičanskog ulja.

Komisija se mora obvezati sudjelovati u nacionalnim ocjenama, ocjenama Zajednice i međunarodnim organoleptičkim ocjenama koje se organiziraju za potrebe periodičkog nadzora i usklađivanja kriterija opažanja. Također mora svake godine dostaviti državi članici potpune informacije o sastavu komisije i broju procjena obavljenih u svojstvu odobrene komisije.

5. POSTUPAK ZA ORGANOLEPTIČKU PROCJENU I RAZVRSTAVANJE

5.1. Upotreba ocjenjivačkog listića od strane ocjenjivača

Ocjenjivački listić koji koriste ocjenjivači prikazan je u Dodatku A.

Organoleptički ocjenjivači moraju pomirisati, a zatim i kušati ⁽¹⁾ ulje podneseno na ispitivanje koje se nalazi u čaši za organoleptičko ocjenjivanje, analizirajući dojam mirisa, okusa, dodira i kinestetički dojam te na listiću označiti intenzitet svakog negativnog i pozitivnog svojstva.

Ako ocjenjivač zamijeti negativna svojstva koja nisu navedena na listiću, ona se moraju navesti pod „Ostalo”, koristeći izraze navedene pod 3.2. koji ih najbolje opisuju.

5.2. Obrada podataka od strane predsjednika komisije

Predsjednik komisije skuplja ispunjene ocjenjivačke listiće i provjerava dodijeljene intenzitete. U slučaju uočene nepravilnosti predsjednik treba zatražiti ocjenjivače da pregledaju svoje listiće i, ako je potrebno, ponove test.

Predsjednik komisije može unijeti podatke svakog ocjenjivača u računalni program za izračunavanje medijana (Dodatak B). Podaci za svaki uzorak se unose u tablicu od 10 okomitih stupaca za 10 senzorskih svojstava i po jednog retka za svakog člana komisije.

Ako više od 50 % članova komisije navede određeno negativno svojstvo pod „Ostalo”, predsjednik komisije mora i za to svojstvo izračunati medijan te u skladu s time razvrstati ulje.

U slučaju ocjene u vezi s nadzorom sukladnosti sa standardima i protuocjenjivanja, predsjednik komisije organizira da se ocjenjivanje ponovi najmanje dvaput u razmacima od najmanje jednog dana. Medijani svojstava izračunavaju se uporabom podataka iz ocjenjivačkih listića triju ocjenjivanja.

5.3. Razvrstavanje ulja

Ulje se razvrstava kako slijedi u skladu s medijanom mana i medijanom „voćnosti”. Pod time se podrazumijeva medijan negativnog svojstva s najvećim intenzitetom. Vrijednost grubog koeficijenta varijacije za negativno svojstvo ne smije biti veća od 20 %.

- (a) *ekstra djevičansko maslinovo ulje*: medijan mana jednak nuli, a medijan „voćnosti” veći od nule;
- (b) *djevičansko maslinovo ulje*: medijan mana veći od nule, ali ne veći od 3,5 a medijan „voćnosti” veći od nule;
- (c) *obično djevičansko maslinovo ulje*: medijan mana veći od 2,5, ali ne veći od 6,0; ili medijan mana ne veći od 2,5, a medijan „voćnosti” jednak nuli;
- (d) *djevičansko maslinovo ulje lampante*: medijan mana veći od 6,0.

Od 1. studenoga 2003. kategorije c) i d) zamjenjuju se s:

- (c) *maslinovo ulje lampante*: medijan mana veći od 2,5; ili medijan mana nije veći od 2,5 a medijan „voćnosti” jednak nuli.

5.4. Poseban slučaj

Ako je medijan pozitivnog svojstva, izuzev „voćnosti”, veći od 5,0, predsjednik komisije to mora naznačiti na analitičkoj potvrdi.

⁽¹⁾ Uzorak se ne mora kušati ako se uoče vrlo intenzivna negativna svojstva; ove posebne okolnosti upisuju se na ocjenjivački listić.

DODATAK A

Ocjenjivački listić

(za uporabu od strane organoleptičkih ocjenjivača)

ZAMIJEĆENE MANE	INTENZITET
Pljesnivo	→
Pljesnivo/vlažno	→
Kiselo/octeno	→
Blatno	→
Metalno	→
Užeglo	→
Ostalo (navesti)	→
ZAMIJEĆENA POZITIVNA SVOJSTVA	
Voćno	→
Gorko	→
Pikantno	→

Ime organoleptičkog ocjenjivačaŠifra uzorkaDatum

DODATAK B

METODA IZRAČUNAVANJA MEDIJANA I INTERVALA POUZDANOSTI

Medijan

$$Me = [P(X < X_m) \leq 1/2 \wedge P(X \leq X_m) \geq 1/2]$$

Medijan je realni broj X_m za koji vrijedi da je vjerojatnost (P) da vrijednosti distribucije (X) budu niže od tog broja (X_m) nije veća od 0,5 te da je istodobno vjerojatnost (P) da vrijednosti distribucije (X) nisu veće od X_m nije manja od 0,5. Prema drugoj definiciji je medijan 50-ti postotnik distribucije brojeva u rastućem nizu. Drugim riječima, medijan predstavlja središnju vrijednost serije s neparnim brojem elemenata ili srednju vrijednost dvaju središnjih elemenata u seriji s parnim brojem elemenata.

Gruba standardna devijacija

$$S = \frac{1,25 \text{ IQR}}{1,35 \sqrt{N}}$$

Kako bi se postigla pouzdana procjena varijabilnosti koja se javlja oko medijana, potrebno je koristiti Stuartovu ili Kendallovu metodu procjene grube standardne devijacije. Jednadžba za asimptotsku standardnu devijaciju S uključuje N i IQR . N predstavlja broj podataka, a IQR je međukvartilni interval, tj. gruba procjena varijabilnosti promatranih podataka (međukvartilni interval obuhvaća točno 50 % slučajeva u bilo kojoj distribuciji vjerojatnosti). Međukvartilni interval dobiva se računanjem razlike između 75-tog i 25-tog postotnika.

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

Postotnik je vrijednost X_{pc} za koju vrijedi da je vjerojatnost (P) da vrijednosti distribucije budu manje od X_{pc} nije veća od određenog postotka, te da je istodobno vjerojatnost (P) da vrijednosti distribucije ne budu veće X_{pc} je manja od navedenog postotka. Postotak ukazuje na odabrani dio distribucije. U slučaju medijana ovaj on je 50/100.

$$\text{Postotnik} = [P(X < X_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge P(X \leq X_{pc}) \geq \frac{n}{100}]$$

Drugim riječima, postotnik je vrijednost distribucije koja odgovara određenoj površini ispod krivulje distribucije ili gustoće. Na primjer, 25. postotnik predstavlja vrijednost distribucije koja odgovara površini od 0,25 ili 25/100.

Grubi koeficijent varijacije (%)

$$\text{CVR} = \frac{S}{Me} 100$$

Grubi koeficijent varijacije (RVC) predstavlja čisti broj, tj. bezdimenzijsku veličinu, koja ukazuje na postotak varijabilnosti analizirane serije brojeva u odnosu na Me vrijednost medijana. Iz tog je razloga ovaj koeficijent posebno koristan za ispitivanje pouzdanosti organoleptičkih ocjenjivača komisije.

Interval pouzdanosti od 95 % u odnosu na medijan

Interval pouzdanosti (I.C.) od 95 % (vrijednost greške prve vrste iznosi 0,05 ili 5 %) predstavlja raspon unutar kojeg bi vrijednost medijana mogla varirati kada bi bilo moguće ocjenjivanje ponoviti bezbroj puta. U praksi ovaj interval ukazuje na raspon varijabilnosti ocjenjivanja u odabranim uvjetima rada, kada bi bilo moguće ocjenjivanje ponoviti više puta. Interval pomaže u procjeni pouzdanosti ocjenjivanja, kao i u slučaju grubog koeficijenta varijacije.

$$\text{I.C. gornji} = Me + (c.S)$$

$$\text{I.C. donji} = Me - (c.S)$$

gdje c u slučaju pouzdanosti intervala od 0,95 ima vrijednost 1,96.

Razvrstavanje se vrši usporedbom vrijednosti medijana s referentnim rasponima iz odjeljka 5.3. Softverski paket dozvoljava vizualno razvrstavanje na statističkoj tablici ili grafikonu."

5. Prilog XIV. se briše.
6. Dodaje se sljedeći Prilog XIX.

„PRILOG XIX.

ODREĐIVANJE SADRŽAJA ALIFATSKIH ALKOHOLA KAPILARNOM PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. PREDMET

Ovim se postupkom opisuje metoda za određivanje sadržaja alifatskih alkohola u uljima i mastima.

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 eteri 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 persiliniziranog 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).
4. REAGENCI
- 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.
- 4.11. Referentna otopina za tankoslojnu kromatografiju: kolesterol ili fitosteroli, 5 %-tna otopina u kloroformu.
- 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.

- 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 kalijevog 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 peć 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 (*).

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.

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 mikrostrcaljke 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.

- 5.2.5. Ploča se blago i jednoliko pošprica otopinom 2',7'-diklorfluoresceina kad se promatra pod ultraljubičastim svjetlom. Vrpca alifatskih alkohola može se identificirati usporedbom sa slojem dobivenim od referentne otopine: rubovi trake označe se crnom olovkom; označavajući zajedno vrpce alifatskih alkohola i vrpce terpenskih alkohola neposredno iznad nje.

Bilješka 4: Vrpce alifatskih alkohola i terpenskih alkohola uzimaju se zajedno zbog mogućih migracija nekih alifatskih alkohola u vrpce triterpenskih alkohola.

- 5.2.6. Silikagel koji se nalazi u označenom području sastruže se pomoću metalne spatule. Tako dobiveni fino usitnjeni materijal unosi se u lijevak za filtriranje (3.7.). Dodaje se 10 ml vrućeg kloroforma, pažljivo izmiješa metalnom spatulom i filtrira pod vakuumom, skupljajući filtrat u vakuumsku tikvicu (3.8.) spojenu na lijevak za filtriranje.

Ostatak u tikvici ispere se tri puta dietilnim eterom (približno 10 ml svaki put), skupljajući filtrat u istu tikvicu spojenu na lijevak. Filtrat se isparuje do volumena od 4 do 5 ml, preostala se otopina prenosi u prethodno izvaganu epruvetu volumena 10 ml (3.9.), suši se laganim zagrijavanjem pod blagom strujom dušika, otapa se s nekoliko kapi acetona, ponovo suši, stavlja se u peć na 105 °C približno 10 minuta, ostavlja se da se ohladi u eksikatoru i važe.

Ostatak u epruveti sastoji se od alkoholne frakcije.

5.3. Pripremanje trimetilsilil etera

- 5.3.1. Reagens za silaniziranje, koji se sastoji od mješavine piridina, heksametilidisilazana 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).

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.

(*) 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.

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,
- 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.

5.4.4. Identificiranje pikova

Identificiranje pojedinačnih pikova provodi se u skladu s retencijskim vremenima i uspoređivanjem sa standardnom TMSE mješavinom koja se analizira pri jednakim uvjetima.

Kromatogram alkoholne frakcije djevičanskog maslinovog ulja prikazan je na slici 1.

5.4.5. Kvantitativna ocjena

5.4.5.1. Površine pikova 1-eikosanola i alifatskih alkohola C_{22} , C_{24} , C_{26} i C_{28} 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

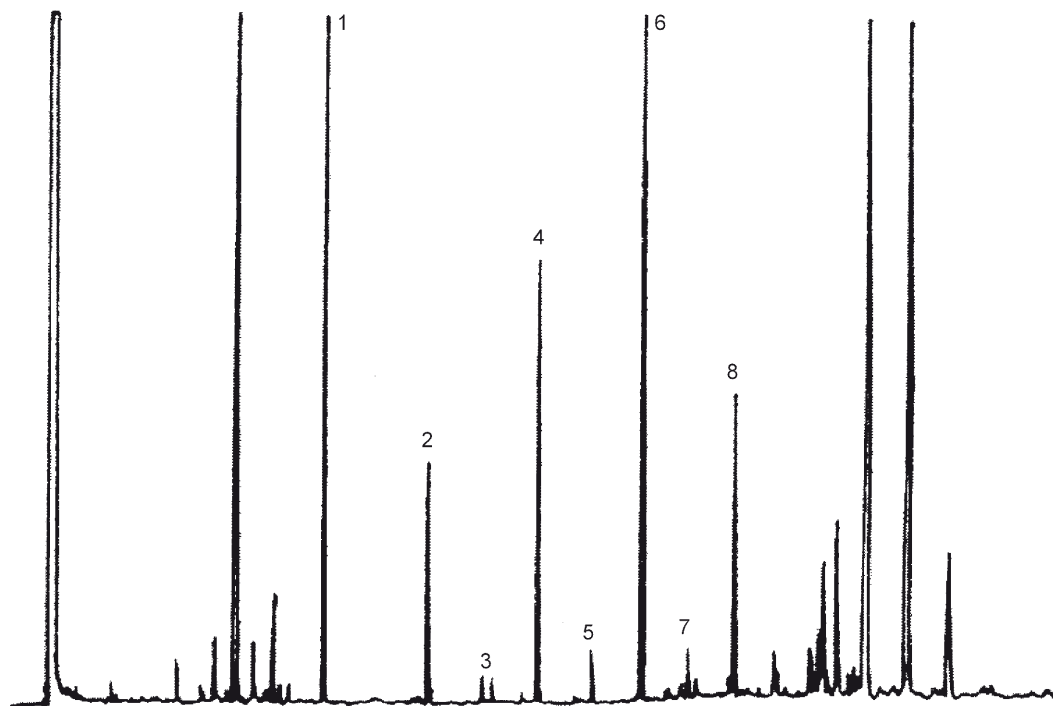
Iskazuje se sadržaj pojedinih alifatskih alkohola u mg/1 000 g masne tvari i zbroj „ukupnih alifatskih alkohola”.

DODATAK

Određivanje linearne brzine plina

U plinski kromatograf, postavljen na normalne radne uvjete, injektira se 1 do 3 μ l metana ili propana i zatim se zapornom urom mjeri vrijeme koje je metanu ili propanu potrebno da proteče kroz kolonu od trenutka injektiranja do trenutka elucije (razvijanja) pika (tM).

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



Slika 1. – Kromatogram alkoholne frakcije djevičanskog ulja

- | | |
|------------------|------------------|
| 1 = eikozanol | 5 = pentakozanol |
| 2 = dekozano | 6 = heksakozanol |
| 3 = trikozano | 7 = heptakozanol |
| 4 = tetrakozanol | 8 = oktakozanol |