

Ez a dokumentum kizárólag tájékoztató jellegű és nem vált ki joghatást. Az EU intézményei semmiféle felelősséget nem vállalnak a tartalmáért. A jogi aktusoknak – ideértve azok bevezető hivatkozásait és preambulumbekendéseit is – az Európai Unió Hivatalos Lapjában közzétett és az EUR-Lex portálon megtalálható változatai tekintendők hitelesnek. Az említett hivatalos szövegváltozatok közvetlenül elérhetők az ebben a dokumentumban elhelyezett linkeken keresztül

► **B** **A BIZOTTSÁG 2568/91/EGK RENDELETE**

(1991. július 11.)

az olívaolaj és az olívamaradék-olaj jellemzőiről és az ezekre vonatkozó elemzési módszerekről

(HL L 248., 1991.9.5., 1. o.)

Módosította:

		Hivatalos Lap		
		Szám	Oldal	Dátum
► <u>M1</u>	A Bizottság 3682/91/EGK rendelete (1991. december 17.)	L 349	36	1991.12.18.
► <u>M2</u>	A Bizottság 1429/92/EGK rendelete (1992. május 26.)	L 150	17	1992.6.2.
► <u>M3</u>	Commission Regulation (EEC) No 1683/92 of 29 June 1992 (*)	L 176	27	1992.6.30.
► <u>M4</u>	Commission Regulation (EEC) No 1996/92 of 15 July 1992 (*)	L 199	18	1992.7.18.
► <u>M5</u>	A Bizottság 3288/92/EGK rendelete (1992. november 12.)	L 327	28	1992.11.13.
► <u>M6</u>	A Bizottság 183/93/EGK rendelete (1993. január 29.)	L 22	58	1993.1.30.
► <u>M7</u>	módosította a Bizottság 826/93/EGK rendelete (1993. április 6.)	L 87	6	1993.4.7.
► <u>M8</u>	Commission Regulation (EEC) No 620/93 of 17 March 1993 (*)	L 66	29	1993.3.18.
► <u>M9</u>	A Bizottság 177/94/EK rendelete (1994. január 28.)	L 24	33	1994.1.29.
► <u>M10</u>	Commission Regulation (EC) No 2632/94 of 28 October 1994 (*)	L 280	43	1994.10.29.
► <u>M11</u>	A Bizottság 656/95/EK rendelete (1995. március 28.)	L 69	1	1995.3.29.
► <u>M12</u>	Commission Regulation (EC) No 2527/95 of 27 October 1995 (*)	L 258	49	1995.10.28.
► <u>M13</u>	Commission Regulation (EC) No 2472/97 of 11 December 1997 (*)	L 341	25	1997.12.12.
► <u>M14</u>	A Bizottság 282/98/EK rendelete (1998. február 3.)	L 28	5	1998.2.4.
► <u>M15</u>	Commission Regulation (EC) No 2248/98 of 19 October 1998 (*)	L 282	55	1998.10.20.
► <u>M16</u>	A Bizottság 379/1999/EK rendelete (1999. február 19.)	L 46	15	1999.2.20.
► <u>M17</u>	Commission Regulation (EC) No 455/2001 of 6 March 2001 (*)	L 65	9	2001.3.7.
► <u>M18</u>	Commission Regulation (EC) No 2042/2001 of 18 October 2001 (*)	L 276	8	2001.10.19.
► <u>M19</u>	Commission Regulation (EC) No 796/2002 of 6 May 2002 (*)	L 128	8	2002.5.15.
► <u>M20</u>	A Bizottság 1989/2003/EK rendelete (2003. november 6.)	L 295	57	2003.11.13.
► <u>M21</u>	A Bizottság 702/2007/EK rendelete (2007. június 21.)	L 161	11	2007.6.22.
► <u>M22</u>	A Bizottság 640/2008/EK rendelete (2008. július 4.)	L 178	11	2008.7.5.
► <u>M23</u>	A Bizottság 61/2011/EU rendelete (2011. január 24.)	L 23	1	2011.1.27.
► <u>M24</u>	A Bizottság 661/2012/EU végrehajtási rendelete (2012. július 19.)	L 192	3	2012.7.20.

(*) Ez a jogi aktus sosem jelent meg magyar nyelven.

► <u>M25</u>	A Bizottság 299/2013/EU végrehajtási rendelete (2013. március 26.)	L 90	52	2013.3.28.
► <u>M26</u>	A Bizottság 1348/2013/EU végrehajtási rendelete (2013. december 16.)	L 338	31	2013.12.17.
► <u>M27</u>	A Bizottság (EU) 2015/1830 felhatalmazáson alapuló rendelete (2015. július 8.)	L 266	9	2015.10.13.
► <u>M28</u>	A Bizottság (EU) 2015/1833 végrehajtási rendelete (2015. október 12.)	L 266	29	2015.10.13.
► <u>M29</u>	A Bizottság (EU) 2016/1227 végrehajtási rendelete (2016. július 27.)	L 202	7	2016.7.28.

▼B**A BIZOTTSÁG 2568/91/EGK RENDELETE****(1991. július 11.)****az olívaolaj és az olívamadaradék-olaj jellemzőiről és az ezekre vonatkozó elemzési módszerekről****▼M20***1. cikk*

(1) Azok az olajok, amelyeknek jellemzői megegyeznek az e rendelet I. mellékletének 1. és 2. pontja szerintiakkal, szűz olívaolajnak minősülnek a 136/66/EGK rendelet mellékletének 1. a) és b) pontja értelmében.

(2) Az az olaj, amelynek jellemzői megegyeznek az e rendelet I. mellékletének 3. pontja szerintiakkal, lampante olívaolajnak minősül a 136/66/EGK rendelet melléklete 1. c) pontja értelmében.

(3) Az az olaj, amelynek jellemzői megegyeznek az e rendelet I. mellékletének 4. pontja szerintiakkal, finomított olívaolajnak minősül a 136/66/EGK rendelet mellékletének 2. pontja értelmében.

(4) Az az olaj, amelynek jellemzői megegyeznek az e rendelet I. mellékletének 5. pontja szerintiakkal, finomított olívaolajokból és szűz olívaolajokból álló olívaolajnak minősül a 136/66/EGK rendelet mellékletének 3. pontja értelmében.

(5) Az az olaj, amelynek jellemzői megegyeznek az e rendelet I. mellékletének 6. pontja szerintiakkal, nyers olívamadaradék-olajnak minősül a 136/66/EGK rendelet mellékletének 4. pontja értelmében.

(6) Az az olaj, amelynek jellemzői megegyeznek az e rendelet I. mellékletének 7. pontja szerintiakkal, finomított olívamadaradék-olajnak minősül a 136/66/EGK rendelet mellékletének 5. pontja értelmében.

(7) Az az olaj, amelynek jellemzői megegyeznek az e rendelet I. mellékletének 8. pontja szerintiakkal, olívamadaradék-olajnak minősül a 136/66/EGK rendelet mellékletének 6. pontja értelmében.

▼ M26

2. cikk

(1) Az olajok I. melléklet szerinti jellemzőinek megállapítása a következő elemzési módszerekkel történik:

- a) a szabad zsírsavak mennyiségének az olajsav százalékban történő meghatározása a II. melléklet szerinti módszerrel;
- b) a peroxid-index meghatározása a III. melléklet szerinti módszerrel;
- c) a viasztartalom meghatározása a IV. melléklet szerinti módszerrel;
- d) a szterinek és a triterpén dialkoholok összetételének és mennyiségének kapilláris oszlopos gázkromatográfiával történő meghatározása az V. melléklet szerinti módszerrel;
- e) a 2-gliceril monopalmitát százalékának meghatározása a VII. melléklet szerinti módszerrel;
- f) a spektrofotometriás elemzés a IX. melléklet szerinti módszerrel;

▼ M28

- g) a zsírsavösszetétel meghatározása a X. melléklet szerinti módszerrel;

▼ M26

- h) az illékony halogénezett oldószerek meghatározása a XI. melléklet szerinti módszerrel;
- i) a szűz olívaolaj érzékszervi jellemzőinek értékelése a XII. melléklet szerinti módszerrel;
- j) a sztigmasztadiének mennyiségének meghatározása a XVII. melléklet szerinti módszerrel;
- k) az ECN42 triglicerid-tartalom meghatározása a III. melléklet szerinti módszerrel;

▼ M28

- l) az alifás és a triterpénes alkoholtartalom meghatározása a XIX. melléklet szerinti módszerrel;

▼ M26

- m) a viasz-, valamint a zsírsav-metilészter- és zsírsav-etilészter-tartalom meghatározása a XX. melléklet szerinti módszerrel.

▼ M28

▼ M26

- (2) A szűz olívaolajok érzékszervi jellemzőinek nemzeti hatóságok vagy képviselőik által történő ellenőrzését a tagállamok által jóváhagyott kóstolói csoportok végzik.

▼ M26

Valamely olajnak az első albekezdésben említett érzékszervi jellemzői akkor tekintendők a bejelentett kategóriának megfelelőnek, ha a tagállamok által jóváhagyott kóstolói csoport megerősíti az osztályozást.

Amennyiben az érzékszervi jellemzők tekintetében a csoport nem erősíti meg a bejelentett kategóriát, az érdekelt fél kérésére a nemzeti hatóságok vagy képviselőik más jóváhagyott csoportokkal haladéktalanul elvégeztetnek két ellenőrző értékelést, melyek közül az egyiket az érintett termelő tagállam által jóváhagyott csoport végzi. Az érintett jellemzők akkor tekintendők a bejelentett kategóriának megfelelőnek, ha az ellenőrző értékelések közül legalább kettő megerősíti az adott osztályozást. Amennyiben ez nem áll fenn, az ellenőrző értékelések költségei az érdekelt felet terhelik.

(3) Az olaj jellemzőinek a nemzeti hatóságok vagy képviselőik által az (1) bekezdésben előírtaknak megfelelően történő ellenőrzése során a mintavételezés a vizsgálati minták előkészítésére vonatkozó EN ISO 661, valamint a mintavételezésre vonatkozó EN ISO 5555 nemzetközi szabvány szerint történik. Azonban az EN ISO 5555 szabvány 6.8 pontja ellenére, a közvetlen csomagolású olajok esetében a mintavételezés e rendelet Ia. melléklete szerint történik. Az ömlesztett olajok esetében, amelyekre nem alkalmazható az EN ISO 5555 szabvány szerinti mintavétel, a mintavételezés a tagállam illetékes hatósága által adott utasítások szerint történik.

Az EN ISO 5555 szabvány és az EN ISO 661 szabvány 6. fejezetének sérelme nélkül a levett mintákat a lehető leggyorsabban sötét helyen, hőhatástól távol kell elhelyezni, és legkésőbb a mintavételezést követő ötödik munkanapig be kell küldeni elemzésre; eltérő esetben úgy kell tárolni a mintákat, hogy azok a laboratóriumba küldésük előtt a szállítás vagy a tárolás során ne sérüljenek vagy károsodjanak.

(4) A (3) bekezdésben említett ellenőrzések céljára a II., III., IX., XII. és XX. mellékletben említett elemzéseket és – ha a nemzeti törvények előírják – az ellenvizsgálatokat csomagolt termékek esetében a minőségmegőrzési idő lejártá előtt kell elvégezni. Az ömlesztett olajok mintavételezése esetében az elemzéseket legkésőbb a mintavételt követő hatodik hónapban el kell végezni.

Az e rendeletben előírt egyéb elemzések vonatkozásában semmiféle határidőt nem kell alkalmazni.

Hacsak a mintavétel nem kevesebb mint két hónappal a minőségmegőrzési idő lejártá előtt történik, akkor amennyiben az elemzések eredményei nem felelnek meg a bejelentett kategóriájú olívaolaj és olívaolajcsa-olaj jellemzőinek, az érintett felet legkésőbb egy hónappal az első albekezdésben meghatározott időtartam lejártá előtt értesíteni kell.

▼M26

(5) Az olívaolajok jellemzőinek az (1) bekezdés első albekezdésében előírt módszerek szerinti meghatározása céljából az elemzés eredményeit közvetlenül össze kell vetni az e rendeletben meghatározott határértékekkel.

▼M25*2a. cikk*

(1) E cikk alkalmazásában a „forgalmazott olívaolaj” egy adott tagállamból származó olívaolaj és olívapogácsa-olaj teljes mennyisége, amely a szóban forgó tagállamban kerül fogyasztásra, vagy amelyet ebből a tagállamból exportálnak.

(2) A tagállamok gondoskodnak arról, hogy a megfelelőségi ellenőrzések szelektív módon, kockázatelemzésre alapozva és megfelelő gyakorisággal történjenek annak biztosítására, hogy a forgalmazott olívaolaj megfelel a bejelentett kategóriának.

(3) A kockázatelemzési szempontok között szerepelhet:

- a) az olaj kategóriája, az előállítás időszaka, az olajok más növényi olajokkal összevetett ára, a keverési és csomagolási eljárások, a tárolási létesítmények és feltételek, a származási ország, a célország, a szállítási eszközök vagy a tétel volumene;
- b) a gazdasági szereplők értékesítési láncban elfoglalt helye, az általuk forgalmazott volumen és/vagy érték, az általuk forgalmazott olajkategóriák skálája, az olyan elvégzett munkatípusok, mint a kinyerés, tárolás, finomítás, keverés, csomagolás vagy kiskereskedelmi értékesítés;
- c) korábbi ellenőrzések eredményei, beleértve a feltárt hiányosságok számát és típusát, a forgalmazott olajok általános minőségét és a használt technikai eszközök teljesítményét;
- d) a gazdasági szereplők által használt, a forgalmazási előírásoknak való megfeleléssel kapcsolatos minőségbiztosítási rendszereknek vagy önellenőrzési rendszereknek a megbízhatósága;
- e) az ellenőrzés végrehajtásának helyszíne, különösen, ha az Unióba való első belépési pontról, az Unióból való utolsó kilépési pontról vagy az olajok előállításának, csomagolásának, berakodásának vagy a végső fogyasztó számára történő értékesítésének helyéről van szó;
- f) minden egyéb olyan információ, amely a megfelelés hiányának kockázatára utalhat.

(4) A tagállamok előre meghatározzák a következőket:

- a) a tételek megfelelésének hiányára vonatkozó kockázatelemzés szempontjai;
- b) az egyes kockázati kategóriák kockázatelemzése alapján azon gazdasági szereplők vagy tételek és/vagy mennyiségek minimális száma, amelyeknél megfelelőségi ellenőrzést kell végezni.

▼ M25

A tagállamban forgalmazott olívaolaj minden ezer tonnájára évente legalább egy megfelelőségi ellenőrzést kell végezni.

- (5) A tagállamoknak ellenőrizniük kell a megfelelést úgy, hogy:
- a) bármilyen sorrendben végrehajtják az I. mellékletben előírt elemzéseket; vagy
 - b) az I. B. mellékletben a döntési fán előírt sorrendet követve hajtják végre azokat, amíg el nem jutnak a döntési fán szereplő valamelyik döntésig.

▼ M19**▼ M25***3. cikk*

Amennyiben megállapítást nyer, hogy egy olaj nem felel meg kategórialeírásának, az érintett tagállam – egyéb szankciók sérelme nélkül – hatékony, arányos és visszatartó erejű, a feltárt szabálytalanság súlyosságának megfelelően meghatározott szankciókat alkalmaz.

Ha az ellenőrzések jelentős szabálytalanságokat tárnak fel, a tagállamok növelik a forgalmazás szakaszára, az olajkategóriára, a származásra vagy egyéb szempontokra vonatkozó ellenőrzések gyakoriságát.

▼ M5*4. cikk***▼ M19**

- (1) The Member States may approve assessment panels so that national authorities or their representatives can assess and verify organoleptic characteristics.

The terms of approval shall be set by Member States and ensure that:

- the requirements of Annex XII.4 are met,
- the panel head is given training recognised for this purpose by the Member State,
- continued approval depends on performance in annual checks arranged by the Member State.

Member States shall notify to the Commission a list of approved panels and the action taken under this paragraph.

▼ M5

- (2) Amennyiben a tagállamok számára problémát jelent ezeknek a csoportoknak a felállítása a saját területükön, felkérhetnek egy másik tagállamban elfogadott kóstolói csoportot.

- (3) Valamennyi tagállam listát készít a szakmai- vagy ágazati szervezetek által az (1) bekezdésben meghatározott feltételekkel összhangban felállított kóstolói csoportokról, továbbá biztosítja e feltételek betartását.

▼ M19**▼ B***6. cikk*

- (1) Az olívaolaj kinyeréséből származó olajpogácsa és egyéb maradékanyagok (KN-kód: 2306 90 11 és 2306 90 19) olajtartalmának meghatározása a XV. mellékletben szabályozott módszerrel történik.

▼B

(2) Az (1) bekezdésben említett olajtartalmat az olaj súlyának a szárazanyag súly százalékos arányában fejezik ki.

▼M20*7. cikk*

A szennyező anyagok jelenlétére vonatkozó közösségi rendelkezéseket alkalmazni kell.

A halogénezett oldószerek esetében a következő határértékek vonatkoznak minden olívaolaj-kategóriára:

- a maximális oldószertartalom minden egyes kimutatott halogénezett oldószer esetében: 0,1 mg/kg,
- a maximális összesített oldószertartalom az összes észlelt halogénezett oldószer tekintetében: 0,2 mg/kg.

▼M25*7a. cikk*

Azon természetes vagy jogi személyek és azok csoportjai, amelyek – akár szakmai, akár kereskedelmi célból – a sajtólétesítményben történő olajkinyeréstől a palackozási stádiumig tartó (ez utóbbit is magában foglaló) folyamat bármely fázisában lévő olívaolajat és olíva-pogácsa-olajat tárolnak, minden olajkategória tekintetében nyilvántartást vezetnek a belépő és a kilépő tételekről.

A tagállamok biztosítják, hogy a gazdasági szereplők az első bekezdésben megállapított kötelezettségnek teljes mértékben megfelelnek.

8. cikk

(1) A tagállamok értesítik a Bizottságot az e rendelet végrehajtására hozott intézkedéseikről. Tájékoztatják a Bizottságot a későbbiekben bekövetkezett minden változásról.

(2) A tagállamok minden évben legkésőbb május 31-ig jelentést nyújtanak be a Bizottsághoz az e rendeletnek az előző naptári év során történő alkalmazásáról. A jelentés mindenképpen tartalmazza az olívaolajokon végzett megfeleléségi ellenőrzéseknek a XXI. mellékletben szereplő táblázat szerinti eredményeit.

(3) Az e rendeletben említett értesítéseket a 792/2009/EK bizottsági rendeletnek ⁽¹⁾ megfelelően kell megküldeni.

▼B*9. cikk*

A 1058/77/EGK rendelet hatályát veszti.

10. cikk

(1) Ez a rendelet az *Európai Közösségek Hivatalos Lapjában* való kihirdetését követő harmadik napon lép hatályba.

A XII. melléklet szerinti módszer azonban ►**M1** 1992. november 1. ◀-jétől hatályos, kivéve az *intervenciós rendszer működésével kapcsolatos műveleteket*.

⁽¹⁾ HL L 228., 2009.9.1., 3. o.

▼ **M5**

Ez a módszer nem vonatkozik az 1992. november 1. előtti forgalomba-hozatal céljára készített szűz olívaolajra.

▼ **B**

(2) E rendeletet nem kell alkalmazni a hatálybalépését megelőzően csomagolt és 1992. október 31-ig forgalomba hozott olívaolajra és olívamaradék-olajra.

Ez a rendelet teljes egészében kötelező és közvetlenül alkalmazandó valamennyi tagállamban.

▼ B*MELLÉKLETEK***ÖSSZEFOGLALÁS**

I. melléklet:	Az olívaolaj jellemzői
Ia. melléklet:	Olívaolajból vagy olívaogácsa-olajból történő mintavétel közvetlen csomagolásban szállított
Ib. melléklet:	Döntési fa annak ellenőrzésére, hogy egy olívaolaj-minta megfelel-e a bejelentett kategóriának
II. melléklet:	A szabad zsírsavak meghatározása hideg injektálós módszerrel
III. melléklet:	A peroxidszám meghatározása
IV. melléklet:	A viasztartalom meghatározása kapilláris gázkromatográfiával
V. melléklet:	A szterinek és triterpén-alkoholok összetételének és mennyiségének meghatározása kapillárisoszlop-gázkromatográfiával
VII. melléklet:	► M21 A 2-gliceril monopalmitát százalékanak meghatározása ◀

▼ M20**▼ B**

IX. melléklet:	Spektrofotometriás vizsgálat ultraibolya fényben
----------------	--

▼ M28

X melléklet:	Zsírsav-metilészterek gázkromatográfiás meghatározása
--------------	---

▼ B

XI. melléklet:	Az olívaolaj illékony halogénezett oldószereinek meghatározása
XII. melléklet:	A nemzetközi olívaolaj-tanácsnak a szűz olívaolajok érzékszervi értékelésére szolgáló módszere

▼ M20**▼ M19****▼ B**

XV. melléklet:	Az olívaamaradék olajtartalma
XVI. melléklet:	A jódszám meghatározása
XVII. melléklet:	A növényi olajok sztigmasztadién-összetételének meghatározása
XVIII. melléklet:	Az ECN-42-Es triacil-glicerinek tényleges és elméleti mennyisége közötti különbség meghatározása
annex XIX:	► M28 Az alifás és a triterpénes alkoholtartalom meghatározása kapilláris gázkromatográfiával ◀

▼ M23

XX. melléklet:	A viasz-, valamint a zsírsav-metilészter- és zsírsav-etilészter-tartalom kapilláris gázkromatográfiával történő meghatározásának módszere
----------------	---

▼ M28**▼ M25**

XXI. melléklet:	A 8. cikk (2) bekezdésében említett, olívaolajokon végzett megfelelőségi ellenőrzések eredményei
-----------------	--

I. MELLÉKLET

AZ OLÍVAOLAJ JELLEMZŐI

Kategória	Zsír-sav-etil-észterek (FAEE) (*)	Savasság (%) (*)	Peroxid-szám mEq O ₂ /kg (*)	Viasztartalom mg/kg (**)	2-gliceril-monopalmitát (%)	Sztigmasz-tadiének mg/kg (1)	Különbség: ECN42 (HPLC) és ECN42 különbsége (elméleti számítás)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ vagy K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organolep-tikus értékelés Hibamedian (Hm) (*)	Organolep-tikus értékelés Gyümölcsös-ségi median (Gym) (*)
1. Extra szűz olívaolaj	FAEE-k ≤ 40 mg/kg (2013–2014-es termesztési év) (2) FAEE-k ≤ 35 mg/kg (2014–2016-os termesztési év) FAEE-k ≤ 30 mg/kg (a 2016-os termesztési év után)	≤ 0,8	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9, ha a palmitinsav összaránya % ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Hm = 0	Gym > 0
					≤ 1,0, ha a palmitinsav összaránya % > 14 %							
2. Szűz olívaolaj	—	≤ 2,0	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9, ha a palmitinsav összaránya % ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Hm ≤ 3,5	Gym > 0
					≤ 1,0, ha a palmitinsav összaránya % > 14 %							

▼M27

Kategória	Zsír-sav-etil-észterek (FAEE) (*)	Savasság (%) (*)	Peroxid-szám mEq O ₂ /kg (*)	Viasztartalom mg/kg (**)	2-gliceril-monopalmitát (%)	Sztigmasz-tadiének mg/kg (1)	Különbség: ECN42 (HPLC) és ECN42 különbsége (elméleti számítás)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ vagy K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptikus értékelés Hibamedian (Hm) (*)	Organoleptikus értékelés Gyümölcsösségi median (Gym) (*)
3. Lampante olívaolaj	—	> 2,0	—	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 300 (3)	≤ 0,9, ha a palmitinsav összaránya % ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Hm 3,5 (4)	—
					≤ 1,1, ha a palmitinsav összaránya % > 14 %							
4. Finomított olívaolaj	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9, ha a palmitinsav összaránya % ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1, ha a palmitinsav összaránya % > 14 %							
5. Finomított és szűz olívaolajokból álló olívaolaj	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9, ha a palmitinsav összaránya % ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0, ha a palmitinsav összaránya % > 14 %							

▼ M27

Kategória	Zsír-sav-etil-észterek (FAEE) (*)	Savasság (%) (*)	Peroxid-szám mEq O ₂ /kg (*)	Viasztartalom mg/kg (**)	2-gliceril-monopalmitát (%)	Sztigmasztadiének mg/kg (1)	Különbség: ECN42 (HPLC) és ECN42 különbsége (elméleti számítás)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ vagy K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptikus értékelés Hibamedian (Hm) (*)	Organoleptikus értékelés Gyümölcsösségi median (Gym) (*)
6. Nyers olívpogácsa-olaj	—	—	—	C40 + C42 + C44 + C46 > 350 (3)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Finomított olívpogácsa-olaj	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Olívpogácsa-olaj	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) A kapilláris kolonnával elválasztható (vagy el nem választható) izomerek összesen.

(2) Ez a határérték a 2014. március 1. után előállított olívaolajokra vonatkozik.

(3) A 300–350 mg/kg közötti viasztartalmú olajok lampante olívaolajnak tekintendők, ha a teljes alifásalkohol-tartalom legfeljebb 350 mg/kg, vagy ha az eritrodiol- és uvaoltartalom legfeljebb 3,5 %.

(4) A hibamedian legfeljebb 3,5 lehet, a gyümölcsösségi median pedig 0.

(5) A 300–350 mg/kg közötti viasztartalmú olajok nyers olívpogácsa-olajnak tekintendők, ha a teljes alifásalkohol-tartalom meghaladja a 350 mg/kg-ot, és ha az eritrodiol- és uvaoltartalom nagyobb mint 3,5 %.

▼ M27

Kategória	Zsírsvösszetétel ⁽¹⁾						Transz- olajzo- merek összege (%)	Transzli- nol- + transzli- nolén- izomerek összege (%)	Szterinösszetétel						Szterinek összege (mg/kg)	Eritrodiol és uvaol (%) (**)
	Mirisz- tinsav (%)	Lino- lénsav (%)	Arachin- sav (%)	Eiko- zénsav (%)	Behéns- av (%)	Ligno- rinsav (%)			Kolesz- terin (%)	Brasszi- kaszterin (%)	Kampesz- terin ⁽²⁾ (%)	Sztigmasz- terin (%)	Láth. β- szitoszte- rin ⁽³⁾ (%) (**)	Delta-7- sztigmasz- tenol ⁽²⁾ (%)		
1. Extra szűz olívaolaj	≤ 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. Szűz olívaolaj	≤ 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. Lampante olívaolaj	≤ 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. Finomított olívaolaj	≤ 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. Finomított és szűz olívaolajokból álló olívaolaj	≤ 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. Nyers olívaolaj	≤ 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. Finomított olívaolaj	≤ 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

Kategória	Zsírsvösszetétel ⁽¹⁾						Transz-olajizomerek összege (%)	Transzlinol- + transzlinolénizomerek összege (%)	Szterinösszetétel						Szterinek összege (mg/kg)	Eritrodiol és uvaol (%) (**)
	Mirisztinsav (%)	Linolénsav (%)	Arachinsav (%)	Eikozénsav (%)	Behénsav (%)	Lignocé-rinsav (%)			Koleszterin (%)	Brassziterin (%)	Kampeszterin ⁽²⁾ (%)	Sztigmaszterin (%)	Láth. β -szitoszterin ⁽³⁾ (%) (**)	Delta-7-sztigmasztenol ⁽²⁾ (%)		
8. Olívapogácsa-olaj	≤ 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⁾ Egyéb zsírsvartartalom (%): palmitin: 7,50–20,00; palmitolein: 0,30-3,50; heptadekán: ≤ 0,30; heptadecén: ≤ 0,30; sztearin: 0,50–5,00; olaj: 55,00–83,00; linol: 2,50–21,00.

⁽²⁾ Lásd e melléklet függelékét.

⁽³⁾ Láth β -szitoszterin: Delta-5,23-sztigmasztadienol+kleroszterin+béta-szitoszterin+szitosztenol+delta-5-avenaszterin+delta-5,24-sztigmasztadienol.

⁽⁴⁾ A 300–350 mg/kg közötti viaszartalmú olajok lampante olívaolajnak tekintendők, ha a teljes alifásalkohol-tartalom legfeljebb 350 mg/kg, vagy ha az eritrodiol- és uvaoltartalom legfeljebb 3,5 %.

⁽⁵⁾ A 300–350 mg/kg közötti viaszartalmú olajok nyers olívapogácsa-olajnak tekintendők, ha a teljes alifásalkohol-tartalom meghaladja a350 mg/kg-ot, vagy ha az eritrodiol- és uvaoltartalom nagyobb mint 3,5 %.

Megjegyzések:

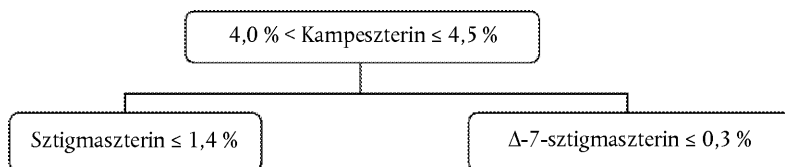
- Az eredményeket ugyanannyi tizedesjegy-pontossággal kell megadni, mint amennyi az egyes jellemzők esetében meg van adva. Ha az elhagyandó értékes számjegy négyenél nagyobb, az utolsó értékes számjegyet meg kell növelni eggyel.
- Ha a jellemzői közül bármelyik kívül esik a megállapított határértéken, az olajat egy másik kategóriába kell sorolni, vagy a tisztaság tekintetében nem megfelelőnek kell minősíteni a rendelet alkalmazásában.
- Az olaj minőségével kapcsolatos, csillaggal (*) jelzett jellemzők azt jelentik, hogy: – a lampante olívaolaj esetében ezeket a határértékeket nem kell egyidejűleg betartani, – szűz olívaolajok esetében ezek közül a határértékek közül legalább egynek a be nem tartása a szűz olívaolajok kategóriáján belüli átsorolással jár, bár az olívaolaj továbbra is a szűz olívaolaj-kategóriák valamelyikéhez tartozik.
- Az olaj minőségével kapcsolatos, két csillaggal (**) jelölt jellemzők azt jelentik, hogy egyik érintett olívapogácsa-olaj esetében sem kell egyidejűleg betartani ezeket a határokat.

▼ M27

Függelék

DÖNTÉSI FA

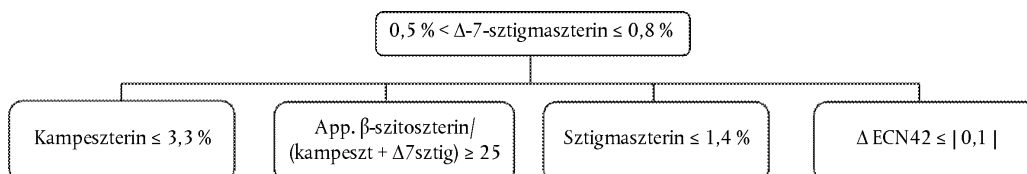
Kampeszterin döntési fa szűz és extra szűz olívaolajokhoz:



A többi paraméternek meg kell felelnie a rendeletben meghatározott határértékeknek.

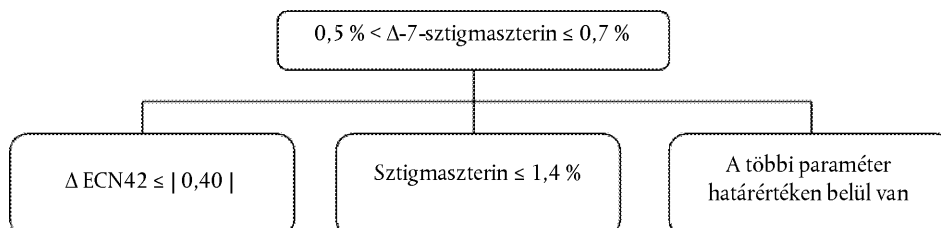
Delta-7-sztigmaszterin döntési fa:

— Extra szűz és szűz olívaolajokhoz



A többi paraméternek meg kell felelnie a rendeletben meghatározott határértékeknek.

— Olívaolaj (nyers és finomított)



▼ **M26***Ia MELLÉKLET***OLÍVAOLAJBÓL VAGY OLÍVAPOGÁCSA-OLAJBÓL TÖRTÉNŐ MINTAVÉTEL KÖZVETLEN CSOMAGOLÁSBAN SZÁLLÍTOTT**

Ez a mintavételi módszer a közvetlen csomagolású olívaolaj- vagy olívapogácsa-olaj gyártási tételekre vonatkozik. A mintavételi módszer annak függvényében változik, hogy a közvetlen csomagolású kiserelés meghaladja-e az 5 litert, vagy sem.

A „gyártási tétel” olyan árucikk-készlet, amit olyan körülmények között állítottak elő, dolgoztak fel és csomagoltak, hogy a minden egyes árucikk által tartalmazott olaj az összes analitikai jellemző tekintetében homogénnek mondható. Az egyes gyártási tételek azonosítását az Európai Parlament és a Tanács 2011/91/EU irányelvének megfelelően kell elvégezni ⁽¹⁾.

Az „egyedi minta” a közvetlen csomag által tartalmazott olajmennyiség, és amit a gyártási tételből emeltek ki véletlenszerűen.

1. AZ ELSŐDLEGES MINTA TARTALMA**1.1. 5 litert meg nem haladó közvetlen csomagolás**

Az „elsődleges minta” az 5 litert meg nem haladó közvetlen csomagolás esetében az egy gyártási tételből vett egyedi minták számát jelenti az 1. táblázatnak megfelelően.

1. táblázat

Az elsődleges minta minimális méretét a következők szerint kell megállapítani

Amennyiben a közvetlen csomagolás űrtartalma	Az elsődleges minta az alábbi számú közvetlen csomagból származó olajat tartalmaz
(a) 1 liter vagy annál nagyobb	(a) 1 közvetlen csomag
(b) kisebb mint 1 liter	(b) a legalább 1 liter összterefogatot kitevő minimális számú csomag

Az 1. táblázatban található, az elsődleges mintát tartalmazó csomagok száma a tagállamok egyedi igényeinek megfelelően növelhető (például, ha az organoleptikus vizsgálatot nem ugyanaz a laboratórium végzi, mint a kémiai vizsgálatot, ellenőrző elemzést stb.)

1.2. 5 litert meghaladó közvetlen csomagolás

Az „elsődleges minta” az 5 litert meghaladó közvetlen csomag esetében az összes egyedi minta reprezentatív része, amit a 2. táblázatnak megfelelő redukciós eljárás szerint kell megkapni. Az elsődleges mintát különböző mintavételi elemekből kell összeállítani.

Az elsődleges minta „mintavételi eleme” azokat a csomagokat jelenti, amelyek együttesen az elsődleges mintát teszik ki.

2. táblázat

Vételezendő egyedi minták minimális száma

Csomagok száma a tételben	A vételezendő egyedi minták minimális száma
Legfeljebb 10	1
11 és 150 között	2

⁽¹⁾ Az Európai Parlament és a Tanács 2011/91/EU irányelve (2011. december 13.) azon árutételt azonosító jelzésekről és jelölésekről, amelyekhez az adott élelmiszer tartozik (HL L 334., 2011.12.16., 1. o.).

▼ **M26**

Csomagok száma a tételben	A vételezendő egyedi minták minimális száma
151 és 500 között	3
501 és 1 500 között	4
1 501 és 2 500 között	5
> 2 500/1 000 csomag	1 plusz egyedi minta

Annak érdekében, hogy csökkenthető legyen a közvetlen csomagokból történő mintavétel, az egyedi minták tartalmát homogenizálni kell az elsődleges minta előállításához. A különböző egyedi minták adagjait a keverés általi homogenizáláshoz egy közös tartályba kell önteni úgy, hogy a lehető leginkább védve legyenek a levegőtől.

Az elsődleges minta tartalmát egy sorozat legkevesebb 1,0 l űrtartalmú csomagba kell önteni, ezek mindegyike az elsődleges minta egy-egy mintavételi elemét képezi.

Az elsődleges minták száma a tagállamok egyedi igényeinek megfelelően növelhető (például, ha az organoleptikus vizsgálatot nem ugyanaz a laboratórium végzi, mint a kémiai vizsgálatot, ellenőrző elemzést stb.)

Minden egyes csomagot úgy kell feltölteni, hogy a tetején a lehető legkisebb legyen a levegőréteg, majd megfelelően le kell zárni és biztosítani, hogy a termék manipulációbiztos legyen.

Ezeket a mintavételi elemeket a megfelelő azonosítás érdekében fel kell címkézni.

2. ELEMZÉSEK ÉS EREDMÉNYEK

2.1. Minden egyes elsődleges mintát az EN ISO 5555 szabvány 2.5. pontja szerint laboratóriumi mintákra kell felosztani, és az Ib. mellékletben szereplő döntési fa szerinti vagy bármilyen más véletlenszerű sorrendben kell elemezni.

2.2. Amennyiben a vizsgálatok minden eredménye megfelel az olaj bejelentett kategóriája jellemzőinek, az egész tételt megfelelőnek kell nyilvánítani.

Amennyiben az elemzések eredményeinek valamelyike nem felel meg az olaj bejelentett kategóriája jellemzőinek, az egész tételt nem megfelelőnek kell nyilvánítani.

3. A GYÁRTÁSI TÉTEL KATEGÓRIÁJÁNAK ELLENŐRZÉSE

3.1. A gyártási tétel kategóriájának ellenőrzésére, az illetékes hatóság a következő táblázat szerint megnövelheti a gyártási tétel különböző pontjain vételezendő elsődleges minták számát:

3. táblázat

A gyártási tétel mérete által meghatározott elsődleges minták száma

Gyártási tétel mérete (literben)	Elsődleges minták száma
7 500	2
7 500 – 25 000	3
25 000 – 75 000	4
75 000 – 125 000	5
≥ 125 000	6 + 1 minden további 50 000 liter után

▼M26

Az elsődleges mintát adó egyedi mintákat a tételben egymás mellett elhelyezkedő közvetlen csomagokból kell vételezni; minden egyes elsődleges minta elhelyezését fel kell jegyezni, és a mintákat egyértelmű azonosítóval kell ellátni.

Minden egyes elsődleges mintát az 1.1. és az 1.2. pontokban ismertetett eljárásoknak megfelelően kell vételezni.

Ezt követően minden elsődleges mintával a 2(1) cikkben ismertetett elemzéseket kell elvégezni.

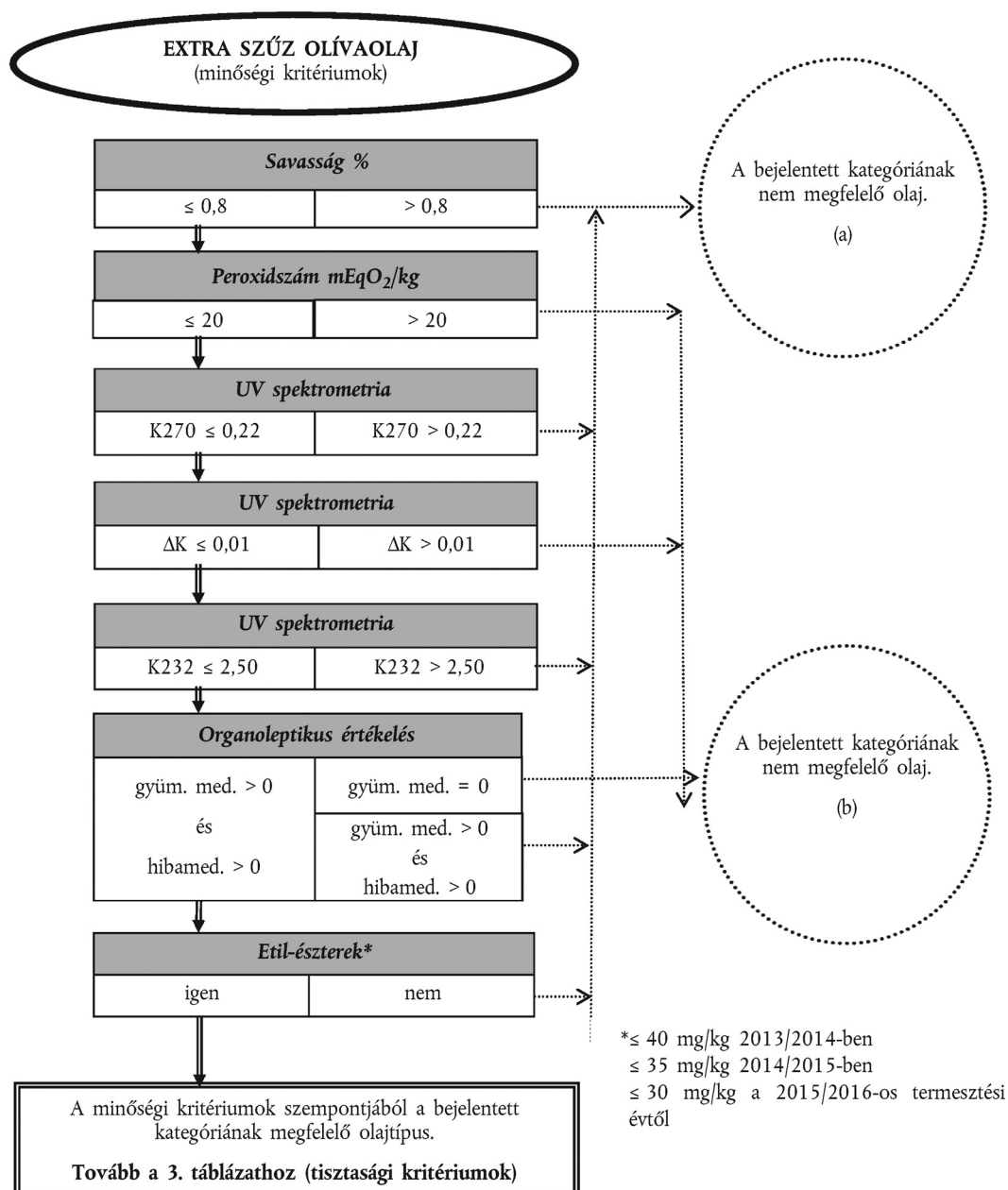
- 3.2. Ha a 2(1) cikkben ismertetett elemzések eredményeinek egyike legalább egy elsődleges minta esetében nem felel meg az olaj bejelentett kategóriája jellemzőinek, a teljes mintázott tételt nem megfelelőnek kell nyilvánítani.

▼ M26

Ib. MELLÉKLET

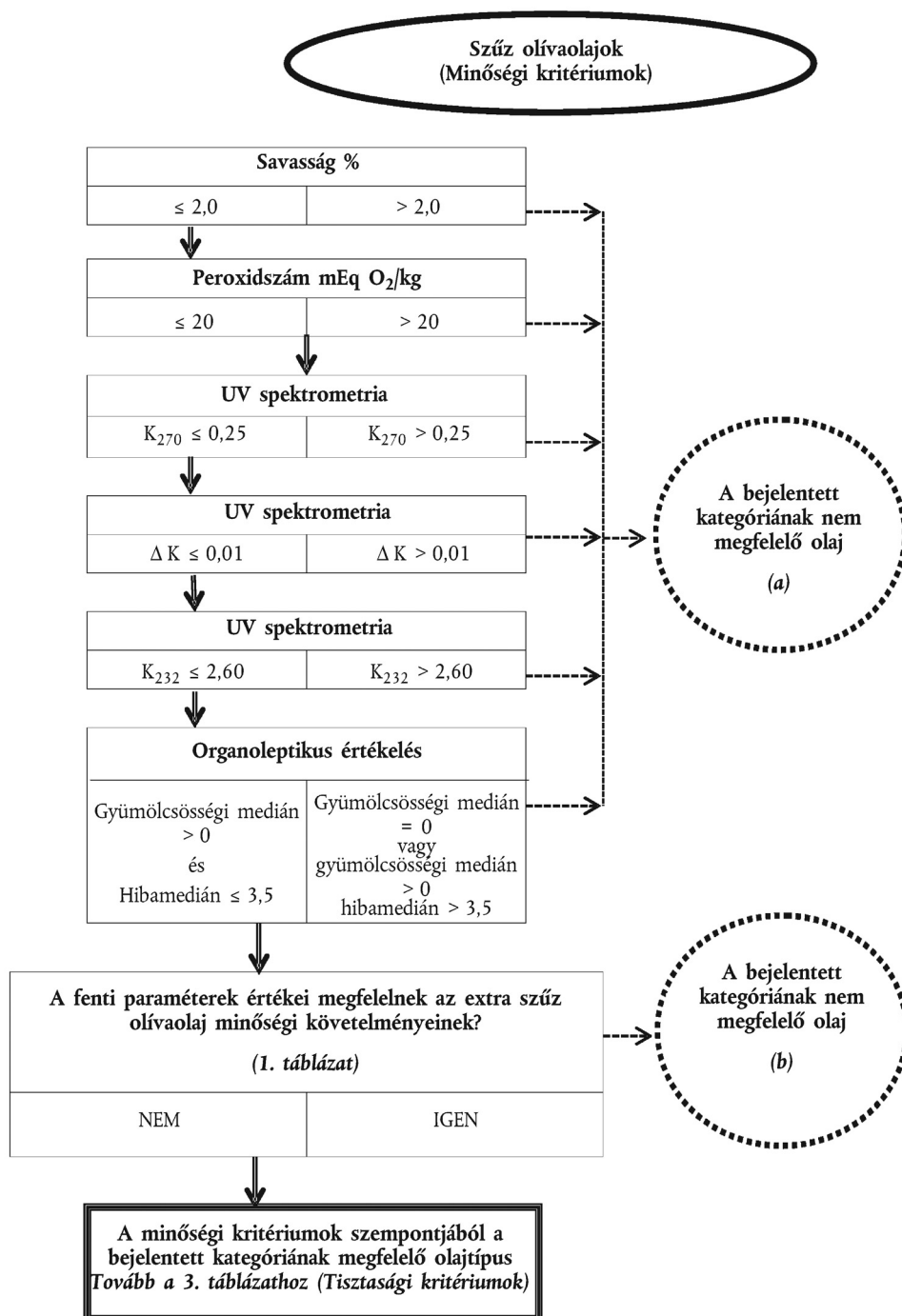
DÖNTÉSI FA ANNAK ELLENŐRZÉSÉRE, HOGY EGY OLÍVAOLAJ-MINTA MEGFELEL-E A BEJELENTETT KATEGÓRIÁNAK

1. táblázat



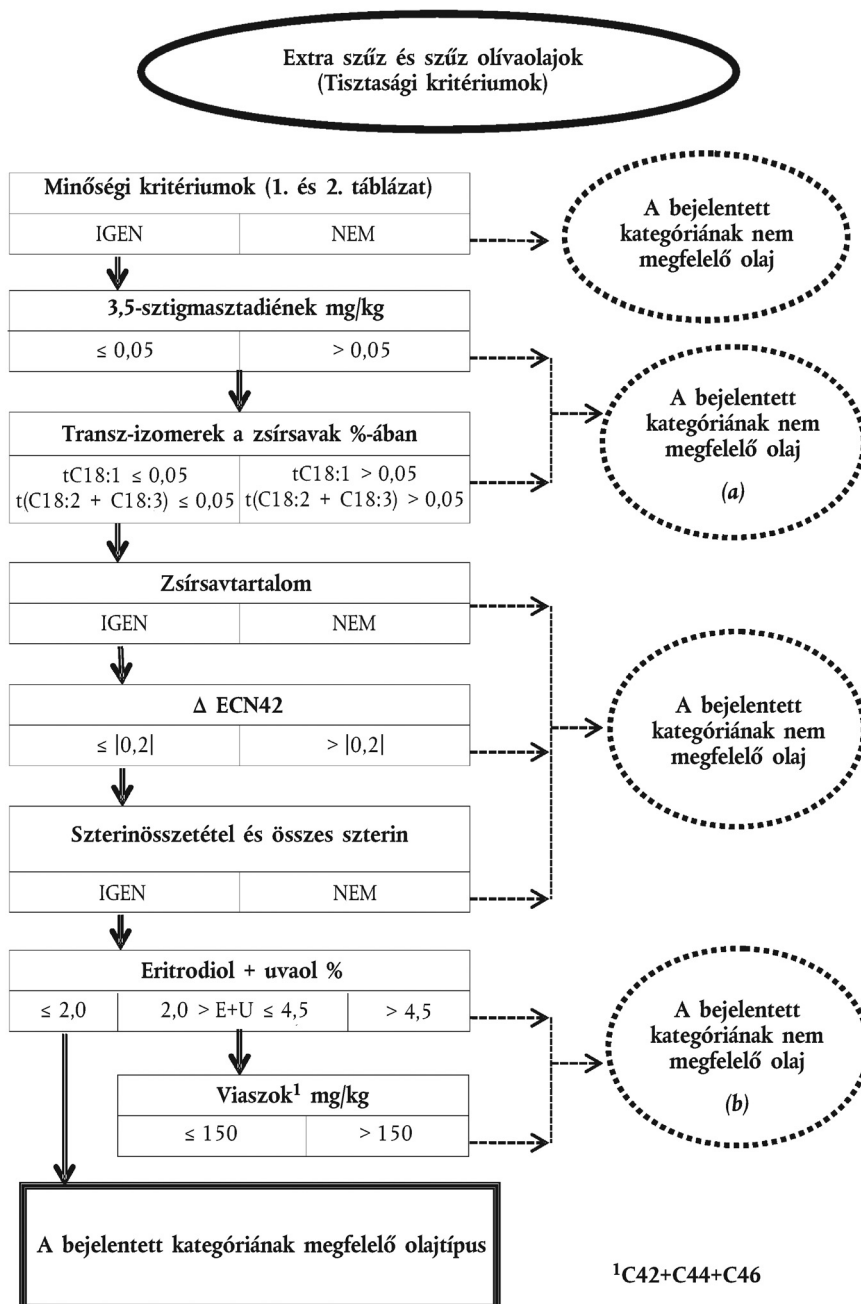
▼ M26

2. táblázat



▼ **M26**

3. táblázat



▼ **M26**

1. függelék

Ekvivalenciátáblázat e rendelet mellékletei és a döntési fában meghatározott elemzések között

— Savasság	II. melléklet	A szabad zsírsavak meghatározása hideg-injektálós módszerrel
— Peroxidszám	III. melléklet	A peroxidszám meghatározása
— UV spektrometria	IX. melléklet	Spektrofotometriás vizsgálat
— Organoleptikus értékelés	XII. melléklet	A szűz olívaolaj organoleptikus értékelése
— Etil-észterek	XX. melléklet	A viasz-, valamint a zsírsav-metilészter- és a zsírsavak-etilészter-tartalom kapilláris gázkromatográfiával történő meghatározásának módszere
— 3,5-sztigmasztadiének	XVII. melléklet	A növényi olajok sztigmasztadién-összetételének meghatározása
▼ M28		
— Zsírsavak transz-izomerjei	X. melléklet	Zsírsav-metilészterek gázkromatográfiás meghatározása
— Zsírsavtartalom	X. melléklet	Zsírsav-metilészterek gázkromatográfiás meghatározása
▼ M26		
— ΔECN42	XVIII. melléklet	Az ECN42 trigliceridek összetételének meghatározása (a HPLC-adatok és az elméleti összetétel közötti különbség)
— Szterinösszetétel és -összmenyiség	V. melléklet	A szterinek és triterpén-alkoholok összetételének és mennyiségének meghatározása kapillárisoszlop-gázkromatográfiával
— Eritrodiol és uvaol		
— Viaszok	IV. melléklet	A viasztartalom meghatározása kapilláris-gázkromatográfiával
▼ M28		
— Alifás és triterpénes alkoholok	XIX. melléklet	Az alifás és a triterpénes alkoholtartalom meghatározása kapilláris gázkromatográfiával
▼ M26		
— A 2-es pozícióban található telített zsírsavak	VII. melléklet	A 2-gliceril-monopalmitát százalékának meghatározása

▼ **M29***II. MELLÉKLET***A SZABAD ZSÍRSAVAK MEGHATÁROZÁSA HIDEG INJEKTÁLÁSOS MÓDSZERREL****1. TÁRGY ÉS ALKALMAZÁSI TERÜLET**

A módszer az olívaolajok és az olívaogácsa-olajok szabadzsírsav-tartalmának meghatározását ismerteti. A szabadzsírsav-tartalmat az olajsav aránya alapján kiszámított savasságként adják meg.

2. ALAPELV

A mintát feloldják oldószerek keverékében és a jelen lévő szabad zsírsavakat kálium- vagy nátrium-hidroxid oldattal titrálják.

3. REAGENSEK

Minden esetben elismert analitikai minőségű reagenseket és desztillált vagy hasonló minőségű vizet kell használni.

3.1. Dietil-éter; 95 % etanol (v/v), azonos térfogategységű keveréke.

Semlegesítse pontosan a felhasználás pillanatában kálium-hidroxid oldattal (3.2.), 100 ml keverékenként 0,3 ml fenoltalein oldat (3.3.) hozzáadásával.

1. megjegyzés: a dietil-éter kiemelten tűzveszélyes és robbanásveszélyes peroxidokat képezhet. Használata során különleges óvatosságra van szükség.

2. megjegyzés: amennyiben nincs mód dietil-éter használatára, etanolt és toluolt tartalmazó oldószerkeverék használható. Szükség esetén az etanol propanol-2-vel helyettesíthető.

3.2. Kálium- vagy nátrium-hidroxid, titrált etanos vagy vizes oldat, c(KOH) [vagy c(NaOH)], megközelítőleg 0,1 mol/l vagy szükség esetén c(KOH) [vagy c(NaOH)], megközelítőleg 0,5 mol/l. Oldószerek kereskedelmi forgalomban kaphatók.

A kálium-hidroxid (vagy nátrium-hidroxid) oldatának pontos koncentrációját ismerni és ellenőrizni kell a felhasználás előtt. Használjon a felhasználás előtt legalább öt nappal korábban készült, barna üvegben tárolt és gumidugóval lezárt oldatot. Az oldatnak színtelennek vagy szalmaszínűnek kell lennie.

Amennyiben a kálium-hidroxid (vagy nátrium-hidroxid) vizes oldatának használata során fázisváltás észlelhető, a vizes oldatot cserélje etanos oldatra.

3. megjegyzés: a kálium-hidroxid (vagy nátrium-hidroxid) stabil színtelen oldatát a következő módon lehet elkészíteni. Forraljon fel 1 000 ml etanolt vagy vizet 8 g kálium-hidroxiddal (vagy nátrium-hidroxiddal) és 0,5 g alumíniumreszeléssel és folytassa a forralást egy órán keresztül. Közvetlenül ezután desztillálja. A desztillátumban oldjon fel szükséges mennyiségű kálium-hidroxidot (vagy nátrium-hidroxidot). Hagyja néhány napig állni, majd öntse le az átlátszó felülúszó folyadékot a leülepedett kálium-karbonátról (vagy nátrium-karbonátról).

Az oldat desztillálás nélkül is elkészíthető a következő módon: 1 000 ml etanolhoz (vagy vízhez) adjon 4 ml alumínium-butilátot és hagyja állni a keveréket néhány napig. Öntse le a felülúszó folyadékot és oldja fel a kívánt mennyiségű kálium-hidroxidot (vagy nátrium-hidroxidot). Az oldat használatra készen áll.

▼ M29

3.3. Fenolftalein 10 g/l oldata 95–96 % (v/v) etanolban vagy alkálilikék 6B vagy timolftalein 20 g/l oldata 95–96 % (v/v) etanolban. Az erősen színezett olajok esetén alkálilikék vagy timolftalein használandó.

4. **BERENDEZÉS**

Szokványos laboratóriumi berendezés, beleértve a következőket:

4.1. analitikai mérleg;

4.2. 250 ml-es Erlenmeyer-lombik;

4.3. „A” osztályú, 10 ml-es buretta 0,05 ml-es beosztással, vagy egyenértékű automata buretta.

5. **ELJÁRÁS**

5.1. **A vizsgálati minta előkészítése**

Ha a minta zavaros, át kell szűrni.

5.2. **Vizsgált mennyiség**

A mintavételezést a várható savasságnak megfelelően végezze, a következő táblázat szerint:

Várható savasság (olajsav g/100 g)	Minta tömege (g)	Mérési pontosság (g)
0–2	10	0,02
> 2–7,5	2,5	0,01
> 7,5	0,5	0,001

Mérje meg a mintát az Erlenmeyer-lombikban (4.2.).

5.3. **Meghatározás**

Oldja fel a mintát (5.2.) dietil-éter és etanol (3.1.) 50–100 ml korábban semlegesített keverékében.

Keverés közben végezzen titrálást 0,1 mol/l kálium-hidroxid (vagy nátrium-hidroxid) oldattal (3.2) (lásd a 4. megjegyzést), amíg az indikátor változni kezd (az indikátor elszíneződése legalább 10 másodpercig nem múlik el).

4. *megjegyzés:* amennyiben a szükséges 0,1 mol/l kálium-hidroxid (vagy nátrium-hidroxid) oldat mennyisége meghaladja a 10 ml-t, használjon 0,5 mol/l oldatot, vagy változtassa meg a mintatömeget a várható szabad savasság és a táblázatban javasolt érték szerint.

5. *megjegyzés:* amennyiben az oldat titrálás közben zavarossá válik, adjon hozzá megfelelő mennyiségű oldószert (3.1.), hogy tiszta oldatot kapjon.

Végezzen második meghatározást, ha az első eredmény magasabb, mint az olaj kategóriája esetében megadott határérték.

▼ M29

6. AZ EREDMÉNYEK KIFEJEZÉSE

Az olajsav tömegszázalékában kifejezett savasság a következő:

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

ahol:

V = a felhasznált titrált kálium-hidroxid (vagy nátrium-hidroxid) oldat térfogata ml-ben;

c = a felhasznált titrált kálium-hidroxid (vagy nátrium-hidroxid) oldat pontos koncentrációja mol/l-ben;

M = 282 g/mol; az olajsav moláris tömege g/mol-ban;

m = a minta tömege grammban.

Az olajsavban kifejezett savasság megadása a következőképpen történik:

a) a 0–1 értékek esetén két tizedesjegy pontossággal;

b) az 1–100 értékek esetén egy tizedesjegy pontossággal.

▼B*III. MELLÉKLET***A PEROXIDSZÁM MEGHATÁROZÁSA**

1. CÉL

Ez az előírás olajok és zsírok peroxidszámának meghatározását írja le.

2. ALKALMAZÁSITERÜLET

Az előírás állati és növényi eredetű olajokra és zsírokra alkalmazható.

3. MEGHATÁROZÁS

A peroxidszám a mintában található azon anyagok mennyisége aktív oxigén/kg milliekvivalensben kifejezve, amelyek kálium-jodidot oxidálnak a megadott üzemi körülmények között.

4. ALAPELV

A vizsgált mennyiség ecetsavas és kloroformos oldatának kezelése kálium-jodid oldattal. A felszabadított jód titrálása standardizált nátrium-tioszulfát oldattal.

5. BERENDEZÉS

Minden felhasznált berendezésnek redukáló- vagy oxidálóanyagoktól mentesnek kell lennie.

Megjegyzés: Ne zsírozza be a csiszolt felületeket.

5.1. 3 ml-es üvegkanál.

5.2. Megközelítőleg 250 ml térfogatú lombikok csiszolt nyakkal és dugókkal, előzetesen kiszárítva és tiszta, száraz inert gázzal (nitrogénnel vagy lehetőleg széndioxiddal) feltöltve.

5.3. 25 vagy 50 ml-es buretta 0,1 ml-es beosztással.

6. REAGENSEK

6.1. Analitikai reagens minőségű kloroform, amelyet mentesítettek az oxigéntől a rajta átbuborékolatott tiszta, száraz inert gázárammal.

6.2. Analitikai reagens minőségű jégacet, amelyet mentesítettek az oxigéntől a rajta átbuborékolatott tiszta, száraz inert gázárammal.

6.3. Kálium-jodid frissen készített, jód-tól és jódsavaktól mentes, telített vizes oldata.

6.4. Nátrium-tioszulfát 0,01 vagy 0,002 mol/l pontosan standardizált vizes oldata, közvetlenül a felhasználás előtt standardizálva.

6.5. Keményítőoldat, 10 g/l vizes diszperzió, frissen készítve természetes oldható keményítőtől.

7. MINTA

Figyeljen, Hogy a minta vételezése és tárolása fénytől védve történjen, és hidegben, teljesen megtöltött üvegedényekben, csiszolt üveg vagy parafadugóval lezárva legyen tárolva.

▼B

8. ELJÁRÁS

A tesztet szórt nappali fény vagy mesterséges megvilágítás mellett kell végezni. A minta tömegét mérje meg üvegkanálban (5.1.) vagy ennek hiányában lombikban (5.2.) a legközelebbi 0,001 g-ra kerekítve, a várt peroxidszámnak megfelelően a következő táblázat szerint:

Várható peroxidszám (meq)	A vizsgált mennyiség súlya (g)
0–12	5,0–2,0
12–20	2,0–1,2
20–30	1,2–0,8
30–50	0,8–0,5
50–90	0,5–0,3

Vegye le a lombik (5.2.) dugóját és tegye bele a vizsgált mennyiséget tartalmazó üvegkanalat. Adjon hozzá 10 ml kloroformot (6.1.). Keveréssel oldja fel gyorsan a vizsgált mennyiséget. Adjon hozzá 15 ml ecetsavat (6.2.), majd 1 ml kálium-jodid oldatot (6.3.). Tegye rá gyorsan a dugót, rázza egy percen keresztül, majd hagyja állni pontosan öt percig fénytől védve, 15–25 °C hőmérsékleten.

Adjon hozzá megközelítőleg 75 ml desztillált vizet. Titrálja a felszabadított jódot a nátrium-tioszulfát oldattal (6.4.) (0,002 Mol/l oldat a várhatóan 12-nél alacsonyabb peroxidszám esetén és 0,01 Mol/l a várhatóan 12-nél magasabb peroxidszám esetén), miközben erőteljesen rázza, indikátorként keményítőoldatot (6.5.) használva.

Egy tesztminta esetén végezzen két meghatározást.

Ezzel egyidejűleg végezzen ellenőrző tesztet. Amennyiben az ellenőrző teszt eredménye meghaladja a 0,05 ml 0,01 mol/l nátrium-tioszulfát (6.4.) értéket, cserélje ki az elszennyeződött reagenseket.

9. AZ EREDMÉNYEK KIFEJEZÉSE

A peroxidszám (PV) aktív oxigén/kg milliekvivalensben kifejezve a következő képlettel határozható meg:

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

ahol:

V = a teszthez felhasznált standardizált nátrium-tioszulfát oldat (6.4.) ml-jeinek száma, az ellenőrző teszt figyelembevételével korrigálva;

T = a felhasznált nátrium-tioszulfát oldat (6.4.) pontos moláris koncentrációja;

m = a vizsgált adag súlya g-ban;

Eredményként a két elvégzett meghatározás számtani közepét kell venni.

▼ **M21***IV. MELLÉKLET***A VIASZTARTALOM MEGHATÁROZÁSA KAPILLÁRIS GÁZKROMATOGRÁFIÁVAL****1. CÉL**

Ez a módszer az olívaolajok viasztartalmának meghatározására szolgáló eljárást írja le. A viaszok leválasztása a szénatomok száma alapján történik. A módszer alkalmas a sajtolással és az extrakcióval kinyert olívaolajok (olívamaradék-olajok) megkülönböztetésére.

2. ALAPELV

A zsírszerű anyag oszlopkromatográfias elválasztása, a megfelelő belső standard hozzáadásával, hidratáltzilicagél-oszlopon; a tesztkörülmények között elsőként eluálódott (a trigliceridekénél kisebb polaritású) frakció leválasztása, majd kapilláris gázkromatográfia segítségével történő analízise.

3. BERENDEZÉS

3.1. 25 ml-es térfogatú Erlenmeyer-lombik.

3.2. 15,0 mm belső átmérőjű, 30–40 cm hosszú kromatográfias üvegoszlop csappal.

3.3. Gázkromatográf kapilláris oszloppal történő használatra, a következőkből álló, közvetlenül az oszlopra történő injektálásra alkalmas rendszerrel felszerelve:

3.3.1. Termosztatikus kamra az oszlopok számára (oszlopkemence), hőmérséklet-programozott fűtéssel.

3.3.2. Közvetlenül az oszlopra vezetett, hideg befecskendező rendszer.

3.3.3. Láng-ionizációs detektor és konverter erősítő.

3.3.4. Regisztráló-integrátor berendezés a konverter erősítővel (3.3.3.) történő használatra, amelynek a válaszideje nem haladja meg az egy másodpercet, és változtatható papírsebességű. (Lehetséges olyan informatizált rendszerek használata is, amelyek alkalmasak a gázkromatográfiai adatok számítógépes feldolgozására.)

3.3.5. Üvegből vagy ömlesztett szilícium-dioxidból készült 8–12 mm hosszúságú, 0,25–0,32 mm belső átmérőjű kapilláris oszlop, belülről egyenletesen 0,10–0,30 µm rétegvastagságú folyadékfázissal borítva. (a folyadékfázis a célnak megfelelő, kereskedelmi forgalomban SE–52 vagy SE–54 jelzésű lehet.)

3.4. 10 µl térfogatú mikrofecskendő közvetlenül az oszlopra történő injektáláshoz, keményített tűvel.

3.5. Vibráló elektromos keverő.

3.6. Forgó párologtató.

3.7. Görgős kemence.

3.8. Analitikai mérleg, + 0,1 mg-os mérési pontossággal.

3.9. Szokványos laboratóriumi üvegeszközök.

4. REAGENSEK

4.1. 60 és 200 µm közötti szemcsenagyságú szilikagél.

A szilikagélt 500 °C-on legalább négy órán keresztül melegíteni kell a kemencében. A kihűlést követően a felhasznált szilikagél-mennyiséghez képest 2 % vizet kell hozzáadni. Keverje át a keveréket megfelelő módon, amíg egyenletes masszát kap. Felhasználás előtt legalább 12 órán keresztül tartsa sötét helyiségben.

▼ **M21**

- 4.2. n-hexán, kromatográfiai minőségű.
- 4.3. Etil-éter, kromatográfiai minőségű.
- 4.4. n-heptán, kromatográfiai minőségű.
- 4.5. Hexános lauril-arachidát standardoldat, 0,1 % (m/V) oldat (belső standard). (Palmitil palmitát vagy mirisztil sztearát is megfelel.)
- 4.5.1. *Szudán 1 (1-fenilazo-2-naftol).*
- 4.6. Vivőgáz: hidrogén és hélium, gázkromatográfiai felhasználáshoz megfelelő tisztaságú.
- 4.7. Segédgázok:
- hidrogén, gázkromatográfiai felhasználáshoz megfelelő tisztaságú,
 - levegő, gázkromatográfiai felhasználáshoz megfelelő tisztaságú.

5. ELJÁRÁS

5.1. **A kromatográfias oszlop előkészítése**

Szuszpendáljon 15 g szilikagélt (4.1.) az n-hexánban (4.2.), és töltsze az oszlopba (3.2.). A teljes ülepedés után elektromos rázóberendezéssel (3.5.) tömörítse, hogy homogénebb kromatográfias réteget kapjon. 30 ml n-hexánnal mossa át az oszlopot, az esetleges szennyeződések eltávolítása érdekében. Mérjen le pontosan a mérleggel (3.8.) 500 mg-ot a mintából a 25 ml térfogatú Erlenmeyer-lombikba (3.1.), majd adja hozzá a megfelelő mennyiségű belső standardot (4.5.), a feltételezett viasztartalomnak megfelelően. Például olívaolaj esetében 0,1 mg lauril-arachidát oldatot, olívmaradék-olaj esetében 0,25–0,5 mg lauril-arachidát oldatot adjon hozzá. Az ily módon előkészített mintát 2 x 2 ml n-hexán segítségével vigye fel a kromatográfias oszlopra (4.2.).

Hagyja lefutni az oldatot 1 mm-rel az abszorbens felszíne fölé, majd további 70 ml n-hexánnal mossa át az oszlopot, a természetes jelen lévő n-alkánok eltávolítása érdekében. Kezdje el a kromatográfias eluálást, és gyűjtsön össze 180 ml 99:1 arányú n-hexán-etil-éter elegyet úgy, hogy 10 másodpercenként megközelítőleg 15 csepp folyjon át. A minta eluálását 22 + 4 °C -os szobahőmérsékleten kell elvégezni.

Megjegyzések: — A 99:1 arányú n-hexán/etil-éter keveréket minden nap frissen kell elkészíteni.

- A viaszok megfelelő eluálódásának vizuális ellenőrzése érdekében a mintaoldathoz hozzáadhat 100 µl szudánt, az eluáló elegy 1 %-a arányában. Mivel a színezőanyag retenciós ideje a viaszok és a trigliceridek között helyezkedik el, amikor a színezék eléri a kromatográfias oszlop alját, függeszse fel az eluálást, ekkorra ugyanis valamennyi viasz eluálódott.

Az így kapott frakciót a rotációs bepárlóban (3.6.) párolja szárazra, amíg az oldószer gyakorlatilag teljesen eltűnik belőle. Az oldószer utolsó 2 ml-ét gyenge nitrogénárammal távolítsa el; majd adjon hozzá 2–4 ml n-heptánt.

5.2. **Gázkromatográfias elemzés**5.2.1. *Előzetes műveletek*

A kapilláris oszlopot illessze be a gázkromatográfba (3.3) úgy, hogy az oszlop bemenetét az oszlopra szerelt („on-column”) rendszerhez, az oszlop kimenetét pedig a detektorhoz csatlakoztassa. Végezze el a gázkromatográfiai rendszer összeszerelésének általános ellenőrzését (gázszerelvények szorossága, a detektor hatékonysága, a regisztráló rendszer hatékonysága stb.).

▼ **M21**

Az első alkalommal használt kapilláris oszlopokat kondicionálni kell. Fúvasson át egy kevés vivőgázt a kapilláris oszlopon, majd kapcsolja be a gázkromatográfiás berendezést. Melegítse fokozatosan addig, amíg körülbelül 4 óra elteltével eléri a 350 °C hőmérsékletet. Ezt a hőmérsékletet tartsa legalább két órán keresztül, majd hozza a berendezést üzemi körülmények közé (gázáram szabályozása, bontóláng begyújtása, csatlakoztatás az elektronikus íróhoz (3.3.4.), a kapilláris oszlop kemencéje, a detektor hőmérsékletének beállítása stb.) és állítsa be a jelet az analízis során tervezett legmagasabb szintnél legalább kétszer nagyobb érzékenységre. Az alapvonalnak lineárisnak kell lennie, illetve mindennemű csúcstól és ingadozástól mentesnek.

A negatív egyenes vonalú drift az oszlop illesztékeinek tökéletlen tömítettségét, míg a pozitív drift az oszlop nem megfelelő kondicionálását jelzi.

5.2.2. *Az üzemi körülmények megválasztása*

Általában véve az irányadó üzemi körülmények a következők:

— oszlophőmérséklet:

	20 °C/ perc		5 °C/ perc		20 °C/ perc	
kiindulási hőmér- séklet: 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10')

— a detektor hőmérséklete: 350 °C,

— a befecskendezett anyag mennyisége: 1 µl az n-heptánoldatból (2–4 ml),

— vivőgáz: hélium vagy hidrogén, a kiválasztott gáz számára optimális lineáris sebességgel (lásd a függelékét),

— a berendezés érzékenysége: az alábbi körülményeknek megfelelően:

A fenti feltételek az oszlop és a gázkromatográf jellemzőinek megfelelően módosíthatók, hogy a kapott kromatogramok lehetővé tegyék valamennyi viasz leválasztását, a csúcsok kielégítő felbontásban láthatók legyenek (lásd az ábrát), miközben a C₃₂ belső standard retenciós ideje 18 ± 3 perc. A viaszok legrepresentatívabb csúcsa a teljes skálaérték minimum 60 %-a legyen.

A csúcsok integrálásához a paramétereket úgy kell beállítani, hogy az lehetővé tegye az érintett csúcsok területeinek pontos becslését.

Megjegyzés: Tekintettel a magas véghőmérsékletre, pozitív drift előfordulása elfogadható, amely azonban nem haladhatja meg a teljes skálaérték 10 %-át.

5.3. **Az elemzés végrehajtása**

A 10 µl térfogatú mikrofecskendő segítségével szívjon fel 1 µl oldatot; a mikrofecskendő dugattyúját felfelé mozgatva ürítse ki a tűt. A tűt vezesse be a befecskendező berendezés válaszfalán, majd egy-két másodperc elmúltával fecskendezze be gyorsan az oldatot, és öt másodperc múlva lassan húzza ki a tűt.

Addig folytassa a rögzítést, ameddig a viaszok teljesen eluálódtak.

▼ M21

Az alapvonalnak minden esetben meg kell felelnie az előírt feltételeknek.

5.4. A csúcsok azonosítása

Az egyes csúcsok azonosítását a retenciós idő alapján és az azonos körülmények között analizált, ismert retenciós idejű viaszkeverékekkel összehasonlítva végezze.

A szűz olívaolajban található viaszok kromatogramja az ábrán látható.

5.5. Mennyiségi értékelés

A belső standard és a nyílt szénláncú C₄₀–C₄₆ észterek csúcsainak területét elektronikus integrálással számítsa ki.

Az egyes észterek mg/kg zsírszerű anyagban kifejezett viasztartalmát a következő képlet segítségével lehet kiszámítani:

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

ahol:

A_x = az egyes észterek csúcsának területe négyzetmilliméterben;

A_s = a belső standard csúcsának területe négyzetmilliméterben;

m_s = a hozzáadott belső standard tömege milligrammban;

m = a meghatározni kívánt minta tömege grammal.

6. AZ EREDMÉNYEK KIFEJEZÉSE

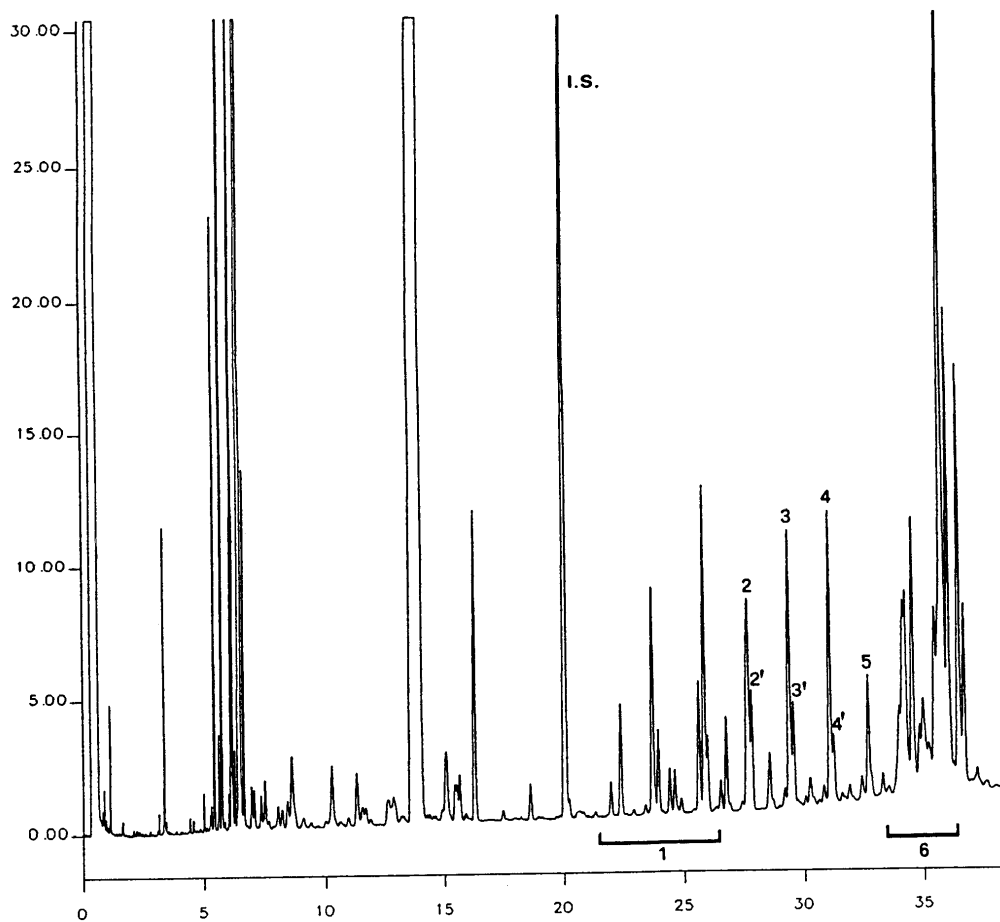
Jegyezze fel a különböző C₄₀–C₄₆ viasztartalmak összegét mg/kg zsírszerű anyagban megadva (ppm).

Megjegyzés: A meghatározandó összetevők a C₄₀-es és a C₄₆-os észterek közötti tartományban lévő páros szénatomok csúcsainak felelnek meg, az alábbi ábrán látható olívaolajviasz-kromatogram példájának megfelelően. Ha a C₄₆-os észter duplán jelenik meg, az azonosítás érdekében tanácsos elvégezni egy olyan olívamadarék-olaj viaszfrakcióinak az analízisét, amelyen a C₄₆-os csúcs könnyen felismerhető, mivel tisztán kiemelkedik.

Az eredményeket egy tizedesjegy pontosságig kell megadni.

▼ M21

Ábra

Egy olívaolaj viasztartalmainak kromatogramja ⁽¹⁾

Jelmagyarázat::

- I.S. = Lauril-arachidát
 1. = Diterpén észterek
 2 + 2' = C₄₀ -es észterek
 3 + 3' = C₄₂ -es észterek
 4 + 4' = C₄₄ -es észterek C₄₄
 5. = C₄₆ -os észterek
 6. = Szerinészterek és triterpénes alkohol.

⁽¹⁾ A szerinészterek eluálódása után a kromatográfias vonalon nem mutatkoznak jelentős csúcsok (trigliceridek).

▼ M21*Függelék***A gáz lineáris sebességének meghatározása**

Fecskendezzen be 1–3 μ metánt (vagy propánt) a normál üzemi körülményekre beállított gázkromatográfba. Stopperóra segítségével mérje meg a metán vagy propán oszlopon történő átáramlásának idejét, a befecskendezés pillanatától a csúcs eluálásának pillanatáig (t_M).

A lineáris sebességet – cm/s-ben – az L/t_M összefüggés adja meg, ahol L az oszlop hosszúsága cm-ben, t_M pedig a stopperórával mért idő másodpercben.

▼ **M26***V. MELLÉKLET***A SZTERINEK ÉS TRITERPÉN-ALKOHOLOK ÖSSZETÉTELÉNEK ÉS MENNYISÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSA KAPILLÁRISOSZLOP-GÁZKROMATOGRÁFIÁVAL**

1. CÉL
Ez a módszer az olívaolajok és olívaogácsa-olajok egyes és összes szterin- és a triterpén-alkohol-tartalmának meghatározására szolgáló eljárást írja le.
2. ALAPELV
Az olajat, amelyhez belső standardként α -kolesztanolt adnak, etanolos kálium-hidroxid oldattal elszappanosítják, majd az el nem szappanosítható anyagot dietil-éterrel kivonják.

A szterin- és triterpén-alkohol-frakciót vékonyréteg kromatográfiás módszerrel, bázisos szilikagél lemezen elválasztják az el nem szappanosítható anyagtól. A szilikagélből visszanyert szterineket trimetilszilil-éterre alakítják és kapillárisoszlop-gázkromatográfia alkalmazásával elemzik.
3. BERENDEZÉS
Hagyományos laboratóriumi felszerelés különös tekintettel a következőkre:
 - 3.1. 250 ml térfogatú lombik visszafolyós hűtővel és csiszolatos üveg csatlakozásokkal.
 - 3.2. 500 ml térfogatú választótölcsér.
 - 3.3. 250 ml térfogatú lombikok.
 - 3.4. Komplet elemzőberendezés vékonyréteg kromatográfiához, 20 × 20 nagyságú üveg tárgylemezekkel.
 - 3.5. 254 vagy 366 nm hullámhosszúságú ultraibolya lámpa.
 - 3.6. 100 μ l és 500 μ l térfogatú mikrofecskendő.
 - 3.7. Hengeres szűrőtölcsér G 3 porózus válaszfállal (15–40 μ m porozitás), megközelítőleg 2 cm átmérőjű és megközelítőleg 5 cm magas, vákuum alatti szűrésre alkalmas, csiszolt üveg apacsatlakozóval.
 - 3.8. 50 ml térfogatú vákuum Erlenmeyer lombik csiszolatos üveg anyacsatlakozóval a szűrőtölcsérral (3.7. pont) való használathoz.
 - 3.9. 10 ml térfogatú kúpos fenekű kémcső, csiszolatos üveg dugóval.
 - 3.10. Gázkromatográf split injektoros kapilláris oszloppal történő használatra, a következőkből felszerelve:
 - 3.10.1. termosztatikus kamra az oszlopok számára (oszlopkemence) a kívánt hőmérséklet ± 1 °C pontosságon belüli tartásához;
 - 3.10.2. Szabályozható hőmérsékletű injektáló egység perszilán borítású üveges gőzölögtető berendezéssel és split rendszerrel;
 - 3.10.3. lángionizációs detektor (FID);
 - 3.10.4. regisztráló-integrátor berendezés a lángionizációs detektorral (3.10.3. pont) történő használatra, mely alkalmas manuális integrációra.
 - 3.11. Ömlesztett szilícium-dioxidból készült, 20–30 m hosszúságú, 0,25–0,32 mm belső átmérőjű, egyenletes 0,10–0,30 μ m vastagságú, 5 % difenil- és 95 % dimetil-polisziloxán összetételű bevonattal ellátott (SE-52 vagy SE-54 állófázis vagy annak megfelelő) kapilláris oszlop.

▼ **M26**

- 3.12. 10 µl térfogatú mikrofecskendő gázkromatográfiához, split injektáláshoz alkalmas cementált tüvel.
- 3.13. Kalcium-klorid szárítóberendezés
4. REAGENSEK
- 4.1. Kálium-hidroxid (minimum 85 %-os koncentrációjú).
- 4.2. Kálium-hidroxid, megközelítőleg 2 N etanos oldat.
130 g kálium-hidroxid (4.1. pont) hűtés közben feloldva 200 ml desztillált vízben, majd etanollal feltöltve egy liter mennyiségűre (4.10. pont). Az oldatot jól lezárt, sötét színű üvegben kell tárolni, legfeljebb két napig.
- 4.3. Analízishez megfelelő tisztaságú dietil-éter.
- 4.4. Kálium-hidroxid, megközelítőleg 0,2 N etanos oldat.
13 g kálium-hidroxid (4.1. pont) feloldva 20 ml desztillált vízben, majd etanollal feltöltve egy liter mennyiségűre (4.10. pont).
- 4.5. Analízishez megfelelő tisztaságú vízmentes nátrium-szulfát.
- 4.6. Szilikagél bevonatú, 0,25 mm vastagságú üveg tárgylemezek (20 × 20 cm), fluoreszcencia indikátor nélkül (kereskedelmi fogalomban használatra készen kapható).
- 4.7. Toluol, kromatográfiás minőség.
- 4.8. Aceton, kromatográfiás minőség.
- 4.9. n-hexán, kromatográfiás minőség.
- 4.10. Dietil-éter, kromatográfiás minőség.
- 4.11. Analízishez megfelelő tisztaságú etanol.
- 4.12. Analízishez megfelelő tisztaságú etil-acetát.
- 4.13. Referenciaoldat a vékonyréteg-kromatográfiához: koleszterin vagy fitoszterinek és eritrodiol 5 %-os oldata etil-acetátban (4.11. pont).
- 4.14. 2,7-diklórfloreszcein 0,2 %-os oldata etanolban. Enyhén meglúgosítva néhány csepp 2 N alkoholos kálium-hidroxid oldat hozzáadásával (4.2. pont).
- 4.15. Vízmentes piridin, kromatográfiás minőség (lásd 5. megjegyzés).
- 4.16. Analízishez megfelelő tisztaságú hexametildiszilazán.
- 4.17. Analízishez megfelelő tisztaságú trimetilklórszilán.
- 4.18. Szterin-trimetilszilil-éterek referenciaadatai.
A felhasználáskor kell előállítani az azokat tartalmazó olajokból származó szterinekből és eritrodiolból.
- 4.19. α-kolesztanol, 99 % feletti tisztaságú (a tisztaságot GC elemzéssel kell ellenőrizni).
- 4.20. α-kolesztanol, 0,2 % (m/V) oldata etil-acetátban (belső standard).(4.11. pont).
- 4.21. Fenoltaleinoldat, 10 g/l etanolban (4.10. pont).
- 4.22. Vivőgáz: hidrogén vagy hélium, gázkromatográfiai felhasználáshoz megfelelő tisztaságú.
- 4.23. Segédgázok: hidrogén, hélium, nitrogén és levegő, gázkromatográfiai felhasználáshoz megfelelő tisztaságú.

▼ **M26**

- 4.24. n-hexán (4.9. pont)/etil-éter (4.10. pont) 65:35 (V/V) arányú keveréke.
- 4.25. Szililező reagens piridin/hexametil-diszilazán/trimetilklórszilán 9:3:1 (V/V/V) arányú keverékéből.

5. **ELJÁRÁS**

- 5.1. El nem szappanosítható anyag készítése.

- 5.1.1. Egy 500 µl mikrofecskendő (3.6. pont) segítségével tegyen a 250 ml-es lombikba (3.1. pont) olyan mennyiségű 0,2 %-os α-kolesztanol kloroformos oldatot (4.20. pont), amelyben a kolesztanol mennyisége az analízishez vett minta szterintartalmának megközelítőleg 10 %-a. Például 5 g mintához adjon 500 µl 0,2 %-os α-kolesztanol oldatot (4.20. pont), ha olívaolajat analizál, és 1 500 µl-t, ha olívaolajcsalaját analizál. Enyhe nitrogénáramban való párologtatással, meleg vízfürdőben, szárítsa ki, majd a lombik lehűtése után mérjen pontosan $5 \pm 0,01$ g-ot a száraz, szűrt mintából ugyanabba a lombikba.

1. megjegyzés: Az észlelhető mennyiségű koleszterint tartalmazó állati vagy növényi olajok és zsírok esetében olyan csúcsok jelennek meg, amelyek retenciós ideje közel van a kolesztanoléhoz. Ennek előfordulása esetén a szterinfrakciót kétszer kell elemezni, egyszer belső standard nélkül, egyszer pedig belső standarddal.

- 5.1.2. Adjon hozzá 50 ml 2 N etanos kálium-hidroxid oldatot (4.2. pont) és néhány forrkövet, csatlakoztassa a visszafolyós hűtőt, és vízfürdőben fokozatosan hevítse forrásig, amíg a szappanképződés meg nem indul (az oldat tisztává válik). Folytassa a melegítést további 20 percen keresztül, majd adjon hozzá 50 ml desztillált vizet a kondenzátor tetején keresztül, ezután szerelje le a kondenzátort, és hűtse le a lombikot megközelítőleg 30 °C-ra.

- 5.1.3. A lombik tartalmát töltsse át egy 500 ml térfogatú választótölcsérbe (3.2. pont) több rész desztillált vízzel (50 ml) történő öblítés mellett. Adjon hozzá megközelítőleg 80 ml dietil-étert (4.10. pont) és körülbelül 60 másodpercen keresztül rázza erőteljesen; a nyomás kiengedésehez időszakosan fordítsa át a választótölcsért és nyissa meg az elzáráscsapot. Hagyja állni, míg a két fázis teljesen szét nem válik (2. megjegyzés).

Válassza le a szappanos oldatot amennyire csak lehetséges, és gyűjtse össze egy másik választótölcsérbe. Végezzen két további kivonást a vizes-alkoholos fázison hasonló módon, esetenként 60–70 ml etil-éter felhasználásával (4.10. pont).

2. megjegyzés: Az emulziók megszüntethetők hozzáadott kis mennyiségű etilalkohol segítségével (4.11. pont).

- 5.1.4. A három éterkivonatot keverje össze egy közös választótölcsérben 50 ml vízzel. Folytassa az átmosást vízzel (50 ml-enként), amíg a mosóvíz már nem válik rózsaszínűvé egy csepp fenolftaleinoldat hozzáadására (4.21. pont).

A mosóvíz eltávolítását követően, szűrje át vízmentes nátrium-szulfáton (4.5. pont) egy 250 ml térfogatú lombikba, amelynek súlyát előzőleg lemérte, a tölcsért és a szűrőt mossa ki több adagban, kis mennyiségű dietil-éterrel (4.10. pont).

- 5.1.5. Desztillációval párologtassa el az oldószert egy rotációs bepárlóban, 30 °C-on, vákuumban. Adjon hozzá 5 ml acetont és az illékony oldószert teljesen távolítsa el enyhe légáramban. Kemencében 103 ± 2 °C-on hőmérsékleten szárítsa a maradékot 15 percen keresztül. Exsikkátorban hagyja kihűlni, és mérje meg a súlyát 0,1 mg pontossággal.

▼ **M26**

- 5.2. A szterin- és triterpén-alkohol-frakciók (eritriol + uvaol) elkülönítése
- 5.2.1. A bázisos vékonyréteg kromatográfiás lemezek előkészítése. Merítse be a szilikagél lapokat (4.6. pont) teljesen 0,2 N etanos kálium-hidroxid oldatba (4.5. pont) 10 másodpercre, majd hagyja őket vegyifülke alatt száradni két óráig, végül helyezze őket 100 °C hőmérsékletű kemencébe egy órára.

Vegye ki a lapokat a kemencéből, és felhasználásig tegye őket kalcium-kloridot tartalmazó exsikkátorba (3.13. pont) (az így kezelt lapokat 15 napon belül fel kell használni).

3. *megjegyzés:* Amennyiben bázikus szilikagél lapokat használ a szterinfrakció leválasztásához, akkor nincsen szükség az el nem szappanosítható anyagok timfölddel történő kezelésére. Ebből az következik, hogy minden savas jellegű komponens (zsírsavak és egyéb savak) visszamarad a startvonalon, és a szterinek sávja egyértelműen elválik a nyílt szénláncú alkohol- és a triterpénalkohol-sávoktól.

- 5.2.2. Hexán/etil-éter elegyét (4.24. pont) (4. megjegyzés) vezesse be egy futtatókádba megközelítőleg 1 cm mélységben. Zárja le a kádat, és hagyja hűvös helyen megközelítőleg fél órán keresztül, hogy beálljon az egyensúly a gőz és a folyadék között. Futtatószerbe mártott szűrőpapírcsíkok erősíthetők a kád belső felületére. Ezzel megközelítőleg egyharmadával csökkenthető a futtatási idő, és egyenletesebb lesz az összetevők eluálódása.

4. *megjegyzés:* A futtatóelegyet minden vizsgálathoz ki kell cserélni, hogy tökéletesen reprodukálható futtatási körülményeket biztosítson; az előbbi helyett használhatja n-hexán/etil-éter 50:50 térfogatarányú (v/v) oldatát is.

- 5.2.3. Készítsen az el nem szappanosítható anyagból (5.1.5. pont) megközelítőleg 5 %-os etil-acetátos oldatot (4.12. pont), és a 100 µl térfogatú mikrofecskendő segítségével ebből az oldatból 0,3 ml-t vigyen fel egyenletes és vékony csíkokban egy kromatográfiás lap (5.2.1. pont) alsó részére (2 cm-re a szélétől). A szterin- és triterpén-alkoholsáv futtatás utáni azonosítására a csíkokhoz igazodva vigyen fel 2–3 µl referenciaoldatot (4.13. pont).

- 5.2.4. A lemezt helyezze az 5.2.2. pont szerint előkészített futtatókádba. A környezeti hőmérsékletet 15–20 °C között kell tartani (5. megjegyzés). A kádat azonnal fedéllel zárja, le és a mintát hagyja eluálódni, ameddig az oldószerfront el nem éri a lemez felső szélétől számított 1 cm távolságot. Ekkor vegye ki a lemezt a futtatókádból, és melegelevegő-áram segítségével vagy rövid időre elszívófülkébe helyezve párologtassa el az oldószert.

5. *megjegyzés:* Magasabb hőmérséklet hatására romlik az elválasztás hatásfoka.

- 5.2.5. Kismértékben és egyenletesen permetezze be a lemezt 2,7–diklórflooreszcein oldattal (4.14. pont), és hagyja megszáradni. Mikor ultrabolya fényben nézi a lapot, a szterin- és triterpén-alkoholsávokat a referenciaoldat foltjaival történő összehasonlítás alapján lehet felismerni (4.13. pont). A fluoreszkáló terület mentén jelölje be a sávok határait fekete ceruzával (lásd VRK-lemezek 3. ábra).

- 5.2.6. A kijelölt területen található szilikagélt kaparja le egy fém spatulával. Az eltávolított és apróra zúzott anyagot tegye egy szűrőtölcsérbe (3.7. pont). Adjon hozzá 10 ml forró etil-acetátot (4.12. pont), és alaposan keverje össze fém spatula segítségével, majd vákuumban szűrje le, a szűrletet gyűjtse össze a szűrőtölcsérhez csatlakoztatott Erlenmeyer lombikban (3.8. pont).

▼ **M26**

A lombikban maradó anyagot mossa ki háromszor dietil-éterrel (4.3. pont) (minden alkalommal megközelítőleg 10 ml-rel), a szüredéket gyűjtse ugyanabba a tölsérhez csatlakoztatott lombikba. Párolja be a szüredéket megközelítőleg 4–5 ml térfogatúra, és a maradék oldatot töltsse egy 10 ml térfogatú kémcsőbe (3.9. pont), amelynek súlyát előzőleg lemérte; a kémcsövet gyenge nitrogénáramban, kismértékű melegítéssel párolja be, majd oldja be ismét pár csepp acetonban (4.8. pont) és bepárlással ismét szárítsa ki.

A kémcsőben maradt anyag a szterin- és triterpén-alkoholfrakció.

5.3. Trimetilszilil-éterek készítése.

- 5.3.1. Töltse a szterin- és triterpén-alkohol-frakciót tartalmazó kémcsőbe a szililező reagenst (4.25. pont) (6. megjegyzés), a szterinek és triterpén-alkoholok minden milligrammjához 50 µl-nyi mennyiségben úgy, hogy az közben ne vegyen fel nedvességet (7. megjegyzés).

6. megjegyzés: A használatra kész oldatok kereskedelmi forgalomban kaphatók. Egyéb szililező reagensek, mint például bisz-trimetilszilil-trifluoroacetamid + 1 % trimetil-klórszilazán, amelyet azonos térfogatú vízmentes piridinnel kell hígítani, szintén kaphatók.

A piridin helyettesíthető azonos mennyiségű acetonitrillel.

- 5.3.2. Dugózza le a kémcsövet, és óvatosan (felfordítás nélkül) rázza addig, amíg az összetevők teljesen feloldódnak. Ezután hagyja legalább 15 percig szobahőmérsékleten állni, majd ezt követően centrifugálja néhány percre. A tiszta oldat gázkromatográfiai vizsgálatra kész.

7. megjegyzés: Kismértékű opálosság kialakulása, ami normális jelenség, nem okoz problémát. A fehér csomók kialakulása vagy a rózsaszín elszíneződés megjelenése a nedvesség jelenlétét, illetve a reagens elhasználódását jelzik. Ebben az esetben a tesztet meg kell ismételni (kizárólag, ha hexametildiszilazán/trimetilklorzilán elegyet használ).

5.4. Gázkromatográfiai elemzés.

5.4.1. Előzetes műveletek és az oszlop tömitése.

- 5.4.1.1. A kapilláris oszlopot (3.11. pont) illessze be a gázkromatográfba úgy, hogy az oszlop bemenetét csatlakoztassa a split injektorhoz, az oszlop kimenetét pedig a detektorhoz.

Végezze el a gázkromatográfiai berendezés általános ellenőrzését (gáz-szerelvények szivárgása, a detektor határfoka, a hasítórendszer és a felvevő rendszer határfoka stb.).

- 5.4.1.2. Amennyiben első alkalommal használja az oszlopot, célszerű azt kondicionálni. Fúvasson át egy kevés vivőgázt a kapilláris oszlopon, majd kapcsolja be a gázkromatográfiai berendezést, és kezdje el fokozatosan melegíteni addig, amíg a hőmérséklet legalább 20 °C-kal meghaladja az üzemi hőmérsékletet (8. megjegyzés). Ezt a hőmérsékletet tartsa legalább két órán keresztül, majd helyezze az egész berendezést üzemi körülmények közé (gázáramok és a split-folyamat szabályozása, bontóláng begyújtása, csatlakoztatás az elektronikus íróhoz, az oszlop szabályozása, a detektor és az injektor hőmérséklete stb.), és rögzítse a jelet az analízis során tervezett legmagasabb szintnél legalább kétszer nagyobb érzékenységgel. Az alapvonalnak lineárisnak kell lennie, illetve mindennemű csúcstól és ingadozástól mentesnek.

▼ **M26**

A negatív egyenes vonalú drift az oszlop csatlakozásainak tökéletlen tömítettségét jelzi, míg a pozitív drift az oszlop nem megfelelő kondicionálását jelzi.

8. *megjegyzés:* A kondicionálás hőmérsékletének legalább 20 °C-kal alacsonyabbnak kell lennie, mint az alkalmazott állófázis esetén várható maximális hőmérséklet.

5.4.2. Az üzemi körülmények megválasztása.

5.4.2.1. Az irányadó üzemi körülmények a következők:

- oszlophőmérséklet: 260 ± 5 °C;
- az injektor hőmérséklete: 280–300 °C;
- a detektor hőmérséklete: 280–300 °C;
- a vivőgáz lineáris sebessége: hélium 20–35 cm/s, hidrogén 30–50 cm/s;
- bontási tényező: 1:50–1:100;
- a berendezés érzékenysége: a minimális elnyelés 4–16-szorosa;
- a rögzítés érzékenysége: 1–2 mV teljes méréstartomány;
- a befecskendezett anyag mennyisége: 0,5–1 µl TMSE oldat.

A fenti feltételek az oszlop és a gázkromatográf jellemzőinek megfelelően módosíthatók, hogy a kapott kromatogramok megfeleljenek a következő feltételeknek:

- a β-szitoszterin-csúcs retenciós idejének 20 ± 5 percnek kell lennie;
- a kampeszterin-csúcsnak olívaolaj esetén (átlagos tartalom 3 %) a teljes skála 20 ± 5 %-ának, szójaolaj esetén (átlagos tartalom 20 %) a teljes skála 80 ± 10 %-ának kell lennie;
- minden jelenlévő szterint szét kell választani. A szétválasztáson túl minden csúcsot teljesen fel kell bontani, azaz a csúcs vonalának a következő csúcs kezdete előtt vissza kell térnie az alapvonalhoz. Azonban a nem teljes felbontás elfogadható abban az esetben, ha a TRR 1,02-nél (szitosztanol) lévő csúcs a függőleges segítségével kiszámítható.

5.4.3. Az elemzési eljárás.

5.4.3.1. A 10 µl térfogatú mikrofecskendő segítségével szívjon fel 1 µl hexánt majd 0,5 µl levegőt, ezt követően pedig 0,5–1 µl mintaoldatot. A mikrofecskendő dugattyúját felfelé mozgatva ürítse ki a tűt. A tűt vezesse be a befecskendező berendezés válaszfalán, majd 1–2 másodperc elmúltával fecskendezze be gyorsan az oldatot, és kb. 5 másodperc múlva lassan húzza ki a tűt.

Automatikus injektor is alkalmazható.

5.4.3.2. Folytassa a rögzítést, ameddig a jelenlévő triterpén-alkoholok TMSE keveréke teljesen eluálódott. Az alapvonalnak továbbra is meg kell felelnie az előírásoknak (5.4.1.2.).

5.4.4. A csúcsok azonosítása

Az egyes csúcsok azonosítását a retenciós idő alapján és az azonos körülmények között analizált szterin és triterpén-alkoholok TMSE keverékkel összehasonlítva végezze (lásd Függelék).

▼ M26

A szterinek a következő sorrendben eluálódnak: koleszterin, brasszi-kaszterin, ergoszterin, 24-metilén-koleszterin, kampeszterin, kampesz-tanol, sztigmaszterin, Δ 7-kampeszterin, Δ 5,23-sztigmasztadienol, kleroszterin, β -sziztoszterin, sziztosztanol, Δ 5-avenaszterin, Δ 5,24-sztigmasztadienol, Δ 7-sztigmasztenol, Δ 7-avenaszterin, eritrodiol és uvaol.

Az SE-52 és SE-54 oszlopok β -sziztoszterinjének retenciós ideje az 1. táblázatban látható.

Az 1. ábrán és a 2. ábrán néhány olaj jellegzetes kromatogramja látható.

5.4.5. Mennyiségi értékelés.

5.4.5.1. Az α -kolesztanol és a szterin és triterpén-alkoholok csúcsainak területét az integrátor segítségével számítsa ki. Ne vegye figyelembe az 1. táblázat felsorolásában nem szereplő vegyületektől származó csúcsokat (az ergoszterint nem kell figyelembe venni). Az α -kolesztanol reakció együtthatójának értékét vegye 1-nek.

5.4.5.2. Az egyes szterinek mg/kg zsírszerű anyagban megadott koncentrációját a következő módon lehet kiszámítani:

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

ahol:

A_x = az x szterin csúcsának területe a rendszer által használt mértékegységben;

A_s = az α -kolesztanol csúcsának területe a rendszer által használt mértékegységben;

m_s = a hozzáadott α -kolesztanol tömege milligrammban;

m = a meghatározni kívánt minta tömege grammban.

6. AZ EREDMÉNYEK KIFEJEZÉSE

6.1. Jegyezze fel az egyes szterinek mg/kg zsírszerű anyagban megadott mennyiségét, illetve összegüket az „összes szterin” mennyiségeként.

Az egyes szterinek és az eritrodiol és uvaol összetételét egy tizedes pontosságig kell megadni.

Az összes szterin összetételét tizedes nélkül kell megadni.

▼ M28

6.2. Az egyes szterinek koncentrációját a vonatkozó csúcs területének és az összes szterincsúcs területének hányadosából határozza meg:

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

ahol:

A_x = x csúcsának területe;

$\sum A$ = az összes szterincsúcs alatti terület.

▼ M26

6.3. Látható β -sziztoszterin: Δ 5-23-sztigmasztadienol + kleroszterin + β -sziztoszterin + sziztosztanol + Δ 5-avenaszterin + Δ 5-24-sztigmasztadienol.

▼M26

- 6.4. Számítsa ki az eritrodiol- és uvaol-százalékot:

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

Ahol:

ΣA = a szterin összterülete a rendszer által használt mértékegységben;

Er = az eritrodiol területe a rendszer által használt mértékegységben;

Uv = az uvaol területe a rendszer által használt mértékegységben;

▼ **M26***Függelék***A gáz lineáris sebességének meghatározása**

Fecskendezzen 1–3 µl metánt vagy propánt a normál üzemelési körülményekre beállított gázkromatográfba, és mérje meg a metán vagy propán oszlopon történő áramlásának idejét a befecskendezés pillanatától a csúcs megjelenésének pillanatáig (tM).

A cm/s-ben megadott lineáris sebesség az L/tM kifejezésből adódik, ahol az L oszlop hossza centiméterben, a tM pedig a stopperórával mért idő másodpercben.

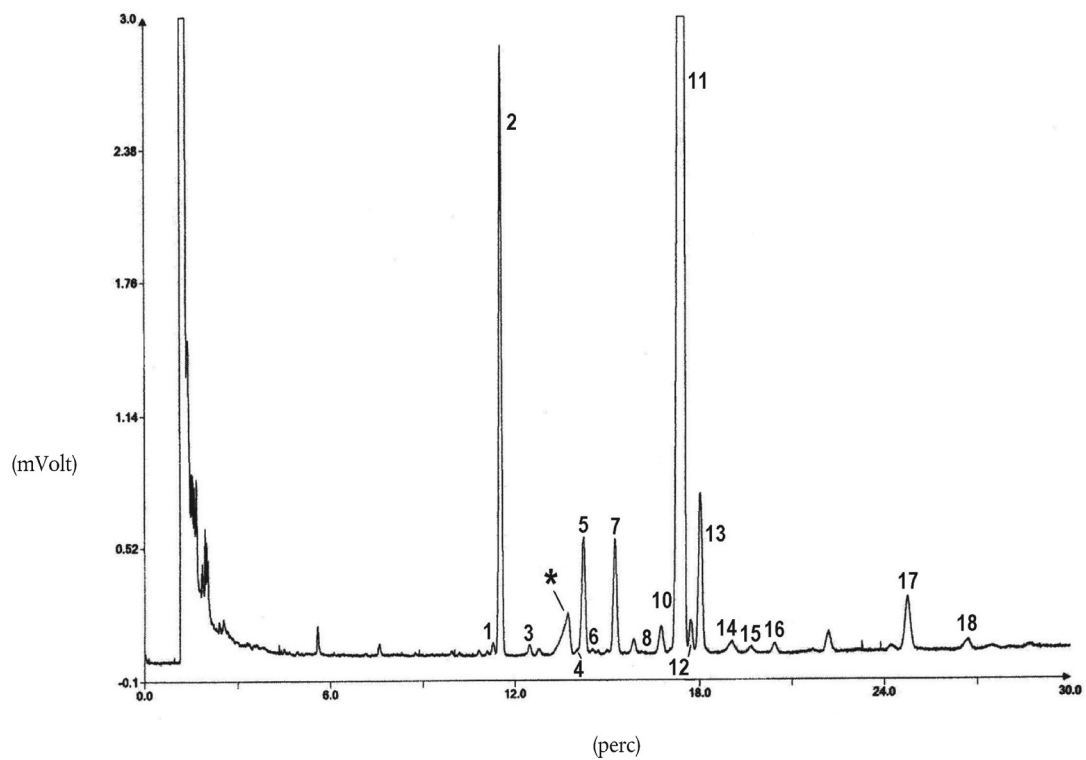
*1. táblázat***A szterinek relatív retenciósi ideje**

Csúcs	Megnevezés		Relatív retenciósi idő	
			SE 54 oszlop	SE 52 oszlop
1	Koleszterin	Δ -5-kolesztén-3 β -ol	0,67	0,63
2	Kolesztanol	5 α -kolesztán-3 β -ol	0,68	0,64
3	Brasszikaszterin	[24S]-24-metil- Δ -5,22-kolesztadién-3 β -ol	0,73	0,71
*	Ergoszterin	[24S]-24-metil- Δ 5,7,22-kolesztatrién-3 β -ol	0,78	0,76
4	24-metilén-koleszterin	24-metilén- Δ -5,24-kolesztadién-3 β -ol	0,82	0,80
5	Kampeszterin	(24R)-24-metil- Δ -5-kolesztén-3 β -ol	0,83	0,81
6	Kampesztanol	(24R)-24-metil-kolesztán-3 β -ol	0,85	0,82
7	Sztigmaszterin	(24S)-24-etil- Δ -5,22-kolesztadién-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ -7-kampeszterin	(24R)-24-metil- Δ -7-kolesztén-3 β -ol	0,93	0,92
9	Δ -5,23-sztigmasztadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,23-kolesztadién-3 β -ol	0,95	0,95
10	Kleroszterin	(24S)-24-etil- Δ -5,25-kolesztadién-3 β -ol	0,96	0,96
11	β -szitoszterin	(24R)-24-etil- Δ -5-kolesztén-3 β -ol	1,00	1,00
12	Szitosztanol	24-etil-kolesztán-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ -5-avenaszterin	(24Z)-24-etilidén- Δ -5-kolesztén-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5,24-sztigmasztadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,24-kolesztadién-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ -7-sztigmaszterin	(24R,S)-24-etil- Δ -7-kolesztén-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-avenaszterin	(24Z)-24-etilidén- Δ -7-kolesztén-3 β -ol	1,16	1,16
17	Eritrodiol	5 α -oleán-12-én-3 β 28-diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ 12-urszén-3 β 28-diol	1,52	1,52

▼ M26

1. ábra

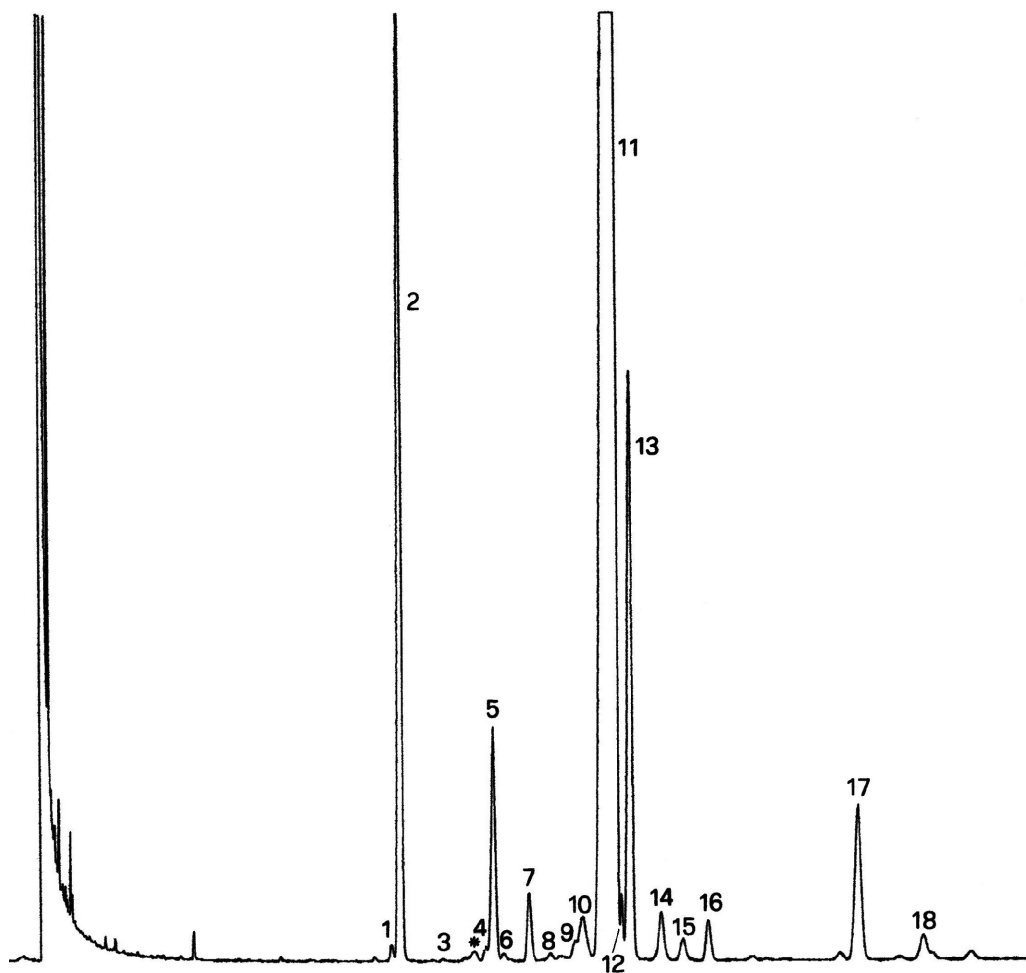
Lampante olívaolaj szterin- és triterpén-alkohol-frakciójának gázkromatogramja (belső standardokkal)



▼ M26

2. ábra

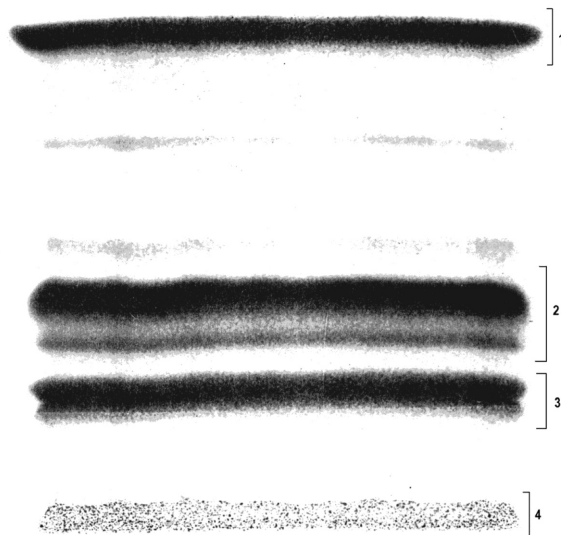
Egy finomított olívaolaj szterin- és triterpén-alkohol-frakciójának gázkromatogramja (belső standardokkal)



▼ **M26**

3. ábra

Olívapogácsa-olaj VRK-lemeze azzal a területtel, amit le kell kaparni a szterinek és triterpén-alkoholok meghatározásához



- 1 – Szkvalén
- 2 – Triterpén- és alifás alkoholok
- 3 – Szterinek és triterpén-alkoholok
- 4 – Start és szabad zsírsavak

▼ **M21***VII. MELLÉKLET***A 2-GLICERIL MONOPALMITÁT SZÁZALÉKÁNAK MEGHATÁROZÁSA****1. CÉL ÉS ALKALMAZÁSI TERÜLET**

Ez a módszer a palmitinsav-tartalom meghatározásának analitikus eljárását írja le a trigliceridek 2-pozícióján, a 2-gliceril monopalmitát százaléknak értékelésének segítségével.

A módszer a szobahőmérsékletű (20 °C), folyékony növényi olajokra alkalmazható.

2. ALAPELV

Az előkészítés után az olajminta reakcióba lép a pankreatin-lipázzal: a triglicerid molekula 1- és 3-pozícióján végbemenő részleges és specifikus hidrolízis nyomán elválasztódnak a 2-pozícióban lévő monogliceridek. A monoglicerid-frakción belül a 2-gliceril monopalmitát százalékát – a szilileződés után – kapilláris gázkromatográfia segítségével határozzuk meg.

3. BERENDEZÉS ÉS LABORATÓRIUMI ESZKÖZÖK

- 3.1. 25 ml térfogatú Erlenmeyer-lombik
- 3.2. 100, 250 és 300 ml térfogatú főzőpoharak
- 3.3. 21–23 mm belső átmérőjű, 400 mm hosszú kromatográfias üvegoszlop összesütött üveglemezzel a csapnál
- 3.4. 10, 50, 100 és 200 ml térfogatú kalibrált kémcsövek
- 3.5. 100 és 250 ml térfogatú gömbölyű fenekű lombik
- 3.6. Forgó párologtató
- 3.7. 10 ml térfogatú, kúpos aljú centrifugakémcső csiszolt üvegdugóval
- 3.8. Laboratóriumi centrifuga 10 és 100 ml térfogatú kémcsövekkel
- 3.9. A hőmérsékletet 40 °C + 0,5 °C-on tartó termosztát
- 3.10. 1 és 2 ml térfogatú mérőpipetták
- 3.11. 1 ml-es fecskendő
- 3.12. 100 µl-es mikrofecskendő
- 3.13. 1 000 ml-es tölcsér
- 3.14. Gázkromatográf kapilláris oszloppal, az alábbiakból álló, közvetlenül az oszlopra történő injektálásra alkalmas „on column” rendszerrel, valamint a kiválasztott hőmérsékletet 1 °C pontossággal tartó kemencével felszerelve
- 3.15. Közvetlenül az oszlopba vezetett, „on column” hideg befecskendező rendszer
- 3.16. Lángionizációs detektor és elektrométer
- 3.17. Regisztráló-integrátor berendezés az elektrométerrel történő használatra, amelynek a válaszüzeje nem haladja meg az egy másodpercet, és változtatható papírsebességű
- 3.18. Üvegből vagy ömlesztett szilícium-dioxidból készült, 8–12 méter hosszúságú, 0,25–0,32 mm belső átmérőjű, 5 % 0,10–0,30 µm rétegvastagságú metil-polisziloxánnal vagy fenil-metil-polisziloxánnal bélelt kapilláris oszlop, amely 370 °C-on használható

▼ M21

3.19. 10 µl-es, legalább 7,5 cm hosszú mikrofecskendő keményített tüvel, közvetlenül az oszlopra történő injektáláshoz.

4. REAGENSEK

4.1. 0,063 és 0,200 mm közötti szemcsenagyságú szilikagél (70/280 mesh), a következőképpen elkészítve: helyezze a szilikagélt egy porcelán csészébe, 160 °C-os kemencében szárítsa ki 4 órán keresztül, majd hagyja kihűlni szobahőmérsékleten egy szárítóban. Adjon hozzá a szilikagél súlya 5 %-ának megfelelő vízmennyiséget a következőképpen: egy 500 ml térfogatú Erlenmeyer-lombikban mérjen le 152 g szilikagélt, adjon hozzá 8 g desztillált vizet, dugaszolja be, majd óvatosan rázza fel, hogy a víz egyenletesen oszljon el. Felhasználás előtt hagyja állni legalább 12 óráig.

4.2. n-hexán (kromatográfiai minőségű)

4.3. Izopropanol

4.4. Izopropanol, vízzel 1/1 (V/V)

4.5. Pankreatin lipáz. A felhasznált lipáznak 2,0 és 10 lipáz egység/mg lipáztevékenységet kell mutatnia (Kereskedelmi forgalomban is kaphatók 2 és 10 lipáz egység/enzim mg lipáztevékenységet mutató pankreatin lipázok.)

4.6. Tris-hidroximetilaminometán-pufferoldat: 1 M vizes oldatát állítsa be pH 8 értékűre koncentrált HCl (sósav) (1/1 V/V) hozzáadásával (ellenőrizze potenciométerrel)

4.7. Nátrim-kolát (enzim minőségű), 0,1 %-os vizes oldat (ezt az oldatot az elkészítését követő 2 héten belül fel kell használni)

4.8. Kalcium-klorid, 22 %-os vizes oldat

4.9. Dietil-éter kromatográfiahoz

4.10. Kifejlesztőoldat: n-hexán/dietil-éter keverék (87/13) (V/V)

4.11. Nátrium-hidroxid, (súlyra) 12 %-os oldat

4.12. Fenoltalein, 1 %-os etanol oldat

4.13. Vivőgáz: hidrogén vagy hélium, gázkromatográfiai felhasználáshoz megfelelő tisztaságú

4.14. Segédgázok: hidrogén, minimum 99 %-os, nedvességtől és szerves szennyeződésektől mentes, illetve levegő, szintén gázkromatográfiai felhasználáshoz megfelelő tisztaságú

4.15. Szilanizációs reagens: 9/3/1 (V/V/V) arányú piridin-hexametildiszilil-trimetilkloroszilán keverék. A használatra kész oldatok kereskedelmi forgalomban kaphatók; egyéb szilanizációs reagens is felhasználható, mint például N, 0-bis (trimetilszilil) trifluoroacetamid + 1 % trimetilkloroszilán azonos térfogatú víztelen piridinnel való keveréshez.

4.16. Referenciaminták: tiszta monogliceridek, vagy olyan monoglicerid-keverékek, amelyeknek ismert, a mintához hasonló százalékos összetételük van.

5. ELJÁRÁS**5.1. A minta előkészítése**

5.1.1. A 3 %-nál kisebb szabad savasságú olajokat nem szükséges semlegesíteni a szilikagéllal elvégzett oszlopkromatográfia előtt. A 3 %-nál nagyobb szabad savasságú olajokat az 5.1.1.1. pontnak megfelelően semlegesíteni kell.

▼ **M21**

5.1.1.1. Töltsön az 1 000 ml-es tölcsérbe (3.13.) 50 g olajat és 200 ml n-hexánt. Adjon hozzá 100 ml izopropanolt, és az olaj 5 %-kal megemelt szabad savasságának megfelelő mennyiségű 12 %-os nátrium-hidroxid oldatot (4.11.). Egy percen keresztül rázza erőteljesen. Adjon hozzá 100 ml desztillált vizet, majd rázza fel ismét, ezután hagyja leülepedni.

A leválasztást követően távolítsa el az alsó szappanréteget. Távolítsa el az esetleges többi réteget (nyálka, oldhatatlan anyag) is. Mossa át a semlegesített olaj hexánoldatát többször 50–60 ml 1/1 (V/V) izopropanol/víz oldatban (4.4.), amíg a fenolftalein rózsaszín árnyalata el nem tűnik.

A hexán nagyobbik részét távolítsa el vákuum alatt végzett bepárlással (használjon például forgó párologtatót), és töltsen át az olajat egy 100 ml-es gömbölyű lombikba (3.5.). Szárítsa ki az olajat vákuumban, amíg az oldószer teljesen el nem távozik.

Az eljárás végén az olaj savasságának 0,5 %-nál alacsonyabbnak kell lennie.

5.1.2. A fent leírtak szerint előkészített olajból 1,0 g-ot töltsön egy 25 ml térfogatú Erlenmeyer-lombikba (3.1.), és oldja fel 10 ml kifejlesztőoldatban (4.10.). Hagyja leülepedni az oldatot legalább 15 percen keresztül, a szilikagéllal végzett oszlop-kromatográfia előtt.

Ha az oldat zavaros, centrifugálja ki, a kromatográfiához szükséges optimális feltételeket teremtve. (Használatra kész, 500 mg-os SPE szilikagél hüvelyek is felhasználhatók a célra).

5.1.3. *A kromatográfiás oszlop előkészítése*

Öntsön az oszlopba (3.3.) megközelítőleg 30 ml kifejlesztőoldatot (4.10.), helyezzen az oszlop alsó felébe üvegrúd segítségével egy vattadarabot; nyomkodja meg, hogy a levegő távozzon belőle.

Egy főzőpohárban készítsen szuszpenziót, 25 g szilikagélt (4.1.) megközelítőleg 80 ml kifejlesztőoldatban feloldva, és egy tölcsér segítségével öntse az oszlopba.

Ellenőrizze, hogy az egész szilikagél be lett töltve az oszlopba; mossa át a kifejlesztőoldattal (4.10.), nyissa ki a csapot, és hagyja, hogy a folyadék szintje érjen fel megközelítőleg 2 mm-rel a szilikagél felső szintje fölé.

5.1.4. *Oszlopkromatográfia*

Egy 25 ml térfogatú Erlenmeyer-lombikban (3.1.) mérjen le pontosan 1,0 g, az 5.1. pontnak megfelelően előkészített mintát.

Oldja fel a mintát 10 ml kifejlesztőoldatban (4.10.). Az így kapott oldatot öntse az 5.1.3. pontnak megfelelően előkészített kromatográfiás oszlopba. Kerülje az oszlop felszínének mozgását.

Nyissa meg a csapot, és hagyja átfolyni a mintaoldatot, amíg az el nem éri a szilikagél szintjét. Fejlessze ki 150 ml kifejlesztőoldattal. Állítsa a térfogatáramot 2 ml/percre (úgy, hogy körülbelül 60–70 perc alatt 150 ml oldat folyjon át az oszlopba).

Az eluátumot fogja fel egy előzetesen lemért, 250 ml térfogatú gömbölyű lombikban. Vákuum alatt párologtassa el az oldószert, az utolsó nyomokat nitrogénáram segítségével távolítva el.

Mérje le a gömbölyű lombikot, és számítsa ki a kinyert kivonatot.

▼ M21

(Használatra kész SPE szilikagél hüvelyek használata esetén a következőképpen járjon el: Öntsön 1 ml oldatot (5.1.2.) az előzetesen 3 ml n-hexánnal előkészített hüvelyekbe.)

Az átmosás után fejlessze ki az oldatot 4 ml 9/1 (V/V) arányú n-hexán/dietil-éter keverékkel.

Fogja fel az eluátumot egy 10 ml térfogatú kémcsőben, és párologtassa el nitrogénáram segítségével a teljes kiszáradásig.

A kiszáritott maradékot tegye ki a pankreatin-lipáz hatásának (5.2.). Rendkívül fontos, hogy SPE hüvelyen való áthaladás előtt, illetve után egyaránt ellenőrizze a zsírsavösszetételt).

5.2. Hidrolízis pankreatin-lipázzal

5.2.1. Mérjen a centrifugakémcsőbe 0,1 g, az 5.1. pontnak megfelelően előkészített olajat. Adjon hozzá 2 ml pufferoldatot (4.6.), 0,5 ml nátrium-kolát-oldatot (4.7.) és 0,2 ml kalcium-klorid-oldatot; minden hozzáadás után alaposan rázza fel a keveréket. Zárja le a kémcsövet a csiszolt dugóval, majd tegye a $40 \pm 0,5$ °C hőmérsékleten tartott termosztátba (4.17.).

5.2.2. Adjon hozzá 20 mg lipázt, rázza fel alaposan (kerülje a dugó benedvesedését), majd tegye a kémcsövet a termosztátba pontosan 2 percre. Ezután vegye ki, rázza fel erőteljesen pontosan 1 percig, és hagyja kihűlni.

5.2.3. Adjon hozzá 1 ml dietil-étert, zárja le a dugóval és erőteljesen rázza fel, majd centrifugálás után az éteroldatot mikrofecskendő segítségével öntse át egy tiszta és száraz kémcsőbe.

5.3. A szilanizált származékok és a gázkromatográfia előkészítése

5.3.1. Egy mikrofecskendő segítségével töltsön 100 µl oldatot (5.2.3.) egy 10 ml térfogatú kúpos fenekű kémcsőbe.

5.3.2. Enyhe nitrogénárammal párologtassa el az oldószert, adjon hozzá 200 µl szilanizációs reagenst (4.15.), dugaszolja be a kémcsövet, és hagyja ülepedni 20 percig.

5.3.3. A 20 perc leteltével adjon hozzá 1–5 ml n-hexánt (a kromatográfiai körülmények függvényében): az így kapott oldat készen áll a gázkromatográfiai eljárásra.

5.4. Gázkromatográfia

Az üzemi körülmények a következők:

— az injektor hőmérséklete (oszlopra szerelt „on column” injektor): az oldószer forráspontjánál (68 °C) alacsonyabb,

— a detektor hőmérséklete: 350 °C,

— az oszlop hőmérséklete: a kemence hőmérsékletének programozása: 1 percig 60 °C, percenként 15 °C-kal emelve 180 °C-ig, majd percenként 5 °C-kal 340 °C-ig, majd 13 percig 340 °C,

— vivőgáz: hidrogén vagy hélium, az 1. ábrán tükröződő felbontáshoz szükséges lineáris sebességre beállítva. A C₅₄ triglicerid retenciósi idejének 40 ± 5 percnél kell lennie (lásd a 2. ábrát). (A fent leírt üzemi körülmények tájékoztató jellegűek. Minden esetben optimalizálni kell őket a kívánt felbontás elérése érdekében. A 2-gliceril monopalmitátnak megfelelő csúcs minimális magasságának a regisztráló berendezés skálája 10 %-ának kell lennie),

▼ M21

- a befecskendezett anyag mennyisége: 0,5–1 µl n-hexán oldat (5 ml) (5.3.3.).

5.4.1. *A csúcsok azonosítása*

Az egyes monogliceridek azonosítását a retenciós idők alapján, és az azonos körülmények között analizált standard monoglicerid-keverékek retenciós idejével összehasonlítva kell elvégezni.

5.4.2. *Mennyiségi értékelés*

Az egyes csúcsok területét elektronikus integrálással számítsa ki.

6. AZ EREDMÉNYEK KIFEJEZÉSE

A gliceril monopalmitát százalékat az ehhez tartozó csúcs területe, illetve az összes monoglicerid csúcsok területének összege közötti arány alapján számítsa ki (lásd a 2. ábrát), a következő képlet alapján: $\frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$ ahol:

A_x = a gliceril monopalmitáthoz tartozó csúcs területe

ΣA = az összes monogliceridcsúcs területének összege

Az eredményt egy tizedesjegy pontosságig kell megadni.

7. ANALÍZIS JEGYZŐKÖNYV

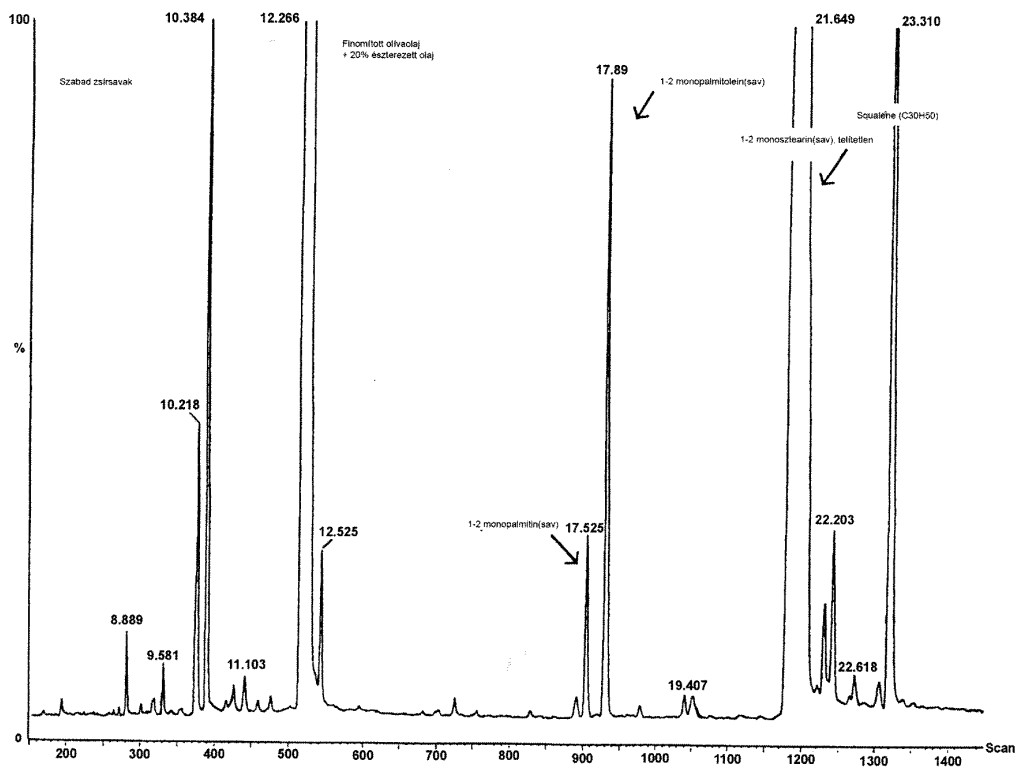
Az analízis jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

- a fenti módszerre való hivatkozás,
- a minta maradéktalan azonosításához szükséges mindenfajta információ,
- az analízis eredménye,
- a fenti módszertől, akár az érintett felek döntéséből, akár egyéb okból kifolyólag történő mindennemű eltérés,
- a laboratórium részletes azonosítása, az analízis időpontja és az analízisért felelős személyek aláírása.

▼ M21

1. ábra

A 20 % észterezett olajjal (100 %) kevert finomított olívaolajra kifejtett lipázhatás nyomán keletkezett szilanzációs reakciótermékek kromatogramja.



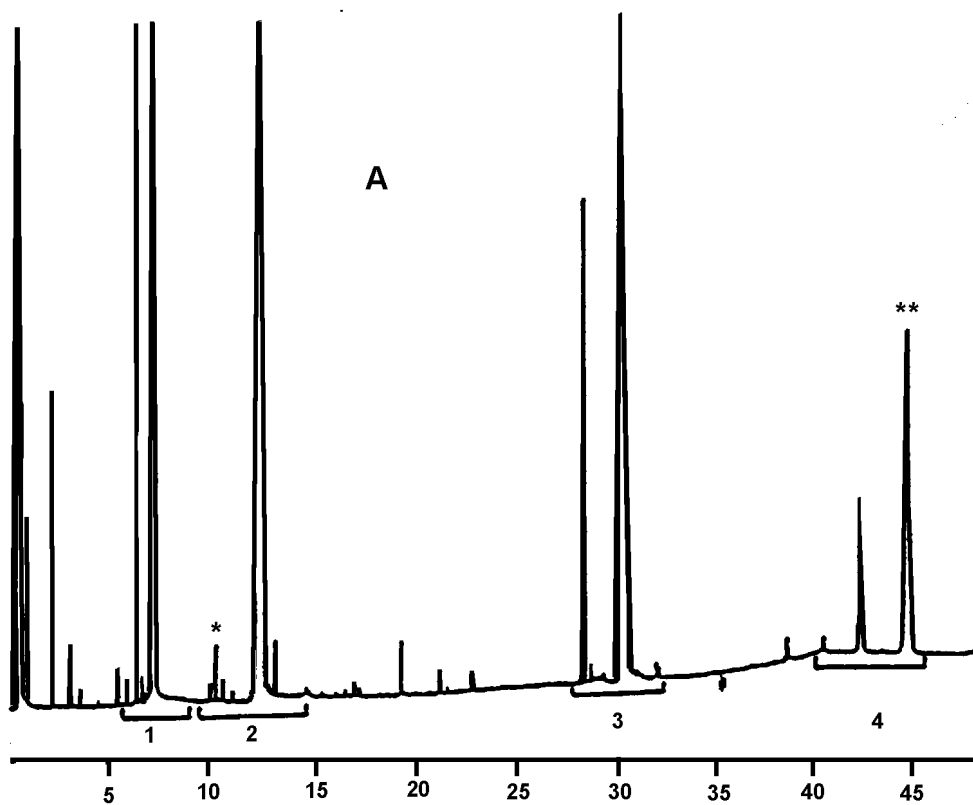
▼ M21

2. ábra

Kromatogram:

(A) nem észterezett olívaolaj, a lipázreakció után; a szilanizáció után; ilyen körülmények között (8–12 m-es kapilláris oszlop) a viaszfrakció a digliceridfrakcióval egy időben, vagy kevéssel utána eluálódik.

A lipázreakció után a triglicerid-tartalom nem haladhatja meg a 15 %-ot.



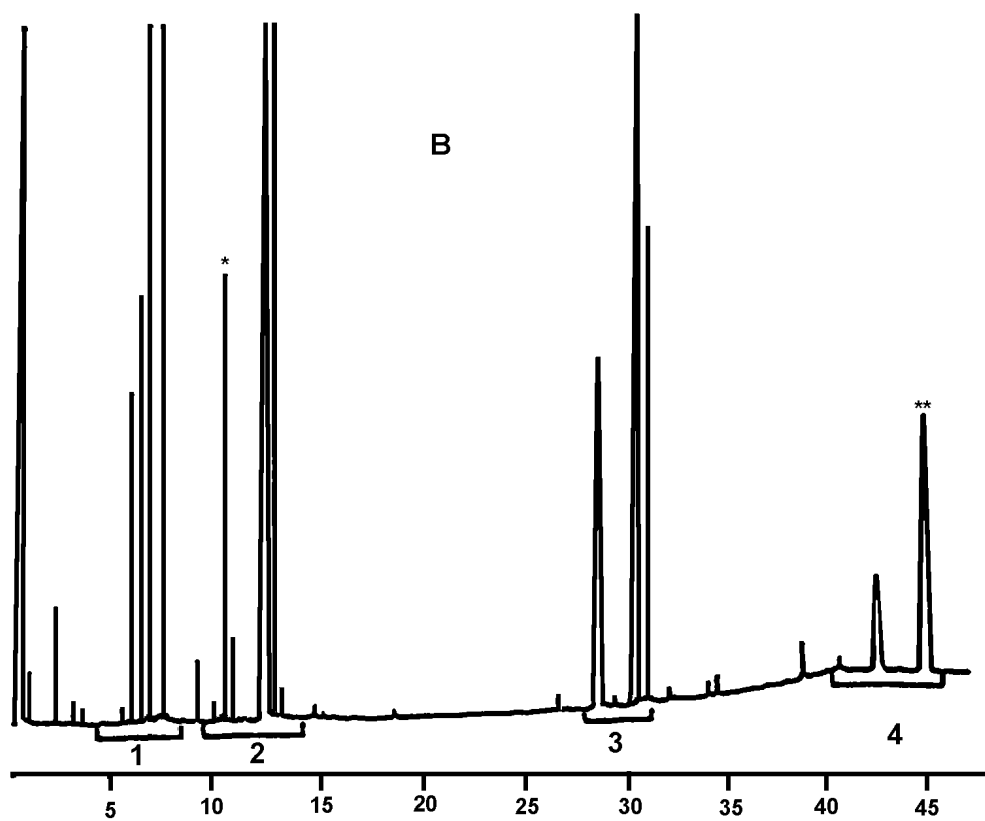
Jelmagyarázat::

- 1 = Szabad zsírsavak
- 2 = Monogliceridek
- 3 = Digliceridek
- 4 = Trigliceridek
- * = 2-monopalmitin
- ** = C₅₄ triglicerid

▼ M21**Kromatogram:**

(B) észterezett olaj a lipázreakció után; a szilanizáció után; ilyen körülmények között (8–12 m-es kapilláris oszlop) a viaszfrakció a digliceridfrakcióval egy időben, vagy kevéssel utána eluálódik.

A lipázreakció után a triglicerid-tartalom nem haladhatja meg a 15 %-ot.

*Jelmagyarázat:*

- 1 = Szabad zsírsavak
- 2 = Monogliceridek
- 3 = Digliceridek
- 4 = Trigliceridek
- * = 2-monopalmitin
- ** = C₅₄ triglicerid

▼ **M21**

8. MEGJEGYZÉSEK

1. megjegyzés: A LIPÁZ ELKÉSZÍTÉSE

Kielégítő lipázaktivitású lipázok kaphatók kereskedelmi forgalomban, de lehetséges laboratóriumi elkészítésük is a következők szerint:

Hűtsön le 5 kg friss sertés-hasnyálmirigyet 0 °C hőmérsékletre. Távolítsa el a környező szilárd zsiradékot és a kötőszövetet, majd dörzsölje szét egy keverőgépben, hogy pépes folyadékot kapjon. A keverővel keverje össze a pépet 2,5 l vízmentes acetonnal 4–6 órán keresztül, majd centrifugálja. Extrahálja a maradékot még háromszor, azonos mennyiségű acetonnal, majd két alkalommal aceton és dietil-éter 1/1 (V/V) keverékével, majd kétszer dietil-éterrel.

Szárítsa a maradékot *in vacuo* 48 órán keresztül, hogy stabil port kapjon, amely hűtőszekrényben és nedvességtől védve hosszan tárolható.

2. megjegyzés: A LIPÁZ AKTIVITÁSÁNAK BEÁLLÍTÁSA

Készítsen olívaolaj-emulziót a következőképpen:

Megfelelő keverőben 10 percen keresztül rázza össze a 165 ml 100 g/l-es gumiarábikum-oldatból, 15 g jégzúzalékból és 20 ml előzetesen semlegesített olívaolajból álló keveréket.

Egy főzőpohárba tegyen 10 ml-t ebből az emulzióból, majd ezután 0,3 ml 0,2 g/ml-es nátrium-kolát oldatot és 20 ml desztillált vizet.

Tegye a főzőpoharat egy 37 °C hőmérsékleten tartott termosztátba; helyezze bele egy pH-mérő elektródáit és egy keverőpirált.

Egy buretta segítségével cseppenként adagoljon nátrium-hidroxid-oldatot (0,1 N), amíg a pH-érték 8,3 nem lesz.

Adjon hozzá megfelelő mennyiséget a lipáz vizes szuszpenziójából (0,1 g/ml lipáz). Amint a pH-mérő 8,3-at mutat, indítsa el a stopperórát, és olyan sebességgel csepegtesse a nátrium-hidroxid-oldatot, hogy a 8,3 pH-érték megmaradjon. Minden percben olvassa le a felhasznált lúgoldat térfogatát.

A megfigyeléseket rögzítse grafikonon, az időértékeket használva abszcisszaként, az állandó pH-érték fenntartásához szükséges 0,1 N-es lúgoldat ml-ben kifejezett térfogatát pedig ordinátaként. Lineáris grafikont kell kapnia.

A felhasznált por lipáz egység/mg-ban kifejezett aktivitása a következő képlettel határozható meg:

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

ahol:

A a lipáz egység/mg-ban kifejezett aktivitása,

V a percenként felhasznált nátrium-hidroxid-oldat ml-ek száma (a grafikonból kiszámítva),

N a nátrium-hidroxid-oldat moláris koncentrációja,

m a lipáz por vizsgált mennyiségének tömege mg-ban.

A lipázegység definíciója a következő: az az enzimmennyiség, amely percenként 10 μ–savekvivalenst szabadít fel.

▼ **M20**

IX. MELLÉKLET

SPEKTROFOTOMETRIÁS VIZSGÁLAT ULTRAIBOLYA FÉNYBEN

ELŐSZÓ

Az ultraibolya fényben végzett spektrofotometriás vizsgálat segítségével a zsír minőségével, tartósítási állapotával és a technológiai folyamatok által benne okozott változásokkal kapcsolatos információk állapíthatók meg. A módszernél megadott hullámhosszok elnyelése az oxidációs folyamatok és/vagy finomítási eljárások következtében jelen lévő konjugált dién- és triénrendszereknek köszönhető. Ezeket az abszorpciókat fajlagos kioltásban $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (azaz a zsír meghatározott oldószerrel készült, 1 %-os oldatában, 10 mm-es vastagságban mért kioltásban) fejezik ki, amelyet egyezményesen K-val (más néven „kioltási tényező”) jelölnek.

1. ALKALMAZÁSI KÖR

A melléklet az olívaolajok ultraibolya fényben történő spektrofotometrikus vizsgálatának eljárását ismerteti.

2. A MÓDSZER ELVE

Egy mintát feloldanak a szükséges oldószerben, majd az adott hullámhossztartományban meghatározzák az oldat kioltását a tiszta oldathoz viszonyítva.

A fajlagos abszorbancia kiszámítása 232 nm-en és 268 nm-en izooktánban vagy 232 nm-en és 270 nm-en ciklohexánban, 1 százalékos koncentrációnál, 10 mm-es küvettában történik.

3. BERENDEZÉS

- 3.1. Egy, az ultraibolya hullámhosszon (220 és 360 nm között) történő mérésre alkalmas spektrofotométer, amely képes a nanométeregységek egyenkénti leolvasására. Az abszorbancia- és a hullámhosszkála, illetve a szórt fény pontosságát és reprodukálhatóságát rendszeresen ellenőrizni kell.

- 3.1.1. *Hullámhosszkála:* Ellenőrzése holmium-oxidot vagy holmium-oxid oldatot tartalmazó, jól elkülönülő abszorpciós sávokkal rendelkező (zárt vagy nem zárt) optikaiüveg-szűrőből álló referenciaanyag segítségével történhet. A referenciaanyagok alkalmasak a látható és ultraibolya tartományokban mérő, legfeljebb 5 nm névleges spektrális sáv szélességgel rendelkező spektrofotométerek hullámhosszkáláinak ellenőrzésére és kalibrálására. A méréseket 640–240 nm hullámhossztartományban, levegős vakmintával szemben végzik a referenciaanyagokhoz mellékelt utasításoknak megfelelően. Az alapkorrekciót üres sugármenettel végzik minden egyes résszélesség-változásnál. A minta hullámhosszai a referenciaanyag tanúsítványában találhatóak.

- 3.1.2. *Abszorbanciaskála:* Ellenőrzése kereskedelmi forgalomba kapható, savas kálium-dikromát oldatokat tartalmazó, meghatározott koncentrációjú és a λ_{max} mellett tanúsított abszorbancia értékű zárt referenciaanyagok segítségével történhet (kálium-dikromát négyféle, perklórsavas, négy UV-kvarcküvettába zárt oldata. A négy oldat a linearitás és fotometrikus pontosság UV-fényben történő mérésére szolgál). A kálium-dikromát oldatokat az alapkorrekciót követően a használt savból álló vakmintával szemben mérik a referenciaanyagokhoz mellékelt utasításoknak megfelelően. A minta abszorbanciaértékei a referenciaanyag tanúsítványában találhatóak.

Egy másik lehetőség a fotocella és a fénysokszorozó átvitelének ellenőrzéséhez a következő: mérjen ki 0,2000 g tiszta kálium-kromátot a spektrofotometriához és oldja fel 0,05 N kálium-hidroxid-oldatban egy 1 000 ml térfogatú mérőlombikban, majd a lombikot töltsse fel a jelíg. Az így kapott oldatból vegyen pontosan 25 ml-t, tegye át egy 500 ml térfogatú mérőlombikba, majd ugyanazzal a kálium-hidroxid-oldattal töltsse fel a lombikot a jelíg.

▼ **M28**

Mérje meg az így kapott oldat kioltását 275 nm hullámhosszon, referenciaként a kálium-hidroxid-oldatot használva. Az 1 cm-es küvétával mért kioltásnak $0,200 \pm 0,005$ értékűnek kell lennie.

- 3.2. Az ultrabolya-hullámhosszon (220 és 360 nm között) történő mérésre alkalmas, 10 mm-es optikai átviteli úttal rendelkező, kupakkal ellátott, szögletes kvarcküvetta. Vizzel vagy más megfelelő oldószerrel feltöltve a küvetta nem mutathatnak egymáshoz képest 0,01 kioltási egységnél nagyobb különbséget.

- 3.3. Egyjelű mérőlombikok, 25 ml térfogat, A osztály.

- 3.4. 0,0001 g pontossággal mérő analitikai mérleg.

4. REAGENSEK

Ellenkező értelmű utasítás hiányában az elemzés során csak elismert analitikai minőségű reagenseket és desztillált vagy ásványmentesített vizet, illetve hasonló tisztaságú vizet használjon.

Oldószer: Izooktán (2,2,4-trimetil-pentán) a 232 nm-en és 268 nm-en történő méréshez vagy ciklohexán a 232 nm-en és 270 nm-en történő méréshez, a desztillált vízhez viszonyítva 232 nm-en 0,12-nél, 270 nm-en pedig 0,05-nél kisebb abszorbanciával, 10 mm-es küvetában mérve.

5. ELJÁRÁS

- 5.1. A mintának teljesen homogénnek kell lennie, és nem lehetnek benne lebegő szennyeződések. Ellenkező esetben kb. 30 °C hőmérsékleten át kell szűrni papíron.

- 5.2. A fentiek szerint előkészített minta megközelítőleg 0,25 g-ját pontosan (1 mg pontossággal) be kell mérni egy 25 ml-es mérőlombikba, az előírt oldószerrel a jelig fel kell tölteni, majd homogenizálni kell. A kapott oldatnak teljesen átlátszónak kell lennie. Amennyiben opálosság vagy zavarosság lép fel, papíron gyorsan át kell szűrni.

MEGJEGYZÉS: Általánosságban 0,25–0,30 g tömeg elegendő a szűz és az extra szűz olívaolaj abszorbanciájának 268 nm-en és 270 nm-en történő méréséhez. A 232 nm-en történő mérésekhez általában 0,05 g tömegű minta szükséges, ezért általában két külön oldat készül. Az olívaolaj-csa-olajok, a finomított olívaolajok és a hamisított olívaolajok abszorbanciájának méréséhez általában kisebb mintaadag, pl. 0,1 g is elegendő magasabb abszorbanciájuknak köszönhetően.

- 5.3. Szükség esetén korrigálja az alapot (220–290 nm) mindkét kvarcküvetából (minta és referencia) vett oldattal, majd töltsse fel a mintát tartalmazó kvarcküvetta a tesztoldattal, és a használt oldószer referenciaként használva mérje meg a kioltásokat 232, 268 vagy 270 nm-en.

A mért kioltási értékeknek 0,1 és 0,8 közé kell esniük, vagy a spektrofotométer linearitási tartományán belül kell lenniük, amelyet ellenőrizni kell. Ha nem így van, a mérést meg kell ismételni töményebb, illetve hígabb oldatokkal.

- 5.4. Az abszorbancia 268 vagy 270 nm-en történő mérését követően mérje meg az abszorbanciát λ_{\max} , $\lambda_{\max} + 4$ és $\lambda_{\max} - 4$ értékeken. Ezeket az abszorbanciaértékeket a fajlagos kioltásban bekövetkező változás (ΔK) meghatározására használják.

MEGJEGYZÉS: a λ_{\max} 268 nm izooktán oldószer esetében, illetve 270 nm ciklohexán esetében.

▼M28

6. AZ EREDMÉNYEK KIFEJEZÉSE

- 6.1. Fel kell jegyezni a különböző hullámhosszokon a következő módon kiszámított fajlagos kioltásokat (kioltási tényezőket):

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

ahol:

$K\lambda$ = fajlagos kioltás λ hullámhosszon;

$E\lambda$ = a λ hullámhosszon mért kioltás;

C = az oldat koncentrációja g/100 ml-ben;

s = a kvarcküvetta átviteli úthossza cm-ben;

kerekítve 2 tizedesjegyre.

- 6.2. **A fajlagos kioltás változása (ΔK)**

A kioltás abszolút értékének változását (ΔK) az alábbi képlet adja meg:

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

ahol K_m a maximális abszorpcióhoz tartozó, 270 nm és 268 nm (a használt oldattól függően) hullámhosszon mért fajlagos kioltás.

kerekítve 2 tizedesjegyre.

▼ **M28***X. MELLÉKLET***ZSÍRSAV-METILÉSZTEREK GÁZKROMATOGRÁFIÁS MEGHATÁROZÁSA****1. ALKALMAZÁSI KÖR**

Ez a melléklet útmutatást nyújt a növényi zsírokban és olajokban lévő szabad és kötött zsírsavak gázkromatográfiás meghatározásához azok zsírsav-metilészterre alakítását követően.

A triacil-glicerinek kötött zsírsavai, valamint az észteresítési módszertől függően – a szabad zsírsavak zsírsav-metil-észterre alakulnak, amelyeket kapillaris gázkromatográfia segítségével lehet meghatározni.

Az ebben a mellékletben bemutatott módszer lehetővé teszi a zsírsav-metilészterek meghatározását C₁₂-től C₂₄-ig, beleértve a telített, a cisz- és a telítetlen transz-, valamint a cisz- és a többszörösen telítetlen transz zsírsav-metilésztereket.

2. ALAPELV

A zsírsav-metilészterek mennyiségi elemzésére gázkromatográfiát használnak. A zsírsav-metilésztert az A. résznek megfelelően készítik elő. Ezt követően injektorba fecskendezik és elpárologtatják azt. A zsírsav-metilészter elválasztását meghatározott polaritású és hosszúságú analitikai oszlopokon végzik. A zsírsav-metilészterek észlelésére lángionizációs detektort (FID) használnak. Az elemzés feltételei a B. részben találhatóak.

Vivőgázként (mozgó fázis) hidrogén vagy hélium használható a zsírsav-metilészterek FID-vel végzett gázkromatográfiája során. A hidrogén felgyorsítja az elválasztást és élesebb csúcsokat ad. A stacioner fázis egy szilícium-dioxidból készült közömbös, szilárd felületen lévő vékony folyadékfilm mikroszkopikus rétege.

Miközben áthaladnak a kapillaris oszlopokon, a vizsgált elpárologtatott vegyületek kölcsönhatásba lépnek az oszlop belső felületét borító stacioner fázissal. A különböző vegyületek az eltérő kölcsönhatás következtében eltérő időben (ezt nevezik a vegyület retenciós idejének egy adott elemzési paraméterkészleten) eluálnak. A retenciós idők összehasonlítása teszi lehetővé a különböző vegyületek azonosítását.

A. RÉSZ**ZSÍRSAV-METILÉSZTEREK ELŐÁLLÍTÁSA OLÍVAOLAJBÓL ÉS OLÍVAPOGÁCSA-OLAJBÓL****1. ALKALMAZÁSI KÖR**

Ez a rész a zsírsav-metilészterek előállítását határozza meg. Zsírsav-metilészterek olívaolajból és olívaogácsa-olajból történő előállítására szolgáló módszereket foglal magában.

2. ALKALMAZÁSI KÖR

A zsírsav-metilészterek olívaolajból és olívaogácsa-olajból történő előállítását kálium-hidroxid metanolos oldatával történő átészterezéssel végzik szobahőmérsékleten. A mintának az átészteresítést megelőző tisztításának szükségessége a minta szabad zsírsavtartalmától és a meghatározandó analitikus paraméterétől függ; az alábbi táblázat alapján választható:

▼ **M28**

Olajkategória	Módszer
≤ 2,0 % savasságú szűz olívaolaj	1. Zsírsav 2. <i>Transz</i> -zsírsavak 3. ΔECN42 (SPE szilikagéllel történő tisztítást követően)
Finomított olívaolaj	
Finomított olívaolajból és szűz olívaolajból álló olívaolaj	
Finomított olívaolajból és szűz olívaolajból álló olívaolaj	
Olívaolajból álló olívaolaj	
> 2,0 % savasságú szűz olívaolaj Nyers olívaolajból álló olívaolaj	1. Zsírsavak (SPE szilikagéllel történő tisztítást követően) 2. <i>Transz</i> -zsírsavak (SPE szilikagéllel történő tisztítást követően) 3. ΔECN42 (SPE szilikagéllel történő tisztítást követően)

3. MÓDSZERTAN

3.1. **Kálium-hidroxid metanolos oldatával szobahőmérsékleten történő átészterezés.**3.1.1. *Alapelv*

A metilészterek kálium-hidroxid metanolos oldatával történő átészterezéssel, az elszappanosítás bekövetkezését megelőző közbenső stádiumként képződnek.

3.1.2. *Reagensek*

3.1.2.1. Legfeljebb 0,5 tömegszázalék víztartalmú metanol.

3.1.2.2. Hexán, kromatográfiai minőség.

3.1.2.3. Heptán, kromatográfiai minőség.

3.1.2.4. Dietil-éter, elemzéshez stabilizált.

3.1.2.5. Aceton, kromatográfiai minőség.

3.1.2.6. Eluáló oldószer az olaj oszlop-/SPE-kromatográfiával történő tisztítására, hexán/dietil-éter 87:13 térfogatarányú elegye.

3.1.2.7. Kálium-hidroxid, kb. 2M metanololdat: oldjon fel 11,2 g kálium-hidroxidot 100 ml metanolban.

3.1.2.8. Szilikagél patronok, 1 g (6 ml), szilárd fázis kioldáshoz.

3.1.3. *Készülékek*

3.1.3.1. Lecsavarható fedelű kémcsövek (5 ml térfogatú) PTFE-tömítőgyűrűs kupakkal.

3.1.3.2. Kalibrált vagy automatikus pipetták, 2 ml-es és 0,2 ml-es.

▼ **M28**3.1.4. *Olajminták tisztítása*

A mintákat szükség esetén úgy tisztítják, hogy az olajat szilikagél szilárd fázisú extrakciós patronon engedik át. A szilikagél patron (3.1.2.8.) egy vákuumos eluáló rendszerbe helyezik és 6 ml hexánnal (3.1.2.2.) mossák át; a mosás vákuum nélkül történik. Ezt követően az olaj (hozzávetőlegesen 0,12 g) 0,5 ml hexánnal készült oldatát az oszlopra töltik. Az oldatot átfuttatják az oszlopon, majd 10 ml hexán/dietil-éterrel (87:13 térfogatarány) (3.1.2.6.) eluálják. A kombinált eluátumokat homogénizálják és két hasonló mennyiségre osztják szét. Rotációs bepárlóban csökkentett nyomás alatt, szobahőmérsékleten szárazra párolják az egyiket. A maradékot 1 ml heptánban feloldják, ezt követően az oldat készen áll a gázkromatográfiás zsírsavelemzésre. A másik részt elpárologtatják, majd a maradékot 1 ml acetonban feloldják a triglicerid szükség esetén elvégzendő folyadékkromatográfiás elemzéséhez.

3.1.5. *Az eljárás*

Egy 5 ml-es lecsavarható fedelű kémcsőben (3.1.3.1.) mérjen le kb. 0,1 g-ot az olajmintából. Adjon hozzá 2 ml heptánt (3.1.2.2.) és rázza össze. Adjon hozzá 0,2 ml metanolos kálium-hidroxid oldatot (3.1.2.7.), helyezze fel a PTFE-tömítőgyűrűs kupakot, szorítsa rá a kupakot, és rázza össze erőteljesen 30 másodpercig. Hagyja, hogy rétegek képződjenek, míg a felső oldat tiszta nem lesz. Dekantálja a metilésztert tartalmazó felső réteget. A heptános oldat ekkor injektálható a gázkromatográfba. Az elemzés megkezdéséig javasolt az oldatot hűtőszekrényben tárolni. Az oldat tárolása 12 óránál tovább nem javasolt.

B. RÉSZ

ZSÍRSAV-METILÉSZTEREK GÁZKROMATOGRÁFIÁS ELEMZÉSE1. **ALKALMAZÁSI KÖR**

Ez a rész általános iránymutatót ad a kapilláris oszlopokat használó gázkromatográfiás vizsgálat alkalmazására, az A. részben megállapított módszer segítségével kapott zsírsav-metilészterekből álló keverék minőségi és mennyiségi jellemzőinek meghatározására.

Ez a rész nem alkalmazható polimerizált zsírsavakra.

2. **REAGENSEK**2.1. **Vivógáz**

Inert gáz (hélium vagy hidrogén), alaposan kiszárítva, kevesebb, mint 10 mg/kg oxigéntartalommal.

1. megjegyzés:

A hidrogén megkésztéri az elemzés sebességét, azonban veszélyes. Rendelkezésre állnak védőfelszerelések.

2.2. **Segédgázok**

2.2.1. Hidrogén (tisztaság $\geq 99,9$ %), szerves szennyeződésektől mentes.

2.2.2. Levegő vagy oxigén, szerves szennyeződésektől mentes.

2.2.3. Nitrogén (tisztaság > 99 %).

2.3. **Referenciaminta**

Tiszta zsírsavak metil-észtereinek, illetve ismert összetételű zsírok metil-észtereinek keveréke, lehetőség szerint a vizsgált zsíros anyaghoz hasonló. Az oktadekán-, oktadekadién- és oktadekatrién-metilészterek cisz- és transz-izomerjei hasznosak a telítetlen savak transz-izomerjeinek azonosításához.

Meg kell akadályozni a többszörösen telítetlen zsírsavak oxidációját.

▼ **M28****3. ESZKÖZÖK**

A következő útmutató a kapilláris oszlopokat és láng-ionizációs detektort alkalmazó gázkromatográfiához használt szokásos felszerelésre vonatkozik.

3.1. Gázkromatográf

A gázkromatográf a következő elemekből áll:

3.1.1. Befecskendező rendszer

Használjon kapilláris oszlopokkal rendelkező befecskendező rendszert, amely esetben a befecskendező rendszernek kifejezetten az ilyen oszlopokkal történő használatra tervezettnek kell lennie. A befecskendező rendszer lehet osztott típusú vagy az oszlopon lévő osztatlan típusú.

3.1.2. Kemence

A kemencének képesnek kell lennie a kapilláris oszlop legalább 260 °C hőmérsékletre történő hevítésére, illetve a kívánt hőmérséklet tartására 0,1 °C-on belüli pontossággal. Az utóbbi követelmény különösen fontos olvasztott szilícium-dioxid csövek használata esetén.

A hőmérséklet-programozott fűtés használata minden esetben ajánlatos, különösen a 16-nál kevesebb szénatomot tartalmazó zsírsavak esetén.

3.1.3. Kapilláris oszlop

3.1.3.1. A vizsgált anyagok tekintetében semleges anyagból (általában üveg vagy szilícium-dioxid) készült cső. A belső átmérője 0,20–0,32 mm. A belső felületét a stacioner fázisból álló bevonat felvétele előtt megfelelően kezelni kell (például felületkikészítés, inaktiválás). A zsírsavakhoz és a zsírsavak cisz- és transz-izomerjeihez 60 m hosszúság elegendő.

3.1.3.2. Stacioner fázis, poláris polisziloxán (cianoszilikonok) kötött (keresztbe kapcsolt) oszlopok használhatók.

2. megjegyzés:

Fennáll a veszélye, hogy a poláris polisziloxánok megnehezítik a lino-lénsav és a C₂₀ savak azonosítását és leválasztását.

A bevonatoknak vékonyak, azaz 0,1–0,2 µm-eseknek kell lenniük.

3.1.3.3. Az oszlop összeszerelése és kondicionálása

Tartsa be a kapillárisoszlopok összeszerelésének normál szabályait, vagyis az oszlopok elrendezése a kemencén (talapzaton), szerelvények kiválasztása és összeszerelése (szivárgásmentesség), az oszlop végének elhelyezése a befecskendező rendszerben és a detektorban (a holtterek csökkentése). Helyezze az oszlopot vivőgáz árama alá (például 0,3 bar (30 kPa) 25 m hosszú és 0,3 mm belső átmérőjű oszlop esetén).

Kondicionálja az oszlopot a kemence környezeti hőmérsékletéről induló, a stacioner fázis lebomlási határa alatti 10 °C-ig terjedő, 3 °C/perc sebességű felfűtésével. Tartsa a kemencét ezen a hőmérsékleten egy órán keresztül, a nullapont stabilizálódásáig. Az izotermikus körülmények között történő munkához állítsa vissza 180 °C hőmérsékletre.

3. megjegyzés: A megfelelően kondicionált oszlopok kereskedelmi forgalomban kaphatók.

3.1.4. Lángionizációs detektor és konvertererősítő**3.2. Fecskendő**

A fecskendő maximális térfogata 10 µl, 0,1 µl-es beosztásokkal.

3.3. Adatgyűjtő rendszer

Detektorokkal ellátott, online bekötött adatgyűjtő rendszerek, csúcsok összegzésére és normalizálásra képes szoftverrel.

▼ **M28**

4. AZ ELJÁRÁS

A 4.1–4.3. pontban leírt műveletek a láng-ionizációs detektor használatára vonatkoznak.

4.1. Vizsgálati körülmények

4.1.1. *A kapilláris oszlopok optimális üzemi körülményeinek kiválasztása*

A kapilláris oszlopok hatásfok- és permeabilitási jellemzőinek köszönhetően az alkotóelemek elválasztása és az elemzés időtartama nagymértékben függ a vívőgáz oszlopbeli sebességétől. Ezért az üzemi körülmények optimalizálására van szükség ennek a paraméternek (egyszerűbben az oszlop nyomásvesztésének) a változtatásával, attól függően, hogy az elválasztást szeretnénk növelni vagy gyorsabb analízist szeretnénk végezni.

Az alábbi körülmények bizonyultak megfelelőnek a zsírsav-metilészterek (C₄–C₂₆) elválasztására. A kromatogramokra a B. függelék tartalmaz példákat:

Injektor hőmérséklete:	250 °C
Detektor hőmérséklete:	250 °C
Kemence hőmérséklete:	165 °C (8 perc 210 °C-ra 2 °C/perc sebességgel)
Hidrogén vívőgáz:	Oszlopfej nyomása: 179 kPa
Teljes átáramló mennyiség:	154,0 mL/perc;
Megosztási arány:	1:100
Befecskendezett mennyiség:	1 µl

4.1.2. *A feloldás meghatározása (lásd az A. mellékletet)*

Az I. és II. szomszédos csúcsok R feloldása az alábbi képlettel számolható ki:

$$R = 2 \times ((d_{r(II)} - d_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ vagy } R = 2 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ (USP) (United States Pharmacopeia – Amerikai Gyógyszerkönyv),}$$

vagy

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

ahol:

$d_{r(I)}$ az I. csúcs retenció távolsága;

$d_{r(II)}$ a II. csúcs retenció távolsága;

$t_{r(I)}$ az I. csúcs retenció ideje;

$t_{r(II)}$ a II. csúcs retenció ideje;

$\omega_{(I)}$ az I. csúcs alapjának szélessége;

$\omega_{(II)}$ a II. csúcs alapjának szélessége;

$\omega_{0,5}$ az adott vegyület csúcshélessége a csúcs közepmagasságában;

Ha $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$, az R értékét az alábbi képlettel kell kiszámolni:

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

ahol:

σ a standard eltérés (lásd A függelék, 1. ábra).

▼ **M28**

Ha a két csúcson közötti $d_{r(II)} - d_{r(I)}$ távolság 4σ , az E feloldási tényező = 1.

Ha két csúcson nincs teljesen elválasztva, a két csúcson inflexiós pontjának tangensei a C pontban keresztezik egymást. A két csúcson teljes elválasztásához a két csúcson közötti távolságnak az alábbiaknak kell lennie:

$$d_{r(II)} - d_{r(I)} = 6 \sigma \text{ ahol } R = 1,5 \text{ (lásd A. függelék, 3. ábra).}$$

5. AZ EREDMÉNYEK KIFEJEZÉSE

5.1. **Minőségi elemzés**

Azonosítsa a B. függelék 1. ábrájának kromatogramjából a minta metil-észter csúcsait, amennyiben szükséges, interpolálás, vagy pedig a metil-észterekből álló referenciakeverékekhez (lásd a 2.3. pontot) tartozókkal való összehasonlítás útján.

5.2. **Mennyiségi elemzés**5.2.1. *Az összetétel meghatározása*

Az alábbi módon számítsa ki az egyes zsírsav-metilészterek w_i tömeghányadát (a metil-észter tömegszázalékában kifejezve):

5.2.2. *Számítási módszer*5.2.2.1. *Általános eset*

Számítsa ki egy adott i összetevő esetében a mennyiséget a metil-észterek tömegének százalékában kifejezve úgy, hogy meghatározza az adott összetevő csúcsa alatti terület nagyságát az összes csúcs alatti területhez képest, a következő képlet segítségével:

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

ahol:

A_i az egyes i zsírsav-metilészterek csúcsa alatti terület;

ΣA az egyes i zsírsav-metilészterek csúcsai alatti területek összege.

Az eredményeket két tizedesjegy pontossággal kell megadni.

4. *megjegyzés:* A zsírok és olajok esetében a zsírsav-metilészterek tömeghányada megegyezik a triacil-glicerinek tömeghányadával g/100 g-ban kifejezve. Azokat az eseteket, ahol ez a feltételezés nem érvényes, lásd az 5.2.2.2. pontban.

5.2.2.2. *A korrekciós tényezők használata*

Bizonyos esetekben, például a nyolcnál kevesebb szénatommal rendelkező zsírsavak vagy a másodlagos csoportokat tartalmazó savak jelenlétében, a területeket korrekciós tényezőkkel (F_{ci}) kell korrigálni. Ezeket a tényezőket minden egyes eszközhöz meg kell határozni. Erre a célra a megfelelő tartományban lévő, hitelesített zsírsav-összetételű referenci anyagokat kell használni.

5. *megjegyzés:* Ezek a korrekciós tényezők nem azonosak az A. mellékletben található elméleti FID korrekciós tényezőkkel, mivel magukban foglalják a befecskendező rendszer teljesítményét stb. is. A nagyobb eltérések esetén azonban a teljes rendszer teljesítményét ellenőrizni kell.

▼ **M28**

Ennél a referenciakeréknél az i zsírsav-metilészter tömegszázaléka a következő képlet segítségével adható meg:

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

ahol

m_i az i zsírsav-metilészter tömege a referenciakerékben;

Σm a referenciakerékben lévő különböző zsírsav-metilészterek összes tömege.

A referenciakerék kromatogramjából számítsa ki az i zsírsav-metilészter területre vetített százalékát a következő képlet segítségével:

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

ahol:

A_i az i zsírsav-metilészter területe a referenciakerékben;

ΣA a referenciakerékben lévő különböző zsírsav-metilészterek összes területe.

Az F_c korrekciós tényező az alábbi:

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

Például az i egyes zsírsav-metilészterek tömegszázaléka a következő:

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

Az eredményeket két tizedesjegy pontossággal kell megadni.

6. megjegyzés:

A számított érték megfelel az egyes zsírsav-metilészterek a triacil-glicerinként számolt tömegszázalékával g/100 g-ban kifejezve.

5.2.2.3. A belső standard használata

Bizonyos elemzések esetén (például amikor nem mindegyik zsírsav mennyiségét határozzuk meg, amikor négy és hat szénatomot tartalmazó savak vannak jelen a 16 és 18 szénatomos savak mellett, vagy ha egy mintában az egyik zsírsav pontos mennyiségét kell meghatározni) belső standardot kell használni. Leggyakrabban az 5, 15 vagy 17 szénatomos zsírsavakat használják. A belső standardhoz (amennyiben szükséges) meg kell határozni a korrekciós tényezőt.

Az i összetevő metil-észterekhez viszonyított tömegszázalékát a következő képlet segítségével lehet kiszámítani:

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

ahol:

A_i az i zsírsav-metilészter területe;

A_{IS} a belső standard területe;

F_i az i zsírsav zsírsav-metilészterben kifejezett korrekciós tényezője;

F_{IS} a belső standard korrekciós tényezője;

m a vizsgált mennyiség tömege milligrammban;

m_{IS} a belső standard tömege milligrammban.

Az eredményeket két tizedesjegy pontossággal kell megadni.

▼M28**6. VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV**

A vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell a metil-észterek előkészítés és a gázkromatográfiás elemzés módszerét. Meg kell említeni benne minden, e standard módszerben nem szereplő vagy opcionálisnak tekinthető üzemi körülményt vagy az eredményekre esetlegesen hatással lévő bármilyen eseményt.

A vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell a minta egyértelmű azonosításához szükséges valamennyi adatot.

7. A MÓDSZER PONTOSSÁGA**7.1. A körvizsgálatok eredményei**

A módszer pontosságának körvizsgálatával kapcsolatos információk az IOC/T.20/Doc. No 33. szabvány C mellékletében találhatóak. Az ebből a körvizsgálatból származó értékek valószínűleg nem alkalmazhatók a megadottakon kívül más koncentrációtartományokra és mátrixokra.

7.2. Megismételhetőség

Az ugyanazon módszerrel ugyanazon tesztanyagon, ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon kezelőszemély által, ugyanazon berendezésen, és a két teszt elvégzése között eltelt rövid idő alatt kapott két független egyedi teszteredmény közötti abszolút különbség az esetek nem több mint 5 %-ban lesz nagyobb az IOC/T.20/Doc. No. 33. szabvány C mellékletének 1–14. táblázatában megadott r értéknél.

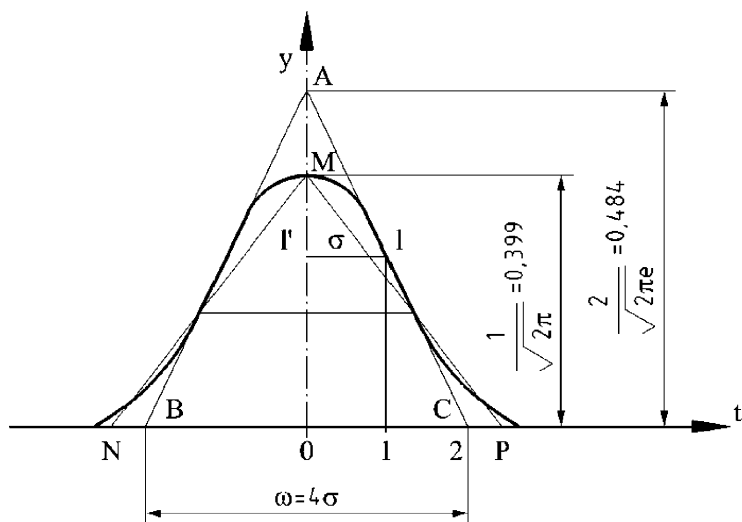
7.3. Reprodukálhatóság

Az ugyanazon módszerrel ugyanazon tesztanyagon, különböző laboratóriumban, különböző kezelőszemély által, különböző berendezésen kapott két egyedi teszteredmény közötti abszolút különbség az esetek nem több mint 5 %-ában lesz nagyobb az IOC/T.20/Doc. No. 33. szabvány C mellékletének 1–14. táblázatában megadott R értéknél.

▼ M28

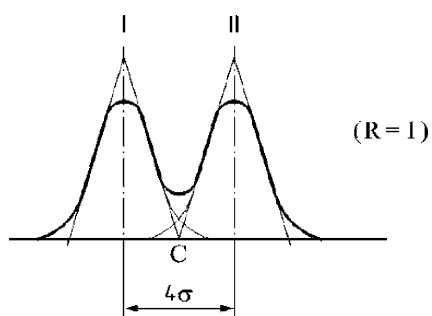
A. függelék

1. ábra

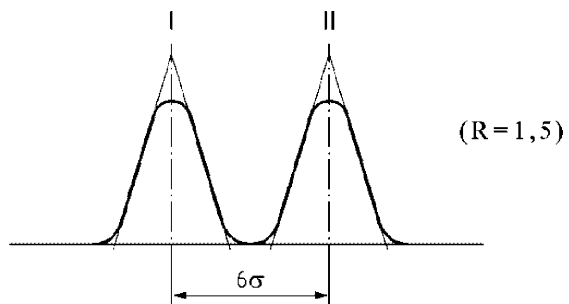


$\omega_{0,5}$ szélességgel az ABC háromszög magasságának felénél és b szélességgel az NPM háromszög magasságának felénél.

2. ábra



3. ábra

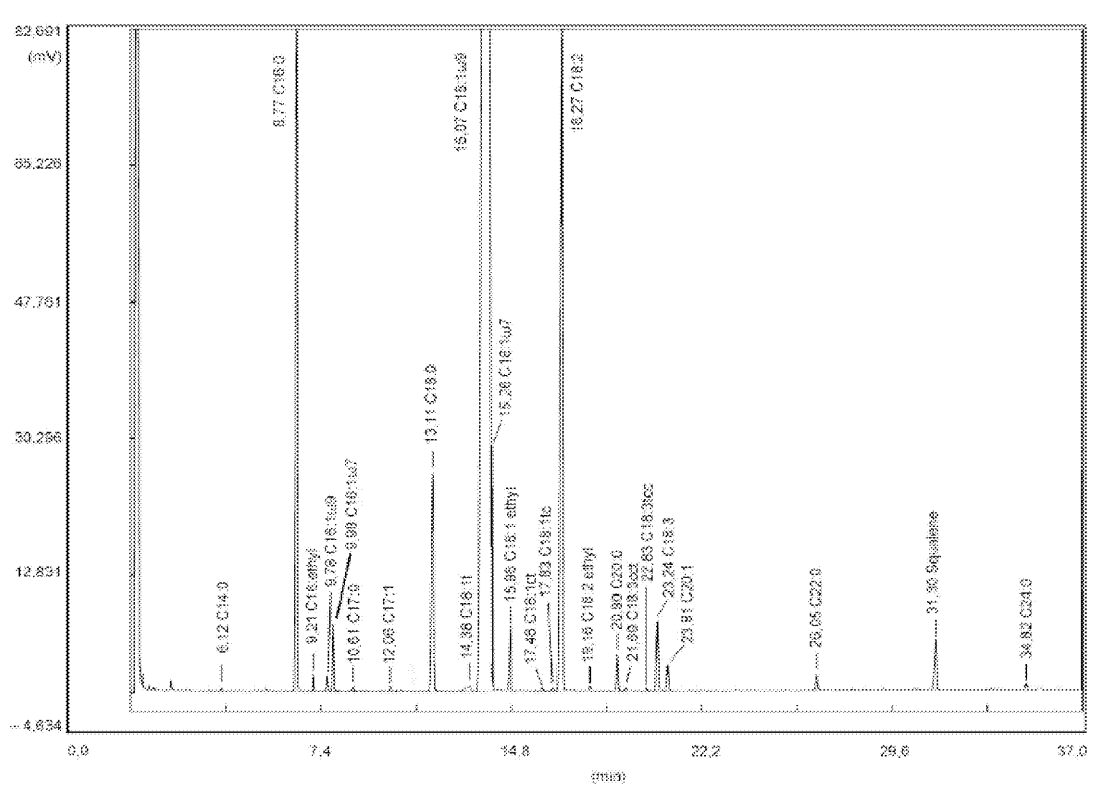


▼M28

B. függelék

1. ábra

Olívapogácsa-olajból hideg metilézéssel nyert gázkromatográfiás profil.



Eltérő rendelkezés hiányában a kromatográfiás csúcsok a metil- és etil-észtereknek felelnek meg.



XI. MELLÉKLET

AZ OLÍVAOLAJ ILLÉKONY HALOGÉNEZETT OLDÓSZEREINEK
MEGHATÁROZÁSA

1. MÓDSZER

A gőztér-mintavételezési technikán alapuló gázkromatográfias elemzés.

2. BERENDEZÉS

2.1. Elektronbefogásos detektorral (ecd) felszerelt gázkromatográfias berendezés.

2.2. Gőztér-mintavételező berendezés.

2.3. Üvegből készült 2 m hosszú, 2 mm átmérőjű gázkromatográfias oszlop, stacioner fázis. OV101 10 % vagy avval egyenértékű a kalcinált, savazott, szilanizált és 80–100 szemcse nagyságú kovaföld impregnálásához.

2.4. Vivő- és segédgázok: az elektronbefogásos detektáláshoz alkalmas nitrogén a gázkromatográfias eljáráshoz.

2.5. 10 ml és 15 ml térfogatú teflonborítású üveglombikok alumíniumdugóval, a fecskendő bevezetésére alkalmas kialakítással.

2.6. Hermetikus zárású bilincsek.

2.7. 0,5–2,0 ml térfogatú gázfecskendő.

3. REAGENSEK

Standard: a gázkromatográfias eljáráshoz megfelelő tisztaságú halogénezett oldószerek.

4. ELJÁRÁS

4.1. Mérjen pontosan 3 g olajat egy üveglombikba (újból nem felhasználható); zárja le hermetikusan. Tegye egy termosztátban 70 °C hőmérsékletre egy óra hosszára. Egy fecskendő segítségével óvatosan szivjon ki a gőztérből 0,2–0,5 ml-t. A fecskendő tartalmát fecskendezze be a következő módon beállított gázkromatográfias berendezés oszlopába:

— injektor hőmérséklete: 150 °C,

— oszlop hőmérséklete: 70–80 °C,

— detektor hőmérséklete: 200–250 °C.

Ettől eltérő hőmérsékletek is beállíthatók, amennyiben az eredmények egyenértékűek lesznek.

4.2. Referenciaoldatok: készítsen a mintában feltételezett tartalomnak megfelelő 0,05–1 ppm (mg/kg) töménységű standard oldatokat olyan finomított olívaolajból, amelyben oldószerek nyomokban sem található meg. A halogénezett oldószerek pentán segítségével hígíthatók.

4.3. Mennyiségi becslés: hasonlítsa össze a minta, illetve a feltételezett töménységhez legközelebb álló standard oldat csúcsainak magasságát vagy területét. Amennyiben az eltérés 10 %-nál nagyobb mértékű, akkor az elemzést meg kell ismételni egy másik standard oldattal történő összehasonlítással, egészen addig, ameddig az eltérés 10 %-on belüli nem lesz. A tartalmazott mennyiség meghatározása az elemi befecskendezések átlaga alapján történik.

4.4. Az eredmények kifejezése: ppm-ben (mg/kg). Az eljárás érzékelési korlátja 0,01 mg/kg.

▼ **M26**

XII. MELLÉKLET

A NEMZETKÖZI OLÍVAOLAJ-TANÁCSNAK A SZŰZ OLÍVAOLAJOK ÉRZÉKSZERVİ ÉRTÉKELÉSÉRE SZOLGÁLÓ MÓDSZERE

▼ **M28**

1. CÉL ÉS ALKALMAZÁSI TERÜLET

Az ebben a mellékletben bemutatott nemzetközi módszernek a célja, hogy megállapítsa az 1308/2013/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet⁽¹⁾ VII. melléklete VIII. részének 1. pontja szerinti szűz olívaolaj érzékszervi jellemzőinek értékelési eljárását, és létrehozza az e jellemzők alapján történő osztályozásukra szolgáló módszert. A módszer a fakultatív címkézésre vonatkozó útmutatást is tartalmaz.

Az ismertetett módszer csak a szűz olívaolajokra alkalmazandó, valamint azok osztályozására vagy címkézésére az érzékelt hibák intenzitása és a gyümölcsösség szerint, egy válogatott, képzett és vizsgáztatott kóstolókból álló, értékelő bizottságként működő csoport által meghatározott módon.

Az IOC (Nemzetközi Olívaolaj-Tanács) e mellékletben említett szabványai a legutolsó rendelkezésre álló verziójukban kerültek alkalmazásra.

▼ **M26**

2. AZ ÉRZÉKSZERVİ ELEMZÉS ÁLTALÁNOS ALAPSZÓKÉSZLETE

Lásd az IOC/T.20/Doc. No 4 „Sensory Analysis: General Basic Vocabulary” (Érzékszervi elemzés: Általános alapszókészlet) szabványt.

3. SZAKKIFEJEZÉSEK

3.1. **Negatív tulajdonságok**

Dohos/seprős Az olyan olajbogyókból sajtolt olaj jellegzetes zamata, amelyek az egymásra halmozás, illetve a tárolási körülmények miatt a légmentes erjedés előrehaladott állapotában vannak, vagy olyan olajé, amely az olajtároló medencékben és kádakban a légmentes erjedés folyamatában lévő fejtési „üledékkel” érintkezett.

Penészes-nedves-földes A több napon keresztül nedves helyen történt tárolás következtében, a penész és élesztőgombák által megtámadott olajbogyóból nyert olaj jellegzetes zamata, vagy olyan olívaolajból nyert olaj jellegzetes zamata, amelyeket földesen, sárosan takarítottak be, és lemosásuk elmaradt.

Boros-ecetes/savanyú-fanyar Némely olajnak a borra vagy ecetre emlékeztető jellegzetes zamata van. Ez a zamat alapvetően az olajbogyóknak, illetve a nem megfelelően lemosott sajtolószitán maradt olajbogyó-pépnek a levegőn való erjedési folyamatából származik, amelynek eredményeként ecetsav, etil-acetát és etanol képződik.

Avas Olyan olajok zamata, amelyek intenzív oxidációs folyamaton mentek keresztül.

Fagyott olíva (nedves fűs) Az olajfán fagyásnak kitett olajbogyókból kivont olajok jellegzetes zamata.

⁽¹⁾ Az Európai Parlament és a Tanács 2013. december 17-i 1308/2013/EU rendelete a mezőgazdasági termékek piacok közös szervezésének létrehozásáról és a 922/72/EGK, a 234/79/EK, az 1037/2001/EK és az 1234/2007/EK tanácsi rendelet hatályon kívül helyezéséről (HL L 347., 2013.12.20., 671. o.).

▼ **M28**3.1.1. *Egyéb negatív tulajdonságok*

<i>Sült vagy égett</i>	Olyan olajok jellegzetes zamata, amelyek előállításuk során – és különösen az olajbogyópép termikus keverése alatt – túlzott mértékben és/vagy túl hosszú ideig lettek felmelegítve, ha ez nem megfelelő hőmérsékleti körülmények között történt.
<i>Szénás-fás</i>	A kiszáradt olajbogyóból kinyert bizonyos olajok jellegzetes zamata.
<i>Nyers</i>	Egyes régi olajok által keltett jellegzetes hatás, melyek kósteláskor sűrű, nyúlós érzést okoznak.
<i>Kenőzsíros</i>	A gázolajra, gépszírra vagy ásványi olajra emlékeztető zamat.
<i>Vizes</i>	Erjedt növényi nedvekkel hosszabb ideig érintkezésben maradt olajok által szerzett zamat.
<i>Sós</i>	A sós páclében tartósított olajbogyóból nyert olajok jellegzetes zamata.
<i>Fémés</i>	Fémekre emlékeztető aroma. Az olyan olaj jellegzetessége, amely a zúzás, a keverés, a sajtolás vagy a tárolás során hosszabb ideig fémfelületekkel érintkezett.
<i>Eszpartó</i>	Új eszpartófü-szítán kipréselt olivabogyókból származó olajok jellegzetes zamata. A zamat változhat attól függően, hogy a sajtolószítát zöld vagy száraz eszpartófűből készítették-e.
<i>Férges</i>	Az olajbogyó-fürölégy (<i>Bactrocera oleae</i>) lárváitól erősen megtámadott olajbogyóból származó olaj zamata.
<i>Uborkás</i>	A hermetikusan lezárt állapotban, például bádogtartályban túl hosszú ideig tartott olaj jellegzetes zamata, amely a 2,6-nonadienal képződésének tulajdonítható.

3.2. **Pozitív tulajdonságok**

<i>Gyümölcsös</i>	Az olajra jellemző mindazon – olajbogyófajta szerint változó – szagérzetek, amelyek az egészséges és friss, zöld vagy érett gyümölcs közvetlen vagy retronazális úton való szaglásából származnak.
<i>Keserű</i>	A zöld vagy az érési folyamat kezdetén lévő olajbogyóból nyert olívaolaj jellegzetes alapíze, amelyet a nyelven V alakban elhelyezkedő kehelyformájú izlelbimbók érzékelnek.
<i>Csípős</i>	Az egész szájüregben, de különösen a torokban érzékelhető kaparó érzés, amely elsősorban a még éretlen olajbogyóból, a gazdasági év elején termelt olaj sajátságára.

▼ **M29**3.3. **A címkézésnél alkalmazható fakultatív kifejezések**

Kérelemre az értékelő csoport elnöke tanúsíthatja, hogy az értékelt olajok az érzékelés intenzitásának függvényében kizárólag a következő kifejezések és jelzők szerinti meghatározásoknak és fokozatoknak felelnek meg.

▼ **M29**

Pozitív tulajdonságok (gyümölcsös, kesernyés és csípős) az érzékelés intenzitásának függvényében:

- *erős*, ha az érintett tulajdonság mediánja 6-nál nagyobb;
- *közepes*, ha az érintett tulajdonság mediánja 3 és 6 között van;
- *enyhe*, ha az érintett tulajdonság mediánja 3-nál kisebb.

Gyümölcsösség Az olajra jellemző mindazon – olajbogyófajta szerint változó – szagérzetek, amelyek az egészséges és friss gyümölcs közvetlen és/vagy retronazális úton való szaglásából származnak, és ahol sem a zöld, sem az érett gyümölcsösség nem domináns.

Zöld gyümölcsösség Az olajra jellemző mindazon – olajbogyófajta szerint változó –, a zöld gyümölcsre emlékeztető szagérzetek, amelyek a zöld egészséges és friss gyümölcs közvetlen és/vagy retronazális úton való szaglásából származnak.

Érett gyümölcsösség Az olajra jellemző mindazon – olajbogyófajta szerint változó –, az érett gyümölcsre emlékeztető szagérzetek, amelyek az egészséges és friss gyümölcs közvetlen és/vagy retronazális úton való szaglásából származnak.

Kiegyensúlyozott olaj Olyan olaj, amely nem mutat kiegyensúlyozatlanságot; ezen azt a szaglási-ízlelési és érintési érzetet kell érteni, amikor a kesernyés tulajdonság mediánja és a csípős tulajdonság mediánja legfeljebb két ponttal van a gyümölcsös tulajdonság mediánja fölött.

Lágy olaj Olyan olaj esetében alkalmazható, amelynél a kesernyés és a csípős tulajdonság mediánja 2 vagy annál kisebb.

Kifejezések az érzékelés intenzitásának függvényében:

Az érzékszervi vizsgálati jegyzőkönyvben szereplő kifejezések	Az érintett tulajdonság mediánja
Gyümölcsösség	—
Érett gyümölcsösség	—
Zöld gyümölcsösség	—
Enyhe gyümölcsösség	Kevesebb mint 3
Közepes gyümölcsösség	3 és 6 között
Erős gyümölcsösség	6 felett
Enyhe érett gyümölcsösség	Kevesebb mint 3
Közepes érett gyümölcsösség	3 és 6 között
Erős érett gyümölcsösség	6 felett
Enyhe zöld gyümölcsösség	Kevesebb mint 3

▼ **M29**

Az érzékszervi vizsgálati jegyzőkönyvben szereplő kifejezések	Az érintett tulajdonság mediánja
Közepes zöld gyümölcsösség	3 és 6 között
Erős zöld gyümölcsösség	6 felett
Enyhe kesernyesség	Kevesebb mint 3
Közepes kesernyesség	3 és 6 között
Erős kesernyesség	6 felett
Enyhe csípősség	Kevesebb mint 3
Közepes csípősség	3 és 6 között
Erős csípősség	6 felett
Kiegyensúlyozott olaj	A kesernyés tulajdonság mediánja és a csípős tulajdonság mediánja legfeljebb két ponttal van a gyümölcsös tulajdonság mediánja fölött
Lágy olaj	A kesernyés tulajdonság mediánja és a csípős tulajdonság mediánja legfeljebb 2

▼ **M26**

4. AZ OLAJKÓSTOLÓ POHÁR

Lásd az IOC/T.20/Doc. No 5, „Glass for Oil Tasting” (Olajkóstoló pohár) szabványt.

5. VIZSGÁLÓTEREM

Lásd az IOC/T.20/Doc. No 6, „Guide for the Installation of a Test Room” (Segédlet a vizsgáloterem kialakításához) szabványt.

6. BERENDEZÉS

A kóstolók számára a feladatuk megfelelő ellátásához szükséges a következő felszerelést minden kóstolófülkében biztosítani és annak könnyen elérhetőnek kell lennie:

- a mintákat tartalmazó (azonos méretű) poharak, kódszámmal ellátva, óraüveggel lefedve és 28±2 °C-on tartva;
- értékelőlap (lásd 1. ábra) nyomtatva, vagy elektronikusan, feltéve, hogy megfelel az értékelőlap feltételeinek, szükség esetén a használatra vonatkozó utasításokkal;
- toll vagy kitörölhetetlen tinta;
- tálcán almaszeletek és/vagy víz, szénsavas víz és/vagy kétszersült;
- egy pohár környezeti hőmérsékletű víz;
- a 8.4. és 9.1.1. pontban felsorolt általános szabályokra emlékeztető tábla;
- köpöcsészék.

▼ **M26**

7. A CSOPORT ELNÖKE ÉS A KÓSTOLÓK

7.1. A csoport elnöke

A csoport elnökének alapos szakképzettséggel kell rendelkeznie, és a különféle típusú olívaolajok ismerőjének és tapasztalt szakértőjének kell lennie. Ez a személy a csoport kulcsembere, ő felelős a csoport munkájának megszervezéséért és lebonyolításáért.

A csoport vezetőjének feladata az érzékszervi vizsgálatokhoz használt eszközökkel, az érzékszervi képességekkel kapcsolatos továbbképzések megszervezése, az aprólékos előkészületek elvégzése, a tesztek megszervezése és lebonyolítása, valamint rendelkezik azokkal a képességekkel és türelemmel, amelyek szükségesek a tesztek tudományos alaposággal történő megtervezéséhez és kivitelezéséhez.

Egy személyben felelős a kóstolók kiválasztásáért, a képzésükért, a képességük megfelelő szinttartása érdekében, és ellenőrzi teljesítményüket. Szintén az elnök felelős a kóstolók értékeléséért, amelynek mindig objektívnek kell lennie, és amelyhez speciális eljárásokat kell kifejleszteni. Az eljárások tesztekben, valamint szigorú elfogadási és elutasítási kritériumokon kell alapulniuk. Lásd az IOC/T.20/Doc. No 14, „Guide for the selection, training and monitoring of skilled virgin olive oil tasters” (Útmutató a megfelelő képességekkel rendelkező szűz olívaolaj kóstolók kiválasztásához, képzéséhez és ellenőrzéséhez) szabványt.

A csoport elnöke felel a csoport teljesítményéért, ennél fogva annak értékeléséért, melynek során mindig megbízhatónak és pártatlannak kell bizonyulnia. Minden esetben szemléltetnie kell, hogy a módszerek és a kóstolók az ellenőrzése alatt állnak. Javasolt a csoport időszakos felülvizsgálata (IOC/T.20/Doc. No 14, § 5).

Övé a végső felelősség a csoport feljegyzéseinek tárolásáért. Ezeknek a feljegyzéseknek bármikor nyomon követhetőnek kell lenniük. A feljegyzéseknek meg kell felelniük a nemzetközi érzékszervi vizsgálati szabványok által lefektetett biztosítékoknak és minőségi előírásoknak, és mindenkor biztosítaniuk kell a minták anonimitását.

Az elnök felelős a leltározásért, valamint annak biztosításáért, hogy a módszer előírászerű betartásához szükséges berendezések és eszközök tisztítása és karbantartása megfelelő legyen, és az erről, valamint a megfelelő tesztkörülmények meglétéről szóló írott tanúsítványt megőrizze.

Az elnök felel a minták fogadásáért, valamint azok tárolásáért a laboratóriumba való beérkezésüktől kezdődően és a tesztelés után is. Ennek során végig biztosítani kell a minták anonimitását és megfelelő tárolását; ennek biztosítására írásos formában ki kell dolgoznia a folyamatot úgy, hogy az nyomonkövethető legyen és a megfelelő garanciákat biztosítsa.

Ezen felül, az elnök felel a minták előkészítéséért, kódolásáért és átadásáért a kóstolóknak, az előre rögzített protokollnak megfelelő kísérleti elrendezésben, valamint a kóstolók által szolgáltatott adatok összegyűjtéséért és statisztikai feldolgozásáért.

Az elnök felelőssége minden olyan eljárás kidolgozása vagy felvázolása, ami szükséges lehet ennek a szabványnak a teljesítéséért és a kóstolói csoport megfelelő működéséhez.

Annak érdekében, hogy ellenőrizze a csoport megfelelő működését, az elnöknek meg kell találnia a módját, hogy a csoportja adatait összehasonlíthassa más, szűz olívaolajokat elemző kóstolói csoportok adataival.

▼ **M26**

A csoport elnökének feladata a kóstolócsoporthoz tagjainak ösztönzése, az érdeklődésük, kíváncsiságuk felkeltése a köztük kialakított versenyszellem révén. Ennek érdekében javasolt biztosítani a kétirányú információáramlást a csoport tagjaival, a tagokat folyamatosan informálni az általuk elvégzett feladatokról és a kapott eredményekről. Biztosítja azt, hogy a véleményét ne ismerjék meg, illetve megakadályozza, hogy az erősebb személyiségek nézeteiket rákényszerítsék a többi kóstolóra.

Az elnök feladata még a kóstolók időben való értesítése, az esetleges kérdések megválaszolása a tesztek elvégzésével kapcsolatban, de tartózkodnia kell a javaslatától, illetve a mintákkal kapcsolatos véleménynyilvánítástól.

▼ **M28**7.1.1. *A csoport elnökhelyettese*

A csoport elnökét indokolt esetben helyettesítheti bizottsági elnökhelyettes, aki a vizsgálatok elvégzésével kapcsolatos feladatokért fog felelni. A helyettesnek rendelkeznie kell a csoport elnökétől elvárt valamennyi készséggel.

7.2. **Kóstolók**

Az olívaolajok érzékszervi vizsgálatában részt vevő személyeknek önkéntesen kell jelentkezniük. Ezért javasolt a jelölteknek egy írásos kérelmet benyújtaniuk. A jelölteket a csoport elnöke választja ki, képzés és ellenőrzés a hasonló minták megkülönböztetésére irányuló képességeik szerint, szem előtt tartva, hogy a pontosságuk a képzések során egyre finomodni fog.

A kóstolóknak tényleges érzékszervi megfigyelőként kell viselkedniük, félre kell tenniük a személyes véleményüket és csak az észlelt érzékszervi észleléseikről kell beszámolniuk. Ennek érdekében a kóstolóknak mindig csendben, nyugodt körülmények között kell dolgozniuk, sűrűség nélkül, úgy, hogy a lehető legnagyobb érzékszervi figyelmet szenteljék a vizsgált mintának.

Minden egyes teszthez 8 és 12 közötti számú kóstoló szükséges. Ugyanakkor célszerű ennél több kóstolót találni az esetleges hiányzók helyettesítésére.

▼ **M26**8. **TESZTKÖRÜLMÉNYEK**8.1. **A minta tálalása**

Az olajmintát a vizsgálatához egy szabványos pohárban kell tálalni a következő szabvány szerint: IOC/T.20/Doc. No 5, „Glass for Oil Tasting” (Olajkóstoló pohár).

A pohárnak 14-16 ml vagy 12,8-14,6 g olajat kell tartalmaznia, ha a minták tömegének mérése szükséges, és azt minden esetben le kell fedni óraüveggel.

Minden egyes poharat egy kódszámmal kell ellátni, ami véletlenszerűen kiválasztott betűk vagy számok sorozatából áll. A kódokat szagtalan módszerrel kell jelölni.

8.2. **A teszt és a minta hőmérséklete**

A vizsgálatra szánt olajmintákat poharakban, $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ -on kell tartani a teszt teljes időtartamára. Azért erre a hőmérsékletre esett a választás, mert ezen a hőmérsékleten könnyebb meghatározni az érzékszervi különbségeket, mint a környezeti hőmérsékleten, és mert az alacsonyabb hőmérsékleteken az aromaanyagok alig párolognak, illetve olyan illékony komponensek keletkeznek, amelyek a melegített olajokra jellemzőek. Lásd az IOC/T.20/Doc. No 5 „Glass for Oil Tasting” (Olajkóstoló pohár) szabványt azokra a módszerekre nézve, melyekkel a poharakban lévő minták melegíthetők.

▼ **M26**

A vizsgálóhelyiség hőmérsékletének 20 °C és 25 °C fok között kell lennie (lásd IOC/T.20/Doc. No 6).

8.3. **Vizsgálati idő**

Az olajok kóstolására a reggel a legalkalmasabb időszak. Bizonyított, hogy vannak a nap folyamán optimális íz- és illatérzékelési periódusok. Az étkezések előtt megfigyelhető egy időszak, amikor az illat- és ízlelési érzékenység megnövekszik, míg az étkezéseket követően csökken az érzékelő képesség.

Ezt a feltételt azonban nem szabad szélsőségesen kihasználni, mikor az éhség megzavarja a kóstolókat, és ezáltal csökkenti a megkülönböztetési képességüket, különösen a preferencia-, illetve elfogadási feltételeiket; ezért javasolt a kóstolás időpontját reggel 10:00 óra és dél (12:00) közöttre tenni.

8.4. **Kóstolók: általános viselkedési szabályok**

Ezek az ajánlások a kóstolók munkájuk során tanúsított viselkedésére vonatkoznak.

A kóstolóknak, amikor a csoport elnöke behívja őket egy érzékszervi vizsgálaton történő részvételre, a kitűzött időpont előtt meg kell jelenniük és be kell tartaniuk a következőket:

- A teszt meghatározott kezdési ideje előtt legalább 30 perccel nem dohányozhatnak, illetve nem fogyaszthatnak kávét.
- Nem használhatnak semmilyen illatosító szert, kozmetikai szert vagy szappant, amelynek az illata eltart a teszt kezdetéig. A szükséges gyakoriságú kézmosáshoz illatmentes szappant kell használniuk, amelyet leöblítenek, majd kezeiket megszáritják, az illat eltávolítása érdekében.
- A teszt végzése előtt legalább egy órával nem ehetnek.
- Fizikai rosszullét esetén, különösen ha ez érinti a szaglási vagy ízlelési képességet, vagy ha bármilyen olyan pszichológiai hatás alatt állnak, ami megakadályozza őket abban, hogy a munkájukra figyeljenek, a kóstolóknak tartózkodniuk kell a teszten való részvételtől, és erről a megfelelő módon értesíteniük kell a csoport vezetőjét.
- Amennyiben a fentieknek megfelelnek, a kóstolók a lehető leghatározottabb és legcsendesebb módon elfoglalják a számukra kijelölt fülkét.
- Figyelmesen elolvassák az értékelő lapon lévő utasításokat, és addig nem kezdik meg a minta vizsgálatát (nyugodtan és sűrgetés nélkül), amíg teljesen biztosak nem lesznek az elvégzendő feladatban. Amennyiben valamilyen kétség merülne fel, személyesen megbeszélhetik a tapasztalt problémákat a csoport elnökével.
- A kóstolóknak a feladatuk elvégzése alatt csendben kell maradniuk.
- A mobiltelefonjukat végig kikapcsolva kell tartaniuk annak érdekében, hogy az ne vonja el sem a saját, sem a kollégáik figyelmét.

9. **A SZŰZ OLÍVAOLAJ ÉRZÉKSZERVI ÉRTÉKELESÉNEK ÉS OSZTÁLYOZÁSÁNAK ELJÁRÁSA**9.1. **Kóstolási technika**▼ **M29**

- 9.1.1. A kóstoló felveszi a poharat, ekkor még rajta tartja a poháron az óraüveget, és kissé megdönti; ezután ebben a helyzetben körbeforgatja a poharat, hogy a lehető legnagyobb mértékben benedvesítse a pohár belső felületét. Amikor eddig a fázisig eljutott, leveszi az óraüveget és lassú, mély lélegzetvételekkel megszagolja a mintát az olaj értékelése érdekében. A szaglás nem tarthat tovább 30 másodpercnél. Amennyiben ez alatt az idő alatt nem jut döntésre, akkor az újbóli próbálkozás előtt rövid pihenőt kell tartania.

▼ **M29**

A kóstoló a szaglási teszt befejezését követően az aromát (teljes retronazális, szaglási, ízlési és tapintási érzet) értékeli. Ennek elvégzéséhez kortyol egy kicsit (megközelítőleg 3 ml) az olajból. Nagyon fontos, hogy az olajat elossa a teljes szájüregben, a száj és a nyelv elejétől kezdődően végig az oldalak mentén a hátsó részig és a szájpadrásig, mivel ismert tény, hogy a négy alapíz, az édes, a sós, a savanyú és a keserű érzékelése a nyelv, a szájpadrás és a torok különböző területein változó intenzitású.

Nagyon fontos, hogy a kóstoló a nyelv hátsó részén megfelelő mennyiségű olajat lassan terítsen szét a szájpadrás és a torok irányába, mialatt arra figyel, hogy milyen sorrendben jelennek meg a kesernyés és a csípős ingerek. Amennyiben ez nem történik meg, egyes olajok esetén mindkét inger elkerülheti a figyelmet, vagy a kesernyés ingert elnyomhatja a csípős inger.

A szájon keresztül történő gyors, egymást követő belégzések nem csak a minta egész szájban történő szétterítését teszik lehetővé a kóstoló számára, hanem azt is, hogy az orr hátulján keresztül érzékelje az illékony aromás összetevőket.

Megjegyzés: ha a kóstolók egy minta estében nem érzékelnek gyümölcsösséget és a jellemző negatív tulajdonság intenzitása 3,5 vagy kevesebb, az értékelő csoport elnöke úgy határozhat, hogy a kóstolók szobahőmérsékleten ismételtlen végezzék el a minta vizsgálatát (COI/T.20/Doc. No 6/Rev. 1, 2007. szeptember, 3. szakasz – General specifications for installation of a test room – *A vizsgáloterem kialakításának általános előírásai*), meghatározva a szobahőmérséklet fogalmát és körülményeit. Amikor a minta eléri a szobahőmérsékletet, a kóstolóknak azt újra kell értékelniük kizárólag annak ellenőrzése céljából, hogy a gyümölcsösség érzékelhető-e. Amennyiben igen, annak intenzitását a skálán meg kell jelölniük.

A csípősség közvetlen érzékelését is figyelembe kell venni. Ennek érdekében javasolt az olajat le is nyelni.

▼ **M26**

- 9.1.2. Szűz olívaolajok érzékszervi vizsgálatánál javasolt egy sorozat alkalmával legfeljebb NÉGY MINTA vizsgálata, egy nap pedig három sorozat vizsgálata annak érdekében, hogy elkerülhető legyen a többi minta közvetlenül ezt követő kóstolása által okozott kontraszthatás.

Mivel az egymást követő kóstolások az érzékelő képesség kifáradását vagy elvesztését okozzák – amit az előző minták okoznak – olyan terméket kell használni, amellyel eltávolítható az előző kóstolás során a szájban maradó olaj.

Javasolt ehhez egy kis szelet almát összerágni, amely összerágás után egy köpöcsésébe köphető. Ezt követően a kóstoló öblítse ki a száját egy kevés szobahőmérsékletű vízzel. Legalább 15 percnek kell eltelnie egy kóstolás befejezése és egy újabb megkezdése előtt.

9.2. **Hogyan használja a kóstoló az értékelőlapot?**

A kóstolók által használandó értékelőlap ezen Melléklet 1. ábráján látható.

A csoportban részt vevő minden kóstolónak meg kell szagolnia, majd meg kell kóstolnia a megvizsgálandó ⁽¹⁾ olajat.

⁽¹⁾ Visszautasíthatják az olaj megkóstolását, ha rendkívül intenzíven érzékelnek egy vagy több negatív tulajdonságot; ebben az esetben ezt a rendkívüli körülményt fel kell jegyezniük az értékelőlapra.

▼ M26

Ezt követően a rendelkezésére álló értékelőlap 10 cm-es skáláján be kell jelölnie, hogy mekkora intenzitással érzékeli az egyes negatív és pozitív tulajdonságokat. Abban az esetben, ha a kóstolók a 4. pontban fel nem tüntetett negatív tulajdonságot észlelnek, azokat – a meghatározással ellátott kifejezések közül a legpontosabban körülíró kifejezést, illetve kifejezéseket alkalmazva – feljegyzik az „egyéb” rovatba.

▼ M28**9.3. Hogyan dolgozza fel az értékelő csoport elnöke az adatokat?**

Az értékelő csoport elnöke összegyűjti az egyes kóstolók által kitöltött értékelőlapokat; ellenőrzi a különféle tulajdonságokhoz rendelt intenzitási fokozatokat. Ha úgy véli, hogy rendellenességet észlel, felkéri a kóstolót az értékelőlap felülvizsgálatára, és – szükség esetén – a vizsgálat megismétlésére.

Az értékelő csoport elnöke beviseli az egyes kóstolók által megállapított adatokat az IOC/T.20/Doc. No 15 szabványban előírt számítógépes programba a vizsgálat eredményeinek statisztikai kiszámítása céljából, azok mediánjának kiszámítása alapján. Lásd a 9.4. pontot és ezen melléklet függelékét. Az egy mintára vonatkozó adatok feldolgozása egy mátrix segítségével történik, amely a 9 érzéki tulajdonságnak megfelelő 9 oszlopból és a csoport n számú kóstolójának megfelelő n számú sorból áll.

Ha egy, az értékelő csoportnak legalább 50 %-a által érzékelt tulajdonság az „egyéb” rovatba tartozik, ki kell számítani e hiba mediánját, és az olajat ennek megfelelően kell osztályozni.

A nagy jószágfokú variációs együttható (a legerősebb intenzitású és gyümölcsösségi tulajdonságú) értéke, ami meghatározza a besorolást, nem lehet nagyobb, mint 20 %.

Ha ennek az ellenkezője áll fenn, a csoport vezetőjének egy másik kóstolási időpontban meg kell ismételtetnie az adott minta értékelését.

Ha ez a helyzet gyakran előfordul, akkor a csoport elnökének javasolt külön képzésben részesítenie a kóstolókat (IOC/T.20/Doc. No 14, § 5) és alkalmaznia kell az ismételtetési indexet és az eltérési indexet a csoport teljesítményének ellenőrzésére (IOC/T.20/Doc. No 14, § 6).

▼ M29**9.4. Az olaj osztályozása**

Az olajat a hibamedián és a gyümölcsösségi medián függvényében az alábbi osztályokba sorolják. A hibamedián a legnagyobb intenzitással érzékelt hiba mediánja. A hibamediánt és a gyümölcsösségi mediánt egy tizedesjegy pontossággal kell megadni.

Az olaj osztályozása a hibamedián és a gyümölcsösségi medián értékeinek az alább bemutatott referenciatartományokkal való összehasonlítása alapján történik. Ezen tartományok határait a módszerhiba figyelembevételével állapították meg, ezért abszolút értékeknek tekinthetők. A számítógépes programok táblázatba foglalt statisztikai adatok, illetve grafikus ábrázolás útján lehetővé teszik az osztályozás vizuális megjelenítését.

- a) Extra szűz olívaolaj: a hibamedián 0 és a gyümölcsösségi medián 0-nál nagyobb.
- b) Szűz olívaolaj: a hibamedián 0-nál nagyobb, de legfeljebb 3,5, és a gyümölcsösségi medián 0-nál nagyobb.
- c) Lampante szűz olívaolaj: a hibamedián 3,5-nél nagyobb, vagy a hibamedián legfeljebb 3,5 és a gyümölcsösségi medián 0.

▼ **M29**

1. megjegyzés: ha a kesernyés és/vagy csípős tulajdonság mediánja meghaladja az 5,0-öt, az értékelő csoport elnöke ezt bejegyzi a vizsgálati jegyzőkönyvbe.

A megfeleléségi ellenőrzések keretében végzett elemzések esetében egy próbát végeznek. Egymásnak ellentmondó elemzések esetén külön kóstolások során párhuzamos vizsgálatot kell elvégezni. A vizsgálatnak statisztikailag homogén eredményeket kell adnia (lásd a 9.5. pontot). Ellenkező esetben a minta vizsgálatát még kétszer újra el kell végezni. Az osztályozási tulajdonságok mediánjának végső értékét mindkét medián átlaga alapján számolják ki.

9.5. A párhuzamos vizsgálat elfogadási és elutasítási kritériumai

A lejjebb meghatározott normalizált hiba szolgál annak meghatározására, hogy a párhuzamos vizsgálat eredményei homogének vagy statisztikailag elfogadhatók-e:

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

Ahol Me_1 és Me_2 a két vizsgálat mediánja (az első, illetve a második vizsgálaté) és U_1 és U_2 a két érték esetében kapott kiterjesztett bizonytalanság, amelyek számítása a függelékben meghatározottak szerint a következőképpen történik:

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

Kiterjesztett bizonytalanság, $c = 1,96$; ezért:

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

ahol CV_r a nagy jóságfokú variációs együttható.

Annak kijelentéséhez, hogy a két érték statisztikailag nem különböző, E_n -nek legfeljebb 1,0-nak kell lennie.

▼ **M26***Függelék***A medián és a konfidenciaintervallumok kiszámításására használt módszer****Medián**

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

A medián az az X_m valós szám, amelyre egyszerre igaz, hogy az eloszlás értékei (X) 0,5 vagy annál kisebb valószínűséggel (p) kisebbek ennél a számnál (X_m), és hogy az eloszlás értékei 0,5 vagy annál nagyobb valószínűséggel (p) kisebbek vagy egyenlők ezzel a számmal X_m . Egy gyakorlatiasabb meghatározás szerint a medián a növekvő sorozatba rendezett számok 50. centilisének felel meg. Egyszerűbben kifejezve, a medián a páratlan számú sorrendbe rendezett sorozat középső értéke, vagy a páros számú sorrendbe rendezett sorozat két középső értékének átlaga.

Nagy jószágfokú szórás

A medián körüli szóródás megbízható becslése érdekében a Stuart és Kendall (4) szerinti nagy jószágfokú szórás becslésére vonatkozó módszert kell alkalmazni. A következő képlet az aszimptotikus szórászt fejezi ki, azaz a megfigyelt adatok medián körüli szóródásának olyan, nagy jószágfokú becslését, ahol N a megfigyelések száma, az IQR az interkvartilis terjedelem, és amely a valószínű eloszlás eseteinek pontosan 50 %-át foglalja magában:

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

Az interkvartilis terjedelem kiszámításához meg kell határozni a 75. és a 25. centilis közötti eltérés nagyságát

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

A centilis az az X_{pc} érték, amelyre egyszerre igaz, hogy eloszlási értékei egy meghatározott századrésznek megfelelő vagy annál kisebb valószínűséggel (p) kisebbek X_{pc} -nél, és hogy eloszlási értékei egy meghatározott századrésznek megfelelő vagy annál nagyobb valószínűséggel (p) kisebbek vagy egyenlők mint X_{pc} . A századrész az eloszlás kiválasztott hányadát fejezi ki. A medián esetében ez 50/100-dal egyenlő.

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

A gyakorlatban a centilis az az eloszlási érték, amely egy, az eloszlási vagy sűrűségi görbe által behatárolt meghatározott területnek felel meg. Például a 25. centilis azt az elosztási értéket jelenti, amely megfelel egy 0,25 vagy 25/100 nagyságú területnek.

E szerint a módszer szerint a centilisek számítása a mátrix adataiban megjelenő valós értékek alapján történik (centilisszámítási-módszer).

Nagy jószágfokú variációs együttható %-ban kifejezve

A $VE_j\%$ egy olyan tiszta, azaz mértékegység nélküli szám, amely a vizsgált számok sorozatának szóródási százalékát jelöli. Ez az együttható ezért igen alkalmas a csoporttagok megbízhatóságának ellenőrzésére.

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

▼ M26**A medián 95 %-os konfidenciaintervalluma**

A 95 %-os konfidenciaintervallum (az elsőfajú hiba értéke 0,05, azaz 5 %) azt az értéktartományt jelenti, amelynek értékeit – feltételezve, hogy a vizsgálatot végtelen sokszor meg lehet ismételni – a medián felveheti. A gyakorlatban az említett intervallum a vizsgálatok szóródási tartományát adja meg az elfogadott működési körülmények között, feltételezve, hogy a vizsgálatokat többször el lehet végezni. Az intervallum, éppúgy, mint a $VE_j\%$, segít a vizsgálatok megbízhatóságának értékelésében.

$$KI_{felső} = Me + (c \times s^*)$$

$$KI_{alsó} = Me - (c \times s^*)$$

ahol a C értéke 95 %-os konfidenciaintervallum esetén 1,96-tal egyenlő.

A számítási lap egy példája megtalálható az IOC/T 20/Doc. No 15. szabvány 1. mellékletében.

Hivatkozások

- (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/Doc. No 1 September 2007, Guidelines for the accreditation of sensory testing laboratories with particular reference to virgin olive oil according to standard ISO/IEC 17025:2005.
- (7) IOC/T.20/Doc. No 14.
- (8) IOC/T.20/Doc. No 15.
- (9) ISO/IEC 17025:05.

▼ M20**▼ M19**



XV. MELLÉKLET

1. AZ OLÍVAMARADÉK OLAJTARTALMA

1.1. Berendezés

- megfelelő extrakciós berendezés, 200-250 ml térfogatú gömbölyű aljú lombikkal felszerelve,
- elektromos fűtésű fürdő (például homokfürdő, vízfürdő) vagy főzőlap,
- analitikai mérleg,
- maximum 80 °C-ig szabályozható kemence,
- 103 ± 2 °C pontossággal szabályozható termosztáttal felszerelt elektromos fűtésű kemence, amely levegőárammal átjárható vagy csökkentett nyomáson üzemeltethető,
- mechanikai őrlő, amely könnyen tisztítható és lehetővé teszi az olíva-maradékanyagok hőmérséklet-emelkedés nélküli, illetve nedvességtartalmuk, illóanyag-tartalmuk vagy a hexánnal kivonható anyagtartalmuk érzékelhető változása nélküli zúzását,
- extraháló hüvely és pamutvatta vagy szűrőpapír, amelyekről a hexánnal kivonható anyagokat előzőleg már eltávolították,
- szárítóberendezés,
- 1 mm átmérőjű nyílásokkal rendelkező szita,
- előzőleg kiszáritott apró habkődarabok.

1.2. Reagens

Műszaki fokozatú közönséges hexán, amely elpárolgását követően kevesebb, mint 0,002 g/100 ml maradékot hagy.

2. ELJÁRÁS

2.1. A tesztminta előkészítése

A minta megőrlésére szükség esetén használja az előzőleg megfelelően megtisztított mechanikus őrlőt, hogy olyan méretű részecskéket kapjon, amelyek maradék nélkül átjutnak a szitán.

Az őrlő tisztítására használja fel a minta megközelítőleg huszadrészét, ezt az őrleményt öntse ki, őrölje meg a fennmaradó mennyiséget, keverje össze óvatosan, majd késedelem nélkül elemezze.

2.2. A vizsgálati anyag mennyisége

Közvetlenül az őrlés befejezését követően a teszthez mérjen meg a mintából megközelítőleg 10 g mennyiséget 0,01 g pontossággal.

2.3. Az extraháló hüvely

Tegye a vizsgált mennyiséget a hüvelybe és pamutvattával dugózza le. Amennyiben szűrőpapírt használ, csomagolja bele az anyagot.

2.4. Előzetes szárítás

Amennyiben az olíva-maradék nagyon nedves (azaz a nedvességtartalma és az illóanyag-tartalma meghaladja a 10 %-ot), helyezze a betöltött hüvelyt (vagy szűrőpapírt) megfelelő időre egy legfeljebb 80 °C hőmérsékletre felfűtött kemencébe és végezzen előzetes szárítást, hogy a nedvességtartalmat és az illóanyag-tartalmat 10 % alá csökkentse.

▼B**2.5. A gömbölyű fenekű lombik előkészítése**

Mérje meg a korábban egy 103 ± 2 °C hőmérsékletű kemencében kiszáritott és szárítóban legalább 1 órán keresztül hűtött, 1-2 darab habkövet tartalmazó lombikot 1 mg pontossággal.

2.6. Előzetes extrahálás

Helyezze be a vizsgált anyagot tartalmazó hüvelyt (vagy szűrőpapírt) az extraháló berendezésbe. Öntse a lombikba a szükséges mennyiségű hexánt. Illessze a lombikot az extraháló berendezésbe, és helyezze ezt az összeállítást az elektromos fűtésű fürdőre. Állítsa be úgy a fűtési sebességet, hogy a visszaáramlás sebessége másodpercenként legalább 3 csepp legyen (mérsékelt, nem heves forrás). Négyórás extrahálást követően hagyja lehűlni. Vegye ki a hüvelyt az extraháló berendezésből és helyezze levegőáramba, hogy kihajtsa a beleivódott oldószert.

2.7. Második kivonás

Öntse a hüvely tartalmát a mikroórlóba és őrölje meg a lehető legfinomabbra. Öntse vissza a megőrölt keveréket veszteség nélkül a hüvelybe és helyezze vissza az extraháló berendezésbe.

Ugyanannak a kezdeti kivonatot tartalmazó lombiknak a segítségével folytassa az extrahálást további két órán keresztül.

A lombikban így kapott oldatnak tisztának kell lennie. Amennyiben mégse, szűrje át szűrőpapíron, és mossa át néhányszor az eredeti lombikot és a szűrőpapírt hexánnal. A szűrletet és a mosáshoz használt hexánt gyűjtse egy másik gömbölyű fenekű lombikba, amelyet előzőleg kiszáritott és 1 mg pontossággal megmért.

2.8. Az oldószert eltávolítása és a kivonat mérése

Az oldószert nagyobbik részét desztillálással távolítsa el elektromos fűtésű fürdőn. Az oldószert többi részét a lombik 103 ± 2 °C hőmérsékletű kemencében történő 20 perces hevítésével távolítsa el. Az oldószert eltávolítását rendszeres légbefúvással vagy lehetőleg inertgáz-befúvással, illetve a nyomás csökkentésével segítse.

Hagyja a lombikot a szárítóberendezésben legalább egy órán keresztül lehűlni, majd mérje meg 1 mg pontossággal.

Melegítse ismét 10 percen keresztül a fenti módszerrel és hűtse le a szárítóberendezésben, majd mérje meg újra.

A két mérés közötti különbség nem haladhatja meg a 10 mg-ot. Amennyiben meghaladja, végezzen 10 perces melegítéseket és hűtéseket mindaddig, amíg az eltérés 10 mg vagy kevesebb. Jegyezze fel a lombik utoljára mért tömegét.

Végezzen ismételt meghatározást a vizsgálati mintán.

3. AZ EREDMÉNYEK KIFEJEZÉSE**3.1. A számítási módszer és képlet**

a) A kivonat a kapott termék tömegszázalékában kifejezve:

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

▼B

- ahol:
- S a kivonat a kapott termék tömegszázalékában kifejezve,
 - m_0 a vizsgált mennyiség tömege grammban,
 - m_1 a kivonat tömege a szárítást követően, grammban.

Amennyiben a megismételhetőség feltétele teljesül, a két mérés számtani középértékét tekintse eredménynek.

Az eredményeket egy tizedesjegy pontossággal adja meg.

- b) A kivonat olajtartalma szárazanyagtartalomban kifejezve, a következő képlet segítségével:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{a kivonat olajtartalma a szárazanyagtartalom százalékában kifejezve,}$$

ahol: S = a kivonat a kapott termék tömegszázalékában kifejezve (lásd az (a) pontot),

U = annak nedvesség- és illóanyag-tartalma.

3.2. Megismételhetőség

Az egyidőben vagy az ugyanazon elemző által gyors egymásutánban megismételt meghatározással kapott két eredmény közötti különbség nem haladhatja meg a 0,2 g hexán kivonat/100 g mintaértéket.

Amennyiben ez a feltétel nem teljesül, ismétlje meg az elemzést két újabb vizsgálati anyagon. Amennyiben a különbség ebben az esetben is meghaladja a 0,2 g-ot, akkor a négy meghatározás számtani középértékét tekintse eredménynek.



XVI. MELLÉKLET

A JÓDSZÁM MEGHATÁROZÁSA

1. CÉL

Ez a nemzetközi szabvány az állati és növényi zsírok és olajok, a továbbiakban: zsírok, jódszáma megállapításának módszerét írja le.

2. MEGHATÁROZÁS

E nemzetközi szabvány alkalmazásában a következő meghatározások érvényesek:

2.1. *jódszám*: a minta által e nemzetközi szabványban meghatározott üzemi körülmények mellett abszorbeált jód tömege.

A jódszámot g jód/100 g minta mértékegységben fejezik ki.

3. ALAPELV

A minta feloldása oldószerben, majd wijs reagens hozzáadása. egy meghatározott idő elteltével kálium-jodid oldat és víz hozzáadása, majd a felszabadított jód titrálása nátrium-tiosulfát oldattal.

4. REAGENSEK

Minden reagensnek elismert analitikai minőségűnek kell lennie:

4.1. *víz*, az ISO 3696 előírásainak megfelelő, 3. fokozat.4.2. *kálium-jodid*, 100 g/l oldat, nem tartalmaz jódsavat vagy szabad jódot.4.3. *keményítő*, oldat.

Keverjen el 5 g oldható keményítőt 30 ml vízben, adja ezt a keveréket 1 000 ml forrásban lévő vízhez, forralja három percig, majd hagyja lehűlni.

4.4. *nátrium-tiosulfát*, standard volumetrikus oldat, $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1$ mol/l, használat előtt hét nappal nem régebben standardizálva.4.5. *oldószer*, azonos térfogatú ciklohexán és ecetsav összekeverésével készült,4.6. *Wijs reagens*, jód-monoklorid ecetsavban. Használható a kereskedelmi forgalomban kapható Wijs reagens.

5. BERENDEZÉS

A szokásos laboratóriumi berendezés, valamint a következők:

5.1. *üveg mérőkanalak*, a vizsgált mennyiséghez és a lombikba történő benyúláshoz megfelelőek (6.2.),5.2. *kúpos fenekű lombikok*, 500 ml térfogatúak, csiszolt üveg dugóval ellátva, teljesen szárazak.

6. A VIZSGÁLATI MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

Szárítsa ki a homogenizált mintát nátrium-szulfáton, majd szűrje le.

7. ELJÁRÁS

7.1. Vizsgált mennyiség

A vizsgált mennyiség tömege a várható jódszám függvényében változik az 1. táblázat szerint.

▼B

1. táblázat

Várható jódszám	A vizsgált mennyiség tömege (g)
kevesebb, mint 5	3,00
5–20	1,00
21–50	0,40
51–100	0,20
101–150	0,13
151–200	0,10

Mérje meg a vizsgált mennyiséget egy üveg mérőkanállal (5.1.) 0,1 mg pontossággal.

7.2. Meghatározás

Helyezze a vizsgált mennyiséget az 500 ml térfogatú kémcsőbe (6.2.). Adjon hozzá 20 ml oldószert (4.5.), hogy feloldja a zsírt. Adjon hozzá pontosan 25 ml Wijs reagenst (4.6.), tegye be a dugót, forgassa össze a lombik tartalmát, és tegye a lombikot sötét helyre. A Wijs reagenshez ne használjon pipettát.

Készítsen vakpróbát hasonlóképpen az oldószerral és reagenssel, de a vizsgált anyag kihagyásával.

A 150-nél alacsonyabb jódszámú minták esetén egy óráig, a 150-nél magasabb jódszámú minták, illetve a polimerizált termékek, és a jelentős mértékben oxidálódott termékek esetén két óráig hagyja a lombikot a sötétben.

A fenti idő elteltével adjon mindegyik kémcsőhöz 20 ml kálium-jodid oldatot (4.2.) és 150 ml vizet (4.1.).

Végezzen titrálást a standard volumetrikus nátrium-tioszulfát oldattal (4.4.), ameddig a jód miatt kialakult sárga szín majdnem teljesen eltűnik. Adjon hozzá néhány csepp keményítőoldatot (4.3.), és folytassa a titrálást, ameddig a kék szín heves rázás mellett el nem tűnik.

Megjegyzés: Megengedett a végpont potenciometrikus meghatározása.

7.3. A meghatározások száma

Végezzen a mintán két meghatározást.

8. AZ EREDMÉNYEK KIFEJEZÉSE

A jódszám a következő képlettel adható meg:

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

ahol:

c = a felhasznált standard volumetrikus nátrium-tioszulfát oldat (4.4.) pontos töménységének számértéke mol/l-ben;

V₁ = a vakpróbához felhasznált standard volumetrikus nátrium-tioszulfát oldat (4.4.) térfogata ml-ben;

▼B

V_2 = a meghatározáshoz felhasznált standard volumetrikus nátrium-tiosulfát oldat (4.4.) térfogata ml-ben;

m = a vizsgált anyag (7.1.) tömege g-ban.

A két meghatározás számtani középértéket tekintse eredményként, amennyiben teljesül a megismételhetőség követelménye (9.2.).

▼ **M11***XVII. MELLÉKLET***A NÖVÉNYI OLAJOK SZTIGMASZTADIÉN-ÖSSZETÉTELÉNEK MEGHATÁROZÁSA**

1. CÉL

A sztigmasztadiének meghatározása az e szénhidrogéneket alacsony koncentrációban tartalmazó növényi olajokban, különösen szűz olajban és nyers olívmaradék-olajban.

2. HATÁLY

Ez a szabvány minden növényi olajra alkalmazható, viszont a mérések csak abban az esetben megbízhatóak, ha ezeknek a szénhidrogéneknek a mennyisége 0,01–4,0 mg/kg között van. A módszer különösen alkalmas a finomított növényi olajok (olíva, olívmaradék, napraforgó, pálma stb.) jelenlétének szűz olívaolajban történő kimutatására, mivel a finomított olajok tartalmaznak sztigmasztadiéneket, a szűz olajok pedig nem.

3. ALAPELV

A nem szappanosítható anyag leválasztása. A szteroidos szénhidrogén frakció szilikagélén történő leválasztása oszlopkromatográfias módszer segítségével és elemzése gázkromatográfias módszer segítségével.

4. BERENDEZÉS

4.1. Visszafolyós hűtőben való felhasználásra alkalmas 250 ml térfogatú lombikok.

4.2. 500 ml térfogatú választótölcsérek.

4.3. 100 ml térfogatú kerek aljú lombikok.

4.4. Forgó bepárló.

4.5. Üveg kromatográfias oszlop (1,5–2,0 cm belső átmérő, 50 cm hossz) tefloncsappal, üvegyapot dugóval vagy szinterelt üveglappal az alján. A szilikagél oszlop előkészítéséhez öntsön hexánt a kromatográfias oszlopba megközelítőleg 5 cm mélységben, majd tölts fel hexánban elosztatott szilikagélből (15 g szilikagél 40 ml hexánban) álló iszappal, további hexán hozzáadása mellett. Hagyja leülepedni, az ülepedés befejezését kismértékű rázással segítse. Adjon hozzá vízmentes nátrium-szulfátot megközelítőleg 0,5 cm magasságban, majd végül eluálja a feleslegben lévő hexánt.

4.6. Gázkromatográfias berendezés lángionizációs detektorral, az oszlopra szerelt osztott vagy hideg befecskendezővel és ± 1 °C pontossággal programozható kemence.

4.7. Ömlesztett kovaföld kapillárisoszlop gázkromatográfias eljáráshoz (0,25 vagy 0,32 mm belső átmérőjű, 25 m hosszú), 0,25 mm rétegvastagságban 5 % fenil-metil-szilikon fázis bevonatú.

1. megjegyzés:

Használhatók egyéb, azonos vagy alacsonyabb polaritású oszlopok is.

4.8. Integráló-rögzítő berendezés, lehetőleg völgy-völgy integrálási módszer elvégzésére képes.

4.9. 5–10 ml térfogatú mikrofecskendő a gázkromatográfias eljáráshoz, cementált tüvel.

4.10. Elektromos fűtőpalást vagy főzőlap.

▼ M11

5. REAGENSEK

Minden reagensnek analitikai minőségűnek kell lennie, kivéve ha másként nincs előírva. A felhasznált víznek desztillált víznek vagy legalább hasonló tisztaságú víznek kell lennie.

5.1. Hexán vagy alkánok keveréke 65–70°C, rektifikáló oszlopon lepárolva.

2. megjegyzés:

A szennyeződések eltávolítása céljából az oldószert desztillálni kell.

5.2. 96 v/v etanol.

5.3. Vízmentes nátrium-szulfát.

5.4. Kálium-hidroxid 10 %-os alkoholos oldata. Adjon 10 ml vizet 50 g kálium-hidroxidhoz, keverje el, majd öntse fel a keveréket etanollal 500 ml-re.

3. megjegyzés:

A kálium-hidroxid alkoholos oldatának színe állás közben barnává változik. Mindennap frissen kell készíteni, és jól lezárt sötét üvegpalackban kell tárolni.

5.5. Szilikagél 60 a kromatográfias oszlophoz, 70–230 nyílásméretű (Merck, 7734 referenciaszámú vagy azzal megegyező).

4. megjegyzés:

A szilikagél rendszerint közvetlenül felhasználható, mindennemű kezelés nélkül. Néhány szilikagél adag azonban alacsony aktivitású lehet, ami rossz kromatográfias szétválasztást eredményez. Ilyen körülmények mellett a szilikagélt az alábbi módon kell kezelni: aktiválja a szilikagélt legalább négy órán keresztül tartó, 550 °C hőmérsékleten történő hevítéssel. A felmelegítést követően tegye a szilikagélt szárítóberendezésbe, amíg a szilikagél le nem hűl, ekkor töltsé be egy zárható lombikba. Adjon hozzá 2 % vizet, és rázza addig, amíg a por csomómentes nem lesz és szabadon folyik.

Amennyiben a szilikagéladagok a kromatogramokon zavaró csúcsokat eredményeznek, a szilikagélt a fenti módon kell kezelni. Egy másik lehetőség az extra tisztaságú szilikagél 60 használata (Merck, 7754 referenciaszám).

5.6. Koleszta-3, 5-dién (Sigma, 99 % tisztaságú) (200 ppm töménységű) törzsoldata hexánban (10 mg 50 ml-ben).

5.7. Koleszta-3, 5-dién 20 ppm töménységű standard oldata hexánban, a fenti oldat hígításából.

5. megjegyzés:

Az 5.6. és az 5.7. oldatok legalább 4 hónapon keresztül stabilak, amennyiben 4 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleten tárolják.

5.8. n-nonakozán megközelítőleg 100 ppm töménységű hexánoldata.

5.9. Vivőgáz a kromatográfias eljáráshoz: 99,9990 % tisztaságú hélium vagy hidrogén.

5.10. Segédgázok a lángionizációs detektorhoz: 99,9990 % tisztaságú hidrogén és tisztított levegő.

▼ M11**6. ELJÁRÁS****6.1. A nem szappanosítható anyag készítése**

6.1.1. Mérjen $20 \pm 0,1$ g olajat egy 250 ml térfogatú lombikba (4.1.), adjon hozzá 1 ml-t a koleszta-3, 5-dién standard oldatából (20 μg) és 75 ml-t a nátrium-hidroxid 10 %-os alkoholos oldatából, szerelje fel a visszafolyós hűtőt, és harminc percen keresztül forralja gyengén. Vegye le a fűtőeszköztől a mintát tartalmazó lombikot, és hagyja kissé lehűlni az oldatot (ne hagyja, hogy teljesen lehűljön, mert a minta megköt). Adjon hozzá 100 ml vizet, majd 100 ml hexán felhasználásával öntse a mintát a választótölcsérbe (4.2.). Rázza a mintát hevesen 30 másodpercen keresztül, majd hagyja szétválni.

6. megjegyzés:

Amennyiben olyan emulzió keletkezik, amely nem tűnik el gyorsan, adjon hozzá kis mennyiségű etanolt.

6.1.2. Öntse az alsó vizes fázist egy másik választótölcsérbe, és 100 ml hexán segítségével végezzen ismét extrahálást. Engedje ki még egyszer az alsó fázist, és mossa át háromszor a hexánkivonatokat (másik választótölcsérben vegyítve) mindhárom alkalommal etanol-víz (1: 1) keverékével, amíg semleges pH-értéket nem ér el.

6.1.3. Vezesse át a hexánoldatot vízmentes nátrium-szulfáton (50 g), mossa át 20 ml hexánnal, és párolja be a forgó bepárlóban 30 °C hőmérsékleten csökkentett nyomás mellett, amíg ki nem szárad.

6.2. A szteroidos szénhidrogén-frakció leválasztása

6.2.1. A maradékot két 1 ml-es hexánadag segítségével öntse a frakcionáló oszlopba, engedje a mintát az oszlopba addig, ameddig az oldat szintje a nátrium-szulfátig süllyed, és kezdje meg a kromatográfiás elúciót a hexánnal megközelítőleg 1 ml/perc sebességgel. Az eluátum első 25–30 ml-jét öntse ki, majd gyűjtse össze a következő 40 ml-nyi frakciót. Az összegyűjtést követően öntse át ezt a frakciót egy 100 ml térfogatú kerek aljú lombikba (4.3.).

7. megjegyzés:

Az első frakció a telített szénhidrogéneket tartalmazza (lásd az 1a. ábrát), a második a szteroidosakat. A további elúció eredményeképpen szkvalén és rokonvegyületei keletkeznek. A telített és a szteroidos szénhidrogének jó szétválasztása érdekében szükség van a frakciók térfogatainak optimalizálására. Ehhez az első frakció térfogatát úgy kell beállítani, hogy a második frakció elemzésekor a telített szénhidrogéneket jelentő csúcsok alacsonyak legyenek (lásd az 1c. ábrát); amennyiben nem jelennek meg, de a standard csúcs intenzitása alacsony, csökkenteni kell a térfogatot. Az első és a második frakció összetevői közötti szétválasztásra máskülönben nincs szükség, mivel amennyiben a gázkromatográfiás körülmények a 6.3.1. pontnak megfelelően vannak beállítva, akkor a gázkromatográfiás elemzési eljárás során nem fordul elő a csúcsok átfedése. A második frakció térfogatának optimalizálására általában nincsen szükség, mivel a további komponensek szétválasztása megfelelő. A standard oldatnál 1,5 perccel alacsonyabb retenciósidőnél megfigyelhető nagyméretű csúcs jelenléte azonban a szkvalénnek köszönhető és a rossz felbontás jele.

6.2.2. Párolja be a második fázist a forgó bepárlóban 30 °C hőmérsékleten csökkentett nyomás mellett, amíg ki nem szárad, majd ezután azonnal oldja fel a maradékot 0,2 ml hexánban. Az elemzés megkezdéséig tartsa az oldatot hűtőszekrényben.

8. megjegyzés:

A 6.1.3. és a 6.2.2. maradék nem tartható szárazon és szobahőmérsékleten. A keletkezésüket követően azonnal hozzá kell adni az oldószert, és hűtőszekrényben kell tárolni.

▼ **M11****6.3. Gázkromatográfiás eljárás**

6.3.1. Az osztott befecskendezés üzemi körülményei:

- injektor hőmérséklete: 300 °C,
- detektor hőmérséklete: 320 °C,
- integráló-rögzítő berendezés: az integrálás paramétereit úgy kell rögzíteni, hogy a területek pontos becslését eredményezze. Javasolható a völgy-völgy módszer használata,
- érzékenység: a minimális hígítás 16-szorosa,
- a befecskendezett oldat mennyisége: 1 µl,
- a kemence beprogramozott hőmérséklete: 235 °C kiindulási hőmérséklet 6 percen keresztül, majd percenként 2 °C-os hőmérséklet-emelkedés 285 °C hőmérsékletig,
- injektor 1:15 arányú áramlásosztóval,
- vivőgáz: hélium vagy hidrogén megközelítőleg 120 kPa nyomással.

Ezek a körülmények a kromatográfiás berendezés és az oszlop jellemzőinek megfelelően szabályozhatók be úgy, hogy a kromatogramok megfeleljenek az alábbi követelményeknek: belső standard csúcsa megközelítőleg a 6.3.2. pontban megadott időn belül öt perccel; a belső standard csúcsa a teljes skálának legalább 80 %-a.

A gázkromatográfiás rendszert a kolesztadién törzsoldatának (5.6.) és az n-nonakozán oldat (5.8.) befecskendezésével kell ellenőrizni. A koleszta-3, 5-dién csúcsnak az n-nonakozán csúcs előtt kell jelentkeznie (1c. ábra); amennyiben nem ez történik, két dolgot tehet: csökkenti a kemence hőmérsékletét és/vagy kevésbé poláris oszlopot használ.

6.3.2. A csúcsok azonosítása

A belső standard csúcsa megközelítőleg 19 percnél jelentkezik, és a 3,5-sztigmasztadiéné pedig ehhez képest megközelítőleg 1,29 perc retenciósi időnél (lásd az 1b. ábrát). A 3,5-sztigmasztadién rendszerint egy kis mennyiségű izomerrel együtt fordul elő, és a kettő együtt eluálódik egyetlen kromatografikus csúcsként. Ha azonban az oszlop túlságosan poláris vagy magas felbontóképességet mutat, az izomer egy kis csúcsként jelentkezik a 3,5-sztigmasztadién csúcsa előtt és ahhoz közel (lásd 2. ábra). Annak biztosítására, hogy a sztigmasztadiének egyetlen csúcsként eluálódjanak, javasolható egy kevésbé poláris vagy nagyobb belső átmérőjű oszlop használata.

9. megjegyzés:

Referenciaként sztigmasztadiéneket finomított növényi olaj elemzéséből lehet nyerni, kisebb mennyiségű minta használatával (1-2 g). A sztigmasztadiének egy kimagasló és könnyen azonosítható csúcsot eredményeznek.

6.3.3. Mennyiségi elemzés

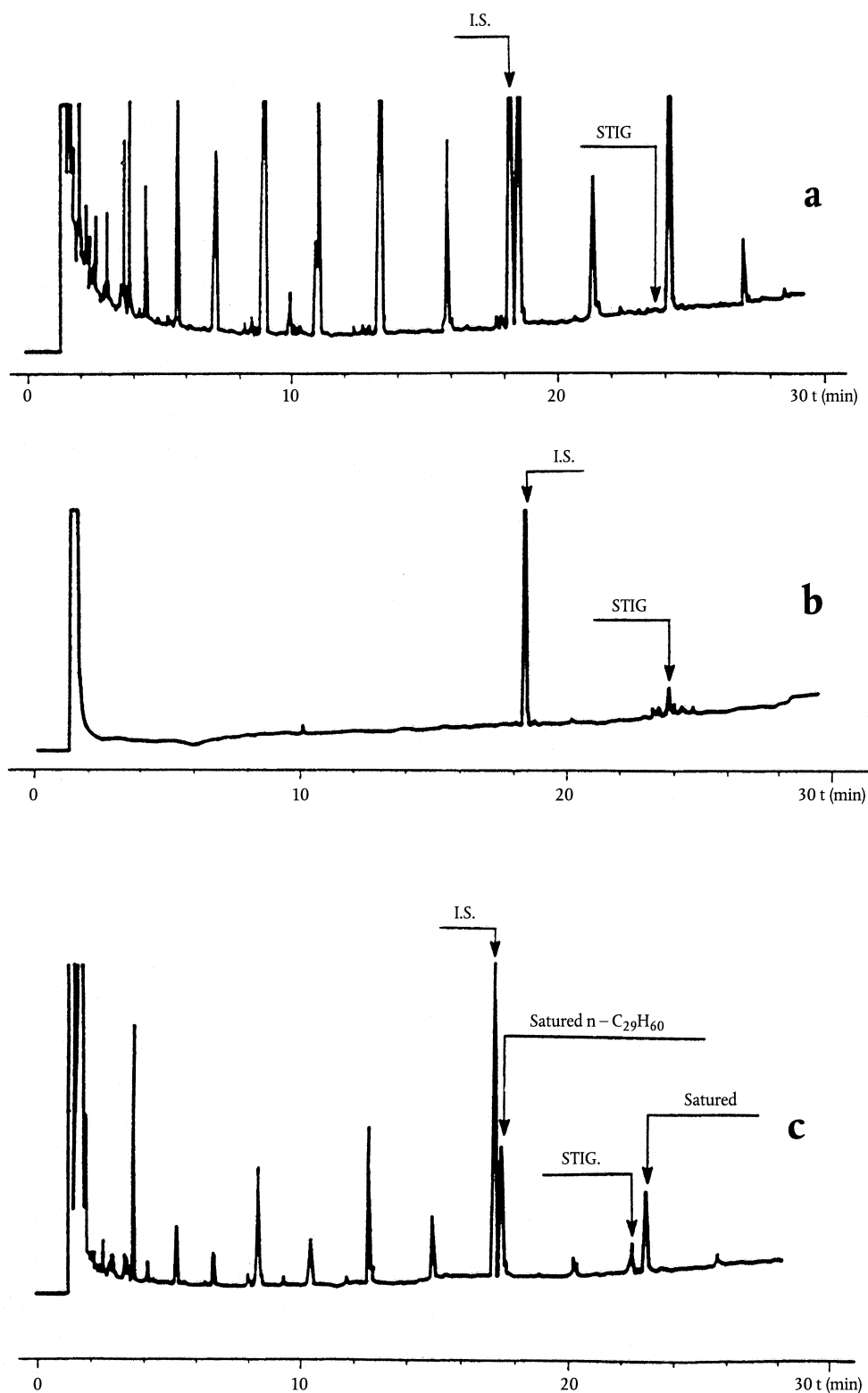
A sztigmasztadién-tartalom az alábbi képlet alapján határozható meg:

$$\text{sztigmasztadiének mennyisége mg/kg-ban} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

▼ M11

ahol: A_s = a sztigmatadién-csúcs területe (amennyiben a csúcs két izomerre bomlik fel, a két csúcs területének összege),
 A_c = a belső standard területe (kolesztadién),
 M_c = a hozzáadott standard tömege, mikrogrammban,
 M_o = a felhasznált olaj tömege grammban.

Érzékelési korlát: megközelítőleg 0,01 mg/kg.

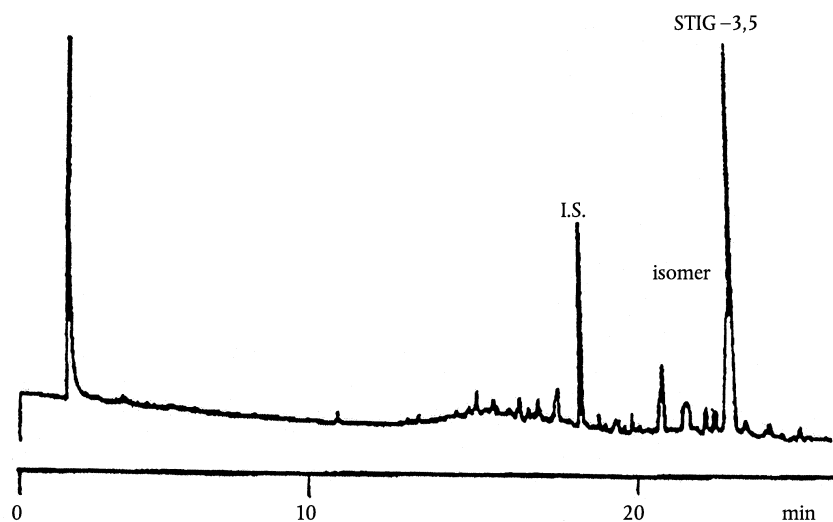
▼ M11

1. ábra

Az ömlesztett kovaföld kapilláris oszlopon (0,25 mm belső átmérő, 25 m, 5 % fenilmetil-szilikon bevonat 0,25 μm rétegvastagságban) elemzett olívaolaj-mintákból kapott gázkromatogramok.

▼M11

- a) Első frakció (30 ml) szűz olívaolajból, a standard csúcaival.
- b) Második frakció (40 ml) 0,10 mg/kg sztigmasztadién-tartalmú olívaolajból.
- c) Második frakció (40 ml), amely tartalmaz egy kis mennyiséget az első frakcióból.

**2. ábra**

DB-5 oszlopon elemzett finomított olívaolaj gázkromatogramja, amelyen látszik a 3,5-sztigmasztadién izomerje.

▼ **M25***XVIII. MELLÉKLET***AZ ECN-42-ES TRIACIL-GLICERINEK TÉNYLEGES ÉS ELMÉLETI MENNYISÉGE KÖZÖTTI KÜLÖNBSÉG MEGHATÁROZÁSA****1. HATÁSKÖR**

A módszer a nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) elemzés révén az olajban mért, 42-es ekvivalens szénszámú triacil-glicerinek kísérleti értékeinek (ECN-42_{HPLC}) és a zsírsavösszetételből kiszámított, 42 ekvivalens szénszámú triacil-glicerinek elméleti értékének (ECN-42_{elméleti}) abszolút különbségét határozza meg.

2. ALKALMAZÁSI KÖR

A módszer olívaolajokra alkalmazandó. A módszer a (linolsavban gazdag) magolajok kis mennyiségeinek jelenlétét hivatott kimutatni bármilyen kategóriájú olívaolajban.

3. A MÓDSZER ALAPELVE

Az ECN-42-es triacil-glicerinek nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás elemzés révén meghatározott mennyisége és az ECN-42-es triacil-glicerinek (a zsírsavösszetétel gáz-folyadék-kromatográfiás módszer [GLC] szerint meghatározott) elméleti mennyisége a valódi olívaolajok esetében bizonyos határértéken belül megegyezik. Amennyiben a különbség meghaladja az egyes olajtípusokra elfogadott értékeket, megállapítható, hogy az olaj magolajokat tartalmaz.

4. MÓDSZER

Az ECN-42-es triacil-glicerinek elméleti mennyiségének megállapítására és a HPLC-adattal összevetve kapott különbség kiszámítására szolgáló módszer végrehajtása alapvetően más módszerek révén nyert analitikai adatok koordinációjával történik. A módszeren belül három fázis különíthető el: a zsírsavösszetétel meghatározása kapilláris gázkromatográfiával, az ECN-42-es triacil-glicerinek összetételének elméleti kiszámítása és az ECN-42-es triacil-glicerinek HPLC-vel történő meghatározása.

4.1. Eszközök

4.1.1. 250 és 500 ml-es gömblombikok.

4.1.2. 100 ml-es főzőpoharak.

4.1.3. Üveg kromatográfiás kolonna, 21 mm belső átmérővel, 450 mm hosszúsággal, csappal és felül normalizált kúpos furattal.

4.1.4. 250 ml-es elválasztó tölcser, alul normalizált kúpos dugóval a kolonna tetejéhez való csatlakoztatás biztosítására.

4.1.5. 600 mm hosszú üvegpálca.

4.1.6. 80 mm átmérőjű üvegtölcser.

4.1.7. 50 ml-es mérőlombikok.

4.1.8. 20 ml-es mérőlombikok.

4.1.9. Rotációs bepárló.

4.1.10. Nagy teljesítményű folyadékkromatográf, amely lehetővé teszi a kolonna hőmérsékletének termostatikusan szabályozását.

4.1.11. 10 µl befecskendezők.

4.1.12. Detektor: differenciál-refraktométer. A teljes skálán mért érzékenység legalább a refraktív index 10^{-4} egysége.

▼ M25

4.1.13. Kolonna: 250 mm hosszú és 4,5 mm belső átmérőjű rozsdamentes acél cső, megtöltve 5 µm átmérőjű, 22–23 %-ban oktadecil-szilán alakban lévő szenet tartalmazó szilikarészecskékkel.

4.1.14. Adatfeldolgozó szoftver.

4.1.15. Kb. 2 ml térfogatú ampullák, teflonbevonatú szeptummal és csavaros kupakkal.

4.2. Reagensok

A reagenseknek analitikai tisztaságúnak kell lenniük. Az eluáló oldószer, melyeket gáztalanítani kell, többször újra felhasználhatók anélkül, hogy ez hatással lenne a szétválasztásra.

4.2.1. Kromatográfiai minőségű petróleum-éter (40–60 °C) vagy hexán.

4.2.2. Frissen desztillált, peroxidmentes etil-éter.

4.2.3. Eluáló oldószer az olaj oszlopkromatográfiával történő tisztítására: petróleum-éter és etil-éter 87:13 térfogatarányú elegye.

4.2.4. Szilikagél, 70–230 mesh, „Merck 7734” típus, 5 tömegszázalékon standardizált víztartalommal.

4.2.5. Üvegyapot.

4.2.6. Aceton HPLC-hez.

4.2.7. Acetonitril vagy propionitril HPLC-hez.

4.2.8. Eluáló oldószer HPLC-hez: acetonitril + aceton (az arányokat a kívánt elválasztásnak megfelelően kell beállítani, 50:50 arányú keverékkel kezdve) vagy propionitril.

4.2.9. Oldáskönnyítő oldószer: aceton.

4.2.10. Referenciatrigliceridek: használhatók a kereskedelmi forgalomban kapható trigliceridek (tripalmitin, triolein stb.), ekkor a retenciósi időket az ekvivalens szénszám függvényében kell ábrázolni, vagy használhatók szójaolajról (szójaolaj, valamint olívaolaj és tiszta olívaolaj 30:70 arányú keverékével) készült referenciakromatogramok (lásd az 1. és 2. megjegyzést, illetve az 1–4. ábrát).

4.2.11. Szilárd fázisú extrakciós oszlop szilikafázissal, 1 g, 6 ml.

4.3. A minták előkészítése

Mivel több interferáló anyag hamis pozitív eredményekhez vezethet, a mintát mindig tisztítani kell, a sütőolajokban található poláris vegyületek meghatározásához használt 2507-es IUPAC-módszernek megfelelően.

4.3.1. A kromatográfias kolonna előkészítése

Töltse meg a kolonnát (4.1.3.) körülbelül 30 ml eluáló oldószerrel (4.2.3.), majd a kolonna belsejébe helyezzen üvegyapotot (4.2.5.), amelyet az üvegpálca segítségével (4.1.5.) nyomjon a kolonna aljára.

Egy 100 ml-es főzőpohárban szuszpendáljon 25 g szilikagélt (4.2.4.) 80 ml eluáló keverékben (4.2.3.), majd üvegtölcsér (4.1.6.) segítségével öntse a kolonnába.

Annak biztosításához, hogy a szilikagél teljes mennyisége átjusson a kolonnába, mossa ki a főzőpoharat az eluáló keverékkel, és a mosásra használt mennyiségeket is juttassa a kolonnába.

Nyissa ki a csapot, és annyi oldószert engedjen a kolonnából eluálni, hogy annak szintje kb. 1 cm-rel lépje túl a szilikagél szintjét.

▼ **M25**4.3.2. *Oszlopkromatográfia*

Mérjen be 0,001 g pontossággal $2,5 \pm 0,1$ g, előzőleg szűrt, homogénizált és szükség esetén vízmentesített olajat egy 50 ml-es mérőlombikba (4.1.7).

Oldja fel körülbelül 20 ml eluáló oldószerben (4.2.3.). Az oldódás elősegítéséhez szükség esetén enyhén hevítse. Hűtse szobahőmérsékleten, és az eluáló oldószerrel állítsa be a volument.

Mérőpipetta segítségével tegyen 20 ml oldatot a 4.3.1. pont szerint előkészített kolonnába, nyissa meg a csapot, és engedje az oldószert a szilikagélréteg szintjéig eluálni.

Ezután eluáljon 150 ml eluáló oldószerrel (4.2.3.), az oldószer sebességét kb. 2 ml/percre beállítva (így kb. 60–70 percig tart, amíg 150 ml átmegy a kolonnán).

Az eluátumot egy előzőleg sütőben kitarált, 250 ml-es gömblombikban (4.1.1.) fogja fel, és tömegét pontosan mérje meg. Rotációs bepárló (4.1.9.) segítségével, csökkentett nyomáson távolítsa el az oldószert, és mérje meg a HPLC-elemzéshez és metil-észter készítéséhez használatos oldat elkészítéséhez szükséges maradékanyag tömegét.

A kolonnából az extra szűz, a szűz, a közönséges, a finomított és az olívaolaj kategóriák esetében legalább a minta 90 %-át, lampante és olívaogácsa-olajok esetében legalább 80 %-át kell visszanyerni.

4.3.3. *Szilárd fázisú extrakcióval történő (SPE) tisztítás*

A szilikátöltetű SPE-kolonnát 6 ml hexán (4.2.3) vákuumban – a kiszáritás elkerülése mellett – történő áteresztésével kell aktiválni.

Mérjen ki 0,001 g pontossággal 0,12 g-ot 2 ml-es ampullába (4.1.15), és oldja fel 0,5 ml hexánnal (4.2.3.).

Töltse meg az SPE-kolonnát az oldattal, és vákuumban eluálja 10 ml (87:13 térfogatarányú) hexán-dietil-éterrel (4.2.3.).

Az összegyűjtött frakciót a rotációs bepárlóval (4.1.9.) csökkentett nyomás mellett, szobahőmérsékleten, szárazságig kell bepárolni. A maradékanyagot 2 ml, triacilglicerol elemzéséhez szolgáló acetonban (4.2.6.) fel kell oldani.

4.4. **HPLC-elemzés**4.4.1. *Minták előkészítése kromatográfias elemzéshez*

A vizsgálati mintából készítsen 5 %-os oldatot, úgy, hogy egy 10 ml-es mérőlombikba mérje ki a minta $0,5 \pm 0,001$ g-ját, és az oldáskönnyítő oldószerrel (4.2.9.) 10 ml-ig töltsen fel.

4.4.2. *Eljárás*

Állítsa össze a kromatográfias rendszert. A teljes rendszer kitisztításához szivattyúzza 1,5 ml/perc sebességgel az eluáló oldószert (4.2.8.). Várjon, ameddig kialakul egy stabil alapvonal.

Fecskendezzen be 10 μ l mennyiségű, a 4.3. pont szerint előkészített mintát.

4.4.3. *Az eredmények kiszámítása és kifejezése*

Használja a területnormálási módszert, azaz tételjeze fel, hogy az ECN-42–ECN-52-es triacil-glicerinekhez tartozó csúcsok alatti területek összege 100 %.

Számítsa ki az egyes trigliceridek relatív százalékát a következő képlet segítségével:

$$\text{triglicerid \%} = \text{csúcs alatti terület} \times 100 / \text{csúcs alatti területek összege}.$$

Az eredményeket legalább két tizedesjegyre kell megadni.

Lásd az 1–4. megjegyzést.

▼ **M25**4.5. **Triacil-glicerinek összetételének (mólszázalék) kiszámítása zsírsav-összetéleli adatokból (területszázalék)**4.5.1. *A zsírsavösszetétel meghatározása*

A zsírsavösszetételt az ISO 5508 segítségével, kapilláris kolonna felhasználásával kell meghatározni. A metil-észtereket a COI/T.20/Doc. No 24 szerint kell elkészíteni.

4.5.2. *A számításhoz szükséges zsírsavak*

A glicerideket ekvivalens szénszámuk (ECN) alapján kell csoportosítani, figyelembe véve az ECN és a zsírsavak közötti alábbi ekvivalenciákat. Csak a 16 és 18 szénatomszámú zsírsavakat kellett figyelembe venni, az olívaolaj tekintetében ugyanis kizárólag ezek fontosak. A zsírsavakat 100 %-ra kell normálni.

Zsírsav	Rövidítés	Molekulatömeg (MW)	ECN
Palmitinsav	P	256,4	16
Palmitoleinsav	Po	254,4	14
Sztearinsav	S	284,5	18
Olajsav	O	282,5	16
Linolsav	L	280,4	14
Linolénsav	Ln	278,4	12

4.5.3. *A területszázalék mólra való átszámítása valamennyi zsírsav esetében (1)*

$$\text{mol P} = \frac{\text{terület \% P}}{\text{MW P}} \quad \text{mol S} = \frac{\text{terület \% S}}{\text{MW S}} \quad \text{mol Po} = \frac{\text{terület \% Po}}{\text{MW Po}}$$

$$\text{mol O} = \frac{\text{terület \% O}}{\text{MW O}} \quad \text{mol L} = \frac{\text{terület \% L}}{\text{MW L}} \quad \text{mol Ln} = \frac{\text{terület \% Ln}}{\text{MW Ln}}$$

4.5.4. *Zsírsavak 100 %-ra történő normálása (2)*

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

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

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

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

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

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

Az eredmény azt adja meg, hogy a triacil-glicerinekben az összes (1, 2, 3-) pozícióban egyes zsírsavak milyen mólszázalékos arányban vannak jelen.

Ezután a P és S telített zsírsavak (SFA) és a Po, O, L és Ln telítetlen zsírsavak (UFA) összegét kell kiszámítani, az alábbiak szerint (3):

$$\text{mol \% SFA} = \text{mol \% P} + \text{mol \% S}$$

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

▼ **M25**4.5.5. *A zsírsavösszetétel kiszámítása a triacil-glicerinek 2- és 1,3- pozícióiban*

A zsírsavakat az alábbiak szerint három csoportra osztják: az egyik csoport a 2- pozícióban, két másik, azonos csoport pedig az 1- és a 3- pozícióban lévő zsírsavakra vonatkozik, ahol a telített (P és S) és telítetlen zsírsavakra (Po, O, L és Ln) különböző tényezőket alkalmaznak.

4.5.5.1. Telített zsírsavak a 2- pozícióban [P(2) és 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. Telítetlen zsírsavak a 2- pozícióban [Po(2), O(2), L(2) és Ln(2)] (5):

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

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

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

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

4.5.5.3. 1,3- pozícióban lévő zsírsavak [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) és 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. *Triacil-glicerinek kiszámítása*

4.5.6.1. Egy zsírsavval rendelkező triacil-glicerinek (AAA, itt 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. Két zsírsavval rendelkező triacil-glicerinek (AAB, itt 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. Három különböző zsírsavval rendelkező triacil-glicerinek (ABC, itt 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. ECN-42-es triacil-glicerinek

Az ECN-42-es triacil-glicerineket a (7), (8) és (9) egyenleteknek megfelelően kell kiszámítani, és a HPLC-nél a várt elúció sorrendjében (általában csak három csúcs) megadni.

LLL

PoLL és LPOl pozíciós izomer

OLLn, valamint OLnL és LnOL pozíciós izomerek

PoPoL és PoLPo pozíciós izomer

PoOLn, valamint OPOLn and OLnPo pozíciós izomerek

PLLn, valamint LLnP és LnPL pozíciós izomerek

PoPoPo

SLnLn és LnSLn pozíciós izomer

PPOLn, valamint PLnPo és PoPLn pozíciós izomerek

Az ECN-42-es triacil-glicerineket a kilenc triacilglicerol – pozíciós izomerjeikkel együtt vett – összege révén, legalább két tizedesjegyre kell megadni.

5. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Össze kell hasonlítani a kiszámított elméleti tartalmat és a HPLC-elemzéssel meghatározott tartalmat. Ha a HPLC-adatból kivont elméleti adat különbsége abszolút értékben nagyobb, mint a megfelelő olajkategóriára a szabványban meghatározott értékek, a minta magolajat tartalmaz.

Az eredményeket két tizedesjegyre kell megadni.

6. PÉLDA (A SZÁMOK A MÓDSZERLEÍRÁSBAN SZEREPLŐ PONTOKRA UTALNAK)

— 4.5.1. *Zsírsavak mólszázalékának kiszámítása GLC-adatokból (normált területszázalék)*

A GLC-módszerrel a zsírsavösszetételre az alábbi adatokat kaptuk:

Zsírsav	P	S	Po	O	L	Ln
MW	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
Terület %	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼ **M25**

- 4.5.3. *A terület százalék mólra való átszámítása valamennyi zsírsav esetében (lásd az (1) képletet)*

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

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

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

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

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

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

$$\text{Összesen} = 0,35821 \text{ mol triacilglicerol}$$

- 4.5.4. *Zsírsavak 100 %-ra történő normálása (lásd a (2) képletet)*

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

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

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

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

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

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

$$\text{Összes mol \%} = 100 \%$$

Triacilglicerolok 1,2,3- pozíciójában lévő telített és telítetlen zsírsavak összege (lásd a (3) képletet):

$$\text{mol \% SFA} = 10,888 \% + 2,944 \% = \mathbf{13,829 \%}$$

$$\text{mol \% UFA} = 100,000 \% - 13,831 \% = \mathbf{86,171 \%}$$

- 4.5.5 *A zsírsavösszetétel kiszámítása a triacil-glicerinek 2- és 1,3- pozícióiban*

- 4.5.5.1. *Telített zsírsavak a 2- pozícióban [P(2) és S(2)] (lásd a (4) képletet)*

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

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

- 4.5.5.2. *Telítetlen zsírsavak a 2- pozícióban [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) és Ln(1,3)] (lásd az (5) képletet)*

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

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

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

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

▼ **M25**

- 4.5.5.3 1,3-pozícióban lévő zsírsavak [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) és Ln(1,3)] (lásd a (6) képletet)

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

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

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

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

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

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

- 4.5.6. *Triacil-glicerinek kiszámítása*

Az sn-2- és sn-3- pozíciókban kiszámított zsírsavösszetételből:

Zsírsav	1,3- poz.	2- poz.
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 %
Össz	100,0 %	100,0 %

az alábbi triacil-glicerinek kiszámítására kerül sor:

LLL

PoPoPo

PoLL 1 pozíciós izomerrel

SLnLn 1 pozíciós izomerrel

PoPoL 1 pozíciós izomerrel

PPoLn 2 pozíciós izomerrel

OLLn 2 pozíciós izomerrel

PLLn 2 pozíciós izomerrel

PoOLn 2 pozíciós izomerrel

- 4.5.6.1. Egy zsírsavval rendelkező triacil-glicerinek (LLL, PoPoPo) (lásd a (7) képletet)

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

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

▼ **M25**

— 4.5.6.2. Két zsírsavval rendelkező triacil-glicerinek (PoLL, SLnLn, PoPoL) (lásd a (8) képletet)

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

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

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. Három különböző zsírsavval rendelkező triacil-glicerinek (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) (lásd a (9) képletet)

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

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

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

0,00761 mol PPOln

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

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

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

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 triacil-glicerinek

1. megjegyzés: Az eluálási sorrend meghatározható az ekvivalens szénszámok kiszámításával, amelyet gyakran az $ECN = CN - 2n$ összefüggéssel adnak meg (ahol a CN a szénatomszám, az n pedig a kettős kötések száma), de a kettős kötések eredetének figyelembevételével sokkal pontosabban számítható. Amennyiben n_o , n_l , illetve n_{in} az olajsavra, linolsavra, illetve linolénsavra jellemző kettős kötések számát jelenti, az ekvivalens szénszám a következő képlettel számítható ki:

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

ahol a d_o , d_l és d_{in} együtthatókat a referenciatrigliceridek alapján lehet kiszámolni. Az e módszerben meghatározott feltételek mellett a kapott összefüggés megközelítőleg a következő:

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

2. megjegyzés: Több referenciatriglicerid segítségével ki lehet számítani a felbontást a triolein tekintetében is:

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

a redukált retenciós idő felhasználásával: $RT^1 = RT - RT_{oldósz}$.

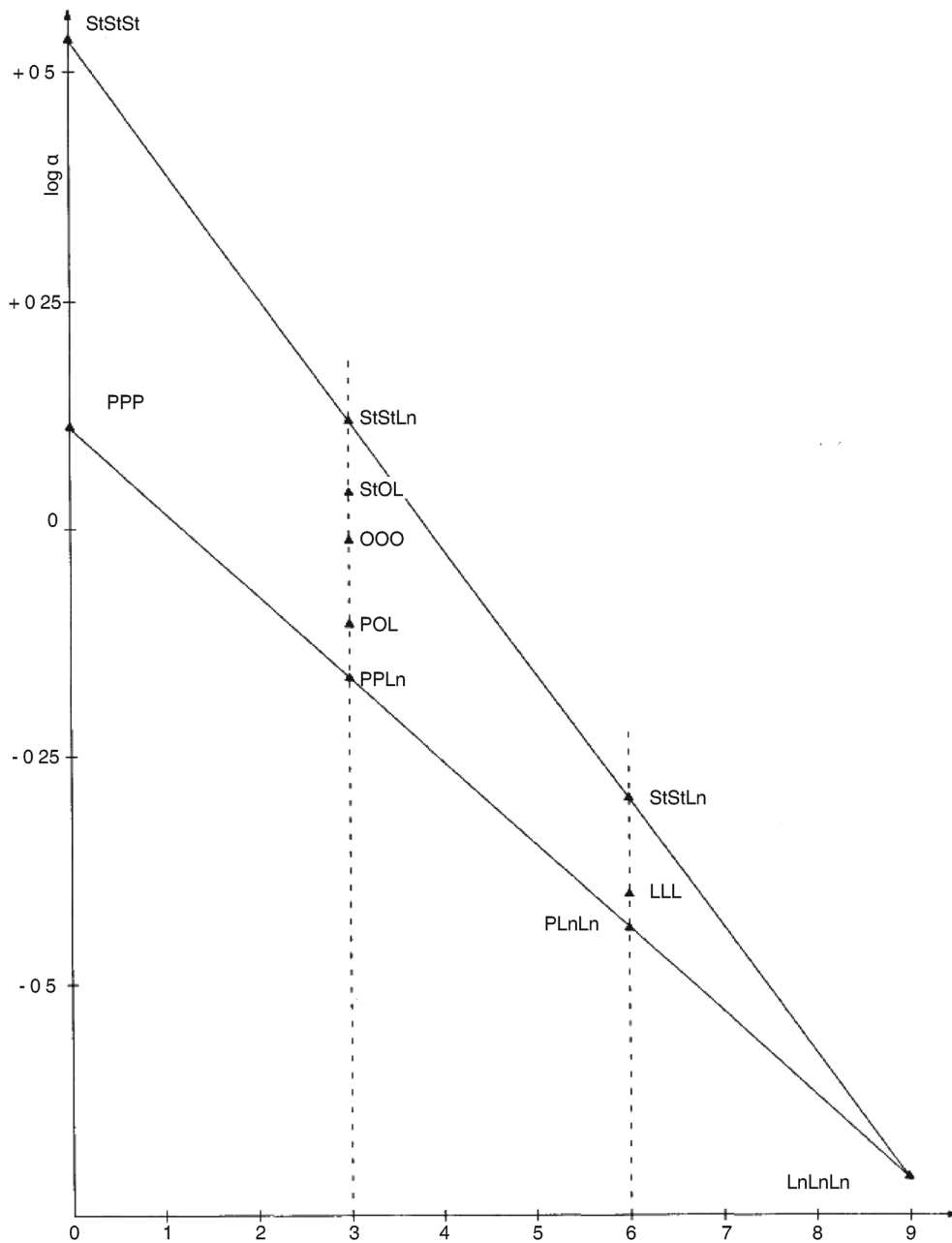
A $\log \alpha$ és az f (a kettős kötések száma) függvénye lehetővé teszi a retenciós értékek kiszámítását a referenciatrigliceridekben található zsírsavak minden trigliceridjére (lásd az 1. ábrát).

3. megjegyzés: Az oszlop határfoka tegye lehetővé a trilinolein csúcsának a szomszédos retenciós idejű trigliceridektől történő egyértelmű elkülönülését. Az elúciót az ECN-52-es csúcsig kell végezni.

4. megjegyzés: Ezen meghatározás szempontjából valamennyi fontos csúcs területének pontos mérése akkor biztosított, ha az ECN-50-hez tartozó második csúcs az adatrögzítő készülék teljes skálájának 50 %-ánál van.

▼ M25

1. ábra

A log α és f (kettős kötések száma) grafikonja

Kettős kötések száma

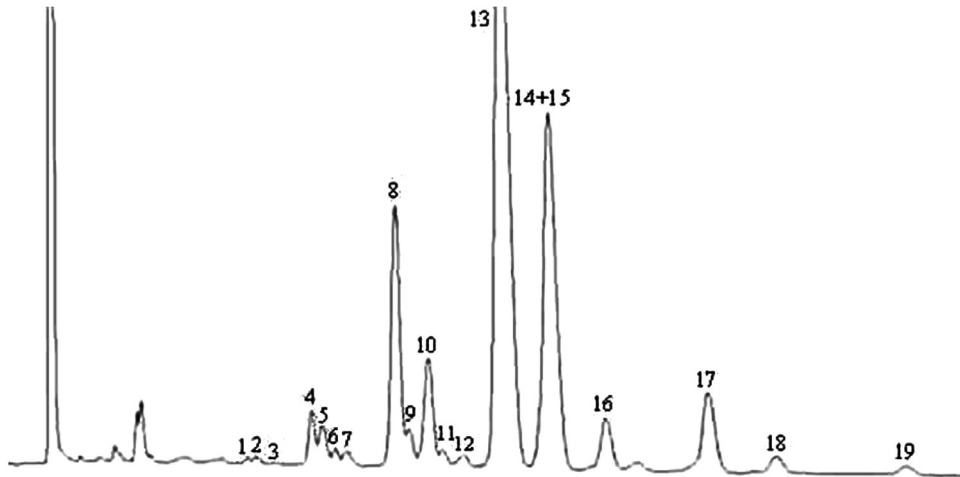
La: laurinsav My: mirisztinsav; P: palmitinsav; S: sztearinsav; O: olajsav; L: linolsav; Ln: lino-
lénsav

▼ **M25**

2. ábra

Alacsony linolsavtartalmú olívaolaj

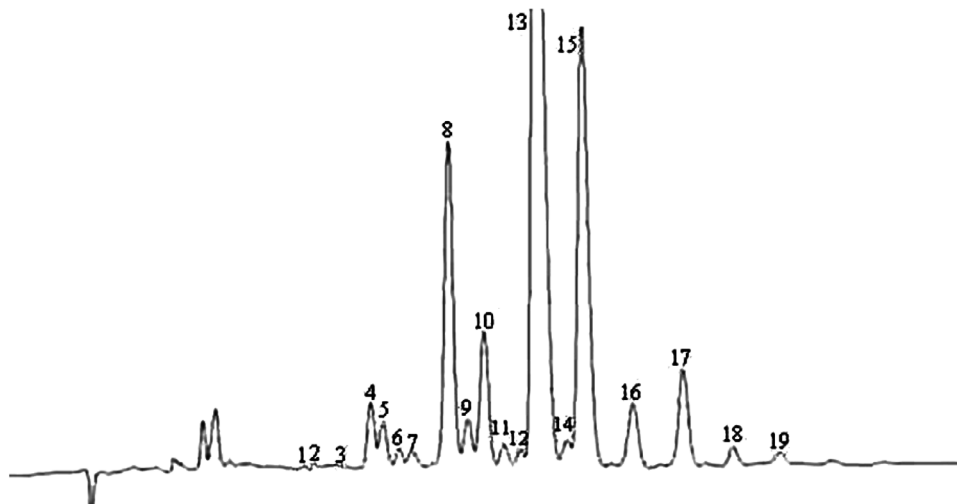
a)



Oldószer: aceton/acetonitril.

a) *profil*: A kromatográfiás csúcsok fő összetevői: **ECN-42**: (1) LLL + PoLL; (2) OLLn + PoOLn; (3) PLLn; **ECN-44**: (4) OLL + PoOL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPOPo; (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN-48**: (13) OOO + PoPP; (14 + 15) SOL + POO; (16) POP; **ECN-50**: (17) SOO; (18) POS + SLS.

b)



Oldószer: propionitril.

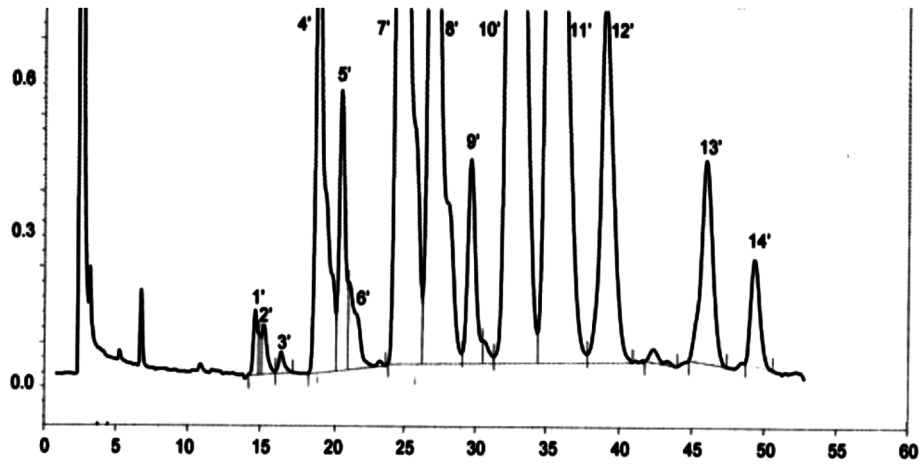
b) *profil*: A kromatográfiás csúcsok fő összetevői: **ECN-42**: (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN-44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPOPo + PPOl; **ECN-46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN-48**: (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN-50**: (17) SOO; (18) POS + SLS.

▼ M25

3. ábra

Magas linolsavtartalmú olívaolaj

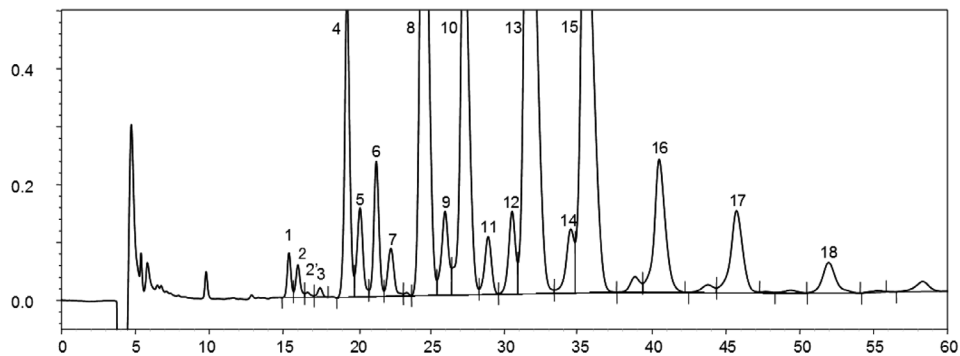
a)



Oldószer: aceton/acetonitril (50:50).

a) *profil*: A kromatográfiás csúcsok fő összetevői: **ECN-42**: (1') LLL + PoLL; (2') OLLn + PoOLn; (3') PLLn; **ECN-44**: (4') OLL + PoOL; (5') OOLn + PLL; (6') POLn + PPOPo; **ECN-46**: (7') OOL + PoOO; (8') PLO + SLL + PoOP; (9') PLP + PoPP; **ECN-48**: (10') OOO; (11') POO + SLL + PPOo; (12') POP + PLS; **ECN-50**: (13') SOO; (14') POS + SLS

b)



Oldószer: propionitril.

b) *profil*: A kromatográfiás csúcsok fő összetevői: **ECN-42**: (1) LLL; (2 + 2') OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN-44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPOPo + PPOl; **ECN-46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; **ECN-48**: (12) PLP; (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN-50**: (17) SOO; (18) POS + SLS; **ECN-52**: (19) AOO.

▼ M19

ANNEX XIX

▼ M28**AZ ALIFÁS ÉS A TRITERPÉNES ALKOHOLTARTALOM
MEGHATÁROZÁSA KAPILLÁRIS GÁZKROMATOGRÁFIÁVAL**

1. TÁRGY

Ez a melléklet egy az olajok és zsírok alifás és triterpénes alkoholtartalmának meghatározására szolgáló módszert írnak le.

▼ M19

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

The fatty substance, with 1-eicosanol added as internal standard, is saponified with ethanolic potassium hydroxide and then the unsaponifiable matter extracted with ethyl ether. The alcoholic fraction is separated from the unsaponifiable matter by chromatography on a basic silica gel plate; the alcohols recovered from the silica gel are transformed into trimethylsilyl ethers and analysed by capillary gas chromatography.

3. EQUIPMENT

- 3.1. 250 ml round-bottomed flask fitted with a reflux condenser having ground-glass joints.
- 3.2. 500 ml separating funnel.
- 3.3. 250 ml round-bottomed flasks.
- 3.4. Chromatographic tank for thin-layer chromatographic analysis, for glass plates of dimensions 20 x 20 cm.
- 3.5. Ultraviolet lamp having a wavelength of 366 or 254 nm.
- 3.6. 100 µl and 500 µl microsyringes.
- 3.7. A cylindrical filter funnel with a G3 porous septum (porosity 15 to 40 µm) of diameter approximately 2 cm and a depth of some 5 cm, with an attachment suitable for filtration under vacuum and a 12/21 male ground glass joint.
- 3.8. 50 ml vacuum conical flask with a 12/21 ground-glass female joint which can be fitted to the filter funnel (3.7).
- 3.9. A 10 ml test tube with a tapering bottom and a sealing stopper.
- 3.10. Gas chromatograph for use with a capillary column, and provided with a splitting system composed of:
 - 3.10.1. Thermostatic chamber for columns (column oven) to hold the temperature desired with a precision of ± 1 °C.
 - 3.10.2. A temperature-adjustable injection unit with a persilanised glass vapourising element.
 - 3.10.3. A flame ionisation detector and converter-amplifier.
 - 3.10.4. Recorder-integrator for operation with the converter-amplifier (3.10.3), with response time not exceeding one second and with variable paper-speed.
- 3.11. Glass or fused silica capillary column, of length 20 to 30 m, internal diameter 0,25 to 0,32 mm, with SE-52 or SE-54 liquid phase or equivalent, with a film thickness between 0,10 and 0,30 µm.
- 3.12. Microsyringe for gas chromatography, of 10 µl capacity with hardened needle.
- 3.13. Analytical balance sensitive to 1 mg (with 0,1 mg display).

▼ M19

4. REAGENTS
 - 4.1. Potassium hydroxide, approximately 2 N ethanolic solution: 130 g potassium hydroxide (minimum concentration 85 %) is dissolved, with cooling, in 200 ml distilled water and then made up to one litre with ethanol. The solution should be stored in a well-stoppered opaque glass bottle.
 - 4.2. Ethyl ether, pure for analysis.
 - 4.3. Anhydrous sodium sulphate, analytical purity.
 - 4.4. Glass plates coated with silica gel, without fluorescence indicator, thickness 0,25 mm (commercially available ready for use).
 - 4.5. Potassium hydroxide, approximately 0,2 N ethanolic solution; 13 g of potassium hydroxide are dissolved in 20 ml of distilled water and made up to one litre with ethanol.
 - 4.6. Benzene, for chromatography (see 5.2.2).
 - 4.7. Acetone, for chromatography (See 5.2.2).
 - 4.8. Hexane, for chromatography (see 5.2.2).
 - 4.9. Ethyl ether, for chromatography (see 5.2.2).
 - 4.10. Chloroform, for chromatography.

▼ M28

- 4.11. Referenciaoldat a vékonyréteg-kromatográfiához: C₂₀–C₂₈ alkoholok 0,5 %-os kloroformban, vagy olivapogácsa-olaj el nem szappanosítható anyagából az 5.2. pontban meghatározottak szerint kinyert alkoholos frakciók.

▼ M19

- 4.12. 0,2 % solution of 2', 7'-dichlorofluorescein in ethanol. Make slightly basic by adding a few drops of 2 N alcoholic potassium hydroxide solution.
 - 4.13. Anhydrous pyridine, for chromatography.
 - 4.14. Hexamethyl disilazane.
 - 4.15. Trimethylchlorosilane.
 - 4.16. Standard solutions of trimethylsilyl ethers of aliphatic alcohols from C₂₀ to C₂₈. They may be prepared from mixtures of pure alcohols at the time they are required for use.
 - 4.17. A 0,1 % (m/v) solution of 1-eicosanol in chloroform (internal standard).
 - 4.18. Carrier gas: hydrogen or helium, gas-chromatographic purity.
 - 4.19. Auxiliary gas: nitrogen, gas-chromatographic purity.
5. PROCEDURE
 - 5.1. **Preparation of the unsaponifiables**
 - 5.1.1. Using a 500 µl microsyringe place, into a 250 ml round-bottom flask, a volume of 0,1 % 1-eicosanol solution in chloroform (4.17) containing a quantity of 1-eicosanol approximately equal to 10 % of the aliphatic alcohols content in that portion of sample to be taken for analysis. For example, to 5 g of sample add 250 µl of the 0,1 % 1-eicosanol solution if olive oil and 1 500 µl if olive pomace oil.

Evaporate to dryness in current of nitrogen and then weigh accurately 5 g of the dry filtered sample into the same flask.

▼ M19

- 5.1.2. Add 50 ml of 2 N potassium hydroxide ethanolic solution, fit the reflux condenser and heat the apparatus to slight boiling on a steam bath, stirring continuously throughout the heating process until saponification has taken place (the solution becomes clear). Continue heating for a further 20 minutes and then add 50 ml of distilled water through the condenser. The condenser is then disconnected and the flask cooled to approximately 30 °C.
- 5.1.3. The contents of the flask are quantitatively transferred to a separating funnel of 500 ml capacity by adding distilled water several times, using a total of around 50 ml distilled water. Add approximately 80 ml of ethyl ether, shake vigorously for approximately 30 seconds and allow to settle (Note 1).

Separate off the lower aqueous phase collecting it in a second separating funnel. Two further extractions are effected on the aqueous phase, in the same manner, using each time 60 to 70 ml ethyl ether.

Note 1: Emulsions may be eliminated by adding, using as a spray, small quantities of ethyl alcohol or methyl alcohol.

- 5.1.4. The ethyl ether extracts are combined in a separating funnel and washed with distilled water (50 ml at a time) until the washing water gives a neutral reaction.

Discard the washing water, dry with anhydrous sodium sulphate and filter, into a flask of 250 ml capacity which has been weighed beforehand, the funnel and filter being washed with small quantities of ethyl ether which are added to the total.

- 5.1.5. Distil the ether down to a few ml, then bring to dryness under a slight vacuum or in a current of nitrogen, completing drying in an oven at 100 °C for approximately a quarter of an hour, and then weigh after cooling in a desiccator.

5.2. Separation of alcoholic fractions

- 5.2.1. Preparation of basic TLC plates: the silica gel plates (4.4) are immersed completely, in 0,2 N potassium hydroxide solution (4.5) for 10 seconds, and then left to dry for two hours under an extractor hood and finally placed in an oven at 100 °C for one hour.

Remove from the oven and keep in a calcium chloride desiccator until required for use (plates treated in this way must be used within 15 days).

Note 2: When basic silica gel plates are used to separate the alcoholic fraction there is no need to treat the unsaponifiables with alumina. It follows that all acid compounds (fatty acids and others) are retained at the origin thereby obtaining both aliphatic alcohol and terpenic alcohol bands which are both separated distinctly from the sterol band.

- 5.2.2. Place a 65/35 by volume hexane/ethyl ether mixture in the plate-developing chamber to a depth of approximately 1 cm ⁽¹⁾.

Close the chamber using an appropriate cover and leave for half an hour to allow equilibration between vapour and liquid. Strips of filter paper dipping into the eluent may be affixed to the inside surfaces of the tank to reduce the development time by approximately one third and obtain more uniform, regular elution of the components.

⁽¹⁾ In these cases in particular, a 95/5 by volume benzene/acetone eluent mixture must be used to obtain distinct band separation.

▼ M19

Note 3: The developing solution must be replaced for each analysis in order to obtain reproducible developing conditions.

- 5.2.3. An approximately 5 % solution of unsaponifiable matter (5.1.5) in chloroform is prepared and 0,3 ml of the solution is streaked as a uniform strip of minimum thickness, using the 100 µl microsyringe, on a TLC plate at approximately 2 cm from the bottom of the TLC plate. Aligned with the origin, 2 to 3 µl of the aliphatic alcohols reference solution (4.11) are spotted for the identification of the aliphatic alcohols band after development has been completed.
- 5.2.4. Place the plate inside the development tank as stated in 5.2.2. The ambient temperature should be maintained between 15 and 20 °C. Immediately close the chamber with the cover and allow to elute until the solvent front reaches approximately 1 cm from the upper edge of the plate.

The plate is then removed from the development chamber and the solvent evaporated under a hot air current or the plate is left for a while under the extractor hood.

▼ M28

- 5.2.5. A lemezt kis mértékben és egyenletesen be kell permetezni 2,7-diklórfloreszcein oldattal, amikor ultraibolya fényben nézik azt. Az alifás alkoholsávokat a referenciaoldat foltjaival történő összehasonlítás alapján lehet felismerni: jelölje be a sávok határait fekete ceruzával; együttesen körvonalazva az alifás alkoholok sávját és a közvetlenül felette lévő sávot, amely a terpénes alkoholok sávjá (4. megjegyzés).

4. megjegyzés: Az alifás alkoholok sávját és a terpénes alkoholok sávját csoportosítani kell, tekintettel arra, hogy egyes alifás alkoholok átvándorolhatnak a triterpénes alkoholok sávjába. A VRK elválasztásra példa található a függelék 1. ábrájában.

- 5.2.6. A kijelölt területen található szilikagélt kaparja le egy fém spatulával. Az eltávolított és apróra zúzott anyagot tegye egy szűrőtölcsérbe (3.7.). Adjon hozzá 10 ml forró kloroformot és alaposan keverje össze fém spatula segítségével, majd vákuumban szűrje le, a szűrletet gyűjtse össze a kúpos fenekű lombikban (3.8.), amely a szűrőtölcsérhez van csatlakoztatva.

A tölcsérben bennmaradó szilikagélt mossa ki háromszor etil-éterrel (minden alkalommal megközelítőleg 10 ml-rel), a szüredéket gyűjtse ugyanabba a tölcsérhez csatlakoztatott lombikba. Párolja be a szüredéket megközelítőleg 4–5 ml térfogatúra, és a maradék oldatot töltsé egy 10 ml térfogatú kémcsőbe (3.9.), amelynek súlyát előzőleg lemérte; a kémcsövet gyenge nitrogénáramban kismértékű melegítéssel párolja be. Oldja fel ismét a maradékot néhány csepp acetonnal, ismét szárítsa meg, párolja, majd helyezze egy kemencébe 105 °C hőmérsékletre 10 percre, ezután vegye ki, hűtse le szárítóberendezésben és mérje meg a súlyát.

A kémcsőben lévő maradvány az alkoholos frakcióból áll.

▼ M19**5.3. Preparation of the trimethylsilyl ethers**

- 5.3.1. The reagent for silylation, consisting of a mixture of 9:3:1 by volume (Note 5) of pyridine-hexamethyldisilazane-trimethylchlorosilane in the proportion of 50 µl for each milligram of aliphatic alcohols, is added to the test tube containing the alcoholic fraction, avoiding all absorption of moisture (Note 6).

▼ M19

Note 5: Solutions which are ready for use are available commercially. Other silanising reagents such as, for example, bis-trimethylsilyl, trifluor acetamide + 1 % trimethyl chlorosilane, which has to be diluted with an equal volume of anhydrous pyridine, are also available.

Note 6: The slight opalescence which may form is normal and does not cause any interference. The formation of a white floc or the appearance of a pink colour are indicative of the presence of moisture or deterioration of the reagent. If these occur the test must be repeated.

5.3.2. Stopper the test tube, shake carefully (without overturning) until the aliphatic alcohols are completely dissolved. Stand for at least 15 minutes at ambient temperature and then centrifuge for a few minutes. The clear solution is ready for gas chromatographic analysis.

5.4. Gas chromatography analysis

5.4.1. Preliminary operations, column packing

5.4.1.1. Fit the column in the gas chromatograph, attaching the inlet end to the injector connected to the splitting system and the outlet end to the detector. Carry out a general check of the gas chromatography assembly (tightness of gas fittings, efficiency of the detector, efficiency of the splitting system and of the recording system, etc.).

5.4.1.2. If the column is being used for the first time it is recommended that it should be subjected to conditioning. A little carrier gas is passed through the capillary column and then the gas chromatography assembly is switched on and gradually heated until a temperature not less than 20 °C above the operating temperature (see Note 7) is attained. That temperature is held for not less than two hours and then the assembly is brought to the operating conditions (regulation of gas flow, split flame ignition, connection to the electronic recorder, adjustment of the temperature of the capillary column oven, the detector and the injector, etc.) and the signal is adjusted to a sensitivity not less than twice the highest level contemplated for the execution of the analysis. The course of the base line must be linear, without peaks of any kind, and must not drift. A negative straight-line drift indicates leakage from the column connections; a positive drift indicates inadequate conditioning of the column.

Note 7: The conditioning temperature shall be at least 20 °C less than the maximum temperature contemplated for the liquid phase employed.

5.4.2. Choice of operating conditions

5.4.2.1. The guideline operating conditions are as follows:

— column temperature: the initial isotherm is set at 180 °C for eight minutes and then programmed at 5 °C/minute to 260 °C and a further 15 minutes at 260 °C,

— temperature of evaporator: 280 °C,

— temperature of detector: 290 °C,

— linear velocity of carrier gas: helium 20 to 35 cm/s, hydrogen 30 to 50 cm/s,

— splitting ratio: 1:50 to 1:100,

— sensitivity of instrument: 4 to 16 times the minimum attenuation,

▼ M19

- sensitivity of recording: 1 to 2 mV fs,
- paper speed: 30 to 60 cm/h,
- quantity of substance injected: 0,5 to 1 µl of TMSE solution.

The above conditions may be modified according to the characteristics of the column and of the gas chromatograph to obtain chromatograms satisfying the following conditions:

- alcohol C₂₆ retention time shall be 18 ± 5 minutes,
- the alcohol C₂₂ peak shall be 80 ± 20 % of the full scale value for olive oil and 40 ± 20 % of the full scale value for seed oil.

5.4.2.2. The above requirements are checked by repeated injection of the standard TMSE mixture of alcohols and the operating conditions are adjusted to yield the best possible results.

5.4.2.3. The parameters for the integration of peaks shall be set so that a correct appraisal of the areas of the peaks considered is obtained.

5.4.3. Analytical procedure

5.4.3.1. Using the microsyringe of 10 µl capacity draw in 1 µl of hexane followed by 0,5 µl of air and subsequently 0,5 to 1 µl of the sample solution; raise the plunger of the syringe further so the needle is emptied. Push the needle through the membrane of the injection unit and after one to two seconds inject rapidly, then slowly remove the needle after some five seconds.

5.4.3.2. Recording is effected until the TMSE of the aliphatic alcohols present have been eluted completely. The base line shall always correspond to the requirements of 5.4.1.2.

▼ M28

5.4.4. A csúcsok azonosítása

Az egyes csúcsok azonosítása a retenció idő alapján és az azonos körülmények között analizált TMSE keverék összehasonlításával történik.

A 3. függelék 2. ábráján látható egy példa a finomított olívaolaj alkoholos frakciójának gázkromatogramjára.

▼ M19

5.4.5. Quantitative evaluation

5.4.5.1. The peak areas of 1-eicosanol and of the aliphatic alcohols C₂₂, C₂₄, C₂₆ and C₂₈ are calculated by electronic integration.

5.4.5.2. The contents of each aliphatic alcohol, expressed in mg/1 000 g fatty substance, are calculated as follows:

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

where:

A_x = area of the alcohol peak x

A_s = area of 1-eicosanol

m_s = mass of 1-eicosanol in milligrams

m = mass of sample drawn for determination, in grams.

6. EXPRESSION OF THE RESULTS

The contents of the individual aliphatic alcohols in mg/1 000 g of fatty substance and the sum of the 'total aliphatic alcohols' are reported.

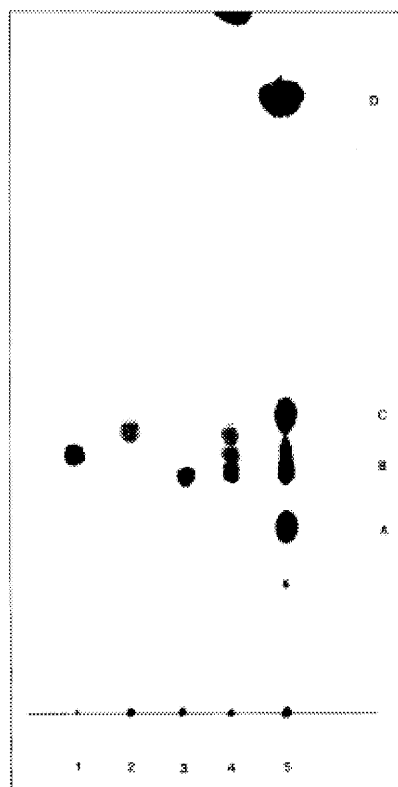
▼ M28

Függelék

Példa VRK-elválasztásra és kromatogram példák

1. ábra

Az olívaolaj hexán-dietil-éterrel (65/35) eluált nem szappanosítható frakciójának vékonyréteg-kromatográfiás lemeze

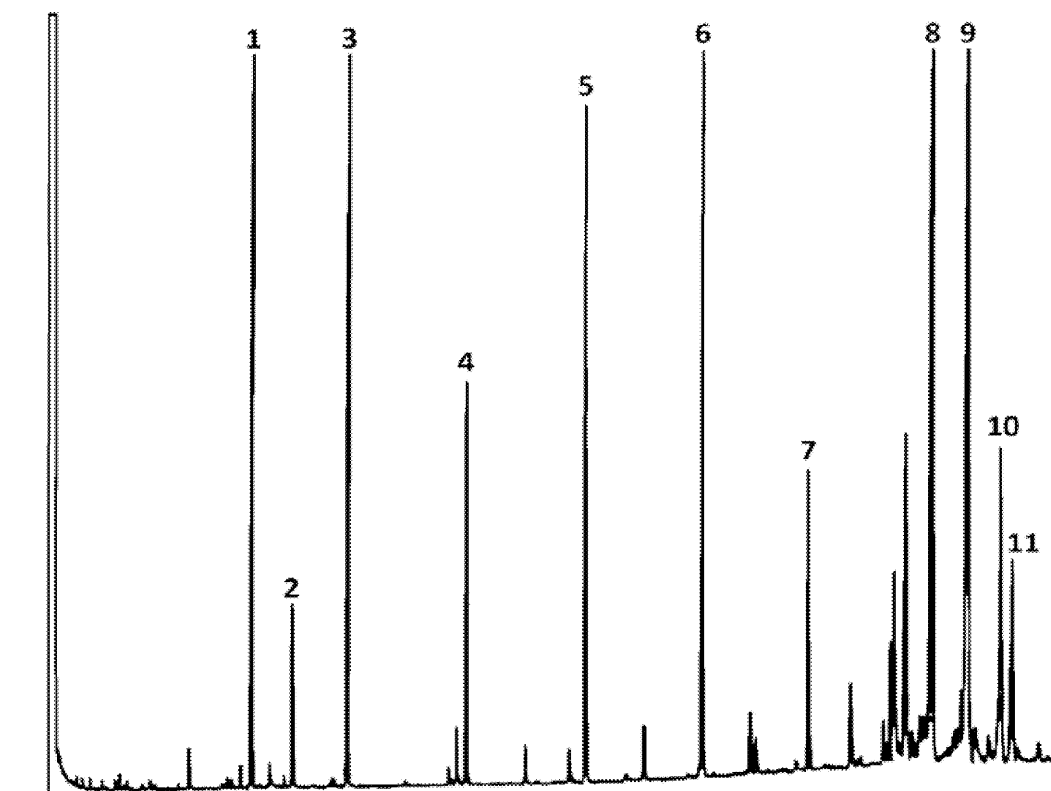


- | | | | |
|---|---|---|-----------------------|
| 1 | C ₂₆ alkohol | A | Szterinek |
| 2 | C ₃₀ alkohol | B | Alifás alkoholok |
| 3 | C ₂₀ alkohol | C | Triterpénes alkoholok |
| 4 | C ₂₀₋₂₂₋₂₆₋₃₀ alkoholkeverékek | D | Szkvalén |
| 5 | Extra szűz nem szappanosítható | | |

▼ M28

2. ábra

Egy finomított olívaolaj alkoholos frakciójának kromatogramja



1 = Fitol

2 = Geranil-gerániol

3 = C₂₀ alkohol (IS)4 = C₂₂ alkohol5 = C₂₄ alkohol6 = C₂₆ alkohol7 = C₂₈ alkohol

8 = Cikloartenol

9 = 24-Metilén-cikloartenol

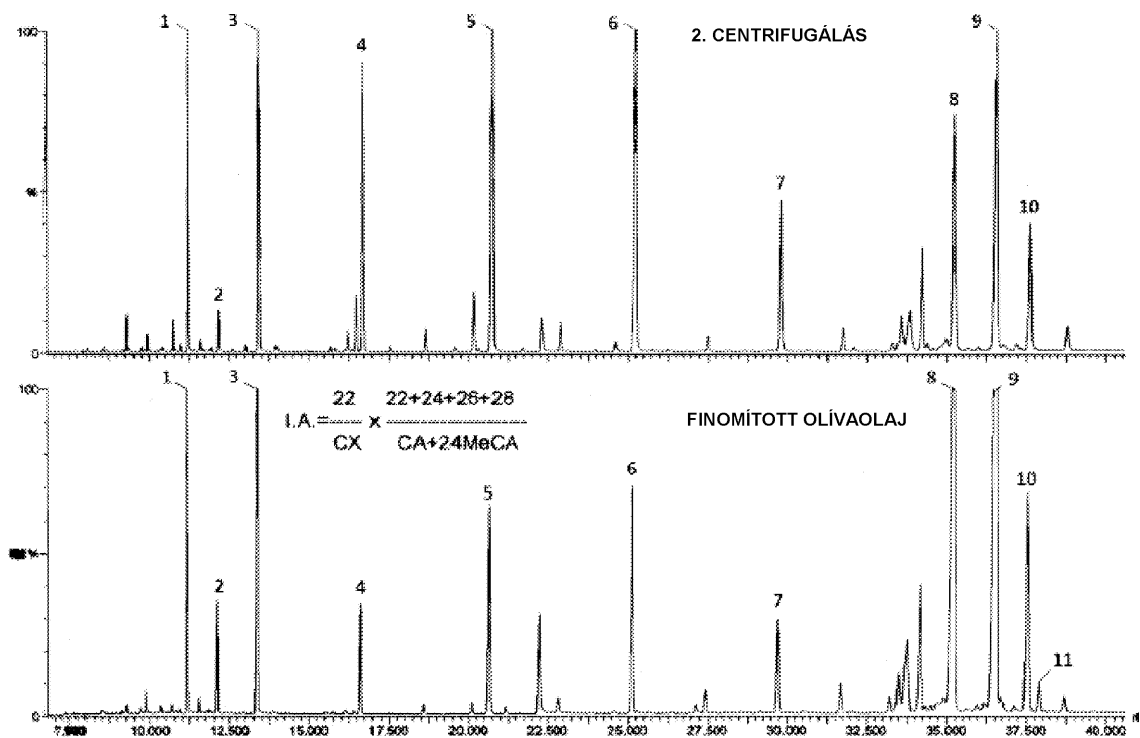
10 = Citrostadienol

11 = Ciklobranol

▼ M28

3. ábra

Finomított olívaolaj és egy második centrifugáláson átesett olívaolaj alifás és triterpénes alkoholjai



1 = Fitol

5 = C₂₄ alkohol9 = 24-Metilén-cikloartenol
(24MeCA)

2 = Geranil-gerániol (CX)

6 = C₂₆ alkohol

10 = Citrostadienol

3 = C₂₀ alkohol7 = C₂₈ alkohol

11 = Ciklobranol

4 = C₂₂ alkohol

8 = Cikloartenol (CA)

▼ **M23***XX. MELLÉKLET***A viasz-, valamint a zsírsav-metilészter-és zsírsav-etilészter-tartalom kapilláris gázkromatográfiával történő meghatározásának módszere**

1. A MÓDSZER CÉLJA

A módszer célja az olívaolaj viasz-, zsírsav-metilészter- és zsírsav-etilészter-tartalmának meghatározása. Az egyes viaszok és alkilészterek elválasztása a szénatomszám alapján történik. Javasolt a módszer alkalmazása az olívaolaj és az olívaolajból készült olaj megkülönböztetésére, valamint az extra szűz olívaolaj minőségének meghatározására, mivel alkalmas az extra szűz olívaolajból és alacsonyabb minőségű olajból – legyen az szűz, lampante vagy valamely szagtalanított olaj – megtevesztő szándékkal létrehozott keverékek azonosítására.

2. ALAPELV

Megfelelő belső standardok hozzáadása az olajhoz, majd frakcionálás kromatográfiás eljárás segítségével hidratált szilikagél-oszlopon. A vizsgálati körülmények között eluált (a triacilglicerinekénél kisebb polaritású) frakció leválasztása, majd kapilláris gázkromatográfia segítségével történő közvetlen elemzése.

3. ESZKÖZÖK

3.1. **25 ml-es térfogatú Erlenmeyer-lombik,**3.2. 15,0 mm belső átmérőjű, 30–40 cm hosszú folyadékkromatográfiás **üvegoszlop** megfelelő csappal,3.3. kapillárisoszloppal történő használatra alkalmas **gázkromatográf**, közvetlenül az oszlopra történő injektálásra alkalmas rendszerrel, amely a következő részekből áll:3.3.1. **termosztátvezérlésű kemence hőmérséklet-programozással,**3.3.2. közvetlenül az oszlopra történő injektálásra alkalmas **hideg befecskendező** rendszer,3.3.3. **lángionizációs detektor és konverter-erősítő,**3.3.4. **regisztráló-integráló berendezés** (1. megjegyzés) a konverter-erősítővel (3.3.3. pont) történő használatra, melynek válaszideje nem haladja meg az egy másodpercet, és változtatható papírsebességű,

1. megjegyzés: Lehetséges olyan informatizált rendszerek használata is, amelyek alkalmasak a gázkromatográfiai adatok számítógépes feldolgozására.

3.3.5. **ömlesztett szilícium-dioxidból** készült, 8–12 m hosszúságú, 0,25–0,32 mm belső átmérőjű, belülről egyenesen 0,10–0,30 µm rétegvastagságú folyadékfázissal (2. megjegyzés) borított **(a viaszok, zsírsav-metilészterek és zsírsav-etilészterek elemzésére szolgáló) kapillárisoszlop,**

2. megjegyzés: E célra használhatók a kereskedelmi forgalomban lévő megfelelő folyadékfázisok, mint az SE52, SE54 stb.

3.4. 10 µl térfogatú **mikrofecskendő** közvetlenül az oszlopra történő injektáláshoz, keményített tűvel,3.5. **elektromos rázóberendezés,**3.6. **rotációs bepárló,**3.7. **tokos kemence,**3.8. **analitikai mérleg, ± 0,1 mg-os mérési pontossággal,**

▼ **M23**

3.9. szokványos laboratóriumi üvegeszközök.

4. REAGENSEK

4.1. **szilikagél**, 60–200 µm mesh. Helyezze a szilikagélt az 500 °C hőmérsékletű tokos kemencébe legalább négy óra hosszára. Hagyja lehűlni, majd adjon hozzá a felhasznált szilikagél mennyisége 2 %-ának megfelelő vízmennyiséget. Alaposan rázza fel a sűrű szuszpenziót, hogy homogénné váljék, majd használat előtt legalább 12 órán keresztül tartsa a szárítóberendezésben.

4.2. **n-hexán**, kromatográfia vagy maradékvizsgálat céljára alkalmas (a tisztaságot ellenőrizni kell).

FIGYELEM! Gőzei a levegővel keveredve gyúlékony elegyet alkotnak! A vizsgálathoz távolítsa el minden gyújtóforrást (hőforrás, szikra, nyílt láng)! Győződjön meg róla, hogy az üvegek mindig jól le legyenek zárva! Használat során gondoskodjon megfelelő szellőzésről! Előzze meg a gőzfelhalmozódást és távolítsa el minden tűzveszélyes tárgyat, pl. a nem éghetetlen anyagokból készült fűtőberendezéseket és elektromos készülékeket! Az anyag belélegezve idegsejt-károsodást okozhat. Ne lélegezze be a gőzt! Szükség esetén használjon megfelelő lélegeztető berendezést! Szembe és bőrre ne kerüljön!

4.3. **Etil-éter, kromatográfia céljára alkalmas.**

FIGYELEM! Kiemelten tűzveszélyes és közepesen toxikus anyag! Bőrrel érintkezve irritációt okoz. Belégzése káros. Szemkárosodást okozhat. Késleltetett káros hatásokat okozhat. Robbanó peroxidokat képezhet. Gőzei a levegővel keveredve gyúlékony elegyet alkothatnak. A vizsgálathoz távolítsa el minden gyújtóforrást (hőforrás, szikra, nyílt láng)! Győződjön meg róla, hogy az üvegek mindig jól le legyenek zárva! Használat során gondoskodjon megfelelő szellőzésről! Előzze meg a gőzfelhalmozódást és távolítsa el minden tűzveszélyes tárgyat, pl. a nem éghetetlen anyagokból készült fűtőberendezéseket és elektromos készülékeket! Ne párolja szárazra, illetve majdnem teljesen szárazra! Víz vagy más megfelelő redukálószer hozzáadásával mérsékelhető a peroxidképződés. Ne igya meg az anyagot! Ne lélegezze be a gőzt! Kerülje a hosszan tartó vagy ismételt bőrkontaktust!

4.4. **n-heptán**, kromatográfia céljára alkalmas, vagy **izo-oktán**.

FIGYELEM! Tűzveszélyes anyag! Belégzése káros. A vizsgálathoz távolítsa el minden gyújtóforrást (hőforrás, szikra, nyílt láng)! Győződjön meg róla, hogy az üvegek mindig jól le legyenek zárva! Használat során gondoskodjon megfelelő szellőzésről! Ne lélegezze be a gőzt! Kerülje a hosszan tartó vagy ismételt bőrkontaktust!

4.5. **Lauril-arachidát 0,05 % (m/v) standard oldata (3. megjegyzés)** heptánban (belső standard viaszhoz).

3. megjegyzés: Palmitil-palmitát, mirisztill-sztearát és arachidil-laureát egyaránt használható.

4.6. **Metil-heptadekanoát 0,02 % (m/v) standard oldata heptánban (belső standard metil- és etilészterekhez).**

4.7. **Szudán 1 (1-fenilazo-2-naftol).**

▼ **M23**

- 4.8. **Vivógáz: hidrogén vagy hélium, gázkromatográfia céljára alkalmas tisztaságban.**

FIGYELMEZTETÉS

Hidrogén. Nyomás alatt kiemelten tűzveszélyes. A vizsgálathoz távolítsa el minden gyújtóforrást (hőforrás, szikra, nyílt láng) és a nem éghetetlen anyagokból készült elektromos készülékeket! Győződjön meg róla, hogy a használaton kívüli palack szelepe zárva legyen! Mindig használjon nyomáscsökkentőt! Mielőtt kinyitná a szelepet, csökkentse a nyomáscsökkentő rugójának feszességét! A szelep nyitásakor ne álljon a kieresztőnyílás elé! Használat során gondoskodjon megfelelő szellőzésről! Ne vezessen hidrogént egyik palackból a másikba! Ne keverje a palackban lévő gázt! Gondoskodjon róla, hogy a palack ne borulhasson fel! Ne tegye ki a palackot napfénynek vagy egyéb hőforrásnak! Tartsa a palackot rozsdamentes környezetben! Ne használjon sérült vagy címke nélküli palackot!

Hélium. Nagy nyomáson sűrített gáz. Csökkenti a belélegezhető oxigén koncentrációját. Tartsa zárva a palackot! Használat során gondoskodjon megfelelő szellőzésről! Nem megfelelő szellőzés esetén ne menjen a tárolótérbe! Mindig használjon nyomáscsökkentőt! Mielőtt kinyitná a szelepet, csökkentse a nyomáscsökkentő rugójának feszességét! Ne vezessen gázt egyik palackból a másikba! Gondoskodjon róla, hogy a palack ne borulhasson fel! A szelep nyitásakor ne álljon a kieresztőnyílás elé! Ne tegye ki a palackot napfénynek vagy egyéb hőforrásnak! Tartsa a palackot rozsdamentes környezetben! Ne használjon sérült vagy címke nélküli palackot! Ne lélegezze be a gázt! Kizárólag ipari céllal használható fel.

- 4.9. **Segédgázok:**

— Hidrogén, gázkromatográfia céljára alkalmas tisztaságban.

— Levegő, gázkromatográfia céljára alkalmas tisztaságban.

FIGYELMEZTETÉS

Levegő. Nagy nyomáson sűrített gáz. Éghető anyagok jelenlétében óvatosan kezelendő, mivel nagy nyomáson a levegőben található legtöbb szerves vegyület öngyulladás hőmérséklete jelentősen csökken. Győződjön meg róla, hogy a használaton kívüli palack szelepe zárva legyen! Mindig használjon nyomáscsökkentőt! Mielőtt kinyitná a szelepet, csökkentse a nyomáscsökkentő rugójának feszességét! A szelep nyitásakor ne álljon a kieresztőnyílás elé! Ne vezessen gázt egyik palackból a másikba! Ne keverje a palackban lévő gázt! Gondoskodjon róla, hogy a palack ne borulhasson fel! Ne tegye ki a palackot napfénynek vagy egyéb hőforrásnak! Tartsa a palackot rozsdamentes környezetben! Ne használjon sérült vagy címke nélküli palackot! Az ipari felhasználásra szánt levegőt nem szabad belélegezni és lélegeztető berendezésekben alkalmazni.

5. **ELJÁRÁS**

- 5.1. **A kromatográfiai oszlop előkészítése**

Készítsen szuszpenziót 15 g szilikagélből (4.1. pont) és n-hexánból (4.2. pont), és töltsé az oszlopba (3.2. pont). Hagyja magától leülepedni. Teljes ülepedés után elektromos rázóberendezéssel tömörítse, hogy homogénebb kromatográfiai réteget kapjon. Az esetleges szennyeződések eltávolítása érdekében 30 ml n-hexánnal mossa át az oszlopot. Az analitikai mérleg (3.8. pont) segítségével mérjen pontosan 500 mg mintát a 25 ml térfogatú lombikba (3.1. pont), majd a feltételezett viasztartalom függvényében adjon hozzá megfelelő mennyiségű belső standardot (4.5. pont), azaz adjon hozzá olívaolaj esetén 0,1 mg, olívaolaj esetén 0,25–0,5 mg lauril-arachidátot, az olívaolajhoz pedig 0,05 mg metil-heptadekanoátot (4.6. pont).

▼ **M23**

Az ily módon előkészített mintát 2 x 2 ml n-hexán (4.2. pont) segítségével vigye fel a kromatográfiás oszlopra.

Hagyja lefutni az oldatot 1 mm-rel az abszorbens felszíne fölé. Ismét mossa át az oszlopot 99:1 arányú n-hexán/etil-éter eleggyel, és gyűjtsön össze 220 ml-t úgy, hogy 10 másodpercenként megközelítőleg 15 csepp folyjon át. **(Az így kapott frakció tartalmazza a metil- és etilésztereket és viaszokat.)** (4. megjegyzés) (5. megjegyzés).

4. megjegyzés: A 99:1 arányú n-hexán/etil-éter keveréket minden nap frissen kell elkészíteni.

5. megjegyzés: A viaszok megfelelő eluálódásának vizuális ellenőrzése érdekében a mintaoldathoz hozzáadhat 100 µl szudán 1 színezőanyagot, az eluáló elegy 1 %-a arányában.

A színezőanyag retenciós ideje a viaszoké és a triacilglicerineké között helyezkedik el. Ezért amikor a színezőanyag eléri a kromatográfiás oszlop alját, függessze fel az eluálást, ekkorra ugyanis valamennyi viasz eluálódott.

Az így kapott frakciókat a rotációs bepárlóban párolja szárazra, amíg az oldószer majdnem teljesen eltűnik belőle. Az oldószer utolsó 2 ml-ét gyenge nitrogénárammal távolítsa el. Gyűjtse össze a metil- és etilésztereket tartalmazó frakciót 2–4 ml n-heptánnal vagy izo-oktánnal hígítva.

5.2. Gázkromatográfiás elemzés

5.2.1. *Előzetes műveletek*

Az oszlopot illessze be a gázkromatográfba (3.3. pont) úgy, hogy az oszlop bemenetét az oszlopra szerelt („on-column”) rendszerhez, az oszlop kimenetét pedig a detektorhoz csatlakoztatja. Ellenőrizze a gázkromatográfiás berendezést (gázszerelvények szorossága, a detektor hatékonysága, a regisztráló rendszer hatékonysága stb.).

Az első alkalommal használt kapillárisoszlopokat ajánlatos kondicionálni. Fúvasson át egy kevés gázt az oszlopon, majd kapcsolja be a gázkromatográfiás berendezést. Melegítse fokozatosan addig, amíg körülbelül 4 óra elteltével el nem éri a 350 °C hőmérsékletet.

Ezt a hőmérsékletet tartsa legalább két órán keresztül, majd hozza a berendezést üzemi körülmények közé (gázáram szabályozása, bontóláng begyűjtása, csatlakoztatás az elektronikus regisztráló berendezéshez [3.3.4 pont], az oszlophőmérséklet szabályozása a kemencén, a detektor szabályozása stb.). Rögzítse a jelet az elemzés elvégzéséhez szükségesnél legalább kétszer nagyobb érzékenység mellett. Az alapvonalnak lineárisnak, mindennemű csúcsból és driftől mentesnek kell lennie.

A negatív egyenes vonalú drift az oszlop illesztékeinek tökéletlenségét, míg a pozitív drift az oszlop nem megfelelő kondicionálását jelzi.

5.2.2. *Az üzemi körülmények megválasztása a viaszok, valamint a metil- és etilészterek esetében (6. megjegyzés)*

Az üzemi körülmények általában az alábbiak:

— Oszlophőmérséklet:

20 °C/perc 5 °C/perc

kiindulási hőmérséklet 80 °C (1') ————— 140 °C
 ————— 335 °C (20)

— Detektor hőmérséklete: 350 °C.

— Befecskendezett anyag mennyisége: 1 µl n-heptán-oldat (2–4 ml).

▼ **M23**

— Vivőgáz: hélium vagy hidrogén, a kiválasztott gáz számára optimális lineáris sebességgel (lásd az A. függelék).

— Berendezés érzékenysége: a fenti körülményeknek megfelelően.

6. *megjegyzés:* Tekintettel a magas véghőmérsékletre, pozitív drift előfordulása megengedhető, amely azonban nem haladhatja meg a teljes skálaérték 10 %-át.

A fenti feltételek az oszlop és a gázkromatográf jellemzőinek megfelelően módosíthatók, hogy a kapott kromatogramok lehetővé tegyék valamennyi viasz, illetve zsírsav-metilészter és zsírsav-etilészter leválasztását, valamint hogy a csúcsok kielégítően elkülöníthetőek legyenek (lásd a 2., 3. és 4. ábrát), miközben a lauril-arachidát belső standard retenciósideje 18 ± 3 perc. A viaszok legreprezentatívabb csúcsának a teljes skálaérték 60 %-ánál nagyobbak kell lennie, míg a metil- és etilészterek esetében a metil-heptadekanoát belső standardnak el kell érnie a teljes skálaértéket.

A csúcsok integrálási paramétereit úgy kell meghatározni, hogy lehetővé váljon az érintett csúcsok alatti területek pontos becslése.

5.3. **Az elemzés menete**

A 10 µl térfogatú mikrofecskendő segítségével szívjon fel 10 µl oldatot, majd a mikrofecskendő dugattyúját felfelé mozgatva ürítse ki a tűt. A tűt vezesse be a befecskendező rendszerbe, majd egy-két másodperc elmúltával gyorsan fecskendezze be az oldatot. Körülbelül öt másodperc elteltével finoman húzza ki a tűt.

Addig folytassa a rögzítést, ameddig a viaszok vagy sztigmaszadiének teljesen eluálódtak, attól függően, hogy melyik frakció analízisét végzi.

Az alapvonalnak minden esetben meg kell felelnie az előírt feltételeknek.

5.4. **A csúcsok azonosítása**

Az egyes csúcsok azonosítását a retencióside alapján, az azonos körülmények között analízált, ismert retenciósidejű viaszkeverékekkel összehasonlítva kell végezni. Az alkilészterek azonosítása az olívaolajokban található főbb zsírsavak (palmitinsav és olajsav) metil- és etilésztereinek keverékei alapján történik.

Az 1. ábrán egy szűz olívaolaj viasz-kromatogramja látható. A 2. és a 3. ábrán két, kiskereskedelmi forgalomban kapható extra szűz olívaolaj kromatogramja látható, metil- és etilészterekkel, illetve azok nélkül. A 4. ábra egy csúcsminőségű extra szűz olívaolaj és egy 20 %-ban szagtalanított olajjal kevert ugyanilyen olaj kromatogramját mutatja.

5.5. **A viasztartalom mennyiségi értékelése**

Az integráló berendezés segítségével határozza meg a lauril-arachidát belső standardnak és a nyílt szénláncú C₄₀–C₄₆-os észtereknek megfelelő csúcsok alatti területet.

A teljes viasztartalom mg/kg zsír alakban történő meghatározásához adja össze az egyes viaszok mennyiségét, az alábbiak szerint:

$$\text{viaszok(mg/kg)} = \frac{(\Sigma A_x) \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

▼ M23

ahol

A_x = az egyes észterek csúcsa alatti terület, a számítógép által használt mértékegységben

A_s = a lauril-arachidát belső standard csúcsa alatti terület, a számítógép által használt mértékegységben

m_s = a hozzáadott lauril-arachidát belső standard tömege milligrammban

m = a meghatározni kívánt minta tömege grammban.

5.5.1. *A metil- és etilészterek mennyiségi értékelése*

Az integráló berendezés segítségével határozza meg a metil-heptadekanoát belső standardnak, a C_{16} -os és a C_{18} -os zsírsavak metilésztereinek és etilésztereinek megfelelő csúcsok alatti területet.

Határozza meg az egyes alkilészterek mennyiségét mg/kg zsír alakban, az alábbiak szerint:

$$\text{észter(mg/kg)} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

ahol

A_x = az egyes C_{16} -os és C_{18} -as észterek csúcsa alatti terület, a számítógép által használt mértékegységben

A_s = a metil-heptadekanoát belső standard csúcsa alatti terület, a számítógép által használt mértékegységben

m_s = a hozzáadott metil-heptadekanoát belső standard tömege milligrammban

m = a meghatározni kívánt minta tömege grammban.

6. AZ EREDMÉNYEK KIFEJEZÉSE

A különböző C_{40} – C_{46} -os viasztartalmak összegét (7. megjegyzés) mg/kg zsír alakban tüntesse fel.

Tüntesse fel a teljes C_{16} – C_{18} -as metilészter- és etilészter-tartalmat, valamint a kettő összegét.

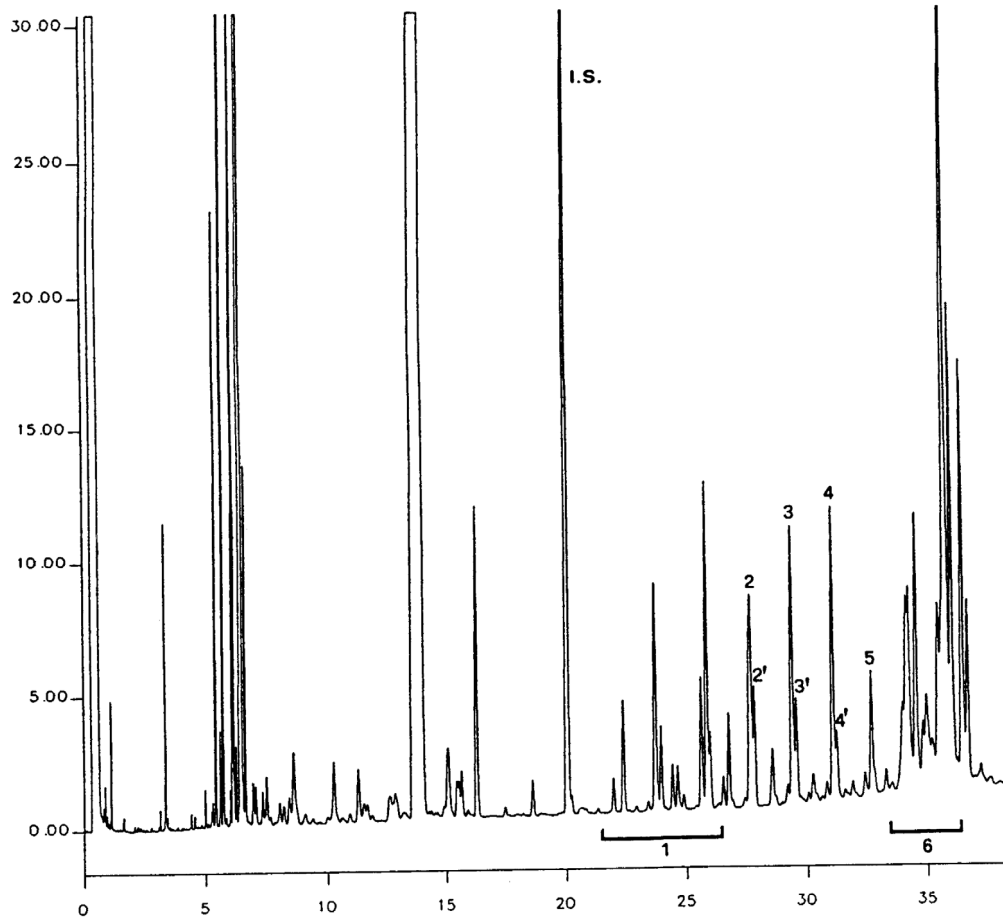
Az eredményeket a közelebbi mg/kg értékre kell kerekíteni.

7. megjegyzés: A meghatározandó mennyiségek a páros szénatom-számú C_{40} – C_{46} -os észtereknek megfelelő csúcsoknál leolvasható értékek, ahogy azt a mellékelt ábrán látható kromatogrammintá (az olívaolaj viasztartalma) mutatja. Amennyiben a C_{46} -észter duplán jelenik meg, javasolt helyette egy olívaolaj-viasztartalmát elemezni, ahol a C_{46} túlsúlya miatt a megfelelő csúcs könnyen azonosítható.

Tüntesse fel a jelen lévő etil- és metilészterek arányát.

▼ M23

1. ábra

Gázkromatogram-minta egy olívaolaj viaszfrakciójáról ⁽¹⁾

Jelmagyarázat:

Az 5–8 perc retenciós idejű zsírsav-metilészterek és zsírsav-etilészterek csúcsai

I.S. = lauril-arachidát

1 = diterpén észterek

2+2' = C₄₀-es észterek3+3' = C₄₂-es észterek4+4' = C₄₄-es észterek5 = C₄₆-os észterek

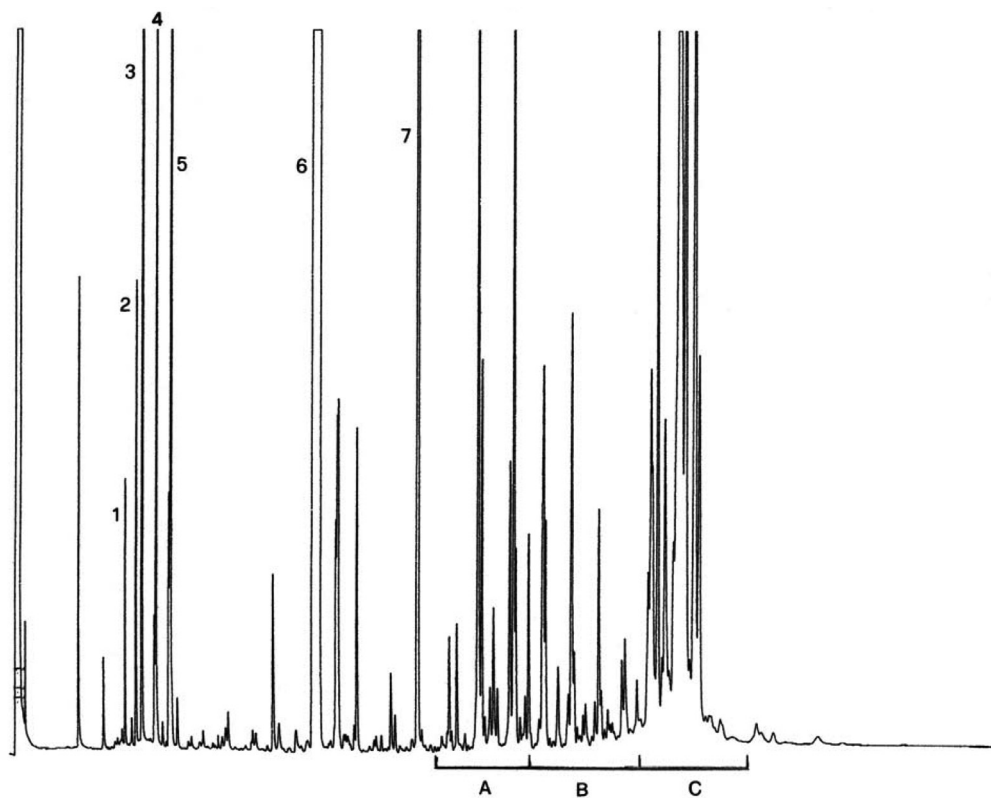
6 = szterinészterek és triterpén alkoholok

⁽¹⁾ A szterinészterek eluálódása után a kromatográfias vonalon nem mutatkoznak jelentős csúcsok (triacilglicerinnek).

▼ M23

2. ábra

Egy szűz olívaolajban található metilészterek, etilészterek és viaszok



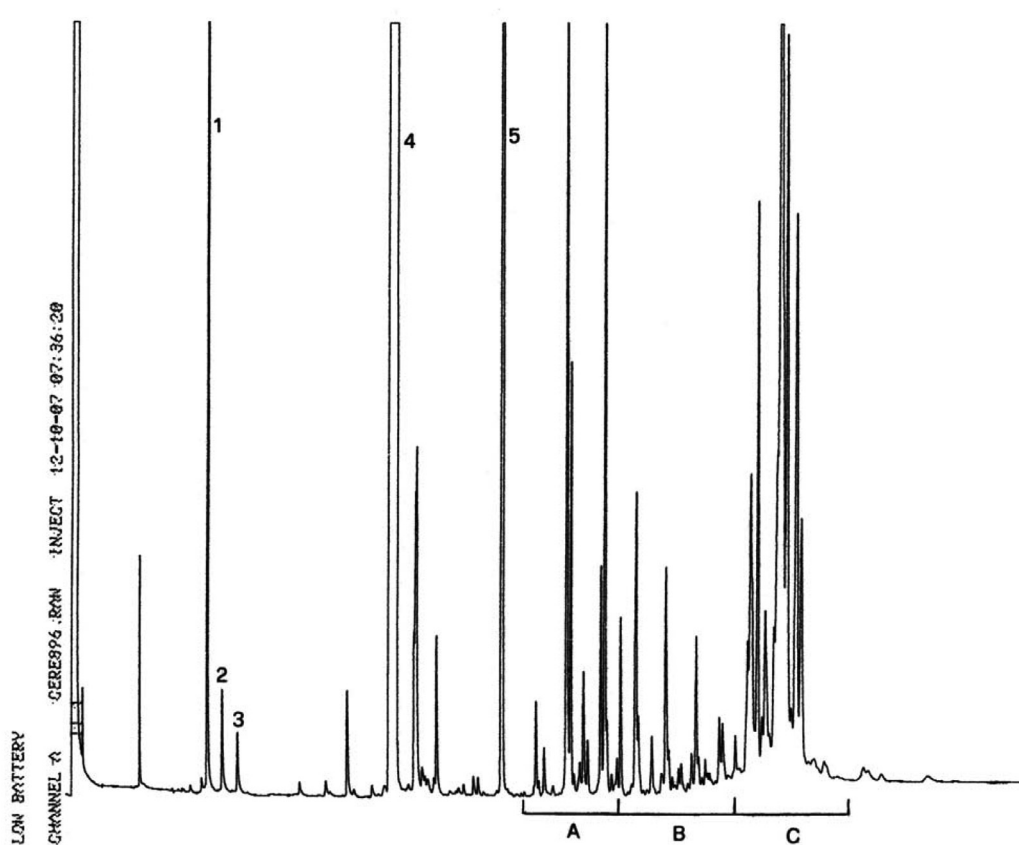
Jelmagyarázat:

- 1 – metil C₁₆
- 2 – etil C₁₆
- 3 – metil-heptadekanoát
- 4 – metil C₁₈
- 5 – etil C₁₈
- 6 – szkvalén
- 7 – lauril-arachidát I.S.
- A – diterpén észterek
- B – viaszok
- C – szterinészterek és triterpén észterek

▼M23

3. ábra

Egy extra szűz olívaolajban található metilészterek, etilészterek és viaszok



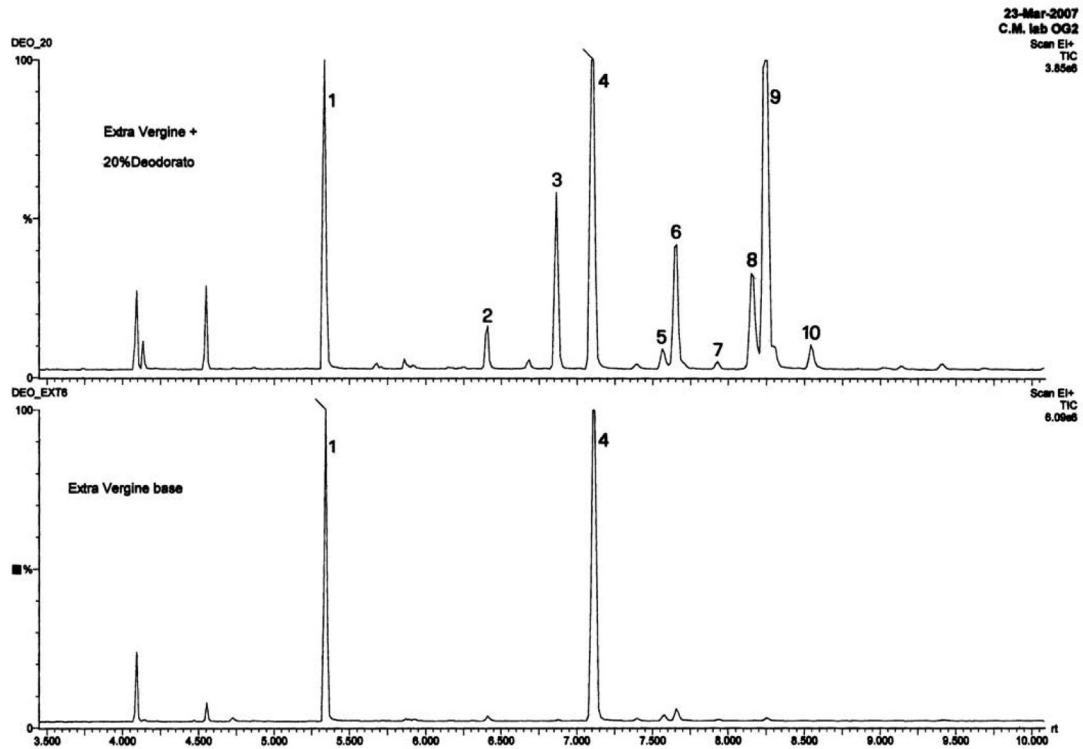
Jelmagyarázat:

- 1 – metil-heptadekanoát
- 2 – metil C₁₈
- 3 – etil C₁₈
- 4 – szkvalén
- 5 – lauril-arachidát I.S.
- A – diterpén észterek
- B – viaszok
- C – szterinészterek és triterpén észterek

▼ M23

4. ábra

Egy extra szűz olívaolaj és egy szagtalanított olajjal kevert ugyanilyen olaj kromatogramjának részlete



Jelmagyarázat:

- 1 – metil-mirisztát I.S.
- 2 – metil-palmitát
- 3 – etil-palmitát
- 4 – metil-heptadekanoát I.S.
- 5 – metil-linoleát
- 6 – metil-oleát
- 7 – metil-sztearát
- 8 – etil-linoleát
- 9 – etil-oleát
- 10 – etil-sztearát

▼ M23*A. függelék***A gáz lineáris sebességének meghatározása**

Fecskendezzen 1–3 µl metánt (vagy propánt) a normál üzemi körülményekre beállított gázkromatográfias berendezésbe. Mérje meg a gáz oszlopon történő átáramlásának idejét a befecskendezés pillanatától a csúcs kiemelkedésének pillanatáig (t_M).

A lineáris sebességet (cm/mp) az L/t_M képlettel kell meghatározni, ahol L az oszlop cm-ben megadott hosszúsága, t_M pedig a másodpercben mért idő.

▼ M28

XXI. MELLÉKLET

A 8. cikk (2) bekezdésében említett, olívaolajokon végzett megfelelési ellenőrzések eredményei

				Címkézés						Kémiai paraméterek			Érzékszervekkel meghatározható jellemzők ⁽⁴⁾			Végkövetkeztetések	
Minta	Kategória	Származási ország	Az ellenőrzés helyszíne ⁽¹⁾	Hivatalos név	Eredet-megjelölés	Tárolási feltételek	Hibás információ	Olvashatóság	M/NM ⁽²⁾	Határértékeken kívül eső paraméterek I/N	Ha igen, melyek ezek? ⁽²⁾	M/NM ⁽²⁾	Hibameddián	Gyümölcsösségi medián	M/NM ⁽²⁾	Szükséges intézkedés	Szankció

⁽¹⁾ Belső piac (sajtoló, palackozók, kiskereskedelmi fázis), export, import.

⁽²⁾ Az olívaolaj I. mellékletben felsorolt jellemzőinek mindegyikéhez tartozik egy kód.

⁽³⁾ Megfelelő/nem megfelelő.

⁽⁴⁾ Olívaolaj és pogácsaolaj esetében nem szükséges megadni.