

31991R2568

5.9.1991

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

L 248/1

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (EWG) NR 2568/91**z dnia 11 lipca 1991 r.****w sprawie właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wyłoczyn oliwek oraz w sprawie odpowiednich metod analizy**

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając rozporządzenie Rady nr 136/66/EWG z dnia 22 września 1966 r. w sprawie ustanowienia wspólnej organizacji rynku olejów i tłuszczów ⁽¹⁾, ostatnio zmienione rozporządzeniem (EWG) nr 3577/90 ⁽²⁾, w szczególności jego art. 35a,

a także mając na uwadze, co następuje:

załącznik do rozporządzenia nr 136/66/EWG zawiera opisy i definicje oliwy z oliwek i oliwy z wyłoczyn oliwek, wprowadzanych do obrotu w każdym Państwie Członkowskim, w handlu wewnątrzwspólnotowym oraz w handlu z państwami trzecimi;

w celu zróżnicowania rodzajów oliwy z oliwek należy określić ich fizyczne i chemiczne właściwości oraz właściwości organoleptyczne oliwy z pierwszego tłoczenia, aby zagwarantować czystość i jakość danych produktów, bez uszczerbku dla innych istniejących przepisów;

charakterystyczne właściwości różnych rodzajów oliwy należy określać w sposób jednolity na terytorium całej Wspólnoty; w tym celu należy ustalić wspólnotowe metody analizy chemicznej i oceny organoleptycznej; należy zezwolić na stosowanie w okresie przejściowym innych metod analiz stosowanych w Państwach Członkowskich, pod warunkiem, że w razie występowania różnic w wynikach, wynikami ostatecznymi są wyniki uzyskane wspólną metodą;

definicja fizycznych i chemicznych właściwości oliwy z oliwek i metod analizy pociąga za sobą zmiany dodatkowych uwag do rozdziału 15 Nomenklatury Scalonej;

metoda oceny właściwości organoleptycznych oliwy z pierwszego tłoczenia obejmuje ustanowienie zespołów wybranych i wyszkolonych degustatorów; w związku z tym należy wyznaczyć niezbędny termin dla utworzenia takiej struktury;

mając na względzie trudności, które niektóre Państwa Członkowskie napotkają w związku z powoływaniem zespołów degustatorów, należy zezwolić na korzystanie z zespołów innych Państw Członkowskich;

w celu zapewnienia, że system opłat stosowanych w odniesieniu do przywozu wyłoczyn z oliwek funkcjonuje w sposób prawidłowy, należy wprowadzić jednolitą metodę oznaczania zawartości oleju w tych produktach;

aby nie zakłócać handlu, należy ustanowić przepis dla oleju zapakowanego przed wejściem w życie niniejszego rozporządzenia, który ma być zbyty w określonym czasie;

konieczne jest uchylene rozporządzenia Komisji (EWG) nr 1058/77 ⁽³⁾, ostatnio zmienionego rozporządzeniem (EWG) nr 1858/88 ⁽⁴⁾;

Komitet Zarządzający ds. Olejów i Tłuszczów nie wydał opinii w terminie ustalonym przez przewodniczącego,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

1. Oleje, których właściwości pokrywają się z właściwościami określonymi w pkt. 1-3 załącznika I do niniejszego rozporządzenia, w rozumieniu pkt. 1 lit. a)-c) załącznika do rozporządzenia nr 136/66/EWG, uznawane są za oliwę z oliwek pierwszego tłoczenia.

2. Olej, którego właściwości pokrywają się z właściwościami określonymi w pkt. 4 załącznika I do niniejszego rozporządzenia, w rozumieniu pkt. 1 d) załącznika I do rozporządzenia nr 136/66/EWG, uznawane są za oliwę z oliwek pierwszego tłoczenia typu lampante.

3. Olej, którego właściwości pokrywają się z właściwościami określonymi w pkt. 5 załącznika I do niniejszego rozporządzenia, w rozumieniu pkt. 2 załącznika do rozporządzenia nr 136/66/EWG, uznawane są za rafinowaną oliwę z oliwek.

⁽¹⁾ Dz.U. 172 z 30.9.1966, str. 3025/66.⁽²⁾ Dz.U. 353 z 17.12.1990, str. 23.⁽³⁾ Dz.U. 128 z 24.5.1977, str. 6.⁽⁴⁾ Dz.U. 166 z 1.7.1988, str. 10.

4. Olej, którego właściwości pokrywają się z właściwościami określonymi w pkt. 6 załącznika I do niniejszego rozporządzenia, w rozumieniu pkt. 3 rozporządzenia nr 136/66/EWG, uznawane są za czystą oliwę z oliwek.

5. Olej, którego właściwości pokrywają się z właściwościami określonymi w pkt. 7 załącznika I do niniejszego rozporządzenia, w rozumieniu pkt. 4 załącznika do rozporządzenia nr 136/66/EWG, uznawane są za oliwę z wyciżczonych oliwek.

6. Olej, którego właściwości pokrywają się z właściwościami określonymi szczegółowo w pkt. 8 załącznika I do niniejszego rozporządzenia, w rozumieniu pkt. 5 rozporządzenia nr 136/66/EWG uznawane są za rafinowaną oliwę z wyciżczonych oliwek.

7. Olej, którego właściwości pokrywają się z właściwościami określonymi w pkt. 9 załącznika I do niniejszego rozporządzenia, w rozumieniu pkt. 6 Załącznika do rozporządzenia nr 136/66/EWG, uznawane są za oliwę z wyciżczonych oliwek.

Artykuł 2

1. Właściwości olejów wymienione w załączniku I oznacza się określonymi poniżej metodami:

- metoda przedstawiona w załączniku II do oznaczania wolnych kwasów tłuszczowych wyrażonych jako procentowa część kwasu oleinowego,
- metoda przedstawiona w załączniku III do oznaczania wskaźnika nadtlenu,
- metoda przedstawiona w załączniku IV do oznaczania alkoholi alifatycznych,
- metoda przedstawiona w załączniku V do oznaczania zawartości sterolu,
- metoda przedstawiona w załączniku VI do oznaczania erytrodiolu i uvaolu,
- metoda przedstawiona w załączniku VII do oznaczania nasyconych kwasów tłuszczowych w pozycji 2 triglicerynianu,
- metoda przedstawiona w załączniku VIII do oznaczania zawartości trylinoleiny,
- metoda przedstawiona w załączniku IX do przeprowadzania analizy spektrofotometrycznej,
- metoda przedstawiona w załączniku X A i X B do oznaczania składu kwasu tłuszczowego,
- metoda przedstawiona w załączniku XI do oznaczania lotnych rozpuszczalników fluorowcowanych,
- metoda przedstawiona w załączniku XII do oznaczania właściwości organoleptycznych oliwy z oliwek pierwszego tłoczenia,
- metoda przedstawiona w załączniku XIII do potwierdzania przeprowadzenia procesu rafinacji.

2. Ocena właściwości organoleptycznych prowadzona jest przez analityka, któremu, stosownie do sytuacji, towarzyszy specjalista,

zgodnie z procedurą opisaną w uwagach dotyczących badań smakowych, określonych w załączniku XII. W przypadku, gdy analiza wskazuje właściwości odbiegające od podanych w opisie produktu, próbka musi być zbadana przez zespół degustatorów zgodnie z przepisami w załączniku XII.

Każda druga analiza przeprowadzana jest przez zespół degustatorów zgodnie z niniejszymi przepisami.

W celu ustalenia właściwości organoleptycznych w związku z operacjami powiązаныmi z systemem interwencyjnym, degustatorzy wchodzący w skład zespołu będą dokonywać tej oceny zgodnie z przepisami załącznika XII.

Artykuł 3

Do dnia 31 października 1992 r. wprowadzenie metod analizy przewidzianej w art. 2 nie przeszkadza w stosowaniu przez Państwa Członkowskie innych sprawdzonych i naukowo uzasadnionych metod, pod warunkiem, że produkty odpowiadające obowiązującym zasadom regulującym metody wspólnotowe dopuszczone są do swobodnego obrotu. Przed stosowaniem innych metod, zainteresowane Państwa Członkowskie powiadamiają o nich Komisję.

W przypadku, gdy jedna z tych innych metod daje wyniki odbiegające od wyników uzyskanych w wyniku stosowania wspólnej metody, decydujący jest wynik otrzymany końcową metodą.

Artykuł 4

1. Do celów oceny właściwości organoleptycznych, Państwa Członkowskie tworzą zespoły wyszkolonych i wybranych degustatorów zgodnie z zasadami ustanowionymi na podstawie metody określonej w załączniku XII.

2. W przypadku, gdy Państwo Członkowskie napotyka trudności w utworzeniu zespołu na swoim terenie, może skorzystać z usług zespołu innego Państwa Członkowskiego.

Artykuł 5

Dodatkowe uwagi 2, 3 i 4 do rozdziału 15 Nomenklatury Scalonej zastąpione są uwagami zamieszczonymi w załączniku XIV.

Artykuł 6

1. Zawartość oleju w makuchu i innych wyciżkach powstających przy ekstrakcji oliwy z oliwek (kody CN 2306 90 11 i 2306 90 19) oznaczane są metodą przedstawioną w załączniku XV.

2. Zawartość oleju, określona w ust. 1, wyrażana jest jako procent masy oleju w stosunku do masy suchej substancji.

Artykuł 7

Stosuje się przepisy wspólnotowe dotyczące obecności niepożądanych substancji innych niż określone w załączniku XI.

Artykuł 8

1. Państwa Członkowskie powiadamiają Komisję o środkach podjętych w celu wprowadzenia w życie niniejszego rozporządzenia.

2. Państwa Członkowskie przesyłają Komisji na początku każdego półrocza oświadczenie o danych analitycznych dotyczących badań przeprowadzonych w ciągu poprzedniego półrocza.

Wyniki analizowane są przez Komitet Zarządzający ds. Olejów i Tłuszczów zgodnie z procedurą ustaloną w art. 39 rozporządzenia nr 136/66/EWG.

Artykuł 9

Niniejszym rozporządzenie (EWG) nr 1058/77 traci moc.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich Państwach Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 11 lipca 1991 r.

Artykuł 10

1. Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie trzeciego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

Jednakże metodę określoną w załączniku XII stosuje się od dnia 1 stycznia 1992 r., z wyjątkiem działań odnoszących się do systemu interwencyjnego.

2. Niniejsze rozporządzenie nie stosuje się do oliwy z oliwek i oleju z wytłocznin z oliwek pakowanych przed wejściem w życie niniejszego rozporządzenia oraz wprowadzonych do obrotu do dnia 31 października 1992 r.

W imieniu Komisji

RAY MAC SHARRY

Członek Komisji

ZAŁĄCZNIK I

Streszczenie

	Strona
ZAŁĄCZNIK I: Właściwości oliwy z oliwek	372
ZAŁĄCZNIK II: Oznaczanie wolnych kwasów tłuszczowych	374
ZAŁĄCZNIK III: Oznaczanie liczby nadtlenkowej	376
ZAŁĄCZNIK IV: Oznaczanie zawartości alkoholi alifatycznych metodą kapilarnej chromatografii gazowej	378
ZAŁĄCZNIK V: Oznaczanie składu i zawartości steroli metodą kapilarnej chromatografii gazowej ...	383
ZAŁĄCZNIK VI: Oznaczanie erytrodiolu i uvaolu	391
ZAŁĄCZNIK VII: Oznaczanie nasyconych kwasów tłuszczowych w pozycji 2 triglicerydu	393
ZAŁĄCZNIK VIII: Oznaczanie składu trylinoleiny	397
ZAŁĄCZNIK IX: Badanie spektrofotometryczne w ultrafiolecie	401
ZAŁĄCZNIK X A: Analiza metodą chromatografii gazowej estrów metylowych kwasów tłuszczowych ...	405
ZAŁĄCZNIK XB: Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych	413
ZAŁĄCZNIK XI: Oznaczanie lotnych fluorowcowanych rozpuszczalników oliwy z oliwek	417
ZAŁĄCZNIK XII: Ocena organoleptyczna oleju z oliwek pierwszego tłoczenia	418
ZAŁĄCZNIK XIII: Potwierdzenie dokonania procesu rafinacji	444
ZAŁĄCZNIK XIV: Dodatkowe uwagi 2, 3 i 4 do rozdziału 15 Nomenklatury Scalonej	446
ZAŁĄCZNIK XV: Zawartość oleju w pozostałości z oliwek	449
ZAŁĄCZNIK XVI: Oznaczenie liczby jodowej	451

ZAŁĄCZNIK I
WŁAŚCIWOŚCI OLIWY Z OLIWEK

Typ	Kwasowość %	Liczba nadtlenkowa meq/O ₂ /kg	Chlorowcowane rozpuszczalniki mg/kg (1)	Alkohole alifatyczne mg/kg	Nasycone kwasy tłuszczowe w pozycji 2 triglicerydu %	Erytrodiol + Uvaol %	Trylinoleina %	Cholesterol %	Brassikosterol %	Kampesterol %	Stigmasterol %	Betasosterol % (2)	Deka-7-stigmasterol %	Łącznie sterole mg/kg
1. Oliwa z oliwek ekstraktu z pierwszego tłoczenia	M 1,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
2. Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia	M 2,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
3. Zwytka oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia	M 3,3	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
4. Oliwa z oliwek lampante z pierwszego tłoczenia	> 3,3	> 20	> 0,20	M 400	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	—	m 93,0	M 0,5	m 1 000
5. Rafinowana oliwa z oliwek	M 0,5	M 10	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
6. Oliwa z oliwek	M 1,5	M 15	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
7. Surowa oliwa z wycłoczyn oliwek	m 2,0	—	—	—	M 1,8	m 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	—	m 93,0	M 0,5	m 2 500
8. Rafinowana oliwa z wycłoczyn oliwek	M 0,5	M 10	M 0,20	—	M 2,0	m 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 800
9. Oliwa z wycłoczyn oliwek	M 1,5	M 15	M 0,20	—	M 2,0	> 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 800

M = maksimum, m = minimum

(1) Ogólna górna granica dla związków wykrywanych przez detektor wychwyty elektronów. Dla związków wychwyconych oddzielnie górna granica jest 0,10 mg/kg.

(2) Delta 5-23-stigmastadienol + klostosterol + sitosterol + sitostanol + delta — 5-avenosterol + delta-5-24-stigmastadienol.

Uwaga:

Jakakolwiek oliwa jest odrzucona, jeśli jedna z właściwości znajduje się poza ustaloną granicą.

Typ	Mieszanka kwasów						K ₂₇₀	K ₂₇₀ z tlenkiem glinowym (1)	Delta K	Tablica testów
	Mirystrynowy %	Linolenowy %	Arachidowy %	Arachidy- nowy %	Behenowy %	Lignocery- nowy %				
1. Oliwa z oliwek ekstra z pierwszego tłoczenia	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 0,20	M 0,10	M 0,01	≥ 6,5
2. Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 0,25	M 0,10	M 0,01	≥ 5,5
3. Zwykła oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 0,25	M 0,10	M 0,01	≥ 3,5
4. Oliwa z oliwek lampante z pierwszego tłoczenia	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	> 0,25	M 0,11	—	< 3,5
5. Rafinowana oliwa z oliwek	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 1,20	—	M 0,16	—
6. Oliwa z oliwek	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 1,00	—	M 0,13	—
7. Surowa oliwa z wytłoczyn oliwek	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	—	—	—	—
8. Rafinowana oliwa z wytłoczyn oliwek	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 2,50	—	M 0,25	—
9. Oliwa z wytłoczyn oliwek	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 2,00	—	M 0,20	—

(1) Uwagi: W przypadku olejów, których kwasowość większa niż 3,3 %, jeśli K₂₇₀ wynosi ponad 0,11 po przejściu na tlenek glinowy, jest koniecznym wykonanie testów określonych w załączniku XIII. W celu ustalenia czystości, gdzie K₂₇₀ przekracza granicę dla danej kategorii, należy określić znowu po przejściu na tlenek glinowy.

ZAŁĄCZNIK II

OZNACZANIE WOLNYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

1. OZNACZANIE KWASOWOŚCI

Oznaczenie wolnych kwasów tłuszczowych w oliwie z oliwek. Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych wyrażona jest w postaci kwasowości obliczonej metodami konwencjonalnymi.

1.1. Zasada

Próbkę rozpuszcza się w mieszaninie rozpuszczalników, a obecne w niej wolne kwasy tłuszczowe miareczkuje przy użyciu roztworu wodorotlenku potasu w etanolu.

1.2. Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny posiadać zatwierdzoną jakość kwalifikującą je do stosowania w laboratorium a woda stosowana powinna być destylowana lub o podobnym stopniu czystości.

1.2.1. Eter dietylowy; etanol 95 % (v/v), mieszanina jednakowych objętościowo części.

Uwaga: Eter dietylowy jest substancją bardzo łatwo palną i może tworzyć nadtenki o właściwościach wybuchowych. Stosując tę substancję należy zachować szczególną ostrożność.

Zobojętnić dokładnie w momencie stosowania za pomocą roztworu wodorotlenku potasowego (1.2.2) z dodatkiem 0,3 ml roztworu fenoloftaleiny (1.2.3) na 100 ml mieszaniny.

Uwaga: Jeżeli zastosowanie tlenu etylenowego nie jest możliwe, można użyć mieszaniny rozpuszczalników zawierającej etanol i toluen. W razie potrzeby etanol można zastąpić propanolem-2.

1.2.2. Wodorotlenek potasu, miareczkowany roztwór etanolowy, c(KOH) o stężeniu 0,1 mol/l lub w razie potrzeby c(KOH) o stężeniu około 0,5 mol/l.

Konieczna jest znajomość dokładnego stężenia roztworu wodorotlenku potasu w etanolu, które należy sprawdzić bezpośrednio przed użyciem. Stosować roztwór przygotowany co najmniej pięć dni przed użyciem i zdekantowany do butelki z brązowego szkła z gumowym korkiem. Roztwór powinien być bezbarwny lub mieć barwę słomkową.

Uwaga: Stabilny bezbarwny roztwór wodorotlenku potasu można przygotować w następujący sposób: doprowadzić do wrzenia 1 000 ml etanolu z 8 g wodorotlenku potasu i 0,5 g opłków aluminiowych i nadal gotować w układzie zwrotnym skroplin przez godzinę. Następnie poddać bezzwłocznie destylacji. Rozpuścić w destylacie wymaganą ilość wodorotlenku potasu. Odstawić na kilka dni, a następnie zdekantować przejrzystą warstwę cieczy nad osadu węglanu potasu.

Roztwór można także przygotować z pominięciem procesu destylacji w następujący sposób: do 1 000 ml etanolu dodać 4 ml butylanu glinu i odstawić mieszaninę na kilka dni. Zdekantować sklarowaną nad osadem ciecz i rozpuścić w niej wymaganą ilość wodorotlenku potasu. Roztwór jest gotowy do użycia.

1.2.3. Fenoloftaleina, roztwór 10g/l w 95 lub 96 % etanolu (v/v) lub błękit zasadowy (w przypadku silnie zabarwionych tłuszczów), roztwór 20 g/l 95 lub 9 % etanolu (v/v).

1.3. Aparatura

Normalnie stosowany sprzęt laboratoryjny, w skład którego wchodzi:

1.3.1. waga analityczna.

1.3.2. kolba stożkowa (Erlenmeyera) o pojemności 250 ml.

1.3.3. biureta na 10 ml skalowana co 0,05 ml.

1.4. Procedura

1.4.1. Przygotowanie próbki do badania

(Badanie przeprowadzać na przefiltrowanej próbce. W przypadku, gdy łączna zawartość wilgoci i zanieczyszczeń jest mniejsza niż 1 %, wykorzystać próbkę bez dalszej obróbki; gdy zawartość ta przekracza 1 %, próbka musi być przefiltrowana.)

1.4.2. Pobieranie próbki

W zależności od zakładanej liczby kwasowej pobierać próbkę według poniższej tabeli:

Przewidywana liczba kwasowa	Masa próbki g	Dokładność ważenia g
< 1	20	0,05
1 do 4	10	0,02
4 do 15	2,5	0,01
15 do 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Próbkę należy ważyć w kolbie stożkowej (1.3.2)

1.4.3. Oznaczenie

Rozpuścić próbkę (1.4.2) w 50 do 150 ml poprzednio zubożonej mieszaniny eteru dietylowego i etanolu (1.2.1).

Miareczkować mieszając 0,1 M roztworem wodorotlenku potasu (1.2.2) (patrz Uwaga 2) dopóki nie nastąpi wskaźnikowa zmiana (różowa barwa fenolofaleiny utrzymuje się przez 10 sekund).

Uwaga 1: miareczkowany roztwór wodorotlenku potasu w etanolu (1.2.2) można zastąpić wodnym roztworem wodorotlenku potasu lub sodu, pod warunkiem, że ilość dodanej wody nie powoduje rozdzielnia faz.

Uwaga 2: jeżeli wymagana ilość 0,1-molowego wodorotlenku potasu przekracza 10 ml, należy zastosować roztwór 0,5 M

Uwaga 3: jeżeli w trakcie miareczkowania roztwór zaczyna mętnieć należy dodać dostateczną ilość rozpuszczalników (1.2.1), aby uzyskać przejrzysty roztwór.

1.5. **Kwasowość: wyrażona w postaci procentowej części kwasu oleinowego**

Kwasowość wyrażona jako procentowa część w stosunku do masy wynosi:

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

gdzie:

V = objętość użytego do miareczkowania roztworu wodorotlenku potasu w mililitrach;

c = dokładne stężenie molowe użytego do miareczkowania roztworu wodorotlenku potasu;

M = molowa masa w gramach na mol kwasu użytego do podania wyniku (= 282);

m = masa próbki w gramach.

Jako wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną dwóch obliczeń.

ZAŁĄCZNIK III

OZNACZENIE LICZBY NADTLENKOWEJ

1. ZAKRES

Niniejsza norma zawiera opis metody oznaczania liczby nadtlenkowej olejów i tłuszczów.

2. ZAKRES ZASTOSOWANIA

Niniejsza norma stosuje się w odniesieniu do olejów i tłuszczów pochodzenia zwierzęcego i roślinnego.

3. DEFINICJA

Liczba nadtlenkowa jest to wyrażona w milirównoważnikach aktywnego tlenu na kilogram zawartość w próbce tych substancji, które utleniają jodek potasu w opisanych warunkach technologicznych.

4. ZASADA

Poddanie Badanej części próbki, w roztworze kwasu octowego i chloroformu, działaniu roztworu jodku potasu. Miareczkowanie uwolnionego jodu znormalizowanym roztworem tiosiarczanu sodu.

5. APARATURA

W użytym sprzęcie nie mogą występować substancje redukujące lub utleniające.

Uwaga: Nie pokrywać tłuszczem powierzchni szlifowanych.

5.1. Łyżka szklana o pojemności 3 ml.

5.2. Kolby stożkowe ze szlifowanymi szyjkami i korkami o pojemności około 250 ml, wysuszone i napełnione czystym, obojętnym gazem (azotem lub najlepiej ditlenkiem węgla).

5.3. Biureta o pojemności 25 lub 50 ml wyskalowana co 0,1 ml.

6. ODCZYNNIKI

6.1 Chloroform, którego jakość spełnia wymogi stawiane odczynnikom laboratoryjnym, pozbawiony tlenu poprzez przepuszczanie przezeń silnego strumienia czystego suchego gazu obojętnego.

6.2. Kwas octowy lodowaty, którego jakość spełnia wymogi stawiane odczynnikom laboratoryjnym, pozbawiony tlenu poprzez przepuszczanie przezeń silnego strumienia czystego suchego gazu obojętnego.

6.3. Jodek potasu w postaci nasyconego roztworu wodnego, świeżo przygotowany, niezawierający jodu i jodanów.

6.4. Tiosiarczan sodu, 0,01 lub 0,002 mol/l z dokładnie nastawionym mianem tuż przed użyciem.

6.5. Roztwór skrobi, rozproszenie wodne o stężeniu 10 g/l, świeżo przygotowany z naturalnej rozpuszczalnej skrobi.

7. PRÓBKA

Należy zadbać, aby próbka była pobrana i składowana w ciemnym i chłodnym miejscu w całkowicie napełnionych szklanych pojemnikach, zamkniętych hermetycznie zatyczkami szlifowanymi szklanymi lub z korka.

8. PROCEDURA

Badanie wykonuje się w rozproszonym świetle dziennym lub w świetle sztucznym. Odważyć szklaną łyżką (5.1) lub, w przypadku jej braku, w kolbie (5.2) z dokładnością do 0,001 g masę próbki według poniższej tabeli stosownie do oczekiwanej liczby nadtlenkowej:

Przewidywana liczba nadtlenkowa	Ciężar próbki częściowej
0 do 12	5,0 do 2,0
12 do 20	2,0 do 1,2
20 do 30	1,2 do 0,8
30 do 50	0,8 do 0,5
50 do 90	0,5 do 0,3

Wyjąć korek z kolby (5.2) i wprowadzić do niej szklaną łyżkę z badaną częścią próbki. Dodać 10 ml chloroformu (6.1). Rozpuścić szybko badaną próbkę mieszając. Dodać 15 ml kwasu octowego (6.2), a następnie 1 ml roztworu jodku potasu (6.3). Szybko zakorkować kolbę, wstrząsać przez jedną minutę i pozostawić dokładnie na pięć minut w nieoświetlonym miejscu o temperaturze od 15 do 25 °C.

Dodać około 75 ml wody destylowanej. Miareczkować uwolniony jod roztworem tiosiarczanu sodu (6.4) (roztworem 0,002 mol/l dla przewidywanych wartości poniżej 12 i roztworem 0,01 mol/l dla przewidywanych wartości powyżej 12) intensywnie wstrząsając, stosując roztwór skrobi jako wskaźnik (6.5).

Przeprowadzić dwa oznaczenia tej samej próbki.

Jednocześnie przeprowadzić ślepią próbę. Jeżeli wynik ślepej próby przekracza 0,05 ml 0,01 mol/l roztworu tiosiarczanu sodu (6.4) należy wymienić zanieczyszczone odczynniki.

9. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

LICZBA NADTLenkowa (LN) wyrażona w milirównoważnikach aktywnego tlenu na kilogram określana jest wzorem:

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

gdzie:

V = ilość ml nastawionego roztworu tiosiarczanu (6.4) użytego w badaniu, skorygowana w celu uwzględnienia ślepej próby

T = dokładna molarność użytego roztworu tiosiarczanu sodu (6.4)

m = masa badanej części próbki w gramach

Jako wynik przyjąć średnią arytmetyczną dwóch oznaczeń.

ZAŁĄCZNIK IV

**OZNACZENIE ZAWARTOŚCI ALKOHOLI ALIFATYCZNYCH METODĄ KAPILARNEJ
CHROMATOGRAFII GAZOWEJ**

1. PRZEDMIOT

Procedura zawiera opis metody oznaczania zawartości alkoholi alifatycznych w olejach i tłuszczach

2. PODSTAWOWA ZASADA METODY

Substancja tłuszczowa z dodanym do niej 1-eikozanolem w charakterze wewnętrznego wzorca, zmydlana jest za pomocą wodorotlenku potasu w etanolu, a następnie ekstrahuje się eterem etylowym substancję nieulegającą zmydleniu.

Frakcja alkoholowa oddzielana jest od substancji nieulegającej zmydleniu metodą chromatografii na warstwie żelu krzemionkowego nasyczonego wodorotlenkiem potasu; alkohole ekstrahowane z żelu krzemionkowego przekształcane są w etery trimetylosilylowe i analizowane metodą kapilarnej chromatografii gazowej.

3. APARATURA

- 3.1. Kolba z okrągłym dnem o pojemności 250 ml z chłodnicą zwrotną i szlifowanymi złączami.
 - 3.2. Rozdzielacze o pojemności 500 ml.
 - 3.3. Kolby o pojemności 250 ml.
 - 3.4. Zbiornik chromatograficzny do analiz metodą chromatografii cienkowarstwowej, płytki szklane o wymiarach 20 x 20 cm.
 - 3.5. Oświetlenie UV o długości fali 366 lub 254 nm do badania płytek TLC.
 - 3.6. Mikrostrzykawka o pojemności 100 µl i 500 µl.
 - 3.7. Lejek do sączenia ze spieku szklanego z porowatą frytą G 3 (o porowatości 15 do 40µ) o przybliżonej średnicy 2 cm i wysokości około 5 cm nadająca się do filtrowania w próżni, z zewnętrznym szlifowanym złączem 12/21.
 - 3.8. Naczynie Dewara o pojemności 50 ml ze szlifowanym złączem wewnętrznym 12/21 do łączenia z lejkiem do sączenia (3.7).
 - 3.9. Probówka o pojemności 10 ml ze stożkowym dnem i korkiem.
 - 3.10. Chromatograf gazowy współpracujący z kolumną kapilarną zaopatrzonego w system rozszczepiający składający się z:
 - 3.10.1. komory termostatycznej dla kolumn (piec kolumnowy) w celu utrzymania wymaganej temperatury z dokładnością do 1 °C.
 - 3.10.2. termostatycznego zespołu odparowującego (z otworem wtryskowym) ze szkłem krzemowanym;
 - 3.10.3. detektora jonizacyjnego płomienia oraz wzmacniacza-konwertera;
 - 3.10.4. współpracującego ze wzmacniaczem-konwerterem (3.10.3) rejestratora całkującego, którego czas reakcji nie przekracza jednej sekundy, o zmiennej prędkości podawania papieru.
 - 3.11. Kolumna kapilarna ze szkła lub topionej krzemionki o długości 20 do 30 m, o wewnętrznej średnicy 0,25 do 0,32 mm, pokryta od wewnątrz warstwą płynu SE-52 lub SE-54 lub im podobną, o grubości od 0,10 do 0,30 µm.
 - 3.12. Mikrostrzykawka do chromatografii gazowej o pojemności 10 µl z hartowaną igłą.
4. ODCZYNNIKI
 - 4.1. Wodorotlenek potasu, w przybliżeniu roztwór 2 mol/l w etanolu: 130 g wodorotlenku potasu (o stężeniu co najmniej 85 %) rozpuszczany jest, z jednoczesnym schładzaniem, w 200 ml destylowanej wody, a następnie uzupełniany etanolem do objętości jednego litra. Roztwór powinien być przechowywany w dobrze zakorkowanej butelce z ciemnego szkła.
 - 4.2. Czysty laboratoryjny eter dietylowy.
 - 4.3. Czysty laboratoryjny bezwodny siarczan sodu.

- 4.4. Płytki szklane do TLC pokryte żelom krzemionkowym, bez wskaźnika fluorescencyjnego o grubości 0,25 mm (dostępne w handlu w postaci gotowej do użytku).
- 4.5. Wodorotlenek potasu, roztwór 0,2 mol/l w etanolu; rozpuścić 13 g wodorotlenku potasu w 20 ml wody destylowanej uzupełnianych do 1 litra etanolem.
- 4.6. Benzen do chromatografii (patrz 5.2.2).
- 4.7. Aceton do chromatografii (patrz 5.2.2).
- 4.8. Heksan do chromatografii (patrz 5.2.2).
- 4.9. Eter dietylowy do chromatografii (patrz 5.2.2).
- 4.10. Chloform do chromatografii.
- 4.11. Roztwór wzorcowy do chromatografii cienkowarstwowej: 5 % mieszanina alkoholi C₂₀ do C₂₈ w chloroformie.
- 4.12. 0,2 % roztwór 2,7-dichlorofluorosceiny w etanolu. Uzyskuje ona nieco zasadowy charakter w wyniku dodania kilku kropel 2 mol/l roztworu wodorotlenku potasu.
- 4.13. Bezwodnik piridyny do chromatografii.
- 4.14. Heksametyldizylazyna.
- 4.15. Trimetylochlorosilan.
- 4.16. Roztwory eterów trimetylosilanowych alkoholi alifatycznych od C₂₀ do C₂₈. Można je otrzymać z mieszanin czystych alkoholi wówczas, gdy są potrzebne.
- 4.17. 0,1 % (m/v) roztwór 1-eikozanolu w CHCl₃ (wewnętrzny mianowany roztwór).
- 4.18. Gazy nośne: czysty wodór i hel do celów chromatografii gazowej.
- 4.19. Gazy pomocnicze:
 - czysty wodór do celów chromatografii gazowej,
 - czyste powietrze do celów chromatografii.

5. PROCEDURA

- 5.1. Przygotowanie substancji nieulegającej zmydleniu.
 - 5.1.1. Za pomocą mikrostrzykawki o pojemności 500 µl wprowadzić do kolby z okrągłym dnem o pojemności 250 µl pewną objętość 0,1 % roztworu 1-heikozanolu (można też użyć 1-eneikozanol) (4.17), w którym zawartość 1-eikozanolu stanowi w przybliżeniu około 10 % zawartości alkoholu alifatycznego w badanej części próbki. Przykład: do 5 g próbki dodać 250 µl 0,1 % roztworu 1-eikozanolu w przypadku analizy oliwy z oliwek lub nasion 1 500 µl, jeśli próbka pochodzi z oliwy z wytlóczyń oliwek. Odparować wewnętrzny roztwór mianowany do poziomu N₂.

Odważyć ilościowo do kolby około 5 g suchej przefiltrowanej próbki.

- 5.1.2. Dodaje się 50 ml roztworu 2 mol/l wodorotlenku potasu w etanolu, instalowana jest chłodnica zwrotna i aparatura zostaje poddana ogrzewaniu w kąpeli parowej z ciągłym mieszaniem przez cały czas ogrzewania, dopóki nie zajdzie proces zmydlenia (roztwór staje się przejrzysty). Ogrzewanie prowadzone jest przez następne 20 minut, a następnie przez chłodnicę wprowadzone zostaje 50 ml destylowanej wody, następnie chłodnica zostaje odłączona, a kolba jest schładzana do około 30 °C.
- 5.1.3. Zawartość kolby ilościowo przenosi się do lejka do sączenia o pojemności 500 ml i kolba wypłukana 2 x 25 ml destylowanej wody. Dodaje się około 80 ml eteru dietylowego — całość intensywnie wstrząsana przez 30 sekund, a dwie fazy do rozdzielania (Uwaga 1).

Znajdująca się niżej warstwa wodna jest odprowadzana do drugiego lejka do sączenia. Dalsze ekstrakcje z fazy wodnej przeprowadza się w taki sam sposób, każdorazowo stosując 60 do 70 ml eteru etylowego.

Uwaga 1. Emulsje mogą być eliminowane przez dodanie w postaci rozpylacza małych ilości alkoholu etylowego lub metylowego.

- 5.1.4. Ekstrakty eteru dietylowego zbierane są w rozdzielaczu i przepłukiwane wodą destylowaną (jednorazowo ilością 50 ml) dotąd, dopóki woda popłuczna nie da odczynu obojętnego.

Odrzucić warstwę wodną, osuszyć fazę eteru bezwodnym siarczanem sodu i przefiltrować do kolby o pojemności 250 ml, która wcześniej została zważona, przy czym lejek i filtr zostały przepłukane niewielkimi ilościami eteru dietylowego dodanymi do całości.

- 5.1.5 Eter jest odparowywany na drodze delikatnego podgrzewania do ilości kilku ml, a następnie reszta jest suszona w słabej próżni lub w strumieniu azotu; proces suszenia jest kończony w piecu w temperaturze 100 °C przez około 15 minut, a następnie, po schłodzeniu w eksykatorze, sucha pozostałość zostaje zważona.
- 5.2 Rozdzielanie frakcji alkoholowej.
- 5.2.1 Przygotowanie płytek podstawowych: zanurzyć płytki (4.4) całkowicie na okres 10 sekund w roztworze 0,2 mol/l wodorotlenku potasu (4.5), po czym pozostawić do wyschnięcia pod wyciągiem na okres dwóch godzin, a na koniec umieścić na okres 1 godziny w piecu nagrzanym do temperatury 100 °C.
- Płytki są następnie wyjmowane z pieca i umieszczane w eksykatorze z chlorku wapnia, w którym są przechowywane do chwili użycia. Poddane takiej obróbce płytki powinny być wykorzystane w ciągu dwóch tygodni.
- Uwaga 2.* Zastosowanie płytek z żelazem krzemionkowym do oddzielania frakcji alkoholowej eliminuje potrzebę poddawania nie ulegających zmydleniu substancji działaniu A1203. W ten sposób wszystkie związki kwasowe (kwasy tłuszczowe i inne) zatrzymane są na linii osadzania, przez co uzyskuje się pasma alkoholi alifatycznych i terpenowych, które są wyraźnie oddzielone od pasma steroli.
- 5.2.2. Napęlnić komorę chromatograficzną mieszaniną benzenu i acetonu w proporcji 95:5 do poziomu około 1 cm. Zamiennie może być zastosowana mieszanina heksanu i eteru dietylu w stosunku objętościowym 65:35. Pojemnik zamyka się i pozostawia na co najmniej 1 godzinę w celu uzyskania równowagi między cieczą i parą. Na wewnętrznych powierzchniach komory można umieścić paski papieru filtracyjnego, tak aby były one zanurzone w eluencie: pozwala to zmniejszyć do mniej więcej jednej trzeciej czas przemieszczenia linii cieczy i uzyskania bardziej jednorodnej elucji składników.
- Uwaga 3.* Przy każdej analizie roztwór wywołujący należy wymienić w celu uzyskania powtarzalnych warunków elucji.
- 5.2.3. Przygotować roztwór substancji nieulegającej zmydleniu (5.1.5) w chloroformie o stężeniu wynoszącym w przybliżeniu 5 % i za pomocą mikrostrzykawki o pojemności 100 µl rozprowadzić 300 µl tego roztworu równomiernie w postaci jednolitego pasma o jak najmniejszej grubości na płytce TLC w odległości około 2 cm od krawędzi płytki. Na przedłużeniu linii osadzania umieścić na jednym końcu płytki 2 do 3 µl wzorcowego roztworu alkoholi alifatycznych (4.11) w celu określenia pasma alkoholu alifatycznego, z chwilą gdy nastąpi rozwinięcie.
- 5.2.4. Umieścić płytkę wewnątrz komory jak podano w pkt. 5.2.2. Temperatura otoczenia powinna być utrzymywana w granicach od 15 do 20 °C. Bezwzględnie zamknąć pokrywę komory pozostawiając w niej próbkę w celu elucji, dopóki rozpuszczalnik nie dotrze na odległość 1 cm od górnej części płytki. Następnie wyjąć płytkę z komory i odparować rozpuszczalnik w strumieniu gorącego powietrza lub pozostawić płytkę na chwilę pod wyciągiem.
- 5.2.5. Spryskać lekko i równomiernie płytkę roztworem 2,7-dichlorofluoresceiny. Wyszukać pasmo alkoholi alifatycznych przyrównując do plamy utworzonej za pomocą roztworu wzorcowego; oddzielić pasmo czarnym ołówkiem od zespołu pasma alkoholi alifatycznych i pasma znajdującego się bezpośrednio powyżej odpowiadającego alkoholom terpenowym.
- Uwaga 4.* Wymóg w odniesieniu do usunięcia pasma alkoholi alifatycznych i terpenowych jest podyktowany przemieszczeniem się niektórych alkoholi alifatycznych do pasma alkoholi terpenowych.
- 5.2.6. Zdrapać żel krzemionkowy umieszczony na przedstawionym obszarze za pomocą metalowej szpatułki. Usunięty materiał rozdrobnić i wprowadzić do lejka do sączenia (3.7), dodać 10 ml gorącego chloroformu i całość starannie wymieszać metalową szpatułką i przefiltrować w próżni, przy czym filtrat jest zbierany do kolby (3.8) połączonej z lejkiem do sączenia.
- Pozostałość na filtrze jest przeniesiona trzykrotnie 10 ml eteru etylowego, a filtrat jest zbierany do tej samej kolby połączonej z lejkiem. Filtrat zostaje odparowany do objętości wynoszącej około 4 do 5 ml i pozostały roztwór jest przelewany do próbówki o pojemności 10 ml (3.9), która przedtem została zważona; próbówka suszona jest poprzez lekkie podgrzewanie w słabym strumieniu azotu. Ponownie rozpuścić pozostałość paroma kroplami acetonu, ponownie osuszyć, następnie umieścić w piecu w temperaturze 105 °C przez 10 minut, wyjąć, schłodzić w eksykatorze i zważyć.
- Pozostałość w próbówce to frakcja alkoholowa.
- 5.3. Przygotowanie trimetylsilyloeterów.
- 5.3.1. Do próbówki zawierającej frakcję alkoholową dodawany jest odczynnik wywołujący reakcję silylowania składający się z mieszaniny objętościowych w proporcji 9:3:1 (Uwaga 5) pirydyny- heksametyldisilazanu-trimetylchlorosilanu w ilości 50 µl na każdy miligram alkoholi wymieszanych, w sposób pozwalający uniknąć absorpcji wilgoci (Uwaga 6).
- Uwaga 5.* W handlu dostępne są roztwory gotowe do wykorzystania; ponadto inne odczynniki silylujące jak np. N, 0-bis(trimetylsilyl) trifluoroacetamid + 1 % trimetylochlorosilanu przeznaczone do wymieszania z taką samą objętością bezwodnika pirydyny.

- 5.3.2 Zatkaną próbkówkę, wstrząsać (bez odwracania) aż do rozpuszczenia alkoholi alifatycznych. Pozostawić na 15 minut w temperaturze otoczenia, następnie wirować przez kilka minut: przejrzysty roztwór może być poddany analizie metodą chromatografii gazowej.
- Uwaga 6. Ewentualne pojawienie się lekkiej opalizacji jest zjawiskiem normalnym i nie stanowi żadnej przeszkody. Biała zawiesina lub różowe zabarwienie wskazują na obecność wilgoci lub zmian w odczynniku. W takim przypadku próbę należy powtórzyć.
- 5.4. Analiza metodą chromatografii gazowej.
- 5.4.1. Operacje wstępne, przygotowanie kolumny kapilarnej.
- 5.4.1.1. Osadzić kolumnę w chromatografii gazowej łącząc końcówkę wlotową z czujnikiem podłączonym do systemu rozszczepiającego, a końcówkę wylotową z detektorem.
- Sprawdzić ogólnie zespół chromatografu (szczelność układu zasilania gazem, sprawność detektora, sprawność systemu rozszczepiania i systemu zapisu itp.).
- 5.4.1.2. Jeżeli kolumna kapilarna jest wykorzystywana po raz pierwszy, zalecane jest jej odpowiednie przygotowanie. Przepuścić przez kolumnę słaby strumień gazu nośnego, następnie zapalić zespół chromatografu gazowego i rozpocząć stopniowe podgrzewanie do temperatury co najmniej o 20 °C wyższej niż temperatura robocza (Uwaga 7). Podtrzymywać tę temperaturę przez co najmniej 2 godziny, a następnie doprowadzić zespół do stanu pracy (regulacja strumienia gazu i układu rozszczepiania, zapalenie płomienia, połączenie z rejestratorem elektronicznym, regulacja temperatury komory kolumny, detektora i inicjatora itd.) i dokonać zapisu sygnału z czułością co najmniej dwa razy większą od przewidzianej czułości analizy. Przebieg uzyskanej linii podstawowej musi mieć charakter liniowy, być pozbawiony szczytowych wartości bez względu na ich charakter i nie powinny w nim występować przesunięcia.
- Ujemne przesunięcie prostoliniowe wskazuje na złą szczelność połączeń kolumny, dodatnie przemieszczenie wskazuje na niedostateczne przygotowanie kolumny.
- Uwaga 7. Temperatura przygotowywania kolumny powinna być zawsze niższa co najmniej o 20 °C od maksymalnej przewidywanej temperatury użytej cieczy rozdzielającej.
- 5.4.2. Dobór warunków roboczych.
- 5.4.2.1. Maksymalne warunki robocze są następujące:
- temperatura kolumny: początkowa wartość izotermi jest ustawiona na 180 °C w ciągu 8 minut, a następnie zaprogramowany wzrost temperatury o 5 °C na minutę do wysokości 260 °C, po czym dodatkowo utrzymanie 260 °C przez 15 minut,
 - temperatura czujnika: 280 °C,
 - temperatura detektora: 290 °C,
 - prędkość liniowa gazu nośnego: hel — 20 do 35 cm/s, wodór — 30 do 50 cm/s,
 - stosunek rozdzielania: 1: 50 do 1: 100,
 - czułość przyrządów: 4 do 16 razy minimalne tłumienie,
 - czułość rejestratora: 1 do 2 mV fs,
 - prędkość przesuwu papieru: 30 do 60 cm /h,
 - ilość wprowadzonej substancji: 0,5 do 1 µl roztworu TMSE
- Warunki te mogą być zmieniane w zależności od charakterystyki kolumny i chromatografu gazowego w taki sposób, aby uzyskiwać chromatogramy spełniające następujące warunki:
- czas zatrzymania alkoholu C₂₆ powinien wynosić 18 ± 5 minut,
 - szczytowa wartość dla alkoholu C₂₂ powinna wynosić 80 ± 20 % skali tła, a dla olejów z nasion 40 ± 20 % skali tła.
- 5.4.2.2. W celu sprawdzenia powyższych wymaganych warunków dokonać kilkakrotnych iniekcji z próbek mieszaniny TMSE alkoholi i ustawić dokładnie warunki robocze do momentu uzyskania najlepszych wyników.
- 5.4.2.3. Parametry całkowite wartości szczytowych powinny być ustawione w sposób umożliwiający uzyskanie właściwych wartości w odniesieniu do uwzględnianych wartości szczytowych.
- 5.4.3. Wykonanie analizy.
- 5.4.3.1. Pobrać za pomocą mikrostrzykawki o pojemności 10 µl, 1 µl heksanu, zassać 0,5 µl powietrza a następnie 0,5- 1 µl roztworu próbki; pociągnąć tłoczek tak, aby opróżnić igłę.
- Wprowadzić igłę przez membranę zespołu iniekcyjnego i po upływie 1 do 2 sekund szybko opróżnić strzykawkę i powoli, tzn. mniej więcej po 5 sekundach, wyjąć igłę.
- 5.4.3.2. Prowadzić rejestrację do momentu całkowitego wypłukania TMSE obecnych w próbce alkoholi alifatycznych. Linia podstawowa powinna zawsze spełniać wymagane warunki (5.4.1.2).
- 5.4.4. Wyznaczenie wartości szczytowych.
- Wyznaczenie poszczególnych wartości szczytowych odbywa się w oparciu o okresy zatrzymania i przez porównanie z mieszaniną TMSE alkoholi alifatycznych poddanych analizie w tych samych warunkach.
- Rysunek 1 przedstawia chromatogram frakcji alkoholi zawartych w oliwie z pierwszego tłoczenia.
- 5.4.5. Ocena ilościowa.
- 5.4.5.1. Za pomocą elektronicznego urządzenia całkującego do obliczenia powierzchni wartości szczytowych 1-eikizanolu i alkoholi alifatycznych C₂₂ do C₂₈.

- 5.4.5.2. Zawartość każdego prostego alkoholu alifatycznego w mg/100 g substancji tłuszczowej oblicza się w następujący sposób:

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

gdzie:

A_x = powierzchnia wartości szczytowej odpowiadającej obecności alkoholu x w mm

A_s = powierzchnia wartości szczytowej odpowiadającej obecności 1-eikosanolu w mm

m_s = masa dodanego 1-eikizanolu w miligramach

m = masa próbki pobranej do badania w gramach

6. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

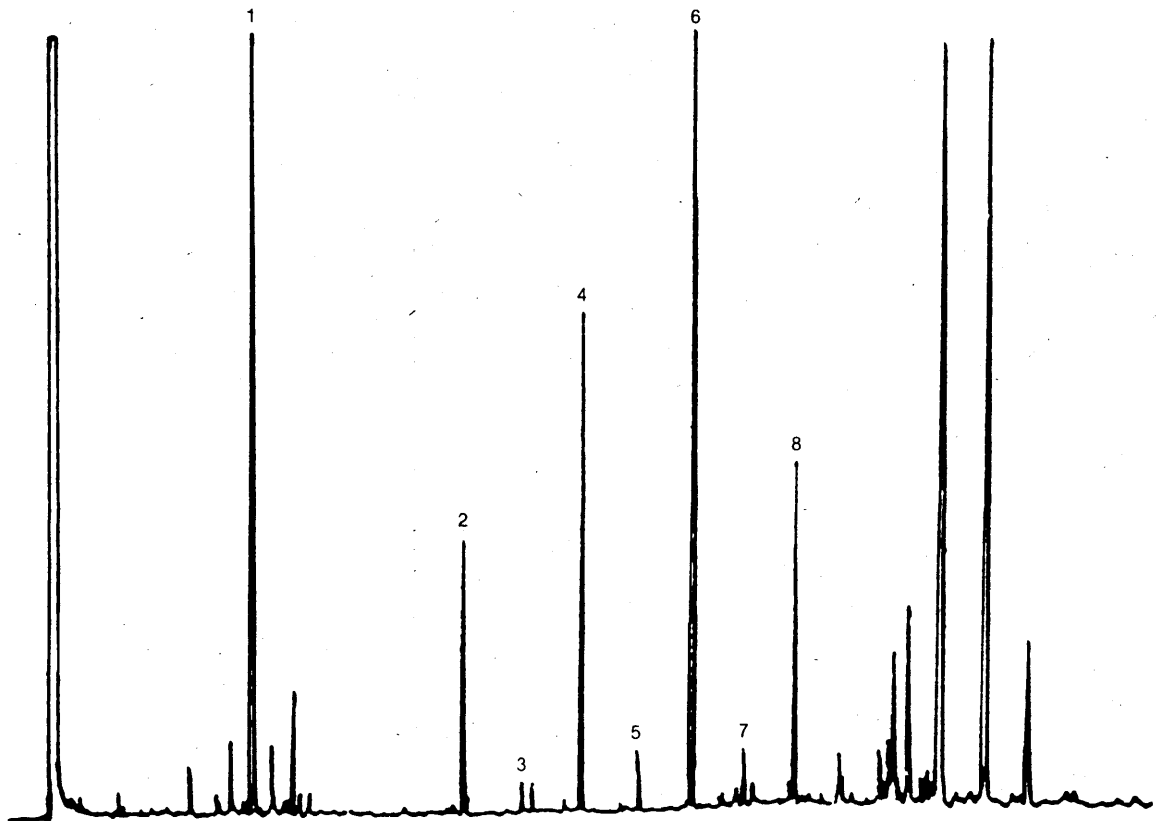
podac zawartoci prostych alkoholi alifatycznych w mg/100 g substancji tłuszczowej, a ich sumę jako „łączne alkohole alifatyczne”.

DODATEK

Oznaczenie prędkości liniowej gazu

Do chromatografu gazowego ustawionego na normalne warunki robocze wprowadzić 1 do 3 µl metanu lub propanu i mierzyć chronometrem czas, którego gaz potrzebuje, aby przejść przez kolumnę począwszy od momentu wstrzyknięcia do spadku wartości szczytowej (t_M).

Prędkość liniowa w cm/s określona jest jako L/t_M gdzie L jest długością kolumny w centymetrach, a t_M czasem zmierzonym w sekundach za pomocą stopera.



Rysunek 1 Chromatografia gazowa frakcji steroli nierafinowanej oliwy z oliwek

1 = Eikozanol (SI)

2 = Dokosanol

3 = Trikosanol

4 = Tetrakosanol

5 = Pentakosanol

6 = Heksakosanol

7 = Heptakosanol

8 = Oktakosanol

ZAŁĄCZNIK V

OZNACZENIE SKADU I ZAWARTOŚCI STEROLI METODĄ KAPILARNEJ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ

1. ZAKRES

metoda opisuje sposoby oznaczania zawartości prostych i łącznych steroli w substancjach tłuszczowych.
2. PODSTAWOWA ZASADA METODY

Substancja tłuszczowa, do której został dodany β -cholesterol w charakterze wewnętrznego mianowanego roztworu, jest zmydlana przy użyciu roztworu wodorotlenku potasu w etanolu, następnie część nieulegająca zmydleniu jest ekstrahowana eterem dietylowym.

Fracja sterolowa jest oddzielana od nieulegającego zmydleniu ekstraktu metodą chromatograficzną na podstawowej płytce z żelu krzemionkowego; sterole uzyskane z żelu krzemionkowego przekształcane są w trimetylsilyletery i analizowane w chromatografii gazowej z kolumną kapilarną.
3. APARATURA
 - 3.1. Kolba o pojemności 250 ml wyposażona w chłodnicę zwrotną ze szlifowanymi końcówkami.
 - 3.2. Rozdzielacz 500 ml.
 - 3.3. Kolby o pojemności 250 ml.
 - 3.4. Kompletny zestaw do chromatografii cienko-warstwowej łącznie z płytkami szklanymi 20 × 20 cm.
 - 3.5. Źródło światła ultrafioletowego o częstotliwości 366 lub 244 nm.
 - 3.6. Mikrostrzykawka o pojemności 100 i 500 μ l.
 - 3.7. Cylindryczny lejek do sączenia z porowatym filtrem G3 (wielkość porów 15 do 40 μ m) o średnicy około 2 cm i głębokości 5 cm z końcówką przystosowaną do filtracji w próżni i końcówką z zewnętrznym szlifem 12/21.
 - 3.8. Kolba o pojemności 50 ml z końcówką z wewnętrznym szlifem 12/21 do łączenia z lejkiem do sączenia (3.7).
 - 3.9. Probówka ze stożkowym dnem o pojemności 10 ml i szczelnym korkiem.
 - 3.10. Chromatograf gazowy dostawany do współpracy z kolumną kapilarną wyposażony w system oddzielania składający się z:
 - 3.10.1 komory termostatycznej dla kolumn w celu utrzymania wymaganej temperatury z dokładnością do 1 °C.
 - 3.10.2 termostatycznego zespołu odparowującego z otworem wtryskowym ze szkła krzemowanego
 - 3.10.3 Detektor jonizacyjny płomienia oraz wzmacniacza-konwertera
 - 3.10.4 współpracującego ze wzmacniaczem-konwerterem (3.10.3) rejestratora całkującego, którego czas reakcji nie przekracza jednej sekundy, o zmiennej prędkości podawania papieru.
 - 3.11. Kolumna kapilarna ze szkła lub topionej krzemionki o długości 20 do 30 m, o wewnętrznej średnicy 0,25 do 0,32 mm, całkowicie pokryta od wewnątrz warstwą płynu SE-52 lub SE-54 lub im podobną, o jednakowej grubości od 0,10 do 0,30 μ m.
 - 3.12. Mikrostrzykawka do chromatografii gazowej o pojemności 10 μ l z hartowaną igłą.
4. ODCZYNNIKI
 - 4.1. Wodorotlenek potasu, w przybliżeniu roztwór 2 mol/l w etanolu: 130 g wodorotlenku potasu (o stężeniu co najmniej 85 %) rozpuszcza się z jednoczesnym schładzaniem w 200 ml destylowanej wody, a następnie uzupełnia etanolem do objętości jednego litra. Roztwór powinien być przechowywany w dobrze zakorkowanej butelce z ciemnego szkła.

- 4.2. Czysty laboratoryjny eter dietylowy.
- 4.3. Czysty laboratoryjny bezwodny siarczan sodu.
- 4.4. Płytki szklane pokryte żelazem krzemionkowym, nie zawierającym wskaźnika fluorescencyjnego, o grubości 0,25 mm (dostępne w handlu w postaci gotowej do użytku)
- 4.5. Wodorotlenek potasu, roztwór 0,2 mol/l w etanolu; rozpuścić 13 g wodorotlenku potasu w 20 ml wody destylowanej uzupełnianych do 1 litra etanolem.
- 4.6. Benzen do chromatografii (patrz 5.2.2)
- 4.7. Aceton do chromatografii (patrz 5.2.2)
- 4.8. Heksan, do chromatografii (patrz 5.2.2)
- 4.9. Eter dietylowy do chromatografii (patrz 5.2.2)
- 4.10. Chloform do chromatografii.
- 4.11. Roztwór chłodzący stosowany w chromatografii płytkowej: roztwór cholesterolu lub fitosterolu w chloroformie o stężeniu 0,5 %.
- 4.12. 0,2 % roztwór 2,7-dichlorofluoresceiny w etanolu. Uzyskuje on nieco zasadowy charakter w wyniku dodania kilku kropel 2 mol/l roztworu wodorotlenku potasu w alkoholu.
- 4.13. Bezwodnik piridyny do chromatografii.
- 4.14. Heksametyldizylazyna
- 4.15. Trimetylochlorosilan.
- 4.16. Roztwory eterów trimetylosilanowych steroli; należy je przygotowywać tuż przed użyciem ze steroli czy- stych lub mieszanek steroli, uzyskanych z zawierających je olejów.
- 4.17. 0,2 % roztwór (m/V) α -cholestanolu w chloroformie (wewnętrzny mianowany roztwór).
- 4.18. Gazy nośne: czysty wodór i hel do celów chromatografii gazowej.
- 4.19. Gazy pomocnicze:
 - czysty wodór do celów chromatografii gazowej,
 - powietrze, do celów chromatografii gazowej.

5. PROCEDURA

5.1 Przygotowanie substancji nie ulegającej zmydleniu.

- 5.1.1. Do kolby o pojemności 250 ml wprowadzić za pomocą mikrostrzykawki o pojemności 500 μ l pewną objętość 0,2 % roztworu β -cholestanolu w chloroformie (4.17) zawierającą ilość cholestanolu odpowia- dającą w przybliżeniu 10 % steroli zawartych w części próbki, która ma być pobrana do badania.

Na przykład w przypadku próbki oliwy z oliwek o wielkości 5 g należy dodać 500 μ l, a w przypadku próbki oleju z nasion lub makuchów oliwek takiej samej wielkości — 1 500 μ l 0,2 % roztworu β -cholestanu. Odparować do wysuszenia w strumieniu azotu, a następnie odważyć dokładnie 5 g suchej przefiltrowanej próbki w tej samej kolbie.

W przypadku olejów i tłuszczów zwierzęcych i roślinnych zawierających znaczne ilości cholesterolu, może pojawić się wartość szczytowa odpowiadająca takiemu samemu czasowi zatrzymania jak cholestanol. W takich przypadkach należy dokonać podwójnej analizy frakcji steroli — bez dodawania mianowanego roz- tworu i z dodaniem tego roztworu.

- 5.1.2. Dodać 50 ml 2 mol/l roztworu wodorotlenku potasu w etanolu, uruchomić chłodzenie zwrotne, pod- grzać w łaźni wodnej do temperatury lekkiego wrzenia cały czas mieszając intensywnie aż do zmydlenia (roztwór staje się przejrzysty). Kontynuować podgrzewanie przez 20 minut, a następnie dodać 50 ml wody destylowanej do górnej części chłodnicy, odłączyć chłodnicę i schłodzić kolbę do temperatury około 30 °C.

- 5.1.3. Przenieść zawartość kolby do rozdzielacza o pojemności 500 ml płuczając ją kilkakrotnie wodą destylo- waną, łącznie około 50 ml wody. Dodać około 80 ml eteru etylowego, mieszać energicznie przez 30 sekund i odstawić do rozdzielnia faz (Uwaga 1).

Oddzielić dolną fazę wodną dekantując ją do innej kolby. Przeprowadzić jeszcze dwie ekstrakcje na fazie wodnej w ten sam sposób stosując każdorazowo około 60 do 70 ml eteru dietylowego.

Uwaga 1: Wszelkie powstałe emulsje można wyeliminować dodając w tym celu za pomocą tryskawki niewielką ilość alkoholu etylowego lub metylowego.

- 5.1.4. Zebrać wszystkie eterowe ekstrakty do jednego rozdzielacza i wypłukać wodą destylowaną (každorazowo stosując 50 ml) aż do uzyskania obojętnego odczynu wody popłucznej.

Usunąć wodę popłucznią, wysuszyć bezwodnikiem siarczanu sodu i przefiltrować przez bezwodnik siarczanu sodu do zważonej uprzednio kolby o pojemności 250 ml, płuczając rozdzielacz i filtr niewielkimi ilościami eteru dietylowego.

- 5.1.5. Eter jest ulatniany delikatnym ogrzewaniem do kilku ml, a następnie osuszyć w słabej próżni lub w strumieniu azotu, zakończyć proces około 15-minutowym suszeniem w piecu w temperaturze 100 °C, a po schłodzeniu zważyć w eksykatorze.

- 5.2. Oddzielanie frakcji steroli.

- 5.2.1. Przygotowanie płytek podstawowych: zanurzyć całkowicie płytki z żelu krzemionkowego (4.4) w 0,2 mol/l roztworze wodorotlenku potasu w etanolu (4.5) na 10 sekund, a następnie zamknąć je na dwie godziny pod wyciągiem, a na koniec umieścić na godzinę w piecu nagrzanym do temperatury 100 °C.

Wyjąć z pieca i umieścić w eksykatorze z chlorku wapnia aż do czasu ich użycia (poddane takiej obróbce płytki powinny być wykorzystane w ciągu 15 dni).

Uwaga 2: Zastosowanie płytek z żelu krzemionkowego do oddzielania frakcji steroli, eliminuje potrzebę poddawania nie ulegających zmydleniu substancji działaniu tlenku glinu. W ten sposób wszystkie związki kwasowe (kwasy tłuszczowe i inne) zatrzymują się na linii osadzania. Uzyskuje się dzięki temu pasmo steroli, które jest wyraźnie oddzielone od pasma alkoholi alifatycznych i terpenowych.

- 5.2.2. Napełnić komorę chromatograficzną mieszaniną benzenu i acetonu w proporcji 95:5 (v/v) do poziomu około 1 cm. Zamiennie można użyć mieszaniny heksanu i eteru dietylowego w stosunku 65:35 (v/v). Zamknąć komorę i pozostawić na co najmniej 1 godzinę w celu uzyskania równowagi układu ciecz–para. Na wewnętrznych powierzchniach komory można umieścić paski papieru filtracyjnego, tak, aby były one zanurzone w eluencji: pozwala to zmniejszyć do mniej więcej jednej trzeciej czas przemieszczenia linii cieczy i uzyskania bardziej jednolitej elucji składników.

Uwaga 3. Przy każdej analizie mieszaninę należy wymienić w celu uzyskania powtarzalnych warunków elucji.

- 5.2.3. Przygotować około 5 % roztwór substancji nieulegającej zmydleniu (5.1.5) w chloroformie i za pomocą mikrostrzykawki o pojemności 100 µl rozprowadzić 300 µl ml tego roztworu równomiernie w postaci jednolitego pasma o jak najmniejszej grubości na płycie chromatograficznej w odległości około 2 cm od krawędzi płytki. Na przedłużeniu taśmy umieścić na jednym końcu płytki 2 do 3 µl wzorcowego roztworu sterolu (4.11) w celu określenia pasma steroli podczas ostatniego rozwinięcia.

- 5.2.4. Wewnątrz komory chromatograficznej umieścić płytkę przygotowaną w sposób opisany w pkt. 5.2.2. Temperatura otoczenia powinna być utrzymywana w granicach od 15 do 20 °C. Bezzwłocznie zamknąć pokrywę komory pozostawiając w niej próbkę w celu eluacji, dopóki rozpuszczalnik nie dotrze na odległość 1 cm z górnej części płytki. Następnie wyjąć płytkę z komory i odparować rozpuszczalnik w strumieniu gorącego powietrza lub pozostawić płytkę na chwilę pod wyciągiem.

- 5.2.5. Spryskać lekko i równomiernie płytkę roztworem 2,7-dichlorofluoresceiny. Wyszukać pasmo steroli przyrównując do plamy utworzonej za pomocą roztworu wzorcowego; oddzielić pasmo czarnym ołówkiem wzdłuż fluoryzujących krawędzi.

- 5.2.6. Zdrapać żel krzemionkowy znajdujący się na zaznaczonym obszarze za pomocą metalowej szpatułki. Usunięty materiał rozdrobnić i wprowadzić do lejka do sączenia (3.7), dodać 10 ml gorącego chloroformu i całość starannie wymieszać metalową szpatułką i przefiltrować w próżni, przy czym filtrat jest zbierany do stożkowej kolby (3.8) połączonej z lejkiem do sączenia.

Pozostałość na filtrze przepłukać 3/10 ml eterem dietylowym a filtrat jest zbierany do tej samej kolby połączonej z lejkiem. Filtrat jest odparowany do objętości wynoszącej około 4 do 5 ml i pozostały roztwór przelany do probówki o pojemności 10 ml (3.9), która przedtem została zważona; probówka jest suszona przez lekkie podgrzewanie w słabym strumieniu azotu. Ponownie pozostałość jest rozpuszczona paroma kroplami acetonu, ponownie osuszona, następnie umieszczona w piecu w temperaturze 105 °C przez 10 minut, wyjęta, schłodzona w eksykatorze i zważona.

Pozostałość w probówce to frakcja steroli.

- 5.3. Przygotowanie trimetylsilyloeterów.

- 5.3.1. Do probówki zawierającej frakcję steroli dodawać odczynnik wywołujący reakcję silylowania składający się z mieszaniny pirydyny- heksametyldisilazanu-trimetylchlorosilanu w proporcji 9:3:1 (v/v/v) w ilości 50 µl na każdy miligram steroli, w sposób pozwalający uniknąć wchłaniania wilgoci (Uwaga 5).

Uwaga 4: W handlu dostępne są roztwory gotowe do wykorzystania; ponadto inne odczynniki silylujące jak np. bis-trimetylsilyltryfluoroacetamid + 1 % trimetylochlorosilanu przeznaczone do wymieszania z taką samą objętością bezwodnika pirydyny.

- 5.3.2 Zatkaną próbkówkę, wstrząsać (bez odwracania) aż do uzyskania pełnej stabilizacji steroli. Pozostawić na 15 minut w temperaturze otoczenia, następnie wirować przez kilka minut: przejrzysty roztwór może być podany analizie metodą chromatografii gazowej.
- Uwaga 5:* Ewentualne pojawienie się lekkiej opalizacji jest zjawiskiem normalnym i nie stanowi żadnej przeszkody. Biała zawiesina lub różowe zabarwienie wskazują na obecność wilgoci lub zmian w odczynniku. W takim przypadku próbę należy powtórzyć.
- 5.4. Analiza metodą chromatografii gazowej.
- 5.4.1. Operacje wstępne, przygotowanie kolumny.
- 5.4.1.1. Osadzić kolumnę w chromatografie gazowym łącząc końcówkę wlotową z wyparką podłączoną do systemu rozszczepiającego, a końcówkę wylotową z detektorem.
- Dokonać ogólnych kontroli zespołu chromatografu (szczelność układu zasilania gazem, sprawność detektora, sprawność systemu rozszczepiania i systemu zapisu itp.).
- 5.4.1.2. Jeżeli kolumna jest wykorzystywana po raz pierwszy, zalecane jest jej odpowiednie przygotowanie. Przepuścić przez kolumnę słaby strumień gazu nośnego, następnie zapalić zespół chromatografu gazowego i rozpocząć stopniowe podgrzewanie do temperatury co najmniej o 20 °C wyższej niż temperatura robocza (Uwaga 6). Podtrzymywać tę temperaturę przez co najmniej 2 godziny, a następnie doprowadzić zespół do stanu pracy (regulacja strumienia gazu i układu rozszczepiania, zapalenie płomienia, połączenie z rejestratorem elektronicznym, regulacja temperatury komory kolumny, detektora i inicjatora itd.) i dokończyć zapisu sygnału z czułością co najmniej dwa razy większą od przewidzianej czułości analizy.
- Przebieg uzyskanej linii podstawowej musi mieć charakter liniowy, jest pozbawionym jakiegokolwiek wartości szczytowej i nie powinny w nim występować przesunięcia. Ujemne przesunięcie prostoliniowe wskazuje na złą szczelność połączeń kolumny, dodatnie przemieszczenie wskazuje na niedostateczne przygotowanie kolumny
- Uwaga 6:* Temperatura przygotowywania kolumny powinna być zawsze niższa co najmniej o 20 °C od maksymalnej przewidywanej temperatury użytej cieczy rozdzielającej.
- 5.4.2. Dobór warunków roboczych.
- 5.4.2.1. Wytyczne warunki robocze są następujące:
- temperatura kolumny 260 °C ± 5 °C,
 - temperatura wyparki: 280 °C
 - temperatura detektora: 290 °C
 - prędkość liniowa gazu nośnego: hel — 20 do 35 cm/s; wodór — 30 do 50 cm/s,
 - stosunek rozdzielania: 1: 50 do 1: 100,
 - czułość przyrządów; 4 do 16 razy minimalne tłumienie
 - czułość rejestratora: 1 do 2 mV f.s.,
 - prędkość przesuwu papieru: 30 do 60 cm na godzinę
 - ilość wprowadzonej substancji: 0,5 do 1 µl roztworu TMSE.
- Warunki te mogą być zmieniane w zależności od charakterystyki kolumny i chromatografu gazowego w taki sposób, aby uzyskiwać chromatogramy spełniające następujące warunki:
- czas zatrzymania b-sitosterolu powinien wynosić 20 ± 5 minut,
 - szczytowa wartość dla kampesterolu powinna wynosić: dla oliwy z oliwek (średnia zawartość 3 %) 15 ± 5 % skali tła, a dla oleju sojowego (średnia zawartość) 80 ± 10 % skali tła,
 - musi nastąpić oddzielenie wszystkich występujących w próbce steroli; konieczne jest, aby inne wartości szczytowe były również całkowicie oddzielone, co oznacza, że wykres wartości szczytowej powinien łączyć się z podstawą zanim pojawi się następna wartość szczytowa. Niepełna rozdzielczość jest jednak tolerowana pod warunkiem, że jest ona mierzalna wzdłuż prostopadłej do wartości szczytowej w punkcie TRR 1,02.
- 5.4.3. Wykonanie analizy.
- 5.4.3.1. Pobrać za pomocą mikrostrzykawki o pojemności 10 µl 1 µl heksanu, zassać 0,5 µl powietrza, a następnie 0,5 — 1 µl roztworu próbki; pociągnąć tłoczek tak, aby opróżnić igłę. Wprowadzić igłę przez membranę zespołu iniekcyjnego i po upływie 1 do 2 sekund szybko opróżnić strzykawkę i powoli, tzn. mniej więcej po 5 sekundach, wyjąć igłę.
- 5.4.3.2. Prowadzić rejestrację do momentu całkowitego wypłukania TMSE występujących w próbce steroli. Linia podstawowa powinna zawsze spełniać wymagane warunki (5.4.1.2).
- 5.4.4. Wyznaczenie wartości szczytowych.
- Wyznaczenie poszczególnych wartości szczytowych odbywa się w oparciu o okresy zatrzymania i przez porównanie z mieszaniną TMSE steroli poddanych analizie w tych samych warunkach.
- Sterole podlegają elucji w następującej kolejności: cholesterol, brassikasterol, 24-metylen- cholesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ 7- kampesterol, Δ 5,23 stigmastadienol, klerosterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ 5-avenasterol, Δ 5,24 stigmastadienol, Δ 7-stigmastenol, Δ 7-avenasterol.

Tabela 1 podaje czasy zatrzymania w odniesieniu do sitosterolu dla kolumn SE-52 i SE-54.

Rysunek 1 i 2 przedstawiają typowe chromatogramy kilku rodzajów oleju.

5.4.5. Ocena ilościowa.

5.4.5.1 Przystąpić do obliczania za pomocą integratora powierzchni wartości szczytowych β -cholesterolu i steroli. Nie uwzględniać ewentualnych wartości szczytowych związków nie wymienionych w tabeli 1. Współczynnik charakterystyki GLV β -cholesterolu przyjmuje się jako 1.

5.4.5.2. Obliczyć zawartość każdego prostego sterolu w mg/100 g substancji tłuszczowej w następujący sposób:

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

gdzie:

A_x = powierzchnia wartości szczytowej odpowiadającej obecności sterolu x w mm²

A_s = powierzchnia wartości szczytowej odpowiadającej obecności β -cholestanolu w mm²

m_s = masa dodanego β -cholestanolu w miligramach

m = masa próbki pobranej do badania w gramach

6. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

6.1. PODAĆ zawartości każdego sterolu w mg/100g substancji tłuszczowej, a ich sumę jako „sterole łączne”.

6.2. Procentową zawartość każdego sterolu oblicza się ze stosunku powierzchni odpowiedniej wartości szczytowej do sumy powierzchni wartości szczytowych steroli.

$$\% \text{ sterol } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \cdot 100$$

gdzie:

A_x = powierzchnia wartości szczytowej dla x;

ΣA = łączna powierzchnia wartości szczytowej.

DODATEK

Oznaczenie prędkości liniowej gazu

Do chromatografu gazowego ustawionego na normalne warunki robocze wprowadzić 1 do 3 μ l metanu lub propanu i mierzyć chronometrem czas, którego gaz potrzebuje, aby przejść przez kolumnę począwszy od momentu wstrzyknięcia do spadku wartości szczytowej (t_M).

Prędkość liniowa w cm/s określona jest jako L/t_M , gdzie L jest długością kolumny w centymetrach, a t_M czasem zmierzonym w sekundach.

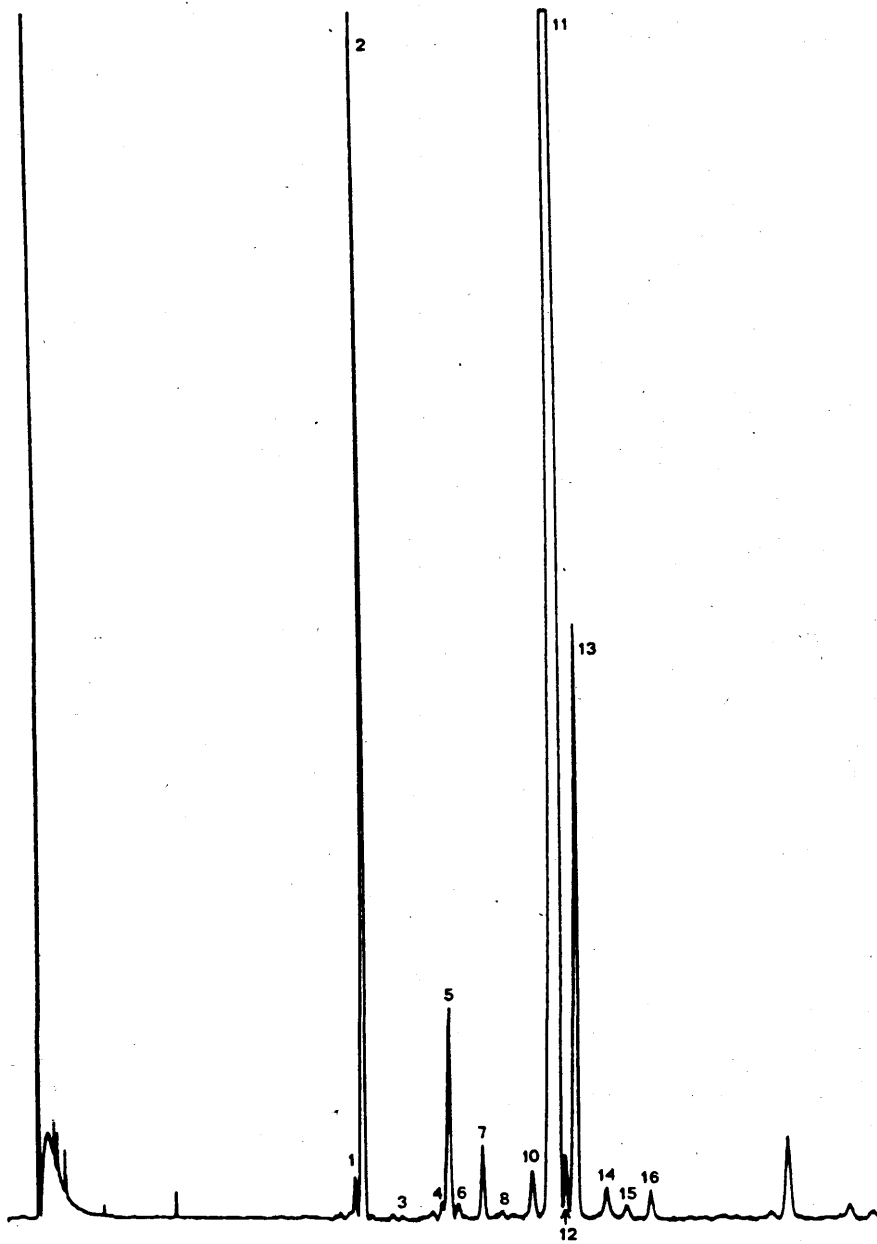
Tabela 1

Względne wielkości czasu zatrzymania dla steroli

Wartość szczytowa	Oznaczenie		Względna wielkość czasu zatrzymania	
			SE 54 Kolumna	SE 52 Kolumna
1	cholesterol	Δ -5-cholesten-3 β -ol	0,67	0,63
2	cholestanol	5 α -cholestan-3 β -ol	0,68	0,64
3	brassikasterol	[24S]- 24-metyl- Δ -5,22-cholestadien-3 β -ol	0,73	0,71
4	24-metylen-cholesterol	24-metylen- Δ -5,24-cholesten-3 β -ol	0,82	0,80
5	kampesterol	[24R]- 24-metyl- Δ -5-cholesten-3 β -ol	0,83	0,81
6	kampestanol	[24R]- 24-metyl-cholestan	0,85	0,82
7	stigmasterol	[24R]-etyl- Δ - 5,22-cholestadien-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ -7-kampesterol	[24R]-metyl- Δ - 7-cholesten-3 β -ol	0,93	0,92
9	Δ -5,23-stigmastadienol	[24R, S]- 24-etyl- Δ - 5,23-cholestadien-3 β -ol	0,95	0,95
10	chlerosterol	[24S]- 24-etyl- Δ - 5,25-cholestadien-3 β -ol	0,96	0,96
11	β -sitosterol	[24R]- 24-etyl- Δ - 5-cholestan-3 β -ol	1,00	1,00
12	sitostanol	24-etyl-cholestan-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ -5-avenasterol	[24Z]- 24-etylid-5-cholesten-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5,24-stigmastadienol	[24R, S]- 24-etyl- Δ - 5,24-cholestadien-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastenol	[24R, S]- 24-etyl- Δ - 7,24-cholestadien-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasterol	[24Z]- 24-etylid- Δ - 7-cholesten-3 β -ol	1,16	1,16

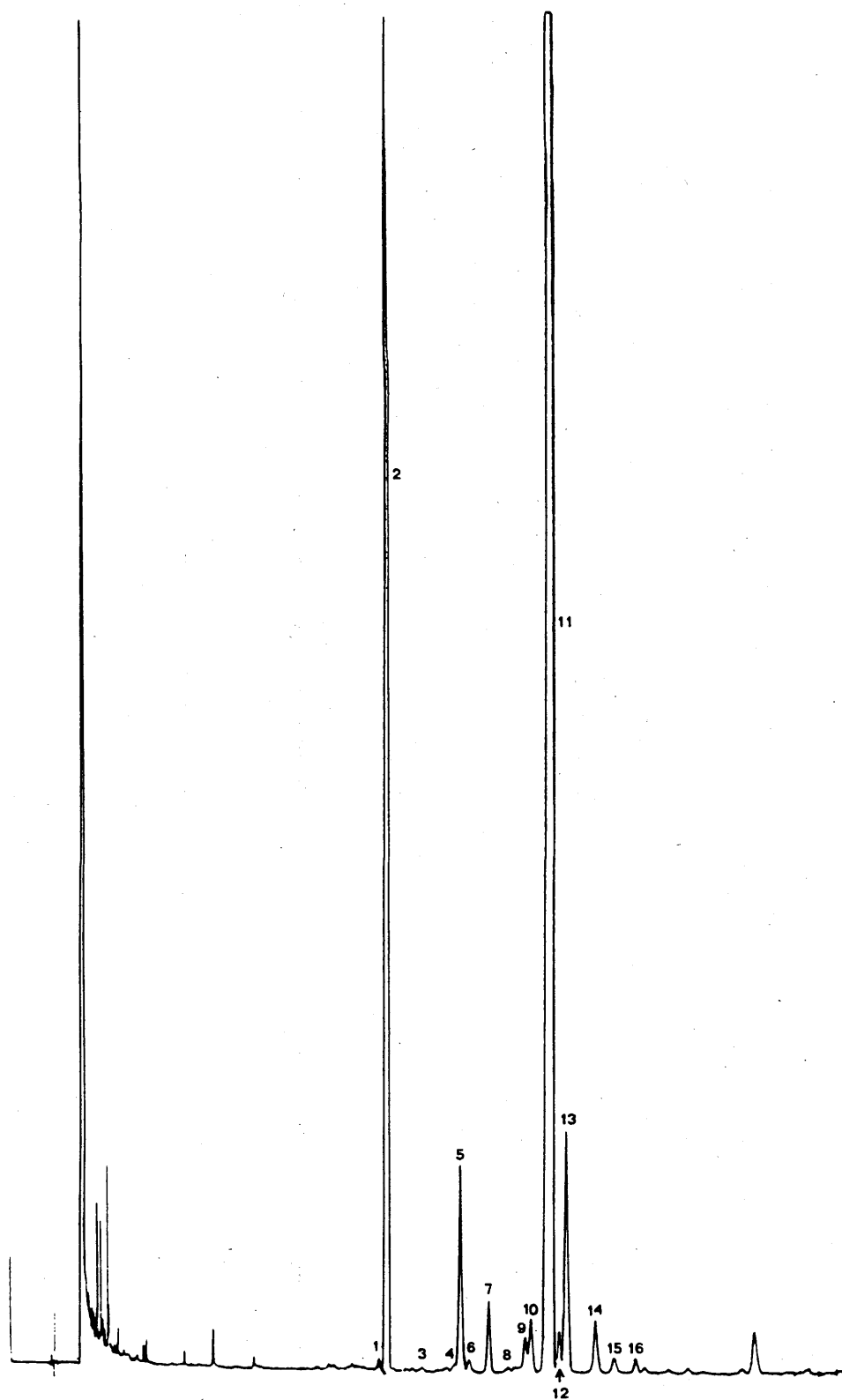
Rysunek 1

Chromatografia gazowa frakcji steroli nierafinowanej oliwy z oliwek



Rysunek 2

Chromatografia gazowa frakcji steroli nierafinowanej oliwy z oliwek



ZAŁĄCZNIK VI

OZNACZANIE ERYTRODIOLU I UVAOLU

WSTĘP

Erytrodiol (ogólna nazwa stosowana powszechnie w odniesieniu do glikoli; erytrodiolu i uvaolu) jest składnikiem substancji nie zmydlającej się, która występuje w pewnych substancjach tłuszczowych. Jego oznaczenie może służyć do sprawdzenia obecności ekstraktu oliwy z oliwek, przy czym jego stężenie jest w niej zdecydowanie większe niż w innych rodzajach oliwy (oliwa tłoczona z oliwek, oliwa z nasion winogron).

1. ZAKRES

przedstawiona tu metoda opisuje sposób oznaczania zawartości erytrodiolu w substancjach tłuszczowych.

2. PODSTAWOWA ZASADA METODY

substancja tłuszczowa zmydlana jest roztworem wodorotlenku potasu w etanolu. Frakcja niezmydlająca się jest następnie ekstrahowana eterem dietylowym, czyszczona w kolumnie siarczanu glinu i rozdzielana metodą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach z żelu krzemionkowego.

Następnie rozdzielane są pasma frakcji sterolowej i erytrodiolowej. Oddzielone na płytkach sterole i erytrodiol są przekształcane w trimetylsilyletery i analizowane metodą chromatografii gazowej.

Wyniki podaje się w procentach erytrodiolu w mieszaninie erytrodiolu i steroli.

3. APARATURA

- 3.1. aparatura opisana w załączniku V (oznaczanie zawartości steroli).

4. ODCZYNNIKI

- 4.1. odczynniki wymienione w załączniku v (oznaczanie zawartości steroli).
- 4.2. 5 % roztwór wzorcowy erytrodiolu w chloroformie.

5. PROCEDURA

5.1. **Przygotowanie substancji nieulegającej zmydleniu.**

Zgodnie z opisem podanym w pkt. 5.1.2 załącznika V.

5.2. **Oddzielanie erytrodiolu i steroli.**

- 5.2.1. Patrz pkt. 5.2.1 metody podanej w załączniku V.
- 5.2.2. Patrz pkt. 5.2.2 metody podanej w załączniku V.
- 5.2.3. Przygotować roztwór substancji nieulegającej zmydleniu (5 %) w chloroformie.

Za pomocą mikrostrzykawki o pojemności 0,1 ml rozprowadzić na płytce chromatograficznej w odległości około 1,5 cm od jej dolnej krawędzi, 0,3 ml wspomnianego roztworu w postaci możliwie jak najcieńszej i jednorodnej linii.

Na jednym końcu płytki umieścić jako wzorzec kilka mikrolitrów roztworu cholesterolu i erytrodiolu.

- 5.2.4. Umieścić płytkę wewnątrz komory jak podano w pkt. 5.2.1. Temperatura otoczenia powinna wynosić około 20 °C. Bezwłocznie zamknąć pokrywę komory pozostawiając w niej próbkę w celu elucji, dopóki rozpuszczalnik nie dotrze na odległość 1 cm od górnej części płytki. Następnie wyjąć płytkę z komory i odprowadzić rozpuszczalnik w strumieniu gorącego powietrza.
- 5.2.5. Spryskać równomiernie płytkę roztworem 2,7-dichlorofluoresceiny. Badając płytkę w świetle ultrafioletowym wyszukać pasma steroli i erytrodiolu przyrównując do składników wzorcowych; następnie zaznaczyć ostrym przyrządem nieco poza krawędziami fluoryzującej substancji.

5.2.6. Zdrapać żel krzemionkowy umieszczony na zaznaczonych obszarach za pomocą metalowej szpatułki. Umieścić materiał usunięty z płytki w kolbie o pojemności 50 ml. Dodać 15 ml gorącego chloroformu, całość starannie wymieszać i przefiltrować w kolbie z filtrem porowatym przenosząc żel krzemionkowy na filtr. Przepłukać trzykrotnie w ciepłym chloroformie (używając każdorazowo około 10 ml) i zebrać filtrat w kolbie o pojemności 100 ml. Odparowywać aż do uzyskania objętości rzędu 4 do 5 ml, przelać do próbówki wirówkowej z dnem stożkowym o pojemności 10 ml, uprzednio zważonej, osuszyć ogrzewając lekko w strumieniu azotu i zważyć.

5.3. **Przygotowanie trimetylsilyloeterów**

Postępować zgodnie z pkt. 5.3 metody opisanej w załączniku V.

5.4. **Analiza metodą chromatografii gazowej.**

Postępować zgodnie z pkt. 5.4 tej samej metody. Analiza metodą chromatografii gazowej powinna być prowadzona w warunkach umożliwiających przestrzeganie wymogów analizy steroli i rozdzielania TMSE erytrodiolu i uvaolu.

Po wstrzyknięciu próbki pozostawić papier tak, aby rozwijał się aż do całkowitej elucji występujących w niej steroli — erytrodiolu i uvaolu. Następnie określić położenie wartości szczytowych (względne wartości czasu zatrzymania erytrodiolu i uvaolu w stosunku do B-sitosterolu wynoszą odpowiednio około 1,45 i 1,55). Następnie obliczyć powierzchnie według zasady podanej dla steroli.

6. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

$$\% \text{erytrodiol} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{steroli}}} \times 100$$

gdzie:

A_1 = obszar wartości szczytowej dla erytrodiolu w mm;

A_2 = obszar wartości szczytowej dla uvaolu w mm;

$\sum A_{\text{steroli}}$ = łączny obszar wartości szczytowej dla steroli w mm.

Wynik jest podawany do jednego miejsca po przecinku.

ZAŁĄCZNIK VII

OZNACZANIE NASYCONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W POZYCJI 2 TRIGLICERYDU

1. ZAKRES

niniejsza norma zawiera opis metody oznaczania składu frakcji kwasów tłuszczowych w oleju lub estryfikowanej substancji tłuszczowej w pozycji 2 (lub pozycji wewnętrznej) glicerolu.

2. ZAKRES STOSOWANIA

niniejsza norma odnosi się do olejów i substancji tłuszczowych o temperaturze topnienia poniżej 45 °C, z uwagi na parametry działania lipazy trzustkowej.

Dotyczy ona z pewnymi ograniczeniami olejów i substancji tłuszczowych z dużą ilością kwasów tłuszczowych zawierających liczbę atomów węgla równą lub mniejszą niż 12 (olej kokosowy i palmowy, substancja tłuszczowa masłowa), kwasy tłuszczowe o wysokim stopniu nienasylenia (posiadające więcej niż cztery wiązania podwójne) posiadające liczbę atomów węgla równą lub większą niż 12 (oleje z ryb i zwierząt morskich) lub kwasy tłuszczowe zawierające inne grupy tlenowe niż grupa kwasowa.

3. ZASADA

ewentualne zobojętnienie olejów i kwasów tłuszczowych w rozpuszczalniku. Oczyszczenie na drodze przepuszczania przez złożę siarczanu glinowego. Częściowa hydroliza triglicerydów za pomocą lipazy trzustkowej przez z góry ustalony okres czasu. Oddzielenie monoglicerydów powstałych podczas chromatografii cienkowsarstwowej i metanolizamonoglicerydów. Analiza estrów metylowych metodą chromatografii gazowej/ciekłej.

4. APARATURA

- 4.1. kolba o pojemności 100 ml.
- 4.2. Kolba o pojemności 25 ml ze szlifowaną szyjką.
- 4.3. Chłodnica powietrzna o długości 1 m, którą można połączyć z kolbą z pkt. 4.2.
- 4.4. Kolba stożkowa o pojemności 250 ml.
- 4.5. Zlewka o pojemności 50 ml.
- 4.6. Rozdzielacz o pojemności 500 ml.
- 4.7. Szklana kolumna chromatograficzna (wewnętrzna średnica: 13 mm; długość: 400 mm) wyposażona w płytkę szklaną ze spieku szklanego i kranik.
- 4.8. Probówka do wirowania o pojemności 10 ml ze szlifowanym korkiem.
- 4.9. Biureta na 5 ml z podziałką co 0,05 ml.
- 4.10. Strzykawka podskórna o pojemności 1 ml z cienką igłą.
- 4.11. Mikrostrzykawka do zakraplania o pojemności od 3 do 4 µl.
- 4.12. Skrapiarka do chromatografii cienkowsarstwowej.
- 4.13. Płytki szklane do chromatografii cienkowsarstwowej (20 × 20 cm).
- 4.14. Szklana komora chromatograficzna do chromatografii cienkowsarstwowej ze szlifowaną pokrywką dostosowana do płytek 20 × 20 cm.
- 4.15. Rozpylacz do chromatografii cienkowsarstwowej.
- 4.16. Suszarka nastawiona na 103 ± 2 °C
- 4.17. Termostat z zakresem regulacji od 30 do 45 °C o dokładności około 0,5 °C.
- 4.18. Wyparka obrotowa.
- 4.19. Elektryczne mieszadło wibracyjne umożliwiające intensywne mieszanie próbki do odwirowywania.
- 4.20. Źródło światła ultrafioletowego do badania płytek do chromatografii cienkowsarstwowej.

Do kontroli działania lipazy:

- 4.21. pH-metr
- 4.22. Mieszadło spiralne.
- 4.23. Biureta o pojemności 5 ml.
- 4.24. Stoper.

Do ewentualnego przygotowania lipazy:

- 4.25. Mieszadło laboratoryjne nadające się do rozproszenia i mieszania substancji niejednorodnych.

5. ODCZYNNIKI

- 5.1. N — heksan lub, w razie jego braku, frakcja ropy naftowej (30 °C do 50 °C) nadająca się do chromatografii.
- 5.2. 2-propanol (lub etanol), 95 °C (v/v) jakość laboratoryjna odczynnika.
- 5.3. 2-propanol (lub etanol) w postaci roztworu wodnego 1:1.
- 5.4. Eter dietylowy pozbawiony nadtlenu.
- 5.5. Aceton.
- 5.6. Kwas mrówkowy o stężeniu co najmniej 98 % (m/m).
- 5.7. Rozpuszczalnik chromatograficzny: mieszanina n-heksanu (5.1), eteru dietylowego (5.4) i kwasu mrówkowego (5.6) w proporcjach 70:30:1 (v/v/v).
- 5.8. Aktywny siarczan glinu do chromatografii, obojętny, o I stopniu aktywności Brockmanna.
- 5.9. Sproszkowana krzemionka zawierająca odpowiednią jakość nadającą się do chromatografii cienkowarstwowej.
- 5.10. Lipaza trzustkowa o odpowiedniej jakości (uwagi 1 i 2).
- 5.11. Wodny roztwór wodorotlenku sodu (120 g/l).
- 5.12. Wodny roztwór kwasu solnego (6 Mol/l).
- 5.13. Wodny roztwór chlorku wapnia (CaCl₂) (220 g/l).
- 5.14. Wodny roztwór enzymatycznego cholanu sodu (1 g/l).
- 5.15. Roztwór buforowy: 1 M wodny roztwór tri-hydroksymetylaminoetanu, którego pH 8 zostało uzyskane przez dodanie kwasu solnego (5.12) (kontrola za pomocą potencjometru).
- 5.16. Roztwór fenoloftaleiny (10 g/l) w etanolu o stężeniu 95 % (v/v).
- 5.17. Roztwór dichloro-2-7-fluoresceiny (2 g/l) w etanolu o stężeniu 95 % (v/v) o słabo zasadowym odczynie uzyskanym przez dodanie jednej kropli 1 N roztworu wodorotlenku sodu na 100 ml.

W celu kontroli działania lipazy:

- 5.18. Zobojętniony olej.
- 5.19. 0,1 M wodny roztwór wodorotlenku sodu.
- 5.20. Wodny roztwór enzymatycznego cholanu sodu (200 g/l).
- 5.21. Guma arabska, wodny roztwór 100 g/l.

6. PRZYGOTOWANIE PRÓBK

Jeżeli kwasowość próbki oznaczona według załącznika II jest niższa niż 3 %, oczyścić bezpośrednio na złożu z siarczanu glinu jak podano w pkt. 6.2.

Jeżeli kwasowość próbki oznaczona według załącznika II jest większa niż 3 %, zobojętnić roztworem zasady jak podano w pkt. 6.1, a następnie przepuścić przez siarczan glinu, jak podano w pkt. 6.2.

- 6.1. Zobojętnienie roztworem zasady.

Wprowadzić do rozdzielacza (4.6) około 10 g ropy naftowej i dodać 100 ml heksanu (5.1), 50 ml 2-propanolu (5.2), kilka kropli roztworu fenoloftaleiny (5.16) oraz ilość roztworu wodorotlenku sodu (5.11) odpowiadającą zawartości kwasów tłuszczowych zwiększoną o 0,3 %. Wstrząsać intensywnie przez jedną minutę, dodać 50 ml wody destylowanej, ponownie wstrząsnąć i odstawić.

Po rozdzieleniu usunąć dolną warstwę mydła. Usunąć także wszystkie pośrednie warstwy (zawiesiny ciał białkowych, substancje nierozpuszczalne). Płukać roztwór heksanu i zobojętnionego oleju kilkoma porcjami 25 do 30 ml roztworu 2-propanolu (5.3) dopóki nie zniknie różowa barwa fenoloftaleiny.

Usunąć większość heksanu za pomocą destylacji w próżni w wyparce obrotowej (4.18) i suszyć olej w temperaturze 30—40 °C (cały czas w próżni) za pomocą strumienia czystego azotu do momentu usunięcia heksanu.

6.2. Oczyszczenie na drodze przepuszczania przez siarczan glinu.

Przygotować zawiesinę złożoną z 15 g aktywnego siarczanu glinu (5.8) w 50 ml heksanu (5.1) i przelać cały czas mieszając do kolumny chromatograficznej (4.7). Zagęścić siarczan glinu i pozwolić na opadnięcie poziomu rozpuszczalnika do około 1 do 2 mm powyżej pochłaniacza. Wylać ostrożnie na kolumnę roztwór składający się z 5 g oliwy w 25 ml heksanu (5.1). Zebrać całość odcieku z kolumny w kolbie o okrągłym dnie (4.1).

7. Przygotowanie płytek chromatograficznych

Oczyścić dokładnie szklane płytki. (4.13) etanolem, eterem, ropą naftową i acetonem w celu usunięcia wszelkich śladów tłuszczu.

Wsypano do stożkowej kolby 30 g sproszkowanej krzemionki (5.9). Dodać 60 ml destylowanej wody. Zamknąć i intensywnie wstrząsać przez okres jednej minuty. Bezzwłocznie przenieść zawiesinę do skrapiaarki (4.12) i rozprowadzić na czystych płytkach w postaci warstwy o grubości 0,25 mm.

Suszyć płytki przez 15 minut w powietrzu, a następnie przez jedną godzinę w piecu (4.16) w temperaturze 103 ± 2 °C. Przed użyciem ostudzić płytki do temperatury otoczenia w ekcykatorze.

Gotowe płytki są dostępne w handlu.

8. PROCEDURA

8.1. Hydroliza przy pomocy lipazy trzustkowej.

Odważyć około 0,1 g próbki przygotowanej we fiolce do odwirowywania (4.8). Jeżeli próbka jest płynną substancją tłuszczową, należy postąpić jak poniżej.

Dodać 20 ml lipazy (5.10) i 2 ml roztworu buforowego (5.15). Wstrząsnąć dobrze zachowując ostrożność, a następnie dodać 0,5 ml roztworu cholanu sodu (5.14) i 0,2 ml roztworu chlorku wapnia (5.13). Zamknąć fiolkę szlifowanym korkiem, ostrożnie wstrząsnąć (tak, aby nie zmoczyć korka) i bezzwłocznie umieścić fiolkę w termostacie (4.17) w temperaturze $40 \pm 0,5$ °C. Mieszać w ręku dokładnie przez jedną minutę.

Wyjąć fiolkę z termostatu i mieszać za pomocą mieszadła elektrycznego (4.19) przez dwie minuty.

Natychmiast schłodzić pod bieżącą wodą; dodać 1 ml kwasu solnego (5.12) i 1 ml eteru dietylowego (5.4). Zamknąć i intensywnie zamieszać za pomocą mieszadła elektrycznego. Odstawić do uspokojenia i w razie potrzeby usunąć po odwirowaniu warstwę organiczną za pomocą strzykawki (4.10).

8.2. Rozdzielanie monoglicerydów metodą chromatografii cienkowarstwowej

Nałożyć ekstrakt na płytkę chromatograficzną w postaci jak najwęższej jednorodnej cienkiej warstwy za pomocą mikrostrzykawki (4.11) w odległości około 1,5 cm od krawędzi dna. Umieścić płytkę w dobrze nasyconej komorze (4.14) i rozwinąć za pomocą rozpuszczalnika (5.7) o temperaturze około 20 °C na odcinku sięgającym na odległość około 1 cm od krawędzi płytki.

Osuszyć płytkę na powietrzu, w temperaturze pieca i naprysnąć roztwór dichloro-2-7-fluoresceiny (5.17). Zaznaczyć pasmo monoglicerydów (R_f około 0,035) w świetle ultrafioletowym (4.20).

8.3. Analiza monoglicerydów za pomocą chromatografii gazowej/cieczowej.

Zebrać pasmo uzyskane w pkt. 8.2 za pomocą szpatułki (unikając zebrania składników pozostałych na linii podstawowej) umieścić w naczyniu do metylowania (4.2).

Poddać zebraną krzemionkę bezpośrednio obróbce metodami opisanymi w załączniku X B w sposób pozwalający przekształcić monoglicerydy w estry metylowe, a następnie zbadać estry metodą chromatografii gazowej jak podano w załączniku X A.

9. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

Określić skład frakcji zawierającej kwasy tłuszczowe w pozycji 2, podając wynik z dokładnością do jednego miejsca po przecinku (Uwaga 3).

10. UWAGI

Uwaga 1: Kontrola działania lipazy.

Przygotować emulsję oleju przez wymieszanie w odpowiednim mieszadle mieszaniny składającej się ze 165 ml roztworu gumy arabskiej (5.21), 15 g kruszonego lodu i 20 ml zubożonego oleju (5.18).

Do zlewki (4.5) wlać 10 ml tej emulsji, następnie 0,3 ml roztworu cholalanu sodu (5.20) i 20 ml wody destylowanej.

Umieścić zlewkę w termostacie, którego temperatura utrzymywana jest na poziomie 37 ± 5 °C (Uwaga 4); umieścić elektrody pH-metru (4.21) i mieszadło spiralne (4.22).

Za pomocą biurety (4.23) dodawać kroplami roztwór wodorotlenku sodu dopóki pH nie osiągnie wartości 8,5.

Dodać dostateczną ilość wodnej zawiesiny lipazy (patrz poniżej). Z chwilą, gdy pH-metr wskaże 8,3 włączyć stoper (4.24) i rozpocząć wkraplanie roztworu wodorotlenku sodu (5.19) z prędkością umożliwiającą utrzymanie stałego pH na poziomie 8,3. Co minutę zapisywać objętość zużytego roztworu zasadowego.

Nanieść zanotowane wartości na diagram zaznaczając na osi odciętych czas, a na osi rzędnych ilości roztworu zasadowego w ml potrzebne dla utrzymania stałego pH. W wyniku tego powinno otrzymać się linię prostą.

Zawiesina wspomnianej wyżej lipazy jest zawieszoną w wodzie o proporcji 1 do 1 000 (m/m). Do każdej próby należy wykorzystać dostateczną ilość, około 1 ml alkalicznego roztworu tak, aby została ona zużyta w ciągu czterech do pięciu minut. Zazwyczaj potrzebna jest ilość proszku wynosząca od 1 do 5 mg.

Jednostka lipazowa jest definiowana jako ilość enzymów, które uwalniają 10 µl kwasu na minutę. Wyrażona w jednostkach lipazowych na miligram aktywność-A użytego proszku jest obliczana za pomocą następującego wzoru:

$$A = \frac{V \times 10}{m}$$

gdzie: V: objętość wodorotlenku sodu (5.19) zużytego w ciągu minuty obliczona, z wykresu, m: masa analizowanej próbki proszku w mg.

Uwaga 2: Przygotowanie lipazy.

Lipazy charakteryzujące się dostatecznym poziomem aktywności są dostępne w handlu, ale można je także otrzymać w następujący sposób:

Schłodzić 5 kg świeżej trzustki wieprzowej do temperatury 0 °C; usunąć tkankę tłuszczową i tkankę łączną, a następnie ucierać w mieszalniku aż do uzyskania płynnej pasty. Wymieszać tę masę w mieszadle (4.25) z 2,5 l bezwodnego acetonu przez cztery i sześć godzin, następnie odwirować. Ekstrahować jeszcze trzy razy z pozostałości stosując tę samą ilość acetonu, a następnie ekstrahować dwa razy mieszaniną acetonu i eteru dietylowego w stosunku 1 do 1 (v/v) i dwa razy eterem dietylowym.

Suszyć pozostałość w próżni przez 48 godzin w celu uzyskania stabilnego proszku nadającego się do przechowywania w lodówce.

Uwaga 3: We wszystkich przypadkach zaleca się oznaczenie składu łącznych kwasów tłuszczowych w tej samej próbce ponieważ porównanie tej zawartości z zawartością kwasów w pozycji 2 pozwoli dokonać interpretacji uzyskanych wyników liczbowych.

Uwaga 4: Temperatura hydrolizy ustalona jest na poziomie 37 °C, ponieważ stosowana jest płynny olej. Jednak temperatura próbki jest ustalona na poziomie 40 °C, aby można było przeanalizować substancje tłuszczowe, których temperatura topnienia może osiągnąć 45 °C.

ZAŁĄCZNIK VIII

OZNACZANIE SKŁADU TRILINOLEINY

1. ZAKRES

Oznaczenie składu triglicerydów płynnych oliwy z oliwek pod względem równoważnej liczby atomów węgla, metodą wysokowydajnej chromatografii cieczowej.

Niniejsza metoda zawiera opis oddzielania i oznaczania ilości triglicerydów olejów roślinnych pod względem masy molekularnej i stopnia nienasylenia, w zależności od równoważnej liczby atomów węgla (patrz Uwaga 1).

2. ZAKRES STOSOWANIA

Niniejszą metodę stosuje się w odniesieniu do wszystkich olejów roślinnych zawierających triglicerydy kwasów tłuszczowych o długich łańcuchach i jest szczególnie przydatna do oznaczania obecności niewielkich ilości olejów pół-schnących (zawierających dużo kwasu linoleinowego) w olejach roślinnych, których głównym kwasem tłuszczowym nienasyconym jest kwas oleinowy (oliwa z oliwek).

3. ZASADA

Oddzielanie triglicerydów według równoważnej liczby atomów węgla metodą wysokowydajnej chromatografii cieczowej (faza odwrotna) i interpretacja chromatogramów.

4. APARATURA

- 4.1. Wysokowydajny chromatograf cieczowy umożliwiający kontrolę termostatyczną temperatury kolumny.
- 4.2. Urządzenie do wstrzykiwania o pojemności 10 µl.
- 4.3. Detektor: refraktometr różnicowy pozwalający na oznaczenie wskaźnika refrakcji z dokładnością do 10 %.
- 4.4. Kolumna: rura ze stali nierdzewnej o długości 250 mm i wewnętrznej średnicy 4,5 mm wypełniona cząsteczkami krzemionki o średnicy 5 mm zawierających 22 do 23 % węgla w postaci octadecylsilanu (Uwaga 2).
- 4.5. Rejestратор i/lub integrator.

5. ODCZYNNIKI

Odczynniki powinny posiadać czystość analityczną, a rozpuszczalniki do elucji powinny być odgazowane (mogą pochodzić z wielokrotnego recyklingu bez żadnej szkody dla oddzielania).

- 5.1. Chloroform.
- 5.2. Aceton.
- 5.3. Nityl kwasu octowego.
- 5.4. Eluent: nityl kwasu octowego + aceton (proporcje powinny być dostosowane zależnie odżądanego rozdzielania; rozpocząć od mieszaniny 50: 50).
- 5.5. Rozpuszczalnik: aceton lub mieszanina 1: 1 acetonu i chloroformu.
- 5.6. Triglicerydy wzorcowe: można użyć triglicerydy dostępne w handlu (tripalmityna, trioleina, etc.), a długości czasu retencji powinny wówczas być dobierane z wykresu w zależności od równoważnej liczby atomów węgla lub ewentualnie chromatogram wzorcowy uzyskany z oleju sojowego (patrz: Uwaga 3 i 4 oraz rysunki 1 i 2).

6. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

Przygotować 5 % roztwór próbek przeznaczonych do analizy odważając $0,5 \pm 0,0001$ g próbki w wyskalowanej probówce o pojemności 10 ml i uzupełnić do 10 ml rozpuszczalnikiem (5.5).

7. PROCEDURA

- 7.1. Utworzyć układ chromatograficzny. Napęlić eluentem (5.4) w ilości 1,5 ml/ mm w celu oczyszczenia układu. Odczekać do uzyskania stabilnej linii podstawowej.

Wstrzyknąć 10 ml próbki przygotowanej wg pkt. 6.

8. OBLICZENIA I PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

Zastosować metodę normalizacji wewnętrznej, to znaczy założyć, że suma powierzchni wartości szczytowych odpowiadających poszczególnym triglicerydom wynosi 100 %. Obliczyć procentowy udział każdego triglicerydu stosując następujący wzór:

$$\% \text{ triglicerydu} = \frac{\text{powierzchnia wartości szczytowej}}{\text{suma powierzchni wartości szczytowych}} \times 100$$

Wynik powinien być podany z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

Uwaga 1: Istnieje możliwość oznaczenia kolejności eluacji poprzez obliczenie równoważnej liczby atomów węgla, często określonej stosunkiem $ECN = CN - 2n$, gdzie CN oznacza liczbę atomów węgla, a n liczbę podwójnych łączy. Można zwiększyć dokładność obliczeń uwzględniając pochodzenie wiązań podwójnych. Jeżeli n_o , n_1 i n_{in} odpowiadają liczbie łączy podwójnych, które mogą być przypisane kwasom oleinowym, linolowym i linolenowym, to równoważna liczba atomów węgla może być obliczona według wzoru:

$$ECN = CN - d_o n_o - d_1 n_1 - d_{in} n_{in}$$

gdzie współczynniki d_o , d_1 mogą być obliczone przy użyciu triglicerydów wzorcowych. W podanych warunkach tej metody otrzymany wynik zbliżony jest do wzoru:

$$ECN = CN [2,60 n_o - 2,35 n_1] - [2,17 n_{in}]$$

Uwaga 2. Przykłady: Lichrosorb (Merck) RP 18 Art 50333;

Lichrosphere (Merck) 100 CH18 Art 50377.

Uwaga 3: W przypadku kilku triglicerydów wzorcowych można również obliczyć rozkład dla oleiny,

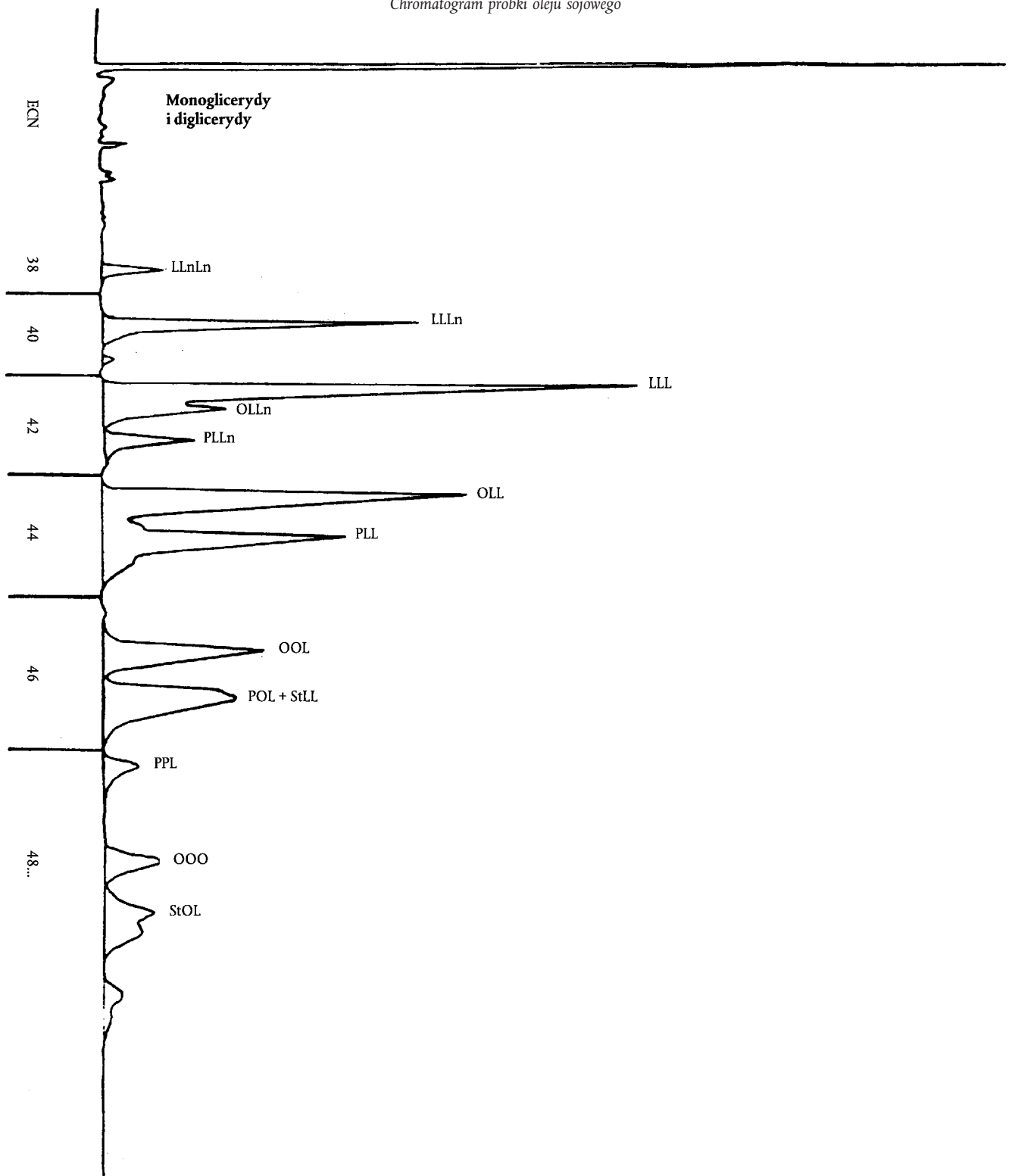
$$a = RT/RT'_{oleina} \text{ stosując zredukowany czas retencji } RT = RT - RT_{rozpuszczalnik}$$

Schemat wykresu funkcji a (f) (liczba wiązań podwójnych) pozwala określić wskaźniki retencji wszystkich triglicerydów kwasów tłuszczowych triglicerydów wzorcowych (patrz rysunek 2).

Uwaga 4: Efektywność kolumny powinna umożliwić wyraźne oddzielenie wartości szczytowej (trilinolowe) od wartości szczytowej odpowiadającej triglicerydom, których czas retencji jest podobny.

Rysunek 1

Chromatogram próbki oleju sojowego

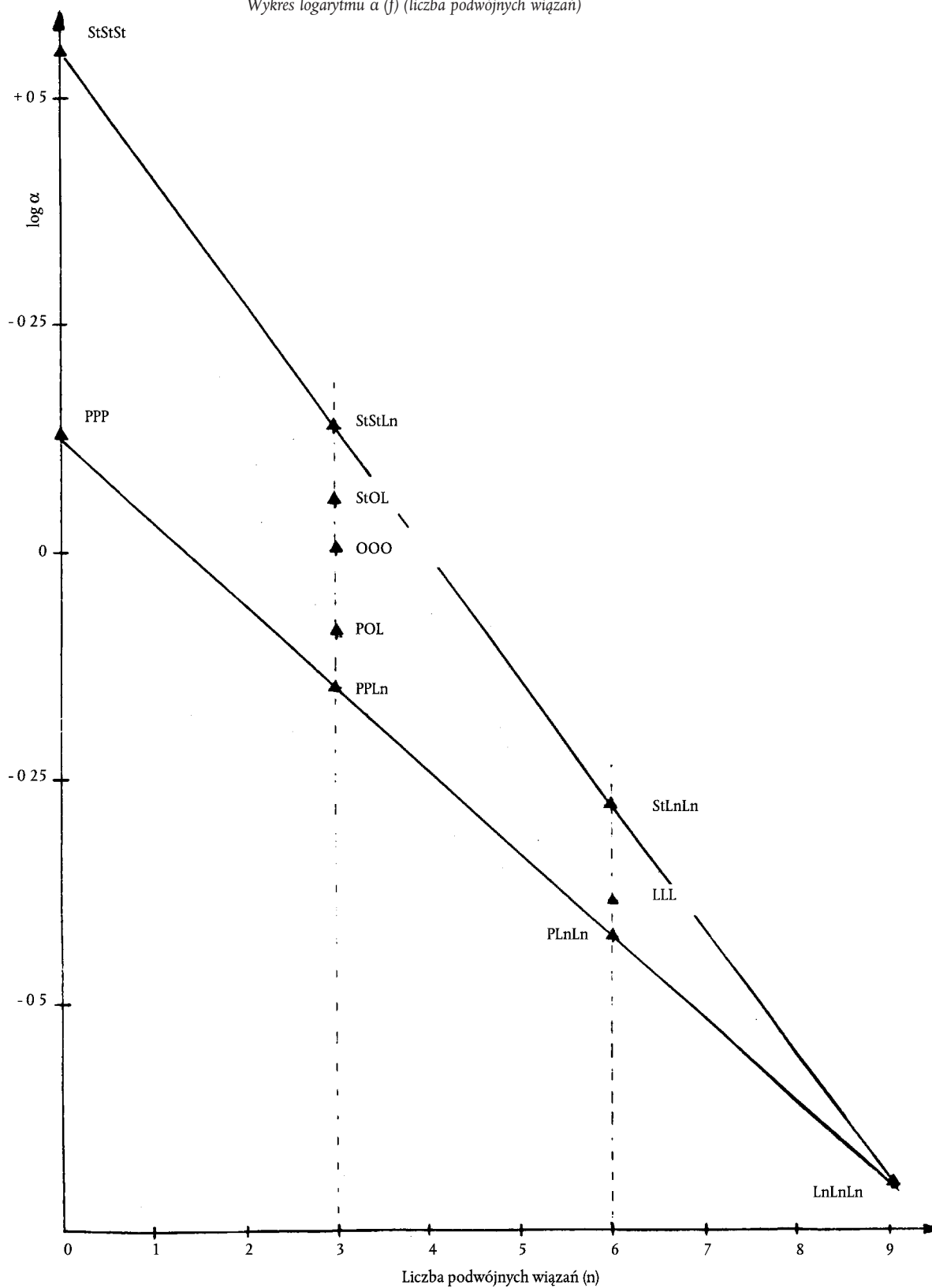


P = kwas palmitynowy
L = kwas linolowy

St = kwas stearynowy
In = kwas linolenowy

O = kwas oleinowy

Rysunek 2

Wykres logarytmu α (f) (liczba podwójnych wiązań)

La = kwas laurowy
 St = kwas stearynowy
 Ln = kwas linolowy

My = kwas mirystynowy
 P = kwas palmitynowy

L = kwas linolowy

ZAŁĄCZNIK IX

BADANIE SPEKTROFOTOMETRYCZNA W ULTRAFIOLECIE

WPROWADZENIE

Badanie spektrofotometryczne w ultrafiolecie może dostarczyć informacji o jakości substancji tłuszczowej, jej stanie zachowania i zmianach wywołanych procesami technologicznymi. Efekty absorpcji fal o długości ustalonej w tej metodzie wywołane są obecnością sprzężonych systemów dienowych i trienowych.

Wielkość takiej absorpcji wyrażana jest jako właściwa gęstość optyczna (gęstość optyczna 1 % roztworu substancji tłuszczowej w zaleconym rozpuszczalniku, dla warstwy o grubości 1 cm) oznaczona warunkowo jako K (określona także „współczynnikiem ekstynkcji”).

1. ZAKRES

Metoda ta opisuje metodę sposobu wykonania badania spektrofotometrycznego oliwy z oliwek w ultrafiolecie.

2. PODSTAWOWA ZASADA METODY

Badana substancja tłuszczowa rozpuszczana jest w wymaganym rozpuszczalniku, a następnie dokonywane jest oznaczenie gęstości optycznej roztworu dla zaleczonej długości fal w porównaniu z czystym rozpuszczalnikiem. Na podstawie odczytów spektrofotometrycznych oblicza się właściwe gęstości optyczne.

3. URZĄDZENIA

- 3.1. Spektrofotometr do pomiaru gęstości optycznej w ultrafiolecie w zakresie od 220 do 360 nm z możliwością odczytu dla każdej jednostki nanometrycznej
- 3.2. Komory z kwarcu pryzmatycznego z pokrywą, o optycznej długości 1 cm. Napełnione wodą lub innym stosownym rozpuszczalnikiem komory nie powinny wykazywać różnic przekraczających 0,01 jednostki gęstości optycznej.
- 3.3. Kolba pomiarowa o pojemności 25 ml.
- 3.4. Kolumna chromatograficzna o długości 450 mm i średnicy 35 mm wyposażona w rurkę powrotną o średnicy około 10 mm.

4. ODCZYNNIKI

- 4.1. Izooktan (2,2,4-trimetylopentan) o czystości pozwalającej na stosowanie go w spektrofotometrii: jego przepuszczalność w porównaniu z wodą destylowaną nie powinna być mniejsza niż 60 % przy 220 nm i nie mniejsza niż 95 % przy 250 nm; lub
 - cykloheksan o czystości pozwalającej na stosowanie go w spektrofotometrii: jego przepuszczalność w porównaniu z wodą destylowaną nie powinna być mniejsza niż 40 % przy 220 nm i nie mniejsza niż 95 % przy 250 nm,
 - inny odpowiedni rozpuszczalnik rozpuszczający idealnie substancję tłuszczową (np. alkohol etylowy dla oleju rycynowego).
- 4.2. Zasadowy siarczan glinu do chromatografii kolumnowej przygotowany i kontrolowany w sposób opisany w dodatku I.
- 4.3. n-heksan do chromatografii.

5. PROCEDURA

- 5.1. Badana próbka Powinna być jednorodna i pozbawiona wszelkich zanieczyszczeń występujących w postaci zawiesiny. Oleje pozostające w stanie płynnym w temperaturze otoczenia filtrowane są przez filtr papierowy w temperaturze około 30 °C, tłuszcze stałe są homogenizowane i filtrowane w temperaturze, która nie przekracza ich temperatury topnienia o więcej niż o 10 °C.

- 5.2. Odważyć około 0,25 g przygotowanej w ten sposób próbki w kolbie pomiarowej o pojemności 25 ml, uzupełnić zalecanym rozpuszczalnikiem i poddać homogenizacji. Uzyskany roztwór powinien być idealnie przezroczysty. W razie wystąpienia opalizacji lub mętnienia przefiltrować szybko przez papierowy filtr.
- 5.3. Napełnić komorę otrzymanym roztworem i dokonać pomiaru gęstości optycznych stosując jako wzorzec zastosowany rozpuszczalnik dla długości fali świetlnej mieszczącej się w granicach od 232 do 276 nm.

Odczytane wartości gęstości optycznej powinny mieścić się w przedziale od 0,1 do 0,8; jeżeli jest odwrotnie, należy powtórzyć pomiary stosując odpowiednio silniejsze lub słabsze roztwory.

- 5.4. W przypadku konieczności oznaczenia właściwych gęstości optycznych po przepuszczeniu przez siarczan glinu, sposób postępowania jest następujący: wprowadzić do kolumny chromatograficznej 30 g zasadowego siarczanu glinu w postaci zawiesiny w heksanie; usunąć nadmiar heksanu po osadzeniu się absorbentu, a w każdym bądź razie do poziomu około 1 cm powyżej górnego poziomu siarczanu glinu.

Rozpuścić 10 g substancji tłuszczowej, poddanej uprzednio homogenizacji i przefiltrowanej zgodnie z pkt. 5.1, w 100 ml heksanu i wlać ten roztwór do kolumny. Zebrać eluent i odparować rozpuszczalnik w próżni w temperaturze poniżej 25 °C.

Bezwłocznie poddać próbkę substancji tłuszczowej obróbce opisanej w pkt. 5.2.

6. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

- 6.1. OKREŚLIĆ właściwe gęstości optyczne (współczynniki ekstynkcji) dla różnych długości fal, obliczając je w sposób następujący:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s}$$

gdzie:

K_{λ} = właściwa gęstość optyczna przy długości fali λ ;

E_{λ} = gęstość optyczna zmierzona przy długości fali λ ;

c = stężenie roztworu w g/100 ml;

s = grubość kuwety w centymetrach.

Wyniki podawane są z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku.

- 6.2. Badanie spektrofotometryczne oliwy z oliwek zgodnie z oficjalną metodą określoną w urzędowych przepisach EWG, przewiduje oznaczenie właściwej gęstości optycznej roztworu w izooktanie dla długości fali od 232 do 270 nm oraz oznaczenie K określonego jako:

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2}$$

gdzie K_m oznacza właściwą gęstość optyczną dla długości fali m , długość fali maksymalnej absorpcji w granicach 270 nm.

DODATEK I

przygotowanie siarczanu glinu i badanie jego aktywności

A.1.1. Przygotowanie siarczanu glinu

Umieścić w zamykanym hermetycznie pojemniku siarczan glinu, uprzednio suszony przez 3 godziny w piecu w temperaturze 380-400 °C, dodać wodę destylowaną w ilości 5 ml na 100 g siarczanu glinu, szybko zamknąć pojemnik, kilkakrotnie wstrząsnąć, a następnie przed użyciem odstawić na co najmniej 12 godzin.

A.1.2 Kontrola aktywności siarczanu glinu

Przygotować kolumnę chromatograficzną z 30 g siarczanu glinu. Postępując zgodnie z pkt. 5.4. przepuścić przez kolumnę mieszaninę składającą się z:

- 95 % oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia, której właściwa gęstość optyczna dla fali o długości 268 nm jest mniejsza niż 0,18,
- 5 % oleju arachidowego poddanego podczas rafinacji oczyszczeniu za pomocą ziemi, o właściwej gęstości optycznej dla fali o długości 268 nm nie mniejszej niż 4

przez kolumnę.

Jeżeli po przepuszczeniu przez kolumnę mieszanina charakteryzuje się właściwą gęstością optyczną dla fali o długości 268 nm większą niż 0,11, siarczan glinu może być stosowany, jeżeli nie, to należy zwiększyć poziom uwodnienia.

—

DODATEK II

kalibracja spektrofotometru

- A.2. Sprzęt powinien być sprawdzany okresowo (co najmniej co sześć miesięcy) bądź pod kątem zgodności długości fali, bądź pod względem dokładności reakcji.
- A.2.1 Kontrola reakcji długości fali może być dokonana za pomocą lampy rtęciowej lub odpowiednich filtrów.
- A.2.2 W celu kontroli komórki fotoelektrycznej i fotomnożnika postępować w sposób następujący: odważyć 0,2 g czystego chromianu potasu do badań spektrofotometrycznych, rozpuścić w roztworze 0,05 N wodorotlenku potasu i uzupełnić do objętości w kolbie o pojemności 1 000 ml i zaznaczyć. Następnie pobrać dokładnie 25 ml otrzymanego roztworu i przenieść do kolby miarowej o pojemności 500 ml po czym uzupełnić do zaznaczonej objętości tym samym roztworem wodorotlenku potasu.

Zmierzyć gęstość optyczną otrzymanego w ten sposób roztworu dla długości fali 275 nm, używając roztworu wodorotlenku potasu jako wzorca. Gęstość optyczna zmierzona przy użyciu komory optycznej o grubości 1 cm powinna wynosić $0,200 \pm 0,005$.

ZAŁĄCZNIK X A

**ANALIZA METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ ESTRÓW METYLOWYCH KWASÓW
TŁUSZCZOWYCH****1. ZAKRES**

Niniejsza metoda zawiera ogólne wytyczne stosowania chromatografii gazowej, z wykorzystaniem wypełnionych lub kapilarnych kolumn, do oznaczania składu jakościowego i ilościowego mieszaniny estrów metanowych kwasów tłuszczowych według sposobu podanego w załączniku X B.

Metoda nie znajduje zastosowania w przypadku spolimeryzowanych kwasów tłuszczowych.

2. ODCZYNNIKI**2.1. Gaz nośny**

Gaz obojętny (azot, hel, argon, wodór itp.) dokładnie wysuszony i zawierający mniej niż 10 mg/kg tlenu.

Uwaga 1: Wodór wykorzystywany w charakterze gazu nośnego wyłącznie w kolumnach kapilarnych pozwala podwoić prędkość analizy, ale stwarza zagrożenia. Istnieją jednak urządzenia zabezpieczające.

2.2. Gazy pomocnicze

2.2.1. Wodór (czystość $\geq 99,9\%$) niezawierający zanieczyszczeń organicznych.

2.2.2. Powietrze lub tlen niezawierające zanieczyszczeń organicznych.

2.3. Produkty wzorcowania

Mieszanina czystych estrów metylowych kwasów tłuszczowych lub estrów metylowych substancji tłuszczowej o znanym składzie, o ile to możliwe jak najbardziej zbliżonym do składu substancji tłuszczowej poddawanej analizie.

Przedsięwziąć wszelkie środki ostrożności, aby uniknąć utlenienia nienasyconych polikwasów tłuszczowych.

3. APARATURA

Podane zalecenia dotyczą powszechnie stosowanego sprzętu do chromatografii gazowej z wykorzystaniem napełnionych kolumn i/lub kapilar i płomieniowego detektora jonizacyjnego. Odpowiednia jest każda aparatura charakteryzująca się taką samą efektywnością i rozdzielczością jak aparatura wymieniona w pkt. 4.1.2.

3.1. Chromatograf gazowy

Chromatograf gazowy składa się z następujących składników:

3.1.1. System wtryskowy.

Stosować system wtryskowy:

a) z wypełnionymi kolumnami, gdy martwa przestrzeń systemu jest możliwie jak najmniejsza (w takim przypadku system wtryskowy musi być zdolny do podgrzania go do temperatury 20 °C do 50 °C wyższej od temperatury kolumny); lub

b) z kolumnami kapilarnymi, w którym to przypadku system musi być specjalnie skonstruowany, aby można było go wykorzystać z takimi kolumnami. Może ono być systemem typu rozdzielacza lub iniektora całkowitego na wlocie do schłodzonej kolumny (iniektor bezkolumnowy).

Uwaga 2: W razie braku substancji tłuszczowej zawierającej kwasy tłuszczowe o mniejszej ilości atomów węgla niż 16, można zastosować iniektor igłowy.

3.1.2. Piec

Piec musi być w stanie nagrzać kolumnę do temperatury co najmniej 260 °C i utrzymać określoną temperaturę z dokładnością do 1 °C w przypadku kolumny z wypełnieniem i z dokładnością do 0,1 °C w przypadku kolumny kapilarnej. Ta ostatnia właściwość jest szczególnie istotna w razie stosowania rury z topionej krzemionki.

Stosowanie urządzenia wyposażonego w programator temperatury jest zalecane we wszystkich przypadkach, w szczególności w przypadku występowania kwasów tłuszczowych zawierających poniżej 16 atomów węgla.

3.1.3. Kolumna wypełniona

3.1.3.1. Kolumna z materiału obojętnego w stosunku do substancji analizowanej (ze szkła lub w razie braku stali nierdzewnej) o następujących wymiarach:

- długość: 1 do 3 m. Stosunkowo krótka kolumna będzie stosowana w przypadku występowania kwasów tłuszczowych o długim łańcuchu (powyżej C_{20}). W razie analizowania kwasów o liczbie atomów węgla C_4 do C_6 zaleca się stosowanie kolumny o długości 2 m;
- średnica wewnętrzna: od 2 do 4 mm.

Uwaga 3: W razie występowania składników nienasyconych z większą ilością podwójnych wiązań niż trzy, kolumna ze stali nierdzewnej może spowodować ich rozpad.

Uwaga 4: Można stosować system z podwójną kolumną z wypełnieniem.

3.1.3.2. Wypełnienie obejmujące następujące składniki

- podłoże:* ziemia krzemkowa wypłukana w kwasach i potraktowana krzemowodorami, lub jakiegokolwiek inne stosowne obojętne podłoże o w miarę jednolitym uziarnieniu (25 mm w granicach od 125 do 200 mm), przy czym średni wymiar jest powiązany z wewnętrzną średnicą i długością kolumny;
- faza nieruchoma:* faza biegunowa typu poliestrowego (na przykład polibursztynian butanodiolu, poliadypinian etylenoglikolu, itp.), cyanosilikony lub jakakolwiek inna faza umożliwiająca rozdzielanie chromatograficzne (patrz pkt. 4). Faza nieruchoma powinna mieścić się w granicach od 5 % do 20 % (m/m). W niektórych przypadkach oddzielania można stosować fazy niebiegunowe.

3.1.3.3. Przygotowanie kolumny.

Po odłączeniu kolumny, jeżeli to możliwe, od detektora, nagrzać stopniowo piec do temperatury 185 °C i utrzymywać kolumnę, przygotowaną w strumieniu obojętnego gazu o natężeniu 20 do 60 ml/min, przez okres 16 godzin w tej temperaturze, a później przez 2 godziny w temperaturze 195 °C.

3.1.4. Kolumna kapilarna

3.1.4.1. Rura z materiału obojętnego w stosunku do badanej substancji (na ogół ze szkła lub topionej krzemionki). Wewnętrzna średnica powinna mieścić się w granicach od 0,2 do 0,8 mm. Musi ona być poddana odpowiedniej obróbce od wewnątrz (przygotowanie powierzchni, dezaktywacja) przed nałożeniem warstwy fazy nieruchomej. W większości przypadków długość 25 mm jest wystarczająca.

3.1.4.2. Faza nieruchoma, głównie typu poliglikolowego [poli (etylen glikolu) 20 000], poliestry (polibursztynian butanodiolu) lub polisiloksany biegunowe (cyanosilikony). Mogą być stosowane szczepione lub usiecione kolumny.

Uwaga 5: Istnieje ryzyko, że polisiloksany biegunowe mogą spowodować trudności przy określaniu i rozdzielaniu kwasu linolenowego i kwasów o C_{20} .

Warstwy powinny być cienkie, tzn. 0,1 do 0,2 mm.

3.1.4.3. Montaż i przygotowanie kolumny

Przestrzegać normalnych środków ostrożności obowiązujących przy montażu kolumn kapilarnych, to znaczy umieszczenie kolumny w piecu (podłoże), dobór i montaż połączeń (szczelność), rozmieszczenie końcówek kolumny w iniektorze i detektorze (zmniejszenie martwych przestrzeni). Umieścić kolumnę pod strumieniem gazu nośnego (na przykład o ciśnieniu 0,3 bara (30 kPa) dla kolumny o długości 25 mm i średnicy wewnętrznej 0,3 mm).

Przygotować kolumnę programując wzrost temperatury pieca na 3 °C/min od poziomu temperatury otoczenia aż do temperatury niższej o 10 °C od granicznej wartości temperatury, w której następuje rozpad fazy nieruchomej. Utrzymywać tę temperaturę przez jedną godzinę do momentu stabilizacji linii podstawowej. Obniżyć temperaturę do 180 °C, aby praca była kontynuowana w warunkach stałej temperatury.

Uwaga 6: Odpowiednio przygotowane kolumny dostępne są w handlu.

3.1.5. Detektor, najlepiej taki, który można nagrzać do temperatury przekraczającej temperaturę kolumny.

3.2. Strzykawka

Strzykawka powinna mieć pojemność najwyższej 10 µl i być wyskalowana co 0,1 µl.

3.3. Rejestrator

Gdy zarejestrowana krzywa jest wykorzystywana do obliczania składu analizowanej mieszaniny, należy stosować urządzenie elektroniczne o dużej dokładności, kompatybilne ze stosowaną aparaturą i charakteryzujące się następującymi parametrami:

- szybkość reakcji poniżej 1,5 s, najlepiej 1 s (szybkością reakcji jest czas wymagany, aby pisak rejestratora przemieścił się od wartości 0 % do 90 % przy nagłym doprowadzeniu sygnału o wartości 100 %);

- b) szerokość papieru minimum 20 cm;
- c) prędkość odwijania papieru podlegająca regulacji w granicach od 0,4 do 2,5 cm/min.

3.4. Integrator

Zastosowanie integratora elektronicznego umożliwi szybkie i dokładne obliczenia. Reaguje on liniowo przy dostatecznej czułości, a korekta odchylenia linii podstawowej jest zadawalająca.

4. PROCEDURA

Szczegółowe zasady postępowania podane w pkt. 4.1 do 4.3 odnoszą się do stosowania płomieniowego detektora jonizacyjnego.

W rozwiązaniu zamiennym można stosować aparat do chromatografii gazowej z detektorem termokonduktometrycznym (działającym na zasadzie termicznych zmian przewodzenia). Warunki pracy powinny być w takiej sytuacji zmienione zgodnie z opisem zamieszczonym w pkt. 6.

4.1. Warunki badania

4.1.1. Dobór optymalnych warunków pracy

4.1.1.1. W przypadku kolumny z wypełnieniem

W celu dokonania doboru warunków pracy należy uwzględnić następujące zmienne:

- a) długość i średnica kolumny;
- b) charakter i ilość fazy nieruchomej;
- c) temperatura kolumny;
- d) natężenie przepływu gazu nośnego;
- e) oczekiwana rozdzielczość;
- f) wielkość badanej próbki dobrana w taki sposób, aby zespół detektora i elektrometru dawał reakcję liniową;
- g) czas trwania analizy.

Na ogół wartości podane w tabeli 1 i tabeli 2 będą wartościami określającymi wymagane wyniki, to znaczy liczba teoretycznych pól, wynosząca co najmniej 2 000 na metr kolumny dla stearynianu metylu i jego elucja w czasie około 15 minut.

Gdy aparat na to pozwala, iniektor powinien mieć temperaturę zbliżoną do 200 °C, a detektor temperaturę równą lub wyższą niż temperatura kolumny.

Na ogół stosunek natężenia przepływu wodoru płomieniowego detektora jonizacyjnego do gazu nośnego waha się od 1: 2 do 1: 1 zależnie od średnicy kolumny. Natężenie przepływu tlenu jest około 5 do 10 razy większe niż wodoru.

Tabela 1

Wewnętrzna średnica kolumny w mm	Przepływ gazu nośnego w ml/min
2	15 do 25
3	20 do 40
4	40 do 60

Tabela 2

Stężenie fazy nieruchomej % (m/m)	Temperatura kolumny °C
5	175
10	180
15	180
20	185

4.1.1.2. Kolumna kapilarna

Właściwości sprawności i przenikalności kolumn kapilarnych sprawiają, że rozdzielanie składników i czas trwania analizy zależą w bardzo dużym stopniu od natężenia przepływu gazu nośnego w kolumnie. Niezbędne będzie na drodze oddziaływania tym parametrem (lub po prostu spadkiem wysokości ciśnienia w kolumnie) dokonanie optymalizacji warunków pracy w zależności od tego czy dąży się do uzyskania lepszego rozdziału, czy też szybkiego przeprowadzenia analizy.

4.1.2. Oznaczenie liczby teoretycznych pól (sprawność) i rozdzielczości (patrz rysunek 1)

Przeprowadzić analizę mieszaniny stearynianu i oleinianu metylu wymieszanych ze sobą w jednakowych zasadniczo proporcjach (na przykład estry metylowe masła kakaowego).

Dobrać wielkość próbki, temperaturę kolumny i natężenie przepływu nośnego w taki sposób, aby maksymalna wartość szczytowa stearynianu metylu została zarejestrowana w 15 minut po szczytowej wartości rozpuszczalnika i aby ta wartość szczytowa odpowiadała trzem czwartym pełnej skali.

Obliczyć liczbę teoretycznych pól n za pomocą wzoru:

$$n = 16 \left[\frac{dr_1}{\omega_1} \right]^2$$

rozdzielczość R za pomocą wzoru:

$$R = \frac{2\Delta}{\omega_1 + \omega_2}$$

gdzie:

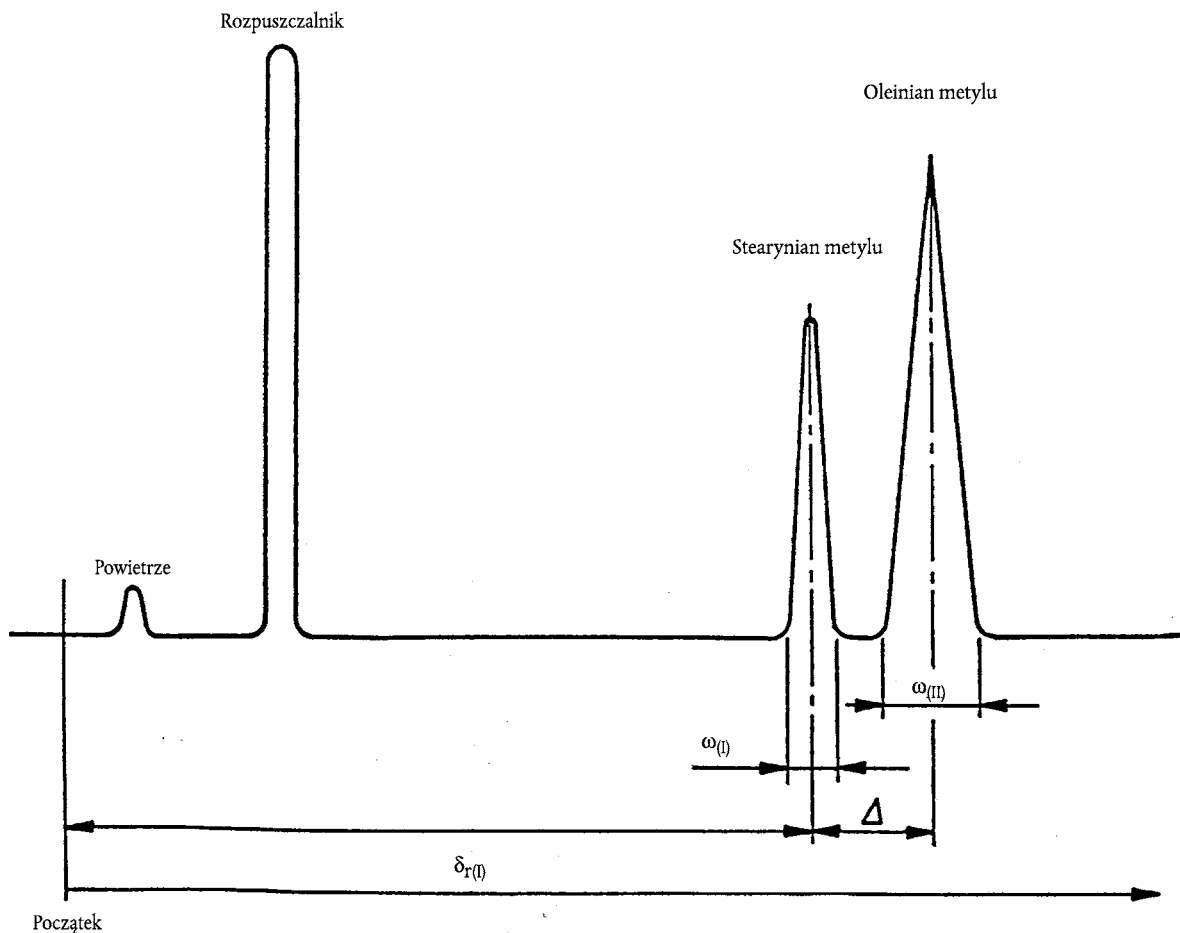
dr_1 odległość retencji w milimetrach zmierzona od początku chromatogramu do maksymalnej wartości szczytowej stearynianu metylu;

ω_1 and ω_2 szerokości w milimetrach szczytowych wartości stearynianu i oleinianu metylu zmierzone między punktami przecięcia z linią podstawową stycznych do punktów ugięcia krzywej;

Δ odległość w milimetrach między względnymi maksymalnymi punktami wartości szczytowych stearynianu i oleinianu metylu.

Rysunek 1

Chromatogram oznaczania liczby teoretycznych pól (sprawność) i rozdzielczości



Początek Warunki robocze są wyznaczone przez liczbę teoretycznych pól dla stearynianu metylu co najmniej równą 2 000 na metr kolumny i rozdzielczości co najmniej 1,25.

4.2. Pobranie próbki

Za pomocą strzykawki (3.2) pobrać 0,1 do 2 ml roztworu estrów metylowych uzyskanego metodą opisaną w załączniku X B i wstrzyknąć do kolumny.

W przypadku estrów bez rozpuszczalników przygotować roztwór ze 100 mg/ml w heptanie przeznaczonym do chromatografii gazowej i wstrzyknąć 0,1 do 1 ml tego roztworu.

W celu zbadania obecności składników występujących w ilościach śladowych można zwiększyć wielkość próbki (nawet 10-krotnie).

4.3. Analiza

W zwykłych przypadkach prowadzić analizę w warunkach określonych w pkt. 4.1.1.

Można jednak pracować przy niższej temperaturze kolumny, w przypadku, w którym zachodzi konieczność dozowania kwasów tłuszczowych, których liczba atomów węgla jest mniejsza niż 12, lub wyższej w przypadku, w którym zachodzi konieczność dozowania kwasów tłuszczowych, których liczba atomów węgla jest większa niż 20. W obu przypadkach istnieje ewentualnie możliwość pracy w temperaturze zaprogramowanej. Jeżeli na przykład próbka zawiera estry metylowe kwasów tłuszczowych zawierające co najmniej 12 atomów węgla, wstrzyknąć próbkę o temperaturze 100 °C (lub 50-60°C, jeżeli występuje w niej kwas masłowy) i bezzwłocznie zaprogramować na wzrost od 4 do 8 °C/min, aż do osiągnięcia optymalnej temperatury. W niektórych przypadkach oba procesy mogą być łączone.

Po okresie programowania temperatury kontynuować elucję w stałej temperaturze aż do elucji wszystkich składników. Jeżeli aparat nie może funkcjonować w zaprogramowanej temperaturze prowadzić proces w dwóch temperaturach ustalonych w przedziale między 100 i 195 °C.

W razie potrzeby zaleca się przeprowadzanie analizy na dwóch stałych fazach o różnych biegunowościach w celu sprawdzenia, czy nie występują zamaskowane wartości szczytowe, na przykład w przypadku jednoczesnej obecności $C_{18:3}$ i $C_{20:0}$ lub łącznie $C_{18:3}$ i $C_{18:2}$.

4.4. Przygotowanie chromatogramu wzorcowego i krzywych wzorcowych

Przeprowadzić analizę mieszaniny wzorcowej (patrz pkt. 2.3), w identycznych warunkach roboczych jak w przypadku próby i oznaczyć długości czasu retencji lub odległości retencyjnych dla kwasów tłuszczowych wchodzących w jej skład. Dla każdej wartości nasycenia wykreślić na papierze półlogarytmicznym krzywe wyznaczające logarytm czasu retencji lub odległości retencyjnej w zależności od liczby atomów węgla. W warunkach izotermicznych i w przypadku estrów z prostym łańcuchem i ustalonym wskaźnikiem nienasycenia krzywe te powinny być liniami prostymi. Proste te powinny być praktycznie równoległe.

Unikać warunków roboczych sprzyjających występowaniu „zamaskowanych wartości szczytowych” tzn. nie występował brak możliwości odróżnienia dwóch składników w wyniku niedostatecznej rozdzielczości.

5. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

5.1. Analiza jakościowa

Do celów próby określić szczytowe wartości estru metylowego nawiązując do krzywych opracowanych w pkt. 4.4 w razie potrzeby interpolując.

5.2. Analiza ilościowa

5.2.1. Oznaczanie składu

Za wyjątkiem szczególnych przypadków, zastosować metodę standaryzacji wewnętrznej, tzn. założyć, że wszystkie składniki występujące w próbce są uwzględnione na chromatogramie, a więc suma powierzchni wartości szczytowych reprezentuje 100 % składników (elucja totalna).

Jeżeli sprzęt jest wyposażony w integrator, należy wykorzystać uzyskane dzięki niemu wartości liczbowe. W innym przypadku określić powierzchnię każdej wartości szczytowej mnożąc wysokość wartości szczytowej przez jej szerokość w połowie wysokości, uwzględniając różne wygaszenia ewentualnie zastosowane w trakcie rejestracji.

5.2.2. Metoda obliczenia

5.2.2.1. Przypadek ogólny

Obliczyć zawartość danego składnika „i”, wyrażoną procentowo masą estrów metylowych, określając procentową zawartość będącą stosunkiem powierzchni wartości szczytowej do sumy powierzchni wszystkich wartości szczytowych, stosując wzór:

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

gdzie:

A_i powierzchnia wartości szczytowej odpowiadająca składnikowi „i”

ΣA suma powierzchni wszystkich wartości szczytowych.

Podać wyniki z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

Uwaga 7: Jeżeli chodzi o przypadek ogólny uznaje się, że wynik obliczeń opartych na powierzchniach przedstawia procentową część masy. W przypadku, w którym taka hipoteza jest niedopuszczalna, patrz pkt. 5.2.2.2.

5.2.2.2. Stosowanie czynników korygujących

W niektórych przypadkach, na przykład w obecności kwasów tłuszczowych, w których liczba atomów węgla jest mniejsza niż 8 lub kwasów o drugorzędym znaczeniu podczas stosowania detektorów termokonduktometrycznych, lub, jeśli wymagany jest specjalnie wyższy stopień dokładności, zachodzi konieczność zastosowania czynników korygujących w celu przeliczenia procentowych wielkości powierzchni wartości szczytowych na procentowe wielkości masowe składników.

Oznaczyć współczynniki korygujące za pomocą chromatogramu uzyskanego ze wzorcowej mieszaniny estrów metylowych o dokładnie znanym składzie w warunkach identycznych jak warunki próby.

Dla tej wzorcowej mieszaniny procentowa wielkość masowa składnika „i” jest podawana wzorem:

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

gdzie:

m_i masa składnika „i” w mieszaninie wzorcowej.

Σm : suma mas różnych składników mieszaniny wzorcowej.

Na podstawie chromatogramu mieszaniny wzorcowej (4.4), obliczyć powierzchnię (powierzchnia/powierzchnia) składnika „i” w sposób następujący:

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

gdzie:

A_i : powierzchnia wartości szczytowej dla składnika „i”;

ΣA : suma powierzchni wszystkich wartości szczytowych.

Stąd współczynnik korygujący:

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

Zazwyczaj współczynniki korygujące wyrażane są w stosunku do K_{C16} więc współczynniki względne przybierają formę:

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

Dla próbki zawartość każdego składnika „i” wyrażona jako procentowa część masy estrów metylowych wynosi:

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

Podać wyniki z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

5.2.2.3. Stosowanie wzorca wewnętrznego

W niektórych analizach (na przykład wówczas, gdy nie wszystkie kwasy tłuszczowe są oznaczone ilościowo i obok kwasów C16 i C18 występują kwasy C4 i C6, lub gdy zachodzi konieczność oznaczenia bezwzględnej ilości kwasów tłuszczowych w próbce), niezbędne jest zastosowanie wzorca wewnętrznego. Stosowane są często kwasy tłuszczowe z 5, 15 lub 17 atomami węgla. Należy wyznaczyć współczynnik korygujący wewnętrznego wzorca (jeżeli zachodzi taka potrzeba).

Procentowy udział masy składnika „i” wyrażony w postaci estrów metylowych jest w efekcie określany wzorem:

$$\frac{m_s \times K'_i \times A_i}{m \times K'_s \times A_s} \times 100$$

gdzie:

A_i powierzchnia wartości szczytowej dla składnika „i”;

A_s powierzchnia wartości szczytowej odpowiadająca wzorcowi wewnętrznemu;

K_i „współczynnik korygujący składnika” i „(odnoszący się do K_{C1});”

K_s „współczynnik korygujący wzorca wewnętrznego (odnoszący się do K_{C16});”

m masa próbki w miligramach;

m_s masa wzorca wewnętrznego w miligramach.

Podawać wynik z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

6. SZCZEGÓLNY PRZYPADEK — STOSOWANIE DETEKTORA TERMOKONDUKTOMETRYCZNEGO (KATAROMETRU)

Aparat do chromatografii gazowej z detektorem termokonduktometrycznym (katarometrem) może być również wykorzystywany do określania składu jakościowego i ilościowego mieszaniny estrów metylowych kwasów tłuszczowych. W takim przypadku należy zmienić warunki określone w pkt. 3 i 4 zgodnie z tabelą 3.

Jeżeli chodzi o analizę ilościową należy stosować współczynniki korygujące określone w pkt. 5.2.2.2.

Tabela 3

Zmienna	Stan wartości
Kolumna	Długość: 2-4 m Średnica wewnętrzna: 4 mm
Podłoże	Uziarnienie 160-200 nm
Stężenie fazy nieruchomej	15-25 % (m/m)
Gaz nośny	Hel lub w przypadku jego braku wodór z możliwie jak najmniejszą zawartością tlenu
Gazy pomocnicze	Brak
Temperatura iniektora	40-60 °C powyżej temperatury kolumny
Temperatura kolumny	180 200 °C
Strumień gazu nośnego	Zazwyczaj 60-80 ml/min
Wielkość wprowadzonej porcji próbki	Zazwyczaj 0,5-2 µl

7. **SPRAWOZDANIE Z TESTU**

Sprawozdanie z testu powinno podawać metody zastosowane do przygotowania estrów metylowych i do analizy za pomocą chromatografii gazowej, jak też uzyskane wyniki. Musi ponadto podawać wszystkie szczegóły operacyjne nieujęte w niniejszej międzynarodowej normie lub mające charakter fakultatywny, jak również ewentualne wydarzenia, które mogły mieć wpływ na wyniki.

Sprawozdanie z testu powinno podawać wszystkie informacje niezbędne do pełnej identyfikacji próbki.

ZAŁĄCZNIK X B

PRZYGOTOWANIE ESTRÓW METYLOWYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

WPROWADZENIE

Wybór procesu, jaki należy zastosować, podyktowany jest wchodzącymi w skład przeznaczonej do analizy substancji tłuszczowej kwasami i jej kwasowością oraz wykonywaną analizą za pomocą chromatografii gazowej.

Należy zwrócić uwagę, że:

- jeżeli chodzi o substancje tłuszczowe zawierające kwasy tłuszczowe o liczbie atomów węgla mniejszej niż 12, należy stosować wyłącznie procesy analizy w zamkniętej kolbie lub za pomocą siarczanu dimetylu;
- jeżeli chodzi o substancje tłuszczowe o kwasowości przekraczającej 3 % należy stosować wyłącznie procesy analizy za pomocą metanolu i kwasu solnego lub siarczanu metylu;
- w przypadku oznaczeń za pomocą chromatografii gazowej izomerów trans, należy stosować wyłącznie procesy analizy za pomocą metylanu sodu lub siarczanu dimetylu;
- do otrzymywania estrów metylowych małych ilości substancji tłuszczowych uzyskanych drogą chromatografii cienkowarstwowej należy stosować proces analizy za pomocą metanolu-heksanu-kwasu siarkowego.

Obecność substancji nieulegających zmydleniu może być pomijana, o ile nie przekracza 3 %, w przeciwnym przypadku estry metylowe należy przygotowywać z kwasów tłuszczowych.

1. ZAKRES I ZASTOSOWANIE

Poniżej zamieszczony jest opis pięciu procesów otrzymywania estrów metylowych z substancji tłuszczowych:

- a) stosując metanolan sodu;
- b) stosując metanolan sodowy w zamkniętej kolbie;
- c) za pomocą metanolu — kwasu solnego w zamkniętej kolbie;
- d) za pomocą siarczanu dimetylowego;
- e) za pomocą metanolu-heksanu-kwasu siarkowego.

Proces A

2. ZASADA

Poddana analizie substancja tłuszczowa jest nagrzewana z przemywaniem alkoholem metylowym i metanolem sodu. Uzyskane estry metylowe są ekstrahowane eterem etylowym.

3. APARATURA

- 3.1. kolba o pojemności 100 ml z Chłodnicą zwrotną wyposażoną na swoim górnym końcu w rurkę z wapnem sodu, ze szlifowanymi złączami.
- 3.2. Rurki wyskalowane o pojemności 50 ml.
- 3.3. Pipeta wyskalowana co 0,1 ml o pojemności 5 ml.
- 3.4. Rozdzielacze o pojemności 250 ml.
- 3.5. Kolba o pojemności 200 ml.

4. ODCZYNNIKI

- 4.1. bezwodny metanol

- 4.2. Roztwór metanolanu sodu o stężeniu około 1 % w metanolu: roztwór ten jest otrzymywany rozpuszczając 0,34 g metalicznego sodu w 100 ml bezwodnego metanolu
- 4.3. Eter etylowy
- 4.4. Chlorek sodu w postaci roztworu o stężeniu 10 %.
- 4.5. Eter naftowy o temperaturze 40-60 °C

5. PROCEDURA

- 5.1. Do kolby o pojemności 100 ml wprowadzić 2 g substancji tłuszczowej, uprzednio odwodnionej za pomocą siarczanu sodu i przefiltrowanej. Dodać 35 ml metanolu, podłączyć chłodnicę zwrotną i gotować przez kilka minut.
- 5.2. Przerwać podgrzewanie, odłączyć chłodnicę i szybko dodać 3,5 ml roztworu metanolanu sodu; połączyć chłodnicę zwrotną i gotować przez co najmniej trzy godziny. Proces metylowania zostaje uznany za zakończony, gdy całość substancji tłuszczowej przejdzie do roztworu, a mieszanina reakcyjna jest idealnie przejrzysta w temperaturze pokojowej.
- 5.3. Schłodzić i przelać mieszaninę reakcyjną do rozdzielacza o pojemności 250 ml, dodać 35-40 ml eteru etylowego, 100 ml wody i 5-6 ml roztworu chlorku sodu o stężeniu 10 %. Zamieszać i odczekać, aż nastąpi rozdzielanie warstw. Przenieść fazę wodną do drugiego rozdzielacza i ponownie ekstrahować za pomocą 25 ml eteru etylowego.

Do połączonych eterowych ekstraktów dodać 50 ml eteru naftowego o temperaturze 40-60 °C; powoduje to oddzielenie wody, którą należy usunąć.

Przemycić trzykrotnie fazę eterowaną dawkami 10-15 ml wody, wysuszyć siarczanem sodu i przefiltrować przez filtr papierowy zbierając filtrat do kolby o pojemności 200 ml.

Poddać rozpuszczalnik destylacji do 20 ml kończąc proces w łaźni wodnej w strumieniu czystego azotu.

Proces B

2. ODCZYNNIKI

Badana substancja t uszczowa poddawana jest działaniu Metanolanu sodu w roztworze metanolem w zamkniętej kolbie o temperaturze 85-90 °C.

3. APARATURA

- 3.1. Kolba szklana o grubych ściankach o pojemności około 5 ml (wysokość 40-45 mm; średnica 14-16 mm).
- 3.2. Pipeta wyskalowana co 0,1 ml o pojemności 1 ml.

4. ODCZYNNIKI

- 4.1. Metanolan sodu w postaci roztworu metanolowego o stężeniu około 1,5 %. Roztwór ten przygotowuje się rozpuszczając 0,50 g metalicznego sodu w 100 ml bezwodnego metanolu.

5. PROCEDURA

- 5.1. Do szklanej kolby wprowadzić 2 g substancji tłuszczowej, uprzednio odwodnionej za pomocą siarczanu sodu i przefiltrowanej. Dodać 0,3 g (około 0,4 ml) roztworu metanolanu sodu i zatopić kolbę w płomieniu.
- 5.2. Umieścić kolbę na dwie godziny w łaźni o temperaturze 85-90 °C mieszając od czasu do czasu; oznaką estryfikacji po osadzeniu gliceryny i pozostałości odczynników jest przejrzystość zawartości.
- 5.3. Schłodzić do temperatury pokojowej. Otworzyć kolbę w momencie stosowania estrów metylowych. Nie wymagają one żadnych innych operacji przed przystąpieniem do chromatografii gazowej.

Proces C

2. ZASADA

Badana substancja t uszczowa powinna być poddana działaniu metanolu-kwasu solnego w zamkniętej kolbie o temperaturze 100 °C.

3. APARATURA
 - 3.1. Kolba szklana o grubych ściankach o pojemności około 5 ml (wysokość 40-45 mm; średnica 14-16 mm).
 - 3.2. Pipety wyskalowane o pojemności 1 i 2 ml.
4. ODCZYNNIKI
 - 4.1. Metanolowy roztwór kwasu solnego o stężeniu 2 %. Przygotować stosując gazowy kwas solny i bezwodny metanol (Uwaga 1).
 - 4.2. Heksan do chromatografii gazowej.
5. PROCEDURA
 - 5.1. Do szklanej kolby wprowadzi 0,2 g substancji tłuszczowej, uprzednio odwodnionej za pomocą siarczanu sodu i przefiltrowanej oraz 2 ml roztworu kwasu solnego w metanolu. Zatopić kolbę w płomieniu.
 - 5.2. Umieścić kolbę na 40 minut w łaźni o temperaturze 100 °C.
 - 5.3. Schłodzić kolbę pod bieżącą wodą, otworzyć, dodać 2 ml destylowanej wody i 1 ml heksanu. Odwirować i usunąć gotową do użytku fazę zawierającą heksan.

Proces D

2. ZASADA

Przeznaczona do analizy substancja tłuszczowa jest zmydlana przy użyciu roztworu wodorotlenku potasu w alkoholu metylowym, a następnie poddana działaniu siarczanu dimetylu. Po dodaniu kwasu solnego następuje samorzutne wydzielenie się powstałych estrów metylowych. Po dodaniu siarczanu glinu otrzymuje się estry metylowe o dużym stopniu czystości.
3. APARATURA
 - 3.1. Probówka szklana z grubymi ściankami o pojemności około 20 ml ze szlifowanym korkiem 10/19 i zaczepami zabezpieczającymi.
 - 3.2. Chłodnice zwrotne ze złączem szlifowanym 10/19.
 - 3.3. Filtry ze spiekanego szkła, gatunek G2, średnica 20 mm.
 - 3.4. Probówki szklane o pojemności około 10 ml i stożkowym dnem.
 - 3.5. Strzykawki o pojemności 1-5 ml.
4. ODCZYNNIKI
 - 4.1. 10 % roztwór wodorotlenku potasu w alkoholu metylowym do chromatografii gazowej.
 - 4.2. Wskaźnik zieleni bromokrezolowej: roztwór o stężeniu 0,05 % w alkoholu metylowym.
 - 4.3. Siarczan dimetylu ($d = 1,335$ w temperaturze 15 °C).
 - 4.4. Stężony kwas solny ($d = 1,19$) rozcieńczony w stosunku 1 + 1 w alkoholu metylowym do wykorzystania w chromatografii gazowej.
 - 4.5. Tlenek glinu Brockmann'a dla adsorpcji w chromatografii.
5. PROCEDURA
 - 5.1. Wprowadzić do próbówki o pojemności 20 ml około 2,2 ml substancji tłuszczowej, uprzednio odwodnionej za pomocą siarczanu sodu i przefiltrowanej. Dodać 5 ml roztworu wodorotlenku potasu i kilka granulek kwarcu w celu kontrolowania stanu wrzenia. Podłączyć chłodnicę zwrotną i podgrzać słabym płomieniem przez pięć minut cały czas mieszając. Proces zmydlania ulega zakończeniu z chwilą, gdy roztwór stanie się przejrzysty. Następnie schłodzić pod bieżącą wodą i odłączyć chłodnicę.

- 5.2. Dodać dwie krople wskaźnika, a za pomocą strzykawki wprowadzić powoli 1 ml siarczanu dimetylu. Zamknąć próbkówkę hermetycznie i wstrząsać przez 2 lub 3 minuty zanurzając często dno próbkówki we wrzącej łaźni wodnej; reakcja dobiega końca z chwilą, gdy wskaźnik zmienia barwę z niebieskiej na żółtą. Należy wówczas schłodzić próbkówkę pod wodą bieżącą, następnie otworzyć i dodać 5 ml roztworu kwasu solnego w metanolu.
- 5.3. Po zamieszaniu przez kilka sekund pochylić próbkówkę i lekko wstrząsać. Ułatwi to wypłynięcie na powierzchnię estrów metylowych w postaci oleistej masy (Uwaga A).

Pobrać estry metylowe za pomocą strzykawki i umieścić w próbkówce ze stożkowym dnem. Dodać pewną ilość siarczanu glinu równą około jednej czwartej objętości estrów metylowych, wstrząsnąć i przefiltrować przez filtr papierowy.

Uwaga A: Jeżeli oddzielenie estrów metylowych nie następuje spontanicznie, dodać do próbkówki 5 ml wody i wstrząsnąć.

Proces E

2. ZASADA

Przeznaczona do analizy substancja t uszczowa jest nagrzewana za pomocą systemu zwrotnego w obecności metanolu-heksanu-kwasu siarkowego. Otrzymane w ten sposób estry metylowe są ekstrahowane eterem naftowym.

3. APARATURA

- 3.1. Próbówka o pojemności około 20 ml połączona z powietrzną chłodnicą zwrotną o długości około 1 m ze szlifowanymi połączeniami.
- 3.2. Pipeta z podziałką o pojemności 5 ml.
- 3.3. Rozdzielacz o pojemności 50 ml.
- 3.4. Próbówki z podziałką o pojemności 10 i 25 ml.
- 3.5. Próbówka z dnem stożkowym o pojemności 15 ml.

4. ODCZYNNIKI

- 4.1. Odczynniki do metylowania: bezwodny metanol-heksan-stężony kwas siarkowy ($d = 1,84$) w proporcjach 75:25:1 (v/v/v).
- 4.2. Eter naftowy o temperaturze 40-60 °C.
- 4.3. Bezwodny siarczan sodu.

5. PROCEDURA

- 5.1. Do próbkówki o pojemności 20 ml wprowadzić produkty pochodzące z płytki i dodać 5 ml odczynnika metylującego.
- 5.2. Podłączyć chłodnicę zwrotną i podgrzewać przez 30 minut we wrzącej łaźni wodnej (Uwaga 2).
- 5.3. Przenieść mieszaninę do rozdzielacza o pojemności 50 ml używając 10 ml wody destylowanej i 10 ml eteru naftowego. Intensywnie wstrząsnąć, odczekać do rozdzielenia faz, usunąć warstwę wodną i wypłukać warstwę eterowaną dikrotnie za pomocą 20 ml wody destylowanej. Dodać do oddzielacza niewielką ilość bezwodnika siarczanu sodu, wstrząsnąć, odstawić na kilka minut i przefiltrować, następnie zebrać filtrat do próbkówki o pojemności 15 ml ze stożkowym dnem.

Odparować rozpuszczalniki w łaźni wodnej w strumieniu azotu.

Uwaga 1: Można łatwo otrzymać w laboratorium małe ilości gazowego kwasu solnego dokonując modyfikacji roztworu dostępnego w handlu ($d = 1,18$) przez dodanie kilku kropli stężonego kwasu siarkowego ($d = 1,84$). Uwolniony gaz można łatwo osuszyć przepuszczając przez bełkotkę zawierającą stężony kwas siarkowy. Ponieważ kwas solny jest szybko wchłaniany przez metanol, podczas rozpuszczania zalecane jest podjęcie normalnie stosowanych środków ostrożności wprowadzając na przykład gaz przez małą odwróconą do góry dnem próbkówkę, której krawędzie stykają się z powierzchnią cieczy. Metanolowy roztwór kwasu solnego można przygotowywać w dużych ilościach z wyprzedzeniem, ponieważ idealnie przechowuje się w butelkach ze szklanym korkiem bez dostępu światła.

Uwaga 2: Do kontrolowania stanu wrzenia umieścić w zlewce szklaną pałeczkę i ograniczyć temperaturę łaźni wodnej do 90 °C.

ZAŁĄCZNIK XI

OZNACZANIE LOTNYCH FLUOROWCOWANYCH ROZPUSZCZALNIKÓW OLIWY Z OLIWEK

1. METODA

Analiza metodą chromatografii gazowej przeprowadzana techniką Analizy fazy gazowej nad roztworem.

2. SPRZĘT

- 2.1. Chromatograf gazowy wyposażony w detektor wychwytu elektronów (ecd).
- 2.2. Aparatura do analizy fazy gazowej nad roztworem.
- 2.3. Szklana kolumna chromatograficzna do chromatografii gazowej o wysokości 2 m i średnicy 2 mm, faza nieruchoma. OV101 do 10 % lub równoważnik, nasycający ziemię okrzemkową, przepłukaną kwasami i potraktowaną krzemometanem, o uziarnieniu odpowiadającym sitom 80-100.
- 2.4. Gaz nośny i gaz pomocniczy: azot do chromatografii gazowej odpowiedni do wykrywania metodą wychwytywania elektronów.
- 2.5. Kolby szklane o wielkości 10-15 ml z wykładziną teflonową i korkiem aluminiowym wyposażonym w system pozwalający pobierać zawartość za pomocą strzykawki.
- 2.6. Szczypce z hermetycznym zamknięciem.
- 2.7. Strzykawka do gazu o pojemności 0,5 lub 2 ml.

3. ODCZYNNIKI

Standard: lotne rozpuszczalniki chlorowcowane charakteryzujące się stopniem czystości kwalifikującym je do chromatografii gazowej.

4. PROCEDURA

- 4.1. Odważyć dokładnie 3 g oliwy w szklanej kolbie (jednorazowego użytku), zamknąć kolbę hermetycznie. Umieścić kolbę w termostacie na okres jednej godziny w temperaturze 70 °C. Pobrać dokładnie za pomocą strzykawki 0,2-0,5 ml fazy gazowej z nad roztworu i wprowadzić do kolumny aparatu chromatograficznego do chromatografii gazowej wyregulowanego w następujący sposób:

- temperatura iniektora: 150 °C,
- temperatura kolumny: 70-80 °C
- temperatura detektora: 200-250 °C

Inne temperatury mogą być również stosowane pod warunkiem, że wyniki pozostaną równoważne.

- 4.2. Roztwory wzorcowe: przygotować roztwory mianowane stosując rafinowaną oliwę z oliwek bez śladu rozpuszczalników, o stężeniach wahających się 0,05-1 ppm (mg/kg) i odpowiadających przewidywanej zawartości próbki. Ewentualne rozcieńczanie należy prowadzić za pomocą pentanu.
- 4.3. Ocena ilościowa: powiązać powierzchnie lub wysokości wykresu dla największych wartości próbki i roztworu mianowanego o najbardziej zbliżonym zakładanym stężeniu. Jeżeli względna rozbieżność przekracza 10 % analiza wymaga powtarzania w porównaniu z innym roztworem mianowanym dopóki jego stężenie nie będzie się mieściło we wspomnianych granicach. Zawartość jest ustalona na podstawie średniej podstawowych wtrysków.
- 4.4. Przedstawienie wyników: w mg/kg (ppm). Granica wykrywalności metody wynosi 0,01 mg/kg.

ZAŁĄCZNIK XII

OCENA ORGANOLEPTYCZNA OLEJU Z OLIVEK PIERWSZEGO TŁOCZENIA

1. ZAKRES

Metoda ta ma na celu ustalenie kryteriów potrzebnych dla dokonania Oceny właściwości zapachu oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia i opracowanie wymaganej metodologii.

2. ZAKRES STOSOWANIA

Opisana metoda obowiązuje jedynie w odniesieniu do oceny i klasyfikacji organoleptycznej oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia wykorzystywanej do bezpośredniej konsumpcji. ogranicza się ona do klasyfikacji oliwy z pierwszego tłoczenia na podstawie skali numerycznej związanej z odczuwaniem jego bodźców zapachowych zgodnie z orzeczeniem grupy wybranych degustatorów tworzących zespół.

3. PODSTAWOWE OGÓLNE SŁOWNICTWO ANALIZY SENSORYCZNEJ

Patrz rozdział pt.: „analiza sensoryczna — podstawowe ogólne słownictwo”.

4. SPECJALNE SŁOWNICTWO DOTYCZĄCE OLIVEK Z OLIVEK

Migdał: ten zapach może przybrać dwie różne postaci: jeden to typowy zapach świeżego migdała, a drugi charakterystyczny dla migdała suchego i zdrowego, który można pomylić ze stadium jęlczenia. Oliwa pozostawia bardzo szczególnie posmak, gdy styka się z językiem i podniebieniem. Powiązany jest on z łagodnymi odmianami oliwy o przytłumionym zapachu.

Jabłko: smak przypominający ten owoc.

Zleżały: charakterystyczny smak oliwy uzyskanej z oliwek składowanych w stosach, które przeszły zaawansowane stadium fermentacji.

Gorzki: smak charakterystyczny dla oliwy pozyskanej z zielonych oliwek lub w etapie dojrzewania. Może być mniej lub bardziej przyjemny, zależnie od jego intensywności.

Solanki: smak charakterystyczny dla oliwy uzyskanej z oliwek konserwowanych w zalewie solnej.

Ogórek: smak oliwy powstający w wyniku zbyt długiego przechowywania w szczelnie zamkniętym opakowaniu, w szczególności w pojemnikach z blachy cynowanej, przypisywany powstawaniu 2,6 nonadienu.

Ziemny: smak charakterystyczny dla oliwy pozyskanej z oliwek zebranych z ziemi i nią zabrudzonych i nie umytych. W niektórych przypadkach takiemu zapachowi może towarzyszyć zapach stęchlizny.

Esparto: charakterystyczny zapach oliwy z oliwek tłoczonych w nowych włóknach esparto. Zapach ten może różnić się w zależności od tego, czy chodzi o włókna wykonane z esparto świeżego czy wysuszonego.

Zwietrzały lub przytłumiony: zapach oliwy z oliwek, której parametry organoleptyczne są bardzo złe w wyniku utraty ich składników aromatycznych.

Owocowy: zapach przypominający zarazem zapach i smak zdrowych świeżych owoców, zebranych w optymalnym momencie dojrzewania.

Trawa: charakterystyczny zapach niektórych rodzajów oliwy, przypominający świeżo ściętą trawę.

Smary: zapach oliwy z oliwek pozyskanej w olejarni, której sprzęt do pozyskiwania oliwy nie był poddany czyszczeniu z pozostałości ropy naftowej, smaru i oleju mineralnego.

Zielone liście (gorycz): zapach oliwy uzyskanej ze zbyt mało dojrzałych oliwek lub oliwek, które zostały rozgniecione z liśćmi i gałązkami.

Larwy muszki oliwnej: charakterystyczny zapach oliwy pozyskanej z oliwek, które zostały zaatakowane przez larwy muszki oliwnej (*Dacus oleae*).

Cierpki: charakterystyczne uczucie niektórych rodzajów oliwy, po degustacji powoduje reakcję skrzywienia.

Siano: charakterystyczny zapach niektórych rodzajów oliwy przypominający zapach trawy wysuszonej w większym lub mniejszym stopniu.

Zapach gotowania lub spalenizny: zapach charakterystyczny dla rodzajów oliwy uzyskanej w wyniku przegrzania i/lub przedłużonego ogrzewania podczas ich wytwarzania, w szczególności podczas termougniatania masy, jeżeli proces ten jest prowadzony w niewłaściwych warunkach.

Metaliczny: zapach przypominający metale; jest charakterystyczny dla oliwy, która zbyt długo stykała się ze środkami spożywczymi lub powierzchniami z metalu, w nieodpowiednich warunkach, w trakcie procesu rozdrabniania, ugniatania, tłoczenia lub magazynowania.

Osady: charakterystyczny zapach oliwy pozyskanej ze zdekantowanych osadów z kadzi i podziemnych zbiorników.

Stęchło-wilgotny: charakterystyczny zapach oliwy pozyskanej z oliwek zaatakowanych przez grzyby i drożdże na skutek przebywania owoców przez szereg dni w wilgoci.

Nieświeży: lub zapach zamkniętego pomieszczenia: charakterystyczny zapach oliwy zbyt długo przechowywanej w pojemnikach magazynowych. Może wystąpić również w rodzajach oliwy przechowywanych z byt długo w zamkniętym opakowaniu.

Pulpa: charakterystyczny zapach przypominający zapach pulpy oliwek.

Pojemnik wyplatany z włókien: zapach charakterystyczny dla oliwy pozyskanej z oliwek tłoczonych w koszach zabrudzonych sfermentowanymi wytłoczkami.

Zjełczały: charakterystyczny zapach wspólny dla wszystkich gatunków oleju i tłuszczów, które uległy samoutlenieniu w wyniku przedłużonego kontaktu z powietrzem. Zapach ten jest nieprzyjemny i nie daje się usunąć.

Owoc dojrzały: zapach oliwy z oliwek powstały z owoców dojrzałych, szczególnie posiadających zapach zwierzały nijaki i smak słodki.

Szorstki: charakterystyczne wrażenie niektórych rodzajów oliwy, których degustacja daje w ustach uczucie gęstości i maziowatości.

Mydlany: zapach przypominający pod względem węchowo-smakowym zielone mydło.

Słodki: uzyskany bez dodawania cukru przyjemny smak oliwy, w której nie dominuje żadna z właściwości takich jak gorycz, działanie ściągające czy smak pikantny.

Woda pochodzenia roślinnego: charakterystyczny zapach, który oliwa uzyskała na skutek złej dekantacji i zbyt długiego kontaktu z wodami pochodzenia roślinnego.

Winno-octowy: charakterystyczny zapach niektórych rodzajów oliwy przypominający wino lub ocet. Zapach ten jest głównie efektem powstania kwasu octowego, octanu etylu i etanolu w ilościach przekraczających normę w zapachu oliwy z oliwek.

5. SZKLANKA PRZEZNACZONA DO DEGUSTACJI OLIWY

Patrz rozdział. z tytułu: „szklanka do degustacji oliwy z oliwek”.

6. POMIESZCZENIE DO DEGUSTACJI

Patrz rozdział. z tytułu: „wytyczne do urządzania pomieszczenia do degustacji oliwy”.

7. APARATURA

Następująca aparatura wymagana przez degustatora do właściwego wypełnienia jego zadań, dostarczona jest do każdej kabiny i jest łatwo dostępna:

- szklanki (standardowe) zawierające próbki oznaczone dwucyfrowymi kodami dobranymi przypadkowo lub cyframi i literami. Oznaczenia mają być wykonane nieścieralnym i bezzapachowym ołówkiem,
- szkiełka zegarkowe z identycznymi oznaczeniami do przykrywania szklanek,
- kartki do prowadzenia notatek (patrz rysunek 2) zawierające instrukcje obsługi,
- długopis lub pióro,
- talerzyki z krążkami jabłka,
- szklanka wody o temperaturze otoczenia.

8. METODOLOGIA

Niniejsza sekcja zawiera podstawowe dane wymagane do przeprowadzenia analizy sensorycznej oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia i kładzie głównie nacisk na ujednoczenie zasad i sposobu postępowania degustatorów, którzy muszą wziąć udział w próbach i do których będzie należało zapoznanie się zarówno z zaleceniami ogólnymi jak i szczegółowymi w zakresie degustacji oliwy.

8.1. Rola organizatora lub kierownika (lub zespołu degustatorów)

Organizator zespołu powinien przejść rzetelne szkolenie będąc zarazem koneserem i wytrawnym ekspertem w zakresie wszystkich rodzajów oliwy, z którymi będzie miał do czynienia podczas swojej pracy. Jest kluczową postacią zespołu i osobą odpowiedzialną za swoją organizację i swoje działanie. Musi on powołać z wyprzedzeniem dostatecznie dużą liczbę degustatorów i zadbać o wyjaśnienie im wszelkich wątpliwości, jakie mogłyby pojawić się w sprawie wykonywania badań, powstrzymując się zarazem od podsuwania im jakichkolwiek sugestii co do próbek.

Jest on odpowiedzialny za inwentaryzację aparatury, za zapewnienie ich idealnego stanu czystości, przygotowanie i oznaczenie próbek, jak również za ich podanie degustatorom zgodnie z przyjętym schematem doświadczenia, zebranie danych i ich statystyczne przetwarzanie, w celu uzyskania jak najlepszych wyników przy jak najmniejszym wysiłku.

Praca kierownika zespołu wymaga zdolności sensorycznych, dokładności w przygotowywaniu prób, ścisłego przestrzegania kolejności ich wykonania, umiejętności i cierpliwości w planowaniu i przeprowadzaniu badań. Poza tym kierownik zespołu ma ponadto za zadanie podtrzymanie na duchu członków grupy podsycając ich zainteresowanie, ciekawość i ducha współzawodnictwa. Nie może dopuścić do tego, aby członkowie zespołu poznali jego opinię oraz, aby przeważające opinie osób mających ogólny posłuch miały wpływ na opinię pozostałych degustatorów. W jego zakresie obowiązków leży także dbałość o trening, dobór i kontrolę degustatorów, aby mieć pewność, że utrzymują oni odpowiednią sprawność.

8.2. Warunki badania

8.2.1. Objętość próbki

Każda szklanka powinna zawierać 15 ml oliwy.

8.2.2. Temperatura badania

Próbki oliwy przeznaczone do degustacji powinny mieć w szklance temperaturę 28 ± 2 °C. Przyjęto taką temperaturę, ponieważ pozwala ona najlepiej odczuwać różnice organoleptyczne, w temperaturze normalnej kiedy oliwa jest wykorzystywana jako przyprawa. Innym powodem, dla którego wybrano tę wartość jest gorsze ulatnianie się składników aromatycznych lub powstawanie związków lotnych, charakterystycznych dla podgrzanej oliwy, w niższych lub wyższych temperaturach.

8.2.3. Harmonogram przeprowadzania badań

W przypadku degustacji oliwy optymalnymi godzinami pracy są godziny ranne: udowodniono, że w ciągu dnia występują optymalne okresy zarówno w odniesieniu do zmysłu smaku jak i zapachu.

Okres wyostrenia zmysłów węchu i smaku występuje przed posiłkami, po których ulegają one stępieniu.

Jednakże kryterium to nie powinno być egzekwowane w sposób skrajny tak, aby głód mógł stanowić czynnik rozpraszający degustatorów i powodować obniżenie ich zdolności rozróżniania, w szczególności stosowanych przez nich kryteriów wyboru i akceptacji.

9. DEGUSTATORZY

Osoby występujące w roli degustatorów podczas dokonywania badań organoleptycznych jadalnej oliwy z oliwek powinny być przeszkolone i wybrane stosownie do ich zdolności odróżniania podobnych próbek; w tym przypadku należy pamiętać, że dokładność rośnie wraz z wprawą (patrz właściwa sekcja).

Podczas każdego badania należy mieć do dyspozycji od ośmiu do dwunastu degustatorów. Trzeba jednak przewidzieć kilku dodatkowych degustatorów, których można zawezwać w razie ewentualnej nieobecności.

9.1. Ogólne zalecenia dla kandydatów i degustatorów

Niniejsze zalecenia dotyczą zachowań, jakich kandydaci i degustatorzy powinni przestrzegać podczas swojej pracy.

Z chwilą odebrania zaproszenia kierownika zespołu do udziału w badaniu organoleptycznym, degustator powinien być w stanie przeprowadzić to badanie we wskazanym czasie i jest zobowiązany do przestrzegania poniższych zasad:

- 9.1.1. Powstrzymać się od palenia tytoniu przez okres około 30 minut przed wyznaczonym czasem badania.
- 9.1.2. Nie używać perfum, kosmetyku lub mydła, których zapach mógłby utrzymywać się podczas badania. Ręce należy myć mydłem nieperfumowanym lub o słabym zapachu, następnie płukać i suszyć tyle razy, ile wymaga tego usunięcie wszelkich śladów zapachu.
- 9.1.3. Nic nie jeść przez co najmniej godzinę przed degustacją.
- 9.1.4. W sytuacji, w której degustator czuje się źle, w szczególności jeśli chodzi o jego zmysł węchu i smaku lub znajduje się w stanie stresu uniemożliwiającego mu koncentrację w trakcie zadania, powinien uprzedzić kierownika zespołu, aby ten ostatni wycofał go z badania lub podjął stosownie decyzje, biorąc pod uwagę możliwość, że wyniki tego degustatora będą odbiegać od średnich wartości pozostałych członków zespołu.
- 9.1.5. Jeżeli degustator spełnia powyższe zasady, powinien zająć wyznaczoną mu kabinę w sposób możliwie jak najbardziej uporządkowany i spokojny.
- 9.1.6. Po zajęciu miejsca siedzącego powinien sprawdzić, czy aparatura, którą potrzebuje jest właściwie przygotowana oraz czy oznaczenie na każdej szklance pokrywa się z oznaczeniem umieszczonym na przykrywającym ją szkiełku zegarkowym.
- 9.1.7. Degustator musi dokładnie zapoznać się z instrukcjami zamieszczonymi na arkuszu do robienia notatek i przystąpić do badania próbki dopiero po całkowitym zapoznaniu z zadaniem, które ma do wykonania. W przypadku wątpliwości powinien on zwrócić się do kierownika zespołu w celu omówienia z nim na osobności napotkanych trudności.
- 9.1.8. Degustator musi wziąć szklankę do ręki nie zdejmując przykrywającego ją szkiełka zegarkowego, następnie pochylić ją lekko i w tym położeniu obrócić o pełny obrót w celu jak najrozleglejszego zwilżenia wewnętrznej powierzchni. Po tej operacji musi zdjąć szkiełko zegarkowe i powąchać próbkę, robiąc długie głębokie wdechy, aby wyrobić sobie opinię o przekazanej mu do oceny próbce. Okres badania zmysłem węchu nie powinien przekroczyć 30 sekund. Jeżeli degustator nie doszedł w tym czasie do żadnego wniosku, następną próbę powinien przeprowadzić po przerwie. Po zakończeniu badania węchowego przystępuje się do badania zapachu (zespołu wrażeń węchowo-smakowo-dotykowych). W tym celu należy wziąć do ust niewielką ilość oliwy około 3 ml. Ważne jest, aby rozprowadzić oliwę na całej wewnętrznej powierzchni ust począwszy od tylnych części ust i języka, poprzez części boczne i przednią aż do podniebienia ponieważ cztery podstawowe smaki (słodki, słony, kwaśny i gorzki) są dobierane z różną intensywnością w zależności od obszaru języka lub podniebienia.

Konieczne jest rozprowadzenie oliwy w odpowiedniej ilości i bardzo powoli na tylnej części języka sięgającej aż do podniebienia i gardła, koncentrując uwagę na kolejności pojawiania się bodźców goryczy i szczypania; jeżeli nie postąpi się w taki sposób, w niektórych rodzajach oliwy te dwa bodźce mogą umknąć uwadze, albo też gorycz może zostać zabita przez ostrość.

Krótkie kolejne wdechy powietrza do ust pozwalają nie tylko rozprowadzić próbkę po powierzchni całej jamy ustnej, ale także odczuć poprzez jamę nosowo-gardłową lotne składniki aromatyczne.

Należy wziąć również pod uwagę wrażenie dotykowe. W ten właśnie sposób powinny być odnotowane płynność, lepkość, ostrość lub pieczenie, a jeżeli wymaga tego badanie, z podaniem intensywności tych doznań.

- 9.1.9. Ocena organoleptyczna oliwy z oliwek z pierwszego tłoczenia musi być odniesiona tylko do jednej próbki w ciągu każdego badania, aby uniknąć zjawiska kontrastu, który mógłby powstać na skutek natychmiastowej degustacji innych próbek.

Biorąc pod uwagę, że kolejne degustacje są obciążone błędem wynikającym ze zmęczenia lub przytłumienia ostrości zmysłów poprzednimi degustacjami, ważne jest użycie produktu, który jest w stanie usunąć z ust resztki oliwy z dokonanej degustacji.

Zaleca się użycie niewielkiego kawałka jabłka (około 15 g), który po przeżuciu można wyrzucić do spluwaczki. Następnie wypłukać usta niewielką ilością wody o temperaturze otoczenia. Przed przystąpieniem do następnej degustacji należy odczekać co najmniej 15 minut.

9.2. Wstępny wybór kandydatów

Leży on w zakresie obowiązków kierownika zespołu, który, na drodze osobiście przeprowadzanych wywiadów, dokonuje wyboru mającego na celu zapoznanie się z osobowością kandydatów i warunkami ich życia. Jeżeli chodzi o warunki fizyczno-psychiczne, to w stosunku do kandydatów nie są stosowane bardzo rygorystyczne kryteria, z uwagi na fakt, że każda normalna osoba może zająć się taką działalnością. Czynniki dotyczące wieku, płci i niektórych przyzwyczajęń (palenie tytoniu) itp. schodzą obecnie na drugi plan w świetle innych aspektów, jak zdrowie, zainteresowanie osobiste i dyspozycyjność.

Podczas wywiadu kierownik zespołu tłumaczy kandydatowi funkcję, którą będzie pełnił i informuje ile w przybliżeniu zajmie to czasu. Następnie kierownik otrzymuje od kandydata informacje pozwalające mu dokonać oceny zainteresowania i motywacji oraz oceny ile czasu kandydat będzie w stanie faktycznie poświęcić tej działalności. Zamieszczony poniżej kwestionariusz może posłużyć jako wzór.

KWESTIONARIUSZ

Proszę odpowiedzieć na poniższe pytania:

- | | Tak | Nie |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 1. Czy chciałby Pan/Pani współpracować przy wykonywaniu prac na ten temat? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Czy uważa Pan/Pani, że tego rodzaju praca może mieć wpływ na poprawę jakości środków spożywczych w waszym kraju i handlu międzynarodowym? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. Jeśli tak, dlaczego ⁽¹⁾ | | |
| | | |
| | | |
| 4. Należy pamiętać, że zostanie Pan/Pani poproszony o dokonanie degustacji różnych rodzajów oliwy stosownie do potrzeb. Czy jesteście na to przygotowani? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. Czy chciałby Pan/Pani porównać swoje zdolności węchowo-smakowe ze zdolnościami swoich kolegów? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. Czy dysponuje Pan/Pani wolnym czasem? Czy jest Pan/Pani na tyle niezależny, aby organizować sobie pracę w ciągu dnia? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 7. Jeśli Pan/Pani był uzależniony od przełożonego, sądzi Pan/Pani, że w przypadku zwalniania się ze stałej pracy szereg razy i w przeciągu kolejno po sobie następujących dni, przełożony pozwoliłby Panu/Pani wypełniać to zadanie? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 8. Czy byłby Pan/Pani skłonny nadrobić czas poświęcany na analizy sensoryczne, aby odrobić nieobecności w Pana/Pani normalnej pracy? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 9. Czy uważa Pan/Pani, że praca ta powinna być wynagradzana? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 10. W jakiej postaci? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Na podstawie zebranych w taki sposób danych kierownik zespołu dokona wstępnego wyboru. Wylimowani są kandydaci, którzy wykazują niewiele zainteresowania dla tego rodzaju pracy, niemogący poświęcić wiele czasu lub nie będący w stanie wypowiedzieć się precyzyjnie.

9.3. Określenie „średniego progu” grupy w odniesieniu do „charakterystycznych właściwości”

Wybrać starannie cztery rodzaje oliwy w taki sposób, aby każda z nich została uznana za reprezentującą taką cechę jak: zleżała, winna, zjełczała i gorzka, o możliwie jak najbardziej wyraźnym i wyczuwalnym stężeniu.

Pobrać jednakową część każdego ze wspomnianych rodzajów oliwy i przygotować próbki o stężeniach różniących się w stosunku 1:2, dokonując kolejnych rozcieńczeń przy użyciu odpowiedniego nośnika aż do momentu w dwóch lub trzech ostatnich roztworach nie będzie już możliwości stwierdzenia różnicy porównując je ze szklanką zawierającą sam nośnik. Ostatnią parę powinny stanowić dwie szklanki zawierające nośnik.

Serię tę należy uzupełnić szklankami zawierającymi większe stężenia roztworu, tak aby było ich w sumie osiem.

Przygotować dostateczną liczbę próbek o różnych stężeniach, aby można było przekazać każdemu z kandydatów kompletne zestawy różnych stężeń każdej właściwości.

W celu ustalenia „średniego progu” kandydatów w odniesieniu do każdej z właściwości należy podać im szklankę zawierającą 15 ml któregośkolwiek z przygotowanych roztworów i jednocześnie szklankę zawierającą wyłącznie 15 ml „nośnika”. Po przeprowadzeniu badania kandydat musi wskazać, czy zawartość szklanki jest taka sama, czy różna.

Takie samo badanie musi być powtórzone w odniesieniu do pozostałych stężeń badanej właściwości.

Odnotować liczbę prawidłowych odpowiedzi w odniesieniu do każdego ze stężeń podanych przez wszystkich kandydatów i podać procentowy udział w przeprowadzonych badaniach.

⁽¹⁾ Proszę określić dokładnie jakie jest Pana/Pani zdaniem, znaczenie, jakie może mieć ocena każdego środka spożywczego, albo oliwy z oliwek, pod kątem jego właściwości organoleptycznych.

Nanieść na osi odciętych według rosnących wartości badane stężenia, a na osi rzędnych wartości w % prawidłowych oznaczeń dla każdego ze stężeń.

Rysunek 1 przedstawia praktyczny przykład powyższych instrukcji. Próg wykrywania jest wyznaczony na osi odciętych na drodze ekstrapolacji z krzywej punktu na osi rzędnych odpowiadający 75 % właściwych odpowiedzi.

To stężenie „progowe”, które może różnić się dla każdej wyjściowej oliwy, ponieważ zależy od intensywności występującej w niej właściwości, powinno być podobne dla poszczególnych grup kandydatów różnych zespołów; nie jest ono uzależnione od żadnego obyczaju, przyzwyczajenia lub tendencyjnej skłonności. Chodzi tu w konsekwencji o wspólny punkt odniesienia dla każdej przeciętnej grupy osób i może posłużyć do ujednoczenia różnych zespołów wyłącznie z uwagi na stopień ostrości ich zmysłów węchu i smaku.

Na podstawie otrzymanego w ten sposób stężenia progowego grupy postępować w sposób następujący:

Przygotować serię rosnących i malejących stężeń tak, aby to „stężenie progowe” odpowiadało wartości 10 na tej skali. Okazuje się, że stężenia odpowiadające wartościom 11 i 12 będą bardziej rozcieńczone, a przez to będzie bardzo trudno wykryć w nich obecność oliwy charakteryzującej się wybraną właściwością.

Wychodząc od stężenia C_{10} pozostałe próbki mogą być przygotowane zgodnie z następującym wzorem:

$C_{10} \times a^n$, gdzie „a” jest wartością stałą odpowiadającą współczynnikowi rozcieńczenia wynoszącym 1,5, a „n” wykładnikiem, który waha się między 9 a -2.

Na przykład: zakładając, że próg uzyskany dla oliwy zjełczałej wynosi 0,32, $C_{10} = 0,32$, a ponieważ „a” = 1,5, seria próbek będzie miała następujące stężenia:

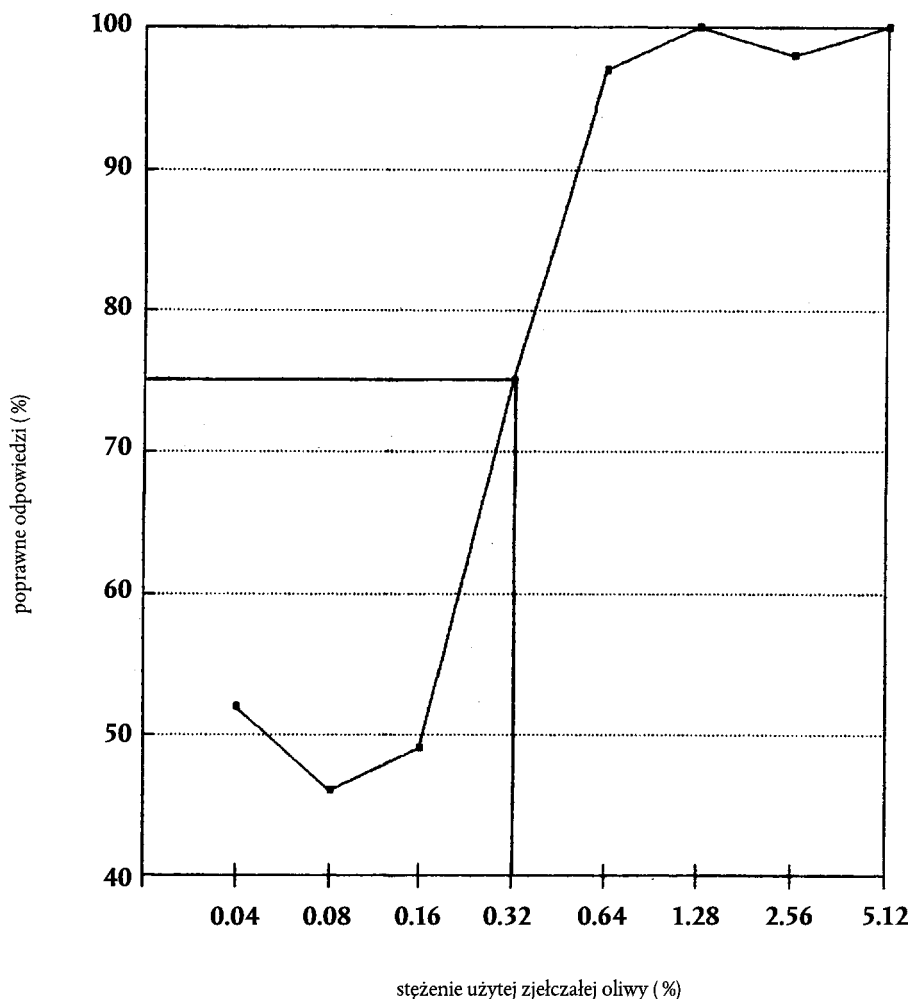
Przykład	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Stężenie	12,30	8,20	5,47	3,65	2,43	1,62	1,08	0,72	0,48	0,32	0,21	0,14

Jeżeli podobna procedura jest powtarzana w odniesieniu do pozostałych trzech właściwości, otrzyma się, na bazie poszczególnych progów obliczonych podobnie jak podano powyżej, skale, które będą dla wszystkich laboratoriów stanowić podobną intensywności aromatyczne dla każdego bodźca, nawet gdyby wyjściowe próbki oliwy posiadały wyczuwalne wady o innym stopniu intensywności.

9.4. Wybór degustatorów metodą klasyfikacji intensywności

Procedura wyboru może mieć miejsce przy liczbie kandydatów, która jest dwa do trzech razy większa od uznanej za niezbędną dla utworzenia zespołu degustatorów z największą wrażliwością lub osób wykazujących się daleko posuniętymi zdolnościami rozróżniania. Zalecane jest przeprowadzenie prób używając tego samego produktu, który później będzie analizowany (w tym konkretnym przypadku zawsze stosuje się oliwę z oliwek).

Rysunek 1



W odniesieniu do wyboru metody należy pamiętać, niezależnie od jej skuteczności, że procedura, którą należy przyjąć, powinna być możliwie jak najbardziej ekonomiczna jeżeli chodzi o ilość oliwy, liczbę próbek do badania i czas przeznaczony na wybór. Skuteczność procedury wyboru polega na wyborze optymalnych poziomów trzech poniższych zmiennych zależnych: a) „koszt” określony liczbą prób; b) „proporcja” kandydatów potencjalnie przydatnych, ale którzy przez nieszczęśliwy przypadek zostali wyeliminowani podczas wyboru degustatorów; c) „proporcja” kandydatów potencjalnie nieprzydatnych, ale w wyniku sprzyjających okoliczności przyjętych, chociaż nie powinno mieć to miejsca.

Cztery punkty przyjętej procedury wyboru, próba klasyfikacji intensywności, która opisana jest w normach ASTM (Amerykańskie Towarzystwo Badań i Publikacji Materiałów), STP (Specjalne Publikacje Techniczne) nr 440, str. 53, zostały zmienione następująco:

1. zmniejszenie liczby próbek w serii;
2. rozszerzenie zakresu bodźców w celu zwiększenia liczby wrażeń węchowo-smakowych, które stanowią podstawę wyboru, pod kątem dostosowania ich do najczęściej spotykanych wad wyczuwalnych w oliwie z oliwek;
3. zmiana stosunku stężenia w serii; i
4. statystyczne przetwarzanie wyników.

Wymagana aparatura:

- butelki lub kolby o pojemności 1 500 ml,
- szklanki do degustacji w ciemnym kolorze,
- probówki o pojemności 10, 15, 1 000 i 1 500 ml.

Wymagane produkty:

- parafina typu Merck (oznaczenie 7160, DAB 8, USP XX) lub oleisty nośnik bez zapachu i bez smaku (świeżo rafinowana oliwa z oliwek lub inny olej),
- próbki oliwy: zleżały, winny, zjełczały i gorzki.

9.4.1. Procedura

Po przygotowaniu roztworów, wybrać kandydatów zaczynając do dwudziestu pięciu kandydatów, zgodnie z metodologią opisaną poniżej dla każdej właściwości:

1. Przygotować serie dwunastu szklanek degustacyjnych oznaczonych kodami (jedna seria na kandydata). Wlać do każdej szklanki 15 ml każdego z roztworów przygotowanych według wzoru $C_{10} \times an$.
2. Po napełnieniu i zakryciu szkiełkiem zegarkowym szklanki powinny pozostać w pomieszczeniu degustacyjnym w temperaturze 20-22 °C na okres co najmniej jednej godziny przed rozpoczęciem degustacji w celu zrównania ich temperatury z temperaturą otoczenia.
3. Organizator ustawia następnie dwanaście szklanek z każdej serii w kolejności odpowiadającej malejącemu stężeniu.
Następnie każdy z kandydatów proszony jest o przeprowadzenie degustacji oddzielnie według poniższych instrukcji.

9.4.2. Instrukcje dla kandydatów

Dwanaście szklanek ustawionych w jednej linii przed kandydatem zawiera roztwory któregoś z rodzajów oliwy: zleżalej, winnej, zjełczalej lub gorzkiej, stosownie do okoliczności. Zawartość szklanek różni się między sobą intensywnością zapachu, przy czym szklanka z roztworem o najsilniejszym zapachu znajduje się po lewej skrajnej stronie, a intensywność zapachu w pozostałych szklankach stopniowo maleje ku prawej stronie. Intensywność zapachu w ostatniej szklanki po prawej stronie może być tak słaba, że może być niewykrywalna.

Należy postąpić następująco: oswoić się z zapachami wydzielanymi przez zawartość poszczególnych szklanek w serii. W tym celu należy rozpocząć od szklanki, która znajduje się po prawej stronie (nr 12) i starać się zapamiętać intensywność zapachów, nie dopuszczając jednak do zmęczenia zmysłu węchu.

Z chwilą, gdy uznacie, że przyzwyczailście się do skali intensywności zapachów wydzielanych przez zawartość szklanek serii, opuście pomieszczenie.

W tym czasie organizator wybiera jedną szklankę z serii i umieszcza na wysokości ostatniej szklanki po prawej stronie (nr 12). Zbliżając jednocześnie pozostałe szklanki, aby zlikwidować puste miejsca pozostawione po wybranej szklance. Wówczas wróćcie do pomieszczenia w celu kontynuowania degustacji.

Wymagany dowód jest następujący:

Wybrana przez organizatora szklanka powinna być umieszczona na swoim właściwym miejscu w serii. W tym celu należy powąchać jej zawartość i porównać z pozostałymi szklankami tyle razy, ile to konieczne, przy czym jeśli chcecie ją umieścić na jej właściwym miejscu w serii musicie pamiętać, że zapach, który wydziela zawartość tej szklanki musi być bardziej intensywny, niż zapach zawartości szklanki znajdującej się bezpośrednio po prawej stronie i mniej intensywny, niż zapach zawartości szklanki znajdującej się bezpośrednio po lewej stronie. Próbę należy powtórzyć z trzema innymi szklankami.

W celu ułatwienia całej operacji i zebrania odpowiedzi, poza wspomnianymi instrukcjami, każdy kandydat powinien otrzymać następujący formularz.

WYBÓR KANDYDATÓW

Próba nr 1 :..... Właściwość :.....

Oddzielona szklanka musi być umieszczona w miejscu nr :.....

Data :..... Nazwisko :.....

9.4.3. Uzyskiwanie wyników

W celu ułatwienia uporządkowania danych, organizator zapisuje dane każdego z kandydatów w sposób następujący:

Nazwisko kandydata	Badana właściwość	Podany nr kolejny (K')	Dokładny nr kolejny (K)	Ocena (K' — K) ²
.....
.....

9.4.4. Statystyczna procedura klasyfikacji

W niniejszym szczególnym przypadku wyboru kandydatów na degustatorów szklanki, które mają być umieszczone na ich właściwym miejscu, powinny być te same dla wszystkich kandydatów. Zgodnie z dokonanym w tym celu rachunkiem statystycznym szklanki te odpowiadają, według kolejności szklanek w serii, poniżej podanym miejscom dla każdej właściwości:

Zleżały (Z)	Winny (W)	Zjełczały (Zj)	Gorzki (G)
nr szklanki	nr szklanki	nr szklanki	nr szklanki
(10, 5, 7, 2)	(11, 3, 8, 6)	(7, 4, 10, 2)	(6, 3, 11, 9)

Numer odpowiadający miejscu zajętemu przez szklanki w serii nie może być zmieniony, ponieważ rachunek statystyczny dla tej próby został przeprowadzony z uwzględnieniem prawdopodobieństwa ustawienia wskazanych szklanek dokładnie na swoim miejscu przez przypadek.

Niemniej jednak, aby uniknąć przekazania informacji przez jednego kandydata innemu, kierownik zespołu musi zadbać:

1. aby nie dopuścić do jakiegokolwiek wymiany informacji między kandydatami; stosować inny kod dla każdego kandydata
2. nie dopuścić, aby kandydaci znali miejsce zajęte przez szklanki, które zostały usunięte.
3. zmienić kolejność podawania szklanek każdemu kandydatowi, jakkolwiek są to te same szklanki we wszystkich przypadkach.

Każdy kandydat otrzyma następnie ocenę stosownie do wyników, które uzyskał. W tym celu należy postępować w sposób następujący:

Oznaczyć dwanaście szklanek zawierających dwanaście stężeń odpowiadających właściwości „i” ($i =$ którakolwiek z czterech właściwości: zleżały, winny, zjełczały i gorzki) i ustawionych według malejącego stężenia danej właściwości jako $e^i_1, e^i_2 \dots e^i_{12}$.

Oznaczyć jako e^i_k jedną z wybranych szklanek, a jako K „położenie, jakie kandydat przydzieli szklance w momencie umieszczania jej z powrotem w serii. Wartości K i K' są w związku z tym liczbami całkowitymi mieszczącymi się w granicach 1-12 włącznie, odpowiadającymi odpowiednio faktycznemu miejscu i wybranemu przez kandydata.

Oznaczyć jako T (maksymalne dopuszczalne odchylenie) wyznaczoną wstępnie wielkość, w naszym przypadku jest to 3, w taki sposób, że gdy $(K' - K) > T$, kandydat zostaje automatycznie wyeliminowany (¹).

Jeżeli natomiast $(K' - K) \leq T$ kandydat zasadniczo nie zostaje wyeliminowany i może od tego momentu kontynuować próbną degustację z uwagi na to, że był w stanie umieścić daną właściwość na właściwym miejscu, a w każdym bądź razie w miejscach bezpośrednio z tym miejscem sąsiadujących.

W takim przypadku ocena przyznana kandydatowi, który badał on określoną właściwość (stężenie), na przykład w serii „zleżały” (Z) jest równa kwadratowi różnicy między kolejnym numerem właściwego miejsca zajmowanego przez szklankę w serii i numerem miejsca, na które została odstawiona szklanka przez kandydata, to znaczy:

$$P_h^{(Fy)} = (K' - K)^2.$$

Ponieważ czynność ta musi być wykonana przez każdego z kandydatów w odniesieniu do czterech stężeń każdej właściwości, cząstkowa ocena za daną właściwość (na przykład Z) będzie następująca:

$$Z^z = P_h^z + P_{zj} + P_m^z$$

Aby zapewnić jak najlepsze zrozumienie tej operacji, podane są następujące przykłady:

Przykład 1:

Załóżmy, że odpowiedzi kandydata A w odniesieniu do czterech stężeń właściwości, które zostały usunięte z serii, są następujące:

Dokładne położenie szklanki w serii (K)	Miejsce, na jakie została odstawiona przez kandydata (K')	Odstępstwo od właściwego położenia (K' - K)
7	7	7 - 7 = 0
4	5	4 - 5 = -1
10	6	10 - 6 = 4 (¹)
2	4	2 - 4 = -2

(¹) Ten kandydat zostaje odrzucony ponieważ w jego przypadku $T > 3$

(¹) Organizator powinien naciskać kandydata, aby postępował rozsądnie, to znaczy bez ztracenia wrażliwości przez zmęczenie organoleptyczne.

Przykład 2:

Założmy, że inny kandydat odstawia szklanki zawierające cztery stężenia badanej właściwości w następujący sposób:

Dokładne położenie szklanki w serii (K)	Miejsce, na jakie została odstawiona przez kandydata (K')	Odstępstwo od właściwego położenia (K' — K)
7	7	7 — 7 = 0
4	4	4 — 4 = 0
10	7	10 — 7 = 3
2	3	2 — 3 = -1

Ten kandydat nie zostaje odrzucony. Otrzymał on ocenę:

$$Z^i = 0^2 + 0^2 + 3^2 + (-1)^2 = 10$$

Końcowa ocena kandydata decydująca o jego wyborze lub odrzuceniu jako degustatora w zależności od czterech rozpatrywanych właściwości ma następującą postać:

$$P_h^G + P_j^G + P_l^G + P_m^G = Z^G$$

$$P_h^Z + P_j^Z + P_l^Z + P_m^Z = Z^Z$$

$$P_h^{Zj} + P_j^{Zj} + P_l^{Zj} + P_m^{Zj} = Z^{Zj}$$

$$P_h^W + P_j^W + P_l^W + P_m^W = Z^W$$

$$Z \text{ końcowe} = Z^G \dots + Z^Z + Z^{Zj} + Z^W$$

Zdzie: G = gorzki
Z = zleżały
Zj = zjełczały
W = winny

Następnie należy określić do jakiej maksymalnej wartości Z kandydata można uznać za nadającego się z racji dobrego poziomu odbierania wrażeń, pamięci węchowej i organizacji umysłowej pozwalającego na udzielenie odpowiedniej odpowiedzi w odniesieniu do czterech uwzględnionych właściwości. Najwyraźniej Z jest zawsze wartością dodatnią, a jeśli $Z = 0$, oznacza to, że kandydat rozpoznał i ocenił prawidłowo komplet szesnastu natężeń, które zostały mu podane (cztery dla każdej właściwości). Wartości Z różniące się od 0 oznaczają, że kandydat rozpoznał strefy skali, którym odpowiadały wybrane intensywności, ale w obrębie tych stref nie był w stanie usytuować bodźca w sposób właściwy ustawiając szklankę na właściwym miejscu ponieważ nie posiada stosownych umiejętności odróżniania w powiązaniu z całą gamą natężeń jednego lub kilku wspomnianych bodźców, która została mu przedstawiona. Tak więc trzeba będzie wyznaczyć taką krytyczną wartość Z, że przy założeniu, iż kandydat umieściłby wszystkie szklanki w sposób przypadkowy w obrębie stref, które przedtem rozpoznał, prawdopodobieństwo oceny ostatecznej Z niższej od Z_c stanowi wielkość dostatecznie małą (α), którą można ustalić z góry.

Innymi słowy należy upewnić się, że w tym sposobie postępowania prawdopodobieństwo wybrania degustatora do zespołu nieposiadającego dostatecznie dobrych warunków odróżniania bodźców w odniesieniu do natężeń wykorzystanych do wyboru było mniejsze niż α .

Po ustaleniu wartości α (w naszym przypadku = 0,05) uzyskanie Z_c zależy od rozkładu krzywej prawdopodobieństwa zmiennej Z, przy czym ta ostatnia zależy z kolei od rozkładu prawdopodobieństwa zmiennych P (K).

Po dokonaniu stosownych obliczeń statystycznych wartość otrzymana dla Z_c wynosi 34.

Z chwilą uzyskania oceny Z dla wszystkich kandydatów, ci których ocena jest większa niż 34, powinni być wyeliminowani.

Patrzy przykłady ocen kandydatów A i B:

Właściwość	Kandydat A	Kandydat B
Zleżały (Z)	$Z^Z = 10$	$Z^Z = 12$
Winny (W)	$Z^W = 10$	$Z^W = 11$
Zjełczały (Zj)	$Z^{Zj} = 10$	$Z^{Zj} = 15$
Gorzki (G)	$Z^G = 4$	$Z^G = 0$
	$\Sigma = 34$	$\Sigma = 38$

Ponieważ wartości Z dla obu sprawdzanych kandydatów wynoszą odpowiednio 34 i 38, kandydat A zostanie przyjęty, natomiast kandydat B zostanie odrzucony. Po wyeliminowaniu wszystkich kandydatów, którzy otrzymali ocenę większą niż 34, pozostali klasyfikowani są według zebranych wartości Z aż do momentu skompletowania zespołu dwunastu najlepszych kandydatów.

9.5. Szkolenie

Głównymi celami szkolenia są:

- a) zapoznanie degustatorów z licznymi wariantami węchowo-smakowo-czuciowymi jakie oferuje oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia;
- b) zapoznanie degustatorów ze specyficzną metodologią sensoryczną;
- c) zwiększenie indywidualnych zdolności rozpoznawania, identyfikacji i oszacowania właściwości sensorycznych; oraz
- d) zwiększenie ostrości odczuć i poprawienie pamięci w odniesieniu do różnych właściwości w celu osiągnięcia zdolności wydawania spójnych ocen.

Okres szkolenia na ogół obejmuje, stosownie do możliwości zespołu i programu, szereg sesji, w trakcie których, po indywidualnej analizie różnych rodzajów oliwy, degustatorzy omawiają wraz z kierownikiem zespołu trudności, na które natknęli się w trakcie analizy oraz komentują uwagi w celu ujednoczenia kryteriów i opinii.

Poziom szkolenia osiągnięty po określonej liczbie sesji jest oceniany w oparciu o procentowy wzrost dokładnych odpowiedzi w przypadku ewentualnego zastosowania badań rozróżniających — lub analizując rozbieżność przeciętnych indywidualnych uwag grupy w odniesieniu do badań przeprowadzanych przy użyciu skali.

Praktyczna przydatność tego okresu szkolenia była szeroko rozpatrywana, ale obecnie uznana jest za bardzo skuteczną, a nawet niezbędną, jeżeli chce się mieć do dyspozycji dokładne i precyzyjne dane sensoryczne.

9.6. Kontrola

Ekipy degustatorów o dużej praktyce na ogół dokonują regularnie degustacji wiążących się z badaniami sensorycznymi, które wymagają z ich strony dużego wysiłku. Od ich opinii uzależnione są istotne decyzje technologiczne i handlowe, tak więc po ich doborze i przeszkoleniu degustatorzy powinni być poddawani kontrolom mającym na celu zagwarantowanie niezawodności wyników.

Oczywiście po utworzeniu zespołów i poddaniu ich rutynowym badaniom, wymagane byłoby regularne kontrolowanie ich „wyników” w odpowiednich odstępach czasu.

10. PROCEDURA ORGANOLEPTYCZNEJ OCENY OLIWY Z OLIWEK Z PIERWSZEGO TŁOCZENIA

Z chwilą spełnienia warunków określonych w wymienionych wyżej normach, dyspozycyjność niezbędnych środków i wyboru grupy degustatorów, każdy z degustatorów musi powąchać, a następnie spróbować ⁽¹⁾ badaną oliwę znajdującą się w szklance degustacyjnej w celu przeanalizowania jej właściwości zapachowych, smakowych, czuciowych i kinestetycznych przy użyciu formularza przedstawionego na rysunku 2, na którym powinien odnotować ich obecność i wartość, jaką przypisuje ich intensywności. Następnie musi przejść do etapu oceny jakości oliwy.

10.1. Sposób korzystania z formularza zamieszczonego na rysunku 2 (opis doznań sensorycznych i ocena jakości).

Po lewej stronie formularza naniesione są niektóre najczęściej spotykane wrażenia sensoryczne w odniesieniu do oliwy z oliwek, opisujące jej zapach. W przypadku wykrycia innych bodźców, które nie odpowiadają wymienionym określeniom, degustator musi odnotować je w rubryce „inne” stosując jak najdokładniejsze określenia.

Ocena wyczuwalnych właściwości powinna być dokonana proporcjonalnie do ich intensywności przez wstawienie znaku (+) w odpowiedniej rubryce według następującego kryterium:

- 1: ledwo wyczuwalny
- 2: lekki
- 3: średni
- 4: silny
- 5: wyjątkowo silny

Po prawej stronie formularza naniesiona jest skala 1-9 punktów (9 za wyjątkową jakość, a 1 za najgorszą), którą degustator powinien wykorzystać w celu podania jednej oceny obejmującej całość parametrów oliwy. Ocena ta powinna być zgodna z zaletami i wadami oliwy już podanymi po lewej stronie formularza.

⁽¹⁾ Może on powstrzymać się, gdy stwierdzi wysoce i intensywnie niemiłe właściwości w zapachu, zapisując to w arkuszu ocen jako wyjątkowe zjawisko.

Pierwsza kolumna (wady) tabeli oceny zawiera pięć rubryk. Klasyfikacja oliwy powinna się więc opierać głównie na całkowitym braku lub występowaniu niewłaściwych zapachów, a także na większej lub mniejszej intensywności wad. Jednakże z uwagi na to, że skala oceny ogranicza się do 9 punktów, należy brać pod uwagę pewne drobne różnice lub pewne aspekty, opisane w drugiej kolumnie z nagłówkiem „właściwości”, decydujące w ostateczny sposób o podjęciu decyzji co do łącznej punktacji.

10.2. **Ocena końcowa**

Kierownik zespołu musi zebrać karty wypełnione przez każdego z degustatorów w celu sprawdzenia, czy właściwości sensoryczne i ich intensywność, jakie stwierdził i odnotował w karcie zbiorczej, pokrywają się z oceną oliwy zawartą w tabeli oceny. W przypadku istotnych różnic kierownik musi zwrócić się do degustatora z prośbą o wprowadzanie poprawek w jego formularzu oceny.

W razie potrzeby degustator powinien powtórzyć badanie.

Na koniec kierownik zespołu musi przystąpić do sporządzenia tabeli ocen zespołu i do obliczeń średniej arytmetycznej oraz wielkości błędu średniego.

Wyłącznie w przypadku powtórnej analizy zespół musi powtarzać badania do momentu uzyskania trzech ocen każdej próbki; ocena końcowa jest wynikiem średniej trzech ocen i ma postać liczby dziesiętnej.

Jeżeli wielkość średniej intensywności smaku gorzkiego i/lub ostrego przekracza 2,5, oliwa powinna zostać stosownie oznakowana, a także należy zapisać, że jest ona wyjątkowo gorzka i/lub ostra.

Podanie wyników: kierownik zespołu na podstawie średniej oceny określa kategorię do jakiej zaliczana jest próbka zgodnie z wartościami granicznymi ustanowionymi w załączniku I. Sprawozdanie zawierające analizę podaje wyłącznie tę kategorię.

Uwaga: Próbkę powinny być przechowywane w zamkniętych naczyniach i w lodówce aż do momentu ich analizy i powinny być tam umieszczane aż do chwili wykonania trzech ocen.

Rysunek 2

Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia

Formularz profilu
Oceny właściwości węchowo-smakowo-dotykowe ⁽¹⁾Tabela oceny ⁽²⁾

	0	1	2	3	4	5
Owoc oliwki (dojrzałej i zielonej) ⁽¹⁾						
Jabłko.....						
Inny dojrzały owoc						
Zielony (liście, trawa)						
Gorzki						
Cierpki.....						
Słodki						
Inne przypisywane właściwości.....						
(Wyszczególnić						
.....)						
Kwaśny/winny/octowy/kwasowy ⁽¹⁾						
Szorstki.....						
Metaliczny.....						
Stęchlizna/wilgoć ⁽¹⁾						
Mętny osad						
Zleżały („Atrojado”)						
Zjełczały						
Inne niedopuszczalne właściwości						
(Wyszczególnić.....						
.....)						

Wady	Cechy	Ogólna ocena: liczba punktów
Brak	Owoc oliwki	9
	Owoc oliwki i owocowe cechy innego świeżego owocu	8
		7
Słabo wyczuwalne	Słabe cechy owocowe dowolnego rodzaju	6
Wyczuwalne	Raczej niedoskonałe cechy owocowe, nieprawidłowe zapachy i smaki	5
Znaczne, na granicy dopuszczalności	Zdecydowanie niedoskonały, nieprzyjemne zapachy i smaki	4
Silne i/lub poważne, wyraźnie wyczuwalne	Zapachy i smaki całkowicie dyskwalifikujące z przeznaczenia do spożycia	3
		2
		1

Uwagi:

Nazwisko degustatora:

Oznaczenie próbki:

Data:

⁽¹⁾ Wrażenie.⁽²⁾ Niepotrzebne skreślić:0: ⁽³⁾,

1: ledwo wyczuwalne,

2: lekkie,

3: średnie,

4: silne,

5: wyjątkowo silne.

ANALIZA SENSORYCZNA: OGÓLNE, PODSTAWOWE SŁOWNICTWO

1. ZAKRES

Celem niniejszej normy jest zestawienie ogólnych terminów stosowanych w analizie sensorycznej i podanie ich definicji.

2. SŁOWNICTWO

2.1. Terminologia ogólna

Analiza sensoryczna (rzeczownik):

badanie właściwości organoleptycznych produktów przy użyciu narządów zmysłów.

Postrzeganie (rzeczownik):

odczucie sensoryczne zewnętrznych obiektów lub zdarzeń.

Organoleptyczny (przymiotnik) (właściwość):

opisuje właściwość produktu wyczuwalną dzięki narządów zmysłów.

Ekspert (rzeczownik):

(w odniesieniu do badania właściwości organoleptycznych)

degustator, który specjalizuje się w analizie sensorycznej określonego produktu i dysponuje podstawową wiedzą na temat jego przygotowywania i preferencji rynkowych.

Degustator (rzeczownik):

przenikliwa, wrażliwa, przeszkolona osoba wybrana do dokonywania oceny właściwości organoleptycznych żywności przy pomocy narządów zmysłów.

Zespół:

grupa oceniających, którzy zostali specjalnie dobrani i przeszkoleni oraz, którzy zbierają się w celu przeprowadzenia analizy organoleptycznej produktu w warunkach kontrolowanych.

Wrażenie (rzeczownik):

subiektywne zjawisko wynikające ze stymulowania układu narządów zmysłów. Zjawisko to może być subiektywnie wyodrębnione lub obiektywnie określone przez uczestniczący narząd zmysłów, zależnie od charakteru i rodzaju bodźca oraz od jego intensywności.

Czułość (rzeczownik):

zdolność do ilościowego i jakościowego odczuwania bodźca o małej intensywności, przy słabej różnicy między bodźcami, przy pomocy narządów zmysłów.

Degustacja (rzeczownik):

czynność obejmująca odczucie, analizowania i ocenę właściwości organoleptycznych produktu, w szczególności właściwości zapachowych, smakowych, dotykowych i kinestetycznych produktu spożywczego.

Dopuszczenie (rzeczownik):

czynność pojedynczej osoby lub grupy osób polegająca na korzystnej ocenie produktu.

Harmonia (rzeczownik):

właściwość produktu, która powoduje powstanie ogólnego przyjemnego wrażenia. Wrażenie to jest wynikiem odczucia składników produktu jako bodźców zapachowych, smakowych, czuciowych i kinestetycznych dzięki obecności tych składników w odpowiednich stosunkach intensywności.

Dopuszczalność (rzeczownik):

stan produktu korzystnie odebranego przez pojedynczą osobę lub grupę osób pod względem jego właściwości organoleptycznych.

Rozróżnianie (rzeczownik):

czynność rozróżniania jakościowego i/lub ilościowego między dwoma lub większą liczbą bodźców.

Kompensacja (rzeczownik):

wynik interakcji zespołu bodźców w taki sposób, że każdy z nich jest odczuwany z mniejszą intensywnością niż gdyby działał pojedynczo.

Postać (rzeczownik):

połączenie właściwości organoleptycznych postrzeganych wzrokowo: rozmiaru, kształtu, barwy, konformacji przestrzennej, zmetnienia, czystości, płynności, spienienia i musowania. Wyrażenie to należy preferować w stosunku do pojęcia „wygląd”.

Właściwość (rzeczownik):

wyczuwalna cecha.

2.2. **Pojęcia fizjologiczne**

Bodziec (rzeczownik):

czynnik fizyczny lub chemiczny, który w sposób swoisty doprowadza do odpowiedzi ze strony zewnętrznych lub wewnętrznych receptorów zmysłowych.

Smak (rzeczownik):

(zmysł smaku)

zmysł, którego receptory mieszczą się w jamie ustnej, w szczególności na języku; receptory te są aktywowane przez różnego rodzaju związki chemiczne występujące w roztworach.

Smakowy (przymiotnik):

opisuje właściwość produktu, który może stymulować aparat smakowy przez wywołanie wrażeń odnoszących się do jednego lub kilku z czterech podstawowych smaków: słodkiego, słonego, kwaśnego i gorzkiego.

Receptor (rzeczownik):

szczególne struktury narządu zmysłów, które mogą być pobudzane i wykazują zdolność do odbierania bodźców i przekształcania ich w wyładowanie nerwowe.

Uwaga: Receptory klasyfikuje się na podstawie rodzaju energii związanej z bodźcem (światło, ciepło, dźwięk, itp.).

Węch (rzeczownik):

funkcja aparatu węchowego polegająca na wyczuwaniu i rozróżnianiu cząsteczek w postaci gazowej docierających do niego ze środowiska zewnętrznego bezpośrednio lub pośrednio przez nos.

Intensywność (rzeczownik):

wielkość energii właściwości, którą można zmierzyć według ilościowej skali wartości powyżej wielkości progowej.

Adaptacja (rzeczownik):

przejściowa zmiana w odczuwaniu bodźców zmysłowych będąca konsekwencją ciągłego, powtarzanego wystawienia na działanie danego bodźca lub na bodziec podobny.

Zahamowanie (rzeczownik):

brak odpowiedzi narządu zmysłów lub jego części pomimo poddawania go działaniu odpowiedniego bodźca o intensywności przewyższającym wielkość progową.

Odpowiedź (rzeczownik):

działanie, którym komórki zmysłowe odpowiadają na działanie jednego lub kilku bodźców, na który wrażliwy jest dany narząd zmysłów.

Pełność (rzeczownik):

wrażenie dotykowe odczuwane w jamie ustnej, na podstawie którego przypisuje się odpowiedni stopień gęstości, lepkości, spójności lub zwartości danemu produktowi.

Aromat (rzeczownik):

świeży, przyjemny, rozkoszny zapach.

Wąchać (czasownik):

(czynność związana z zapachem)

pojęcie to opisuje czynność odczuwania zapachu.

Obiektywny (przymiotnik):

- opisuje to, co daje prawdziwe, sprawdzone odzwierciedlenie obiektu przez zminimalizowanie czynników ludzkich (na przykład preferencji, zwyczajów, skłonności);
- opisuje technikę, która — albo metodami sensorycznymi albo instrumentalnymi, minimalizuje błędy wprowadzone przez osobę eksperymentatora.

Uwaga: Nie stosować pojęcia „instrumentalny” jako synonimu.

Subiektywny (przymiotnik):

opisuje to, co wytwarza wrażenie, na które wpływa nie tylko bodziec, ale także sposób myślenia i odczuwania.

Kinestezja:

wrażenia wynikające z nacisku na próbkę, będącego wynikiem jej poruszania się w jamie ustnej lub między palcami (na przykład: ściskanie sera w palcach)

*Wielkość progowa (rzeczownik)**Bezwzględna wielkość progowa:*

minimalna wartość bodźca sensorycznego, który doprowadza do:

- pojawienia się wrażenia (próg bodźcowy lub próg wykrywalności), lub
- identyfikacji wrażenia (próg rozpoznania).

Wielkość progowa różnicy:

minimalna wartość bodźca zmysłowego, który powoduje powstanie odczuwalnej różnicy intensywności wrażenia.

Krańcowa wielkość progowa:

maksymalna wielkość bodźca, powyżej której nie odczuwa się wzrostu intensywności.

Wielkość progowa preferencji:

minimalna wielkość ilościowa bodźca lub krytycznej wartości ponadprogowej takiego bodźca, przy której pojawia się odpowiedź jego atrakcyjności lub odrzucenia w stosunku do bodźca neutralnego, na przykład w przypadku dokonywania wyboru między posłodzonym roztworem i wodą.

Uwaga: Należy dokonać rozróżnienia między bezwzględną wielkością progową preferencji i wielkością progową rozróżniania preferencji.

Podprogowy (przymiotnik):

poniżej bezwzględnej wielkości progowej.

Ponadprogowy (przymiotnik):

powyżej bezwzględnej wielkości progowej.

Zmęczenie sensoryczne:

szczęgólna forma adaptacji zmysłowej, podczas której dochodzi do spadku czułości.

Kompensacja (rzeczownik):

wynik interakcji zespołu bodźców w taki sposób, że każdy z nich jest odczuwany z mniejszą intensywnością, niż gdyby działał pojedynczo.

Synergiczny (przymiotnik):

Rezultat lub łączne działanie danych substancji, w wyniku, którego intensywność właściwości organoleptycznych połączenia jest większe niż suma intensywności każdej właściwości z osobna.

Efekt kontrastu:

wzrost odpowiedzi na różnice między dwoma równoczesnymi lub kolejnymi bodźcami.

Przeciwieństwo efektu konwergencji.

Efekt konwergencji:

spadek odpowiedzi na różnice między dwoma równoczesnymi lub kolejnymi bodźcami; przeciwieństwo efektu kontrastu.

2.3. Terminologia związana z właściwościami organoleptycznymi:*Kwaśny (przymiotnik):*

- a) opisuje podstawowy smak, który dają rozcieńczone wodne roztwory większości substancji kwaśnych (na przykład kwasu cytrynowego, kwasu mlekowego, kwasu winowego);
- b) opisuje właściwość czystych substancji lub mieszanin, które dają ten smak.

Odpowiedni rzeczownik to kwasowość.

Kwaśny (przymiotnik):

opisuje węchowo-smakowe wrażenie, w przypadku którego dominują kwasy powstające na ogół w procesie fermentacji, jak też środki spożywcze, które dają to wrażenie.

Niektóre czynniki przyczyniające się do powstania tego wrażenia są związane z fermentacją, na przykład fermentacją mlekową lub octową produktu spożywczego.

Gorzki (przymiotnik):

- a) opisuje smak podstawowy, którego wrażenie dają rozcieńczone wodne roztwory różnych substancji, takich jak chinina, kofeina i określone alkaloidy.
- b) opisuje właściwość czystych substancji lub mieszanin dających ten smak.

Odpowiedni rzeczownik to *gorzycz*.

Słony (przymiotnik):

- a) charakterystyczne wrażenie odczuwane przez zmysł smaku, którego najbardziej typowym przykładem jest smak roztworu chlorku sodu;
- b) opisuje właściwość czystych substancji lub mieszanin dających ten smak.

Odpowiedni rzeczownik to *zasolenie*.

Słodki (przymiotnik):

- a) opisuje smak podstawowy, który dają wodne roztwory różnych substancji, takich jak np. cukier trzcinowy;
- b) opisuje właściwość czystych substancji lub mieszanin dających ten smak.

Odpowiedni rzeczownik to *słodkość*.

Cierpki (przymiotnik):

- a) opisuje złożone wrażenie wytwarzane w jamie ustnej przez rozcieńczony roztwór wodny takich produktów, jak niektóre taniny (na przykład taniny z jagód hurmy wschodniej i taniny z owoców śliwy tarniny).
- b) opisuje właściwość czystych substancji lub mieszanin dających to wrażenie.

(Odpowiedni rzeczownik to *cierpkość*).

Zapach (rzeczownik):

zapach oznacza połączenie wrażeń węchowo-smakowo-czuciowych i kinestetycznych umożliwiających osobie oceniającej identyfikację i ustalenie wielopoziomowego, korzystnego lub niekorzystnego kryterium.

Smak (rzeczownik):

- a) wrażenia odczuwane podczas stymulacji brodawek smakowych przez niektóre rozpuszczalne substancje.
- b) właściwość specyficznego wrażenia dawanego przez takie substancje.

Smak podstawowy (rzeczownik):

dowolny z rozróżnialnych smaków, co do których uważa się, że istnieje ich cztery: słodki, słony, kwaśny, gorzki.

Woń (rzeczownik):

- a) zespół wrażeń odczuwanych przez narząd węchu przy wężaniu określonych substancji lotnych;
- b) właściwość specyficznego wrażenia dawanego przez dowolną z powyższych substancji.

Aromat (rzeczownik):

- a) przyjemne wrażenia odczuwalne pośrednio przez narząd węchu przy smakowaniu pożywienia.
- b) w przemyśle perfumeryjnym i w języku niespecjalistycznym pojęcie to odnosi się także do samych wrażeń odczuwanych bezpośrednio przez nos.

Posmak (rzeczownik):

zespół wrażeń odczuwanych po zniknięciu bodźca z jamy ustnej, które różnią się od wrażeń odczuwanych wcześniej.

Aromatyczny (przymiotnik):

- a) opisuje właściwość czystej substancji lub mieszanin, które przy ich smakowaniu dają wrażenia zwane aromatem;
- b) opisuje produkty, które przy ich bezpośrednim zbadaniu przez nos dają wrażenie przyjemnego aromatu i świeżości.

Konsystencja (rzeczownik):

charakterystyka stałego lub reologicznego stanu produktu, który w całości może stymulować receptory mechaniczne w trakcie degustacji, w szczególności receptory zlokalizowane w jamie ustnej.

Uwaga: Pojęcie to odnosi się wyłącznie do właściwości obiektywnych, a nie do uzyskiwanych wrażeń, które oznacza się ogólnymi pojęciami, takimi jak spójność, włóknistość, tłuściość itp.

Płukanie ust:

czynność, w przebiegu której pokarm znajdujący się w jamie ustnej wchodzi w kontakt z wszystkimi jej wrażliwymi obszarami, tak że można odczuć na policzkach wytwarzane przez ten pokarm wrażenia.

Uwaga: Można poszerzyć niniejszy słowniczek przez zapoznanie się z treścią normy ISO 5492, części I–V, jak też z innymi publikacjami, takimi jak artykuł J. L. Magnena pod tytułem *Les cahiers techniques du Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation* itp.

SZKLANKA DO BADANIA OLEJÓW

1. ZAKRES

Celem niniejszej normy jest podanie charakterystyki szklanki przeznaczonej do stosowania w analizie sensorycznej olejów jadalnych (woń, smak, zapach).

Ponadto opisuje odpowiednio dostosowany zestaw grzejny potrzebny do osiągnięcia i utrzymania właściwej temperatury dla tej analizy.

2. OPIS SZKLANKI

Na rysunku 1 postarano się przedstawić optymalne cechy, jakie powinna posiadać aparatura tego typu, które można opisać w sposób następujący:

- a) maksymalna stabilność, aby zapobiec przechyłowi szklanki i rozlaniu się oleju;
- b) podstawa dobrze dopasowana do zagłębienia w zestawie grzejnym, tak aby dno szklanki zostało równo podgrzane;
- c) kształt najszerszy u podstawy, tak aby składniki lotne oleju mogły się łatwo uwalniać, jednak powinien się zwężać ku otworowi, tak aby te same składniki ulegały łatwej koncentracji ułatwiającej ich odczucie i zidentyfikowanie przez nos;
- d) musi być zrobiona z ciemnego szkła, tak aby uniemożliwić degustatorowi zobaczenie barwy oleju, co wyeliminuje wszelkie uprzedzenia i zapobiegnie możliwemu powstawaniu błędów systematycznych lub tendencyjności.

2.1. Wymiary

Szklankę schematycznie przedstawiono na rysunku 1, przy czym ma ona następujące wymiary:

— całkowita pojemność	130 ml ± 10 ml,
— całkowita wysokość	60 mm ± 1 mm,
— średnica otworu	50 mm ± 1 mm,
— średnica szklanki w najszerszym miejscu	70 mm ± 1 mm,
— średnica podstawy	35 mm ± 1 mm,
— grubość boków szklanki	1,5 mm ± 0,2 mm,
— grubość podstawy szklanki	5 mm ± 1 mm.

Każda szklanka musi być wyposażona w szkło zegarkowe, którego średnica musi być o 10 mm większa od średnicy otworu szklanki. Szkło to musi być wykorzystywane jako pokrywka zapobiegająca utracie aromatu i przedostawaniu się kurzu.

2.2. Charakterystyka wykonania

Szklanka musi być zrobiona z wytrzymałego szkła; musi być ciemna, tak aby nie można było rozróżnić barwy jej zawartości, musi być ponadto pozbawiona zarysowań i pęcherzyków.

Brzeg musi być równy, gładki i zaokrąglony.

Szklanka musi zostać odprężona, tak aby wytrzymywała zmiany temperatury, którym będzie musiała zostać poddana w trakcie prób.

2.3. Instrukcja stosowania

Szklanki należy wyczyścić przy pomocy nieperfumowanego mydła lub detergentu, po czym należy je kilka razy wypłukać do momentu usunięcia w całości środka myjącego. Do ostatniego płukania należy użyć wody destylowanej, po czym szklanki należy zostawić do odsączenia, a następnie wysuszyć w suszarce laboratoryjnej.

Nie wolno stosować stężonych kwasów ani mieszanin kwasu chromowego.

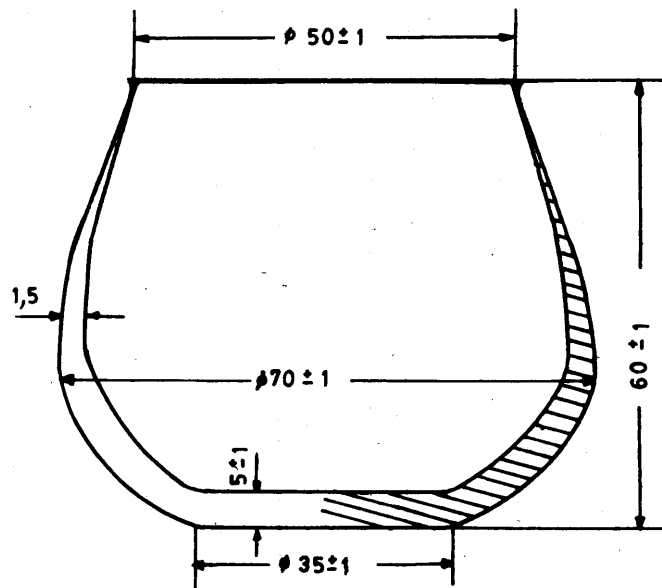
Szklanki należy przechowywać w suszarce aż do momentu, gdy staną się potrzebne, lub w szafie, w której muszą być zabezpieczone przed zanieczyszczeniem jakimikolwiek dodatkowymi woniami z zewnątrz.

Przed użyciem każdą szklankę należy powąchać, aby upewnić się, że brak jest w niej jakiegokolwiek dodatkowej woni z zewnątrz. Podczas przygotowywania próby należy odnotować oznaczenie każdej szklanki i zawartego w niej oleju. Organizator próby musi być jedyną osobą znającą związek między tym oznaczeniem i olejem.

3. URZĄDZENIE DO PODGRZEWANIA PRÓBEK

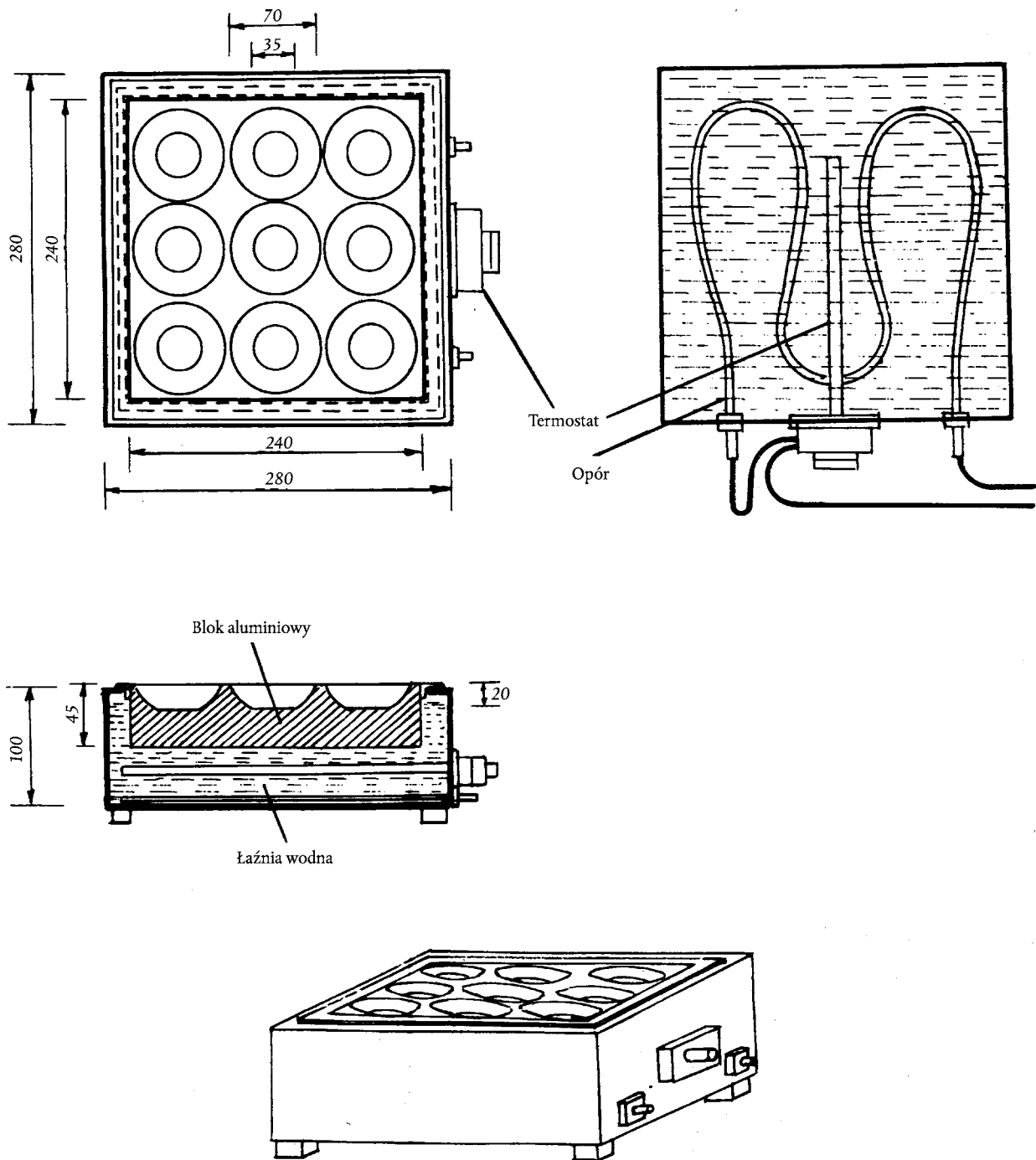
Próbki należy badać organoleptycznie w ustalonej temperaturze, która w przypadku olejów musi wynosić 28 ± 2 °C. W tym celu należy w każdej kabinie zainstalować urządzenie grzejne (patrz: rycina 2) w zasięgu ręki degustatora. Urządzenie to składa się z bloku aluminiowego zanurzonego w kontrolowanej termostaticznie łaźni wodnej, tak aby utrzymać stałą temperaturę. Blok ten ma serię zagłębień, do których pasują dna szklanek. Różnica temperatury między urządzeniem grzejnym i olejem zawartym w szklankach włożonych do zagłębień poszczególnych bloków nie może przewyższać ± 2 °C.

Rysunek 1 — Szklanka do badań organoleptycznych



Wymiary (w mm)

Rysunek 2 — Urządzenie do podgrzewania próbek (wymiary w milimetrach)



WSKAZÓWKI DOTYCZĄCE WYPOSAŻENIA POMIESZCZENIA DO PRÓB**1. WPROWADZENIE**

Pomieszczenie do prób musi zapewnić zespołowi osób uczestniczących w badaniach sensorycznych odpowiednie, wygodne, standardowe środowisko, które ułatwia pracę i pomaga w poprawieniu powtarzalności i odtwarzalności wyników.

2. ZAKRES

Celem niniejszej normy jest określenie podstawowych warunków, które muszą być spełnione przy instalowaniu pomieszczenia do prób.

3. OGÓLNE SPECYFIKACJE INSTALACJI

Pomieszczenia, niezależnie od ich wielkości (patrz 3.1), muszą być zgodne z następującymi specyfikacjami:

Muszą być przyjemne i odpowiednio oświetlone (patrz 3.2), jednak utrzymane w neutralnym stylu. W tym celu zaleca się kojący, jednolity jasny kolor ścian, tworzący wypoczynkową atmosferę⁽¹⁾.

Pomieszczenia mają być takie, aby można je było łatwo wyczyścić i muszą być odseparowane od wszelkich źródeł hałasu; w związku z tym najlepiej, aby były wyciszone. Muszą być także wolne od zewnętrznych, dodatkowych woni, w którym to celu powinny być w miarę możliwości wyposażone w skuteczne urządzenia wentylacyjne. O ile pozwalają na to wahania temperatury otoczenia, sala do prób powinna być wyposażona w klimatyzację, tak aby temperatura powietrza była utrzymywana na poziomie zbliżonym do 20-22°C.

3.1. Wymiary

Wymiary pomieszczeń często zależą od możliwości laboratoriów lub firm. Generalnie powinny one być wystarczająco obszerne, aby można było zainstalować w nich 10 kabin i stanowisko do przygotowywania próbek.

Jednakże, im większy obszar przeznaczony na instalację, tym lepiej, gdyż wtedy można zapewnić przestrzenie pomocnicze przeznaczone np. do mycia aparatury, do sporządzania potraw kulinarnych i do otwartych spotkań panelowych.

3.2. Oświetlenie

Oświetlenie ogólne, czy to światłem słonecznym, czy to przy pomocy lamp (na przykład listew oświetleniowych) musi być jednorodne, podlegające kontroli i rozproszone.

3.3. Warunki temperaturowe i higrometryczne

W pomieszczeniach musi być stale utrzymywana przyjemna temperatura i przyjemne warunki higrometryczne. Jedynie w wyjątkowych okolicznościach zaleca się temperaturę w przedziale 20-22 °C i warunki higrometryczne od 60 do 70 % wilgotności względnej.

4. OPIS KABIN**4.1. Charakterystyka ogólna**

Kabiny do analiz sensorycznych muszą być umieszczone w pomieszczeniach obok siebie. Muszą być identyczne i oddzielone ściankami działowymi, które powinny być na tyle wysokie i szerokie, aby oddzielać od siebie siedzących degustatorów.

Kabiny mogą być wykonane z dowolnego nadającego się do tego celu materiału, łatwego do czyszczenia i pielęgnacji (na przykład z drewna, szklonej sklejk, paneli laminowanych itp.). W przypadku stosowania farby musi być ona kompletnie wolna od woni po wysuszeniu.

Siedzenia w kabinach muszą być wygodne i muszą mieć urządzenie do regulowania wysokości.

Każda kabina musi być także wyposażona w indywidualne oświetlenie o regulowanym kierunku i natężeniu światła.

Zdecydowanie zaleca się wyposażenie kabin w przycisk podłączony do zewnętrznego światła, dzięki któremu degustator będzie mógł zawiadomić pozostającą na zewnątrz osobę z obsługi o tym, że zakończył próbę, potrzebuje następnych próbek, brakuje mu części aparatury, zauważył jakieś nieprawidłowości lub życzy sobie uzyskać informacje itp., bez przeszkadzania innym degustatorom.

⁽¹⁾ Kolor schematu pomieszczenia i jego oświetlenie może wpłynąć na wyniki analizy sensorycznej.

4.2. Wymiary

Kabiny muszą być wystarczająco obszerne i wygodne. Generalnie muszą mieć następujące wymiary:

- szerokość:
 - 0,75 m (bez zlewu)
 - 0,85 (ze zlewem);
- długość:
 - 0,50 m (stół)
 - 0,20 m nadmiar na ścianki działowe;
- wysokość ścianek działowych:
 - minimum 0,60 m od stołu;
- wysokość stołu:
 - 0,75 m.

4.3. Aranżacja

Powierzchnia stołu musi być taka, aby łatwo ją było wyczyścić.

Część tej powierzchni musi zostać wykorzystana do zainstalowania stołu z doprowadzoną bieżącą wodą pitną. Jednakże, jeśli nie jest to możliwe, miejsce to można wykorzystać do umieszczenia tacy, spluwaczki lub podobnego sprzętu.

W przypadku, gdy podczas próby próbki muszą być utrzymywane w stałej temperaturze niższej lub wyższej od temperatury otoczenia, radzi się wyposażyć kabinę w odpowiednie urządzenie (łaźnię wodną, płytkę grzejącą itp.).

Na wysokości około 1,10 metra od podłogi można także zainstalować półkę służącą do umieszczania na niej różnego rodzaju akcesoriów (szklanek, drobnych aparatów itp.).

O ile pozwala na to usytuowanie kabiny w pomieszczeniu do prób, warto zainstalować urządzenie ułatwiające prezentację próbek. Może mieć ono postać zsuwanej śluzi (rysunek 1), obrotowego, pionowego urządzenia (rysunek 2) nadającego się do szklanek lub filiżanek (wysokich pojemników) lub otwierającej się poziomo śluzi, gdy pojemniki, w których przechowywane są próbki, są niewielkie (rysunek 3). Jest to po prostu kwestia zapewnienia, aby otwór był na tyle duży, aby przechodziły przez niego tace i szklanki zawierające próbki.

Na rysunku 4 przedstawiono przykład pomieszczenia do prób i pomieszczeń dodatkowych.

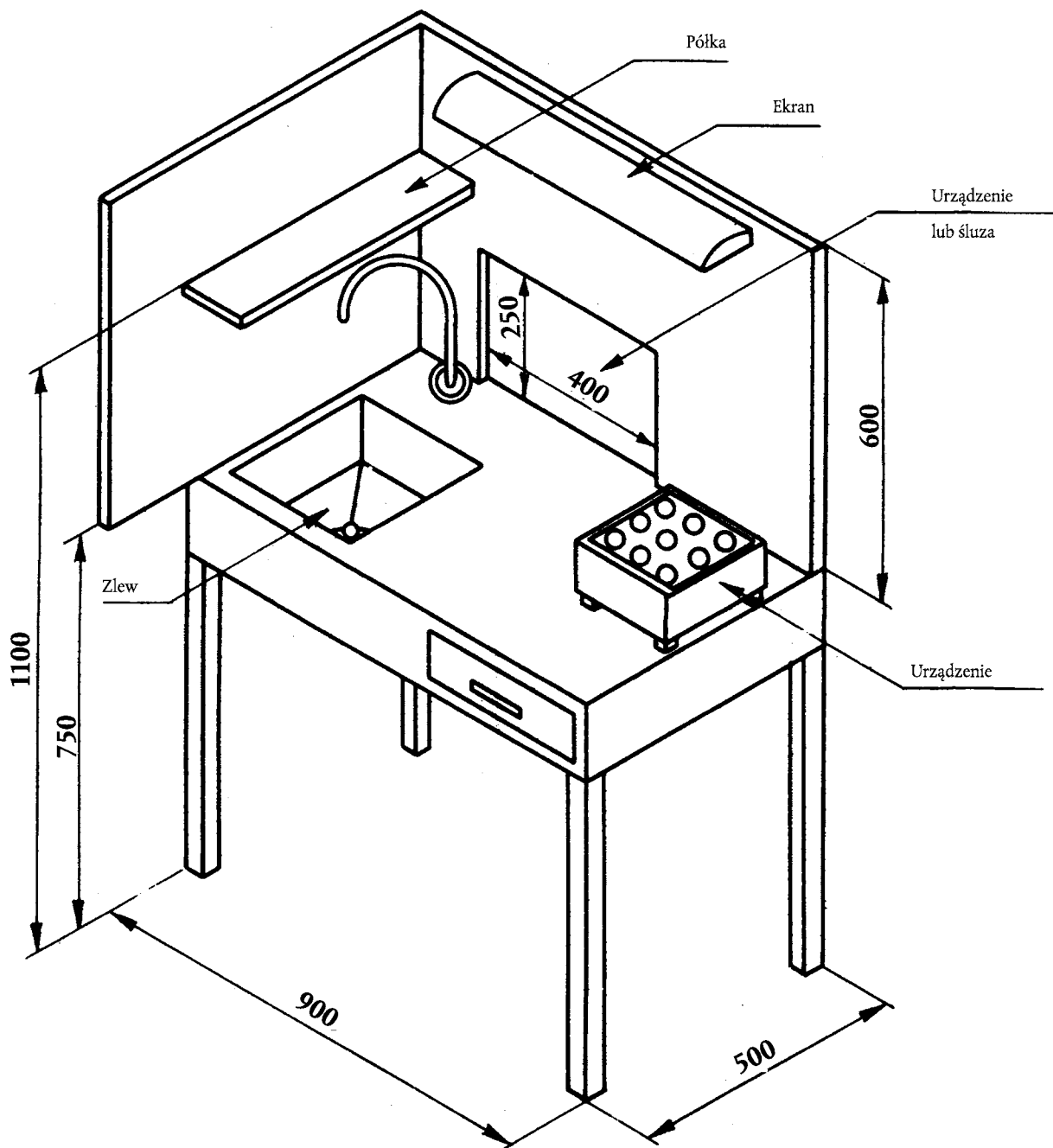
5. DODATKOWE POMIESZCZENIA

Jeżeli istnieje wystarczająco dużo miejsca, radzi się zapewnienie dodatkowych pomieszczeń przeznaczonych do przygotowywania próbek (kulinarnego lub innego), ustawiania szklanek lub aparatury oraz prowadzenia dyskusji przed lub po przeprowadzeniu prób. O ile takie pomieszczenia są dostępne, należy je utrzymywać w czystości; bezwzględnie jakiegokolwiek zapachy, hałas czy rozmowy dobiegające z tych pomieszczeń nie mogą zakłócać pracy osób oceniających w sali do prób.

Uwaga: Opisano warunki idealne, jednak gdyby nie było możliwe zapewnienie takich instalacji wyłącznie do analiz sensorycznych, próby można przeprowadzać w pomieszczeniach spełniających opisane warunki minimum (oświetlenia, temperatury, hałasu, woni) przez wstawienie ruchomych kabin skonstruowanych ze składanych elementów w taki sposób, aby przynajmniej izolowały poszczególnych degustatorów od siebie nawzajem.

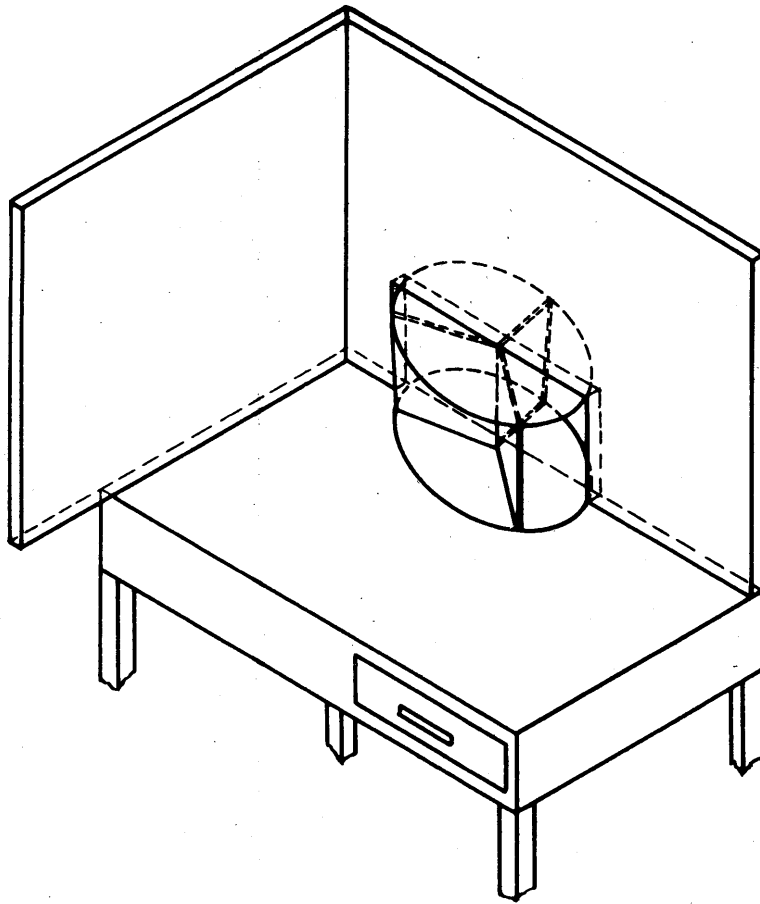
UKŁAD KABINY

Rysunek 1



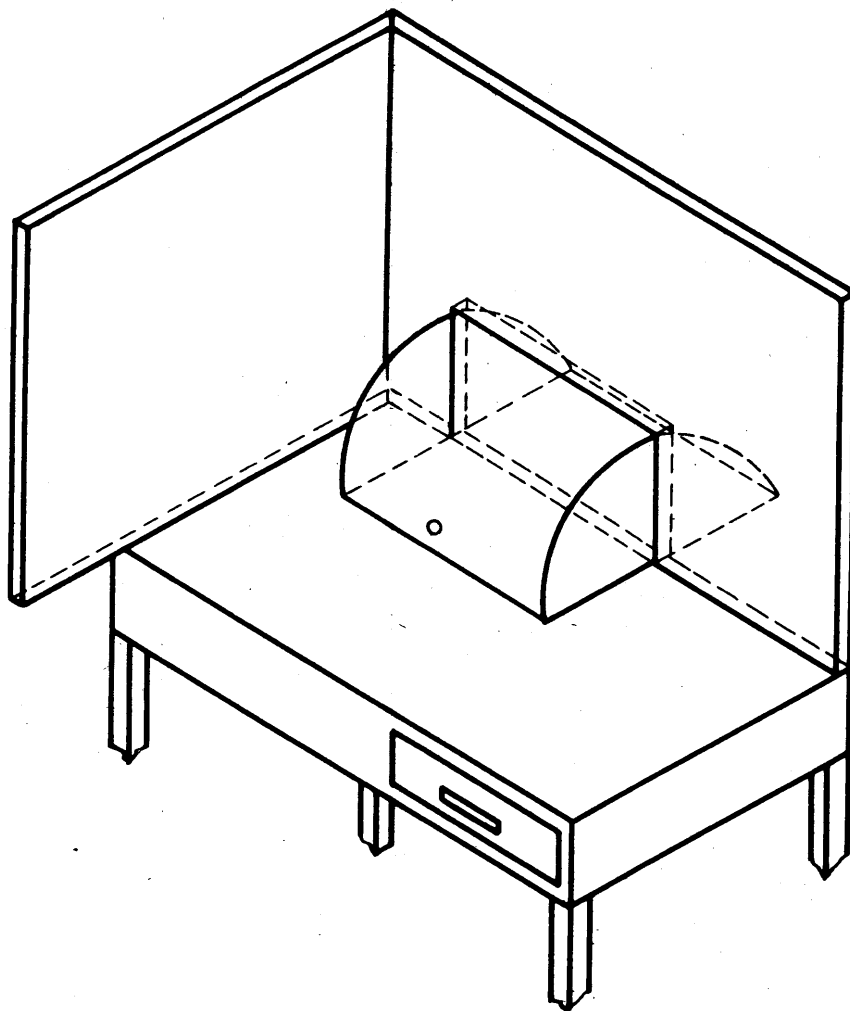
URZĄDZENIE OBROTOWE SŁUŻĄCE DO PREZENTOWANIA PRÓBEK

Rysunek 2



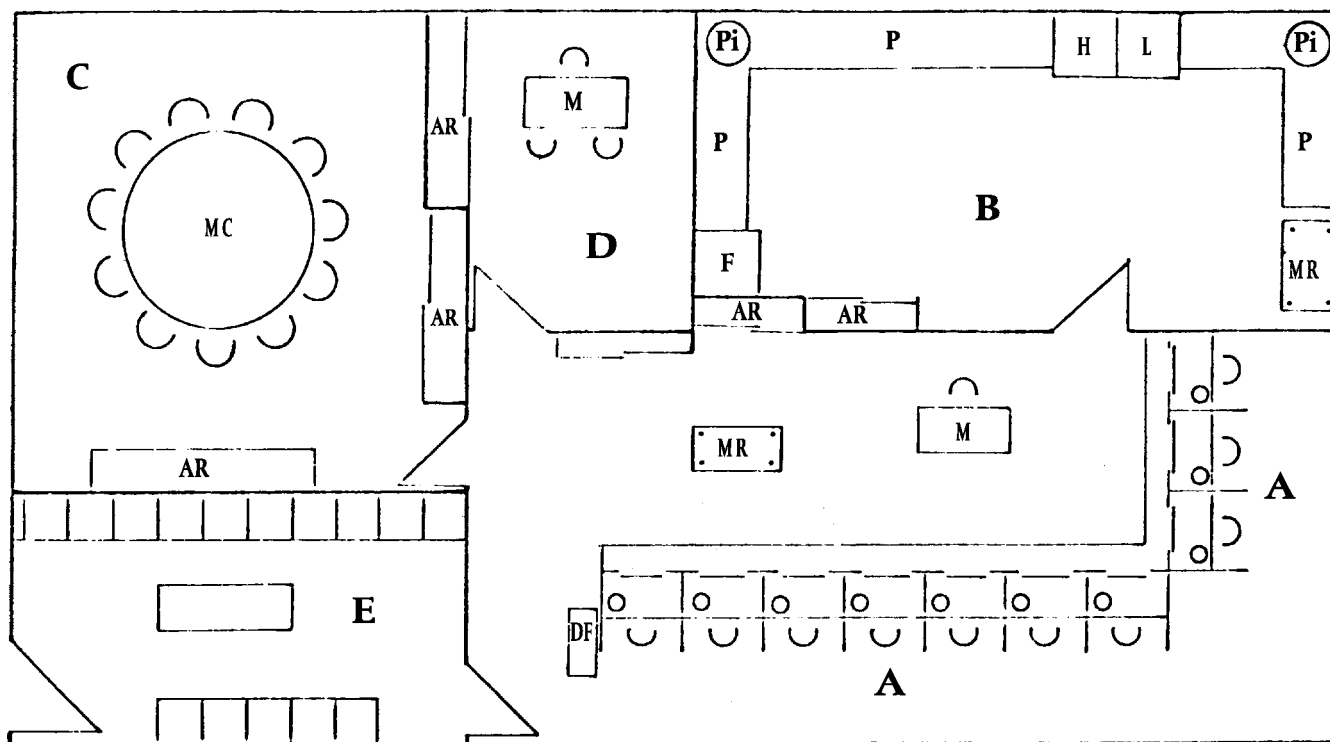
ŚLUZA DO PREZENTOWANIA PRÓBEK

Rysunek 3



LABORATORIUM ANALIZ SENSORYCZNYCH (Przykład)

Rysunek 4 — Przykład pomieszczenia do prób



- A: kabiny do badań organoleptycznych,
- B: pomieszczenie do mycia aparatury i przygotowywania próbek,
- C: otwarty panel,
- D: biuro,
- E: poczekalnia,
- F: lodówka,
- H: piec,
- L: zmywarka do naczyń,
- Pi: zlew,
- AR: szafa,
- MR: wózek,
- DF: dystrybucja formularzy,
- MC: okrągły stół,
- P: blat roboczy.

ZAŁĄCZNIK XIII

POTWIERDZENIE DOKONANIA PROCESU RAFINACJI

1. ZOBOJĘTNIE NIE I ODBARWIENIE OLIWY Z OLIVEK W LABORATORIUM

1.1. **zobojętnienie oliwy**

1.1.1. Aparatura

- zlewka, 300 ml, wysoka,
- wirówka laboratoryjna z probówkami o pojemności 100 ml,
- zlewka, 250 ml,
- kolby stożkowe z okrągłym dnem, 100 ml,
- rozdzielacz, 1 litr.

1.1.2. Odczynniki

- roztwór wodny 12 % wodorotlenku sodu,
- 1 % roztwór fenoloftaleiny w alkoholu etylowym,
- czysty heksan, cz.d.a.,
- czysty propan-2-ol cz.d.a.

1.1.3. Procedura

- a) *Oliwa z zawartością wolnych kwasów tłuszczowych wyrażoną jako zawartość kwasu oleinowego poniżej 30 %*

Wprowadzić 50 g surowej oliwy do wysokiej zlewki o pojemności 300 ml i podgrzać do 65 °C w łaźni wodnej. Dodać ilość 12 % roztworu wodorotlenku sodu odpowiadającą ilości wolnych kwasów w oleju z nadmiarem 5 %, łagodnie mieszając przez cały czas. Kontynuować mieszanie przez pięć minut, utrzymując temperaturę na poziomie 65 °C.

Przenieść mieszaninę do probówek wirówkowych o pojemności 100 ml i oddzielić mydlaną pastę metodą wirowania. Zlać zdekantowaną oliwę do zlewki o pojemności 250 ml i przemyć wrzącą wodą destylowaną w ilości od 50 do 60 ml, usuwając wodę przez syfon. Powtarzać przemywanie, aż zostaną usunięte wszelkie ślady pozostałości mydła (zniknięcie różowego zabarwienia fenoloftaleiny).

Odwirować oliwę, tak aby usunąć wszelkie niewielkie ilości pozostałej wody.

- b) *Oliwa z zawartością wolnych kwasów tłuszczowych wyrażoną jako zawartość kwasu oleinowego przekraczającą 30 %.*

Do 1-litrowego rozdzielacza wprowadzić 50 g surowej oliwy, 200 ml heksanu, 100 ml propanu-2-ol i ilość 12 % roztworu wodorotlenku sodu odpowiadającą ilości wolnych kwasów w oliwy z nadmiarem 0,3 %.

Mieszać energicznie przez jedną minutę. Dodać 100 ml wody destylowanej, wymieszać ponownie i odstawić.

Po oddzieleniu się poszczególnych warstw należy poczekać, aż niższa warstwa, zawierająca mydła, odsączy się. Między dwiema warstwami (oleistą u góry i wodną na dole) często tworzy się warstwa pośrednia ze śluzów i substancji nierozpuszczalnych, którą także należy usunąć.

1.2. **Odbarwienie zneutralizowanej oliwy**

1.2.1. Aparatura

- kolba stożkowa z okrągłym dnem o pojemności 250 ml, z trzema szlifowanymi szybkami szklanymi służącymi do wprowadzenia:
 - a) termometru wyskalowanego w stopniach, pozwalającego na dokonywanie odczytów w temperaturze 90 °C;
 - b) mieszadeł mechanicznych pracujących z szybkością 250-300 obrotów na minutę, z wyposażeniem umożliwiającym pracę w próżni;
 - c) podłączenia do pompy próżniowej,
- pompa próżniowa, z manometrem, zapewniająca ciśnienie rezydualne na poziomie 15-30 milibarów.

1.2.2. Procedura

Odważyć około 100 g zneutralizowanej oliwy do trzyszyjkowej kolby stożkowej. Wprowadzić termometr i mieszadło, podłączyć pompę próżniową i podgrzać do 90 °C, mieszając przez cały czas. Utrzymywać temperaturę, kontynuując mieszanie, aż badana oliwa stanie się całkowicie bezwodna (przez około 30 minut). Wtedy przełamać próżnię i dodać 2-3 g aktywowanej ziemi.

Przywrócić próżnię do uzyskania ciśnienia rezydualnego na poziomie od 15 do 30 milibarów i, utrzymując temperaturę na poziomie 90 °C, mieszać przez 30 minut przy około 250 obrotach na minutę.

Przefiltrować mieszaninę na gorąco w piecu termostycznym (w temperaturze od 50-60 °C).

—

ZAŁĄCZNIK XIV

DODATKOWE UWAGI 2, 3 I 4 DO ROZDZIAŁU 15 NOMENKLATURY SCALONEJ

1. „Uwaga 2 A: Do celów kodów CN 1509 i 1510 »oliwa z oliwek« oznacza oleje pochodzące wyłącznie z przetwarzania oliwek, z wyłączeniem reestryfikowanej oliwy z oliwek i mieszanin oliwy z oliwek z innymi olejami.

Obecność reestryfikowanej oliwy z oliwek lub innych olejów ustala się przy użyciu metod wymienionych w załącznikach V, VII, IX, X i XII. W poniższej tabeli przedstawiono charakterystykę analityczną składu steroli i kwasów we wszystkich oliwach z oliwek oznaczonych kodami CN 1509 i 1510.

Tabela I — Skład kwasowy wyrażony w procentach całej zawartości		Tabela II — Skład steroli wyrażony w procentach całej zawartości	
Kwas mirystynowy	M 0,1	Cholesterol	M 0,5
Kwas linolenowy	M 0,9	Brassikasterol	M 0,2
Kwas arachidowy	M 0,7	Kampesterol	M 4,0
Kwas arachidynowy	M 0,5	Stigmasterol	< kampesterol
Kwas dokozanowy	M 0,3	Betasitosterol (1)	m 93,0
Kwas lignocerynowy	M 0,5	Δ 7-stigmasterol	M 0,5

m = MMaksimumminimum

(1) Delta-5- 23 Stigmasterol + Cholesterol + Betasitosterol + Sitostanol + Delta-5-awenasterol + Delta-5- 24-stigmastadienol.

Uwaga 2 B: »Oliwa z oliwek z pierwszego tłoczenia« oznacza oleje uzyskiwane wyłącznie z oliwek przy użyciu środków mechanicznych lub innych środków fizycznych w warunkach, w szczególności termicznych, nieprowadzących do pogorszenia jakości oliwy, które to oleje nie zostały poddane żadnemu innemu przetwarzaniu poza przemyciem, dekantacją, odwirowaniem lub filtracją, jednak z wyłączeniem olejów ekstrahowanych z oliwek przy użyciu rozpuszczalników (1510) zdefiniowanych w sekcjach I i II poniżej.

- I. Do celów podpozycji 1509 10 10, »oliwa z oliwek lampante z pierwszego tłoczenia«, niezależnie od jej kwasowości, oznacza oliwę z oliwek z:

- a) zawartością alkoholi alifatycznych nieprzekraczającą 400 mg/kg;
- b) zawartością erytrodiolu i uvaolu nieprzekraczającą 4,5 %;
- c) zawartością kwasów tłuszczowych nasyconych w pozycji 2 w triglicerydach nieprzekraczającą 1,3 % i/lub
- d) jedną z następujących cech:
 - d1) liczba nadtlenkowa przekraczająca 20 meq O₂/kg;
 - d2) zawartość lotnych fluorowcowanych rozpuszczalników przekraczająca 0,2 mg/kg ogółem lub przekraczająca 0,1 mg/kg w przypadku dowolnego rozpuszczalnika;
 - d3) współczynnik ekstynkcji K₂₇₀ (100) wyższy o 0,250 oraz, po obróbce oliwy aktywowanym tlenkiem glinu, nie wyższy niż 0,11. Niektóre oleje o zawartości wolnych kwasów tłuszczowych wyrażonej jako zawartość kwasu oleinowego ponad 3,3 g na 100 g, po przejściu przez aktywowany tlenek glinu, zgodnie z metodą opisaną w załączniku XV, mogą mieć współczynnik ekstynkcji K₂₇₀ wyższy niż 0,11. W takim przypadku po zobojętnieniu i odbarwieniu w laboratorium muszą mieć następującą charakterystykę:

- współczynnik ekstynkcji K_{270} nie wyższy niż 1,20;
 - zmienność współczynnika ekstynkcji (ΔK) ⁽¹⁾ w obszarze 270 nm ponad 0,01, jednak nie większa niż 0,16;
- d4) charakterystyka organoleptyczna, która obejmuje wykrywalne wady przekraczające granice dopuszczalności i punktację w teście panelowym niższą od 3,5.
- II. Do celów podpozycji 1509 10 90, »oliwa z pierwszego tłoczenia« oznacza oliwę z oliwek posiadającą następujące cechy:
- a) zawartość kwasów wyrażona jako zawartość kwasu oleinowego nieprzekraczająca 3,3 g na 100 g;
 - b) liczba nadtlenkowa nieprzekraczająca 20 meq O_2 /kg;
 - c) zawartość alkoholi alifatycznych nieprzekraczająca 300 mg/kg;
 - d) zawartość lotnych fluorowcowanych rozpuszczalników nieprzekraczająca 0,2 mg/kg ogółem i nieprzekraczająca 0,1 mg/kg w przypadku każdego rozpuszczalnika;
 - e) współczynnik ekstynkcji K_{270} nie wyższy niż 0,250 oraz, po obróbce oliwy aktywowanym tlenkiem glinu, nie wyższy niż 0,10 ⁽²⁾ ;
 - f) zmienność współczynnika ekstynkcji (ΔK) w obszarze 270 nm ponad 0,010;
 - g) charakterystyka organoleptyczna, która obejmuje wykrywalne wady przekraczające granice dopuszczalności i punktację w teście panelowym niższą od 3,5;
 - h) zawartość erytrodiolu i uvaolu nieprzekraczająca 4,5 %;
 - i) zawartość kwasów tłuszczowych nasyconych w pozycji 2 w triglicerydach nieprzekraczająca 1,3 %.

Uwaga 2 C: Podpozycja 1509 90 00 obejmuje oliwę z oliwek uzyskaną przez przetwarzanie oliw z oliwek ujętych w podpozycjach 1509 10 10 lub 1509 10 90, zmieszanych lub nie z oliwą z oliwek z pierwszego tłoczenia, o następującej charakterystyce:

- a) zawartość kwasów wyrażona jako zawartość kwasu oleinowego nieprzekraczająca 3,3 g na 100 g;
- b) zawartość alkoholi alifatycznych nieprzekraczająca 350 mg/kg;
- c) współczynnik ekstynkcji K_{270} (100) wyższy o 0,250 i nie wyższy niż 1,20 oraz, po przetworzeniu próbki aktywowanym tlenkiem glinu, wyższy niż 0,10 ;
- d) zmienność współczynnika ekstynkcji (ΔK), w obszarze 270 nm ponad 0,010 i nie większa niż 0,160;
- e) zawartość erytrodiolu i uvaolu nieprzekraczająca 4,5 %;
- f) zawartość kwasów tłuszczowych nasyconych w pozycji 2 w triglicerydach nieprzekraczająca 1,5 %.

Uwaga 2 D: Do celów podpozycji 1510 00 10 pojęcie »surowe oleje« oznacza oleje, w szczególności oliwę z wycisków oliwkowych o następujących właściwościach:

- a) zawartość kwasów wyrażona jako zawartość kwasu oleinowego przekraczająca g na 100 g;
- b) zawartość erytrodiolu i uvaolu przekraczająca 12 %;
- c) zawartość kwasów tłuszczowych nasyconych w pozycji 2 w triglicerydach nieprzekraczająca 1,8 %.

Uwaga 2 E: Oleje ujęte w podpozycji 1510 00 90 obejmują oleje uzyskiwane przez przetwarzanie olejów ujętych w podpozycjach 1510 00 10, zmieszane lub nie oliwą z oliwek z pierwszego tłoczenia, które nie mają cech olejów, określonych w pkt. I i II, pod warunkiem, że ich zawartość kwasów tłuszczowych nasyconych w pozycji 2 w triglicerydach nie przekracza 2 %.

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

K_m oznacza współczynnik ekstynkcji o długości wartości absorpcji krzywej w 270 nm.

K_{m-4} i K_{m+4} oznaczają współczynniki ekstynkcji o długości 4 nm niższej lub wyższej niż długość K_m .

⁽²⁾ Jeżeli K_{270} przekracza 0,25, należy wykonać nową próbę po przepuszczeniu przez tlenek glinu. K_{270} nie może przekroczyć 0,10.

2. „Uwaga 3: Podpozycje 1 522 00 31 i 1 522 00 39 nie obejmują:
- a) pozostałości po przetworzeniu substancji tłuszczowych zawierających olej o liczbie jodowej ustalonej przy użyciu metody opisanej w załączniku XVI niższej od 70 lub wyższej od 100;
 - b) pozostałości po przetworzeniu substancji tłuszczowych zawierających olej o liczbie jodowej nie niższej niż 70 lub wyższej niż 100, w przypadku którego powierzchnia pików reprezentujących objętość retencji sitosterolu, ustalona zgodnie z Załącznikiem do rozporządzenia wymienionego w dodatkowej uwadze 4 poniżej, jest mniejsza niż 93 % powierzchni pików całkowitych steroli.”
3. „Uwaga 4: Metody analityczne oznaczania charakterystyki produktów, określonych powyżej, to metody ustanowione w załącznikach do rozporządzenia (EWG) nr 2568/91.”
-

ZAŁĄCZNIK XV

ZAWARTOŚĆ OLEJU W POZOSTAŁOŚCI Z OLIWEK

1. ZAWARTOŚĆ OLIWY W WYTŁOCZKACH OLIWKOWYCH

1.1. Aparatura

- odpowiednia aparatura ekstrakcyjna wyposażona w kolbę stożkową z okrągłym dnem o pojemności 200-250 ml,
- elektrycznie podgrzewana łaźnia (np. łaźnia piaskowa, łaźnia wodna) lub płytka grzejna,
- waga analityczna,
- piec regulowany do maksymalnie 80 °C,
- elektrycznie podgrzewany piec wyposażony w urządzenie termostatyczne regulowane do 103 ± 2 °C, który można omiatać strumieniem powietrza lub obsługiwać pod obniżonym ciśnieniem,
- młynek mechaniczny, łatwy do czyszczenia, który umożliwi zmielenie wytłoczków oliwkowych bez podwyższenia ich temperatury i bez jakiegokolwiek innej stwierdzonej zmiany zawartości w ich wilgoci, substancji lotnych lub substancji ulegających ekstrakcji przy użyciu heksanu,
- gilza do ekstrakcji i bawełna lub bibuła filtracyjna, z których usunięto już substancje ulegające ekstrakcji heksanem,
- suszarka laboratoryjna,
- sito o otworach o średnicy 1 mm,
- małe cząstki wcześniej wysuszonego pumeksu,

1.2. Odczynnik

Normalny heksan, czystości technicznej, po którym zostaje mniej niż 0,002 g pozostałości na 100 ml po pełnym odparowaniu.

2. PROCEDURA

2.1. Przygotowanie próbki do badania

W razie potrzeby wykorzystać młynek mechaniczny, który został uprzednio odpowiednio oczyszczony, do zmielenia próbki laboratoryjnej w celu rozdrobnienia jej do cząstek, które mogą całkowicie przejść przez sito.

Wykorzystać około jednej dwudziestej próbki, aby dokończyć proces czyszczenia młynka, odrzucić zmielony materiał, zemleć pozostałość i zebrać ją, starannie wymieszać i niezwłocznie poddać analizie.

2.2. Badana porcja

Natychmiast po zakończeniu operacji mielenia odważyć około 10 g próbki do zbadania z dokładnością do 0,01 g.

2.3. Przygotowanie gilzy do ekstrakcji

Umieścić porcję badaną w gilzie i zatkać tę ostatnią bawełną. W razie stosowania bibuły filtracyjnej owinąć nią porcję badaną.

2.4. Wstępne suszenie

W przypadku, gdy wytłoczki oliwkowe są bardzo wilgotne (tj. ilość zawartej w nich wilgoci i substancji lotnych przekracza 10 %), przeprowadzić wstępne suszenie przez umieszczenie napełnionej gilzy do ekstrakcji (lub bibuły filtracyjnej) w piecu podgrzewanym przez odpowiedni czas do nie więcej niż 80 °C w celu zmniejszenia zawartości wilgoci i substancji lotnych do mniej niż 10 %.

2.5. Przygotowanie kolby stożkowej z okrągłym dnem

Odważyć z dokładnością do 1 mg kolbę stożkową zawierającą jedną lub dwie cząstki pumeksu, wcześniej wysuszoną w piecu w temperaturze 103 ± 2 °C i schłodzoną w suszarce laboratoryjnej przez nie mniej niż jedną godzinę.

2.6. Wstępna ekstrakcja

Do aparatury ekstrakcyjnej wprowadzić gilzę (lub bibułę filtracyjną) zawierającą porcję badaną. Włączyć do kolby stożkowej wymaganą ilość heksanu. Podłączyć kolbę do aparatury ekstrakcyjnej i umieścić całość na elektrycznie podgrzewanej łaźni. Wyregulować szybkość podgrzewania w taki sposób, aby szybkość odcieku nie była niższa od trzech kropli na sekundę (umiarkowane, nie gwałtowne podgrzewanie). Po ekstrakcji przez cztery godziny pozostawić całość do schłodzenia. Usunąć gilzę z aparatury ekstrakcyjnej i umieścić ją w strumieniu powietrza, aby odprowadzić większość impregnującego rozpuszczalnika.

2.7. Druga ekstrakcja

Wsypaną zawartość gilzy do mikromłynka i zmielić jak najdrobniej. Zwrócić zmieloną mieszaninę do gilzy bez straty i umieścić ją z powrotem w aparaturze ekstrakcyjnej.

Kontynuować ekstrakcję przez następne dwie godziny przy użyciu tej samej okrągłodennej kolby stożkowej zawierającej wstępny ekstrakt.

Roztwór powstały w kolbie ekstrakcyjnej musi się sklarować. Jeżeli tak się nie stanie, należy go kilka razy przefiltrować przez bibułę filtracyjną i kilka razy wymyć pierwotną kolbę i bibułę filtracyjną kilka razy przy pomocy heksanu. Zebrać filtrat i rozpuszczalnik zastosowany do przemywania do drugiej okrągłodennej kolby stożkowej, która została uprzednio wysuszona i wytarowana z dokładnością do 1 mg.

2.8. Usunięcie rozpuszczalnika i odważenie ekstraktu

Usunąć większą część rozpuszczalnika przez destylację na elektrycznie podgrzewanej łaźni. Usunąć ostatnie ślady rozpuszczalnika przez podgrzewanie kolby stożkowej w piecu w temperaturze 103 ± 2 °C przez 20 minut. Pomóc procesowi eliminacji przez wdmuchiwanie w pewnych odstępach czasu albo powietrza albo — w najkorzystniejszej sytuacji — gazu obojętnego, bądź też przy użyciu obniżonego ciśnienia.

Pozostawić kolbę stożkową w suszarce laboratoryjnej do schłodzenia, przez co najmniej jedną godzinę i zważyć z dokładnością do 1 mg.

Ponownie podgrzewać przez 10 minut na takich samych zasadach, schłodzić w suszarce laboratoryjnej i zważyć jeszcze raz.

Różnica między dwoma ważeniami nie może przekroczyć 10 mg. W razie takiego przekroczenia podgrzewać substancję ponownie przez okresy do 10 minut, po czym należy ją schłodzić i zważyć do uzyskania różnicy masy 10 mg lub mniejszej. Odnotować ostatnią masę kolby stożkowej.

Przeprowadzić dwa oznaczenia próbki badanej.

3. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW

3.1. Metoda obliczeń i wzór

a) Ilość ekstraktu jako odsetek masy otrzymanego produktu wynosi:

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

gdzie: S jest odsetkiem masowym otrzymanego produktu,
 m_0 = jest masą, w gramach, porcji badanej,
 m_1 = jest masą, w gramach, ekstraktu po wysuszeniu.

Jako wynik przyjąć średnią arytmetyczną z dwóch oznaczeń, pod warunkiem spełnienia warunków powtarzalności.

Przedstawić wynik z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

b) Ilość ekstraktu wyraża się w odniesieniu do suchej substancji zgodnie z następującym wzorem:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{zawartosc procentowa oleju w ekstrakcie dla suchej masy}$$

gdzie: S = to odsetek ekstraktu na podstawie otrzymanego produktu (patrz a),
 U = jest zawartością wilgoci i substancji lotnych.

3.2. Powtarzalność

Różnica między dwoma oznaczeniami wykonanymi równocześnie lub szybko jedno po drugim przez tego samego analityka nie może przekraczać 0,2 g ekstraktu heksanu na 100 g próbki.

W razie niespełnienia tego warunku powtórzyć analizę na dwóch innych porcjach badanych. Jeżeli także w tym przypadku różnica przekracza 0,2 g, przyjąć wynik jako średnią arytmetyczną z czterech wykonanych oznaczeń.

ZAŁĄCZNIK XVI

OZNACZENIE LICZBY JODOWEJ

1. ZAKRES

Niniejsza norma międzynarodowa określa metodę oznaczania liczby jodowej tłuszczów i olejów zwierzęcych i roślinnych, zwanych dalej tłuszczami.

2. DEFINICJA

Do celów niniejszej normy międzynarodowej ma zastosowanie następująca definicja:

- 2.1. *liczba jodowa* Masa jodu wchłonięta przez próbkę, w warunkach postępowania określonych w niniejszej normie międzynarodowej.

Liczbę jodową wyraża się jako liczbę gramów jodu na 100 g próbki.

3. ZASADA

Rozpuszczanie porcji badanej w rozpuszczalniku i dodanie odczynnika Wijsa. Po określonym czasie dodanie roztworu jodku potasu i wody oraz miareczkowanie uwolnionego jodu przy użyciu roztworu tiosiarczanu sodu.

4. ODCZYNNIKI

Wszystkie odczynniki muszą być odczynnikami o uznanej czystości do analiz:

- 4.1. *woda* spełniająca wymagania normy ISO 3696, stopień 3.

- 4.2. *jodek potasu*, roztwór 100 g/l, niezawierający jodanu ani wolnego jodu.

- 4.3. *skrobia*, roztwór.

Zmieszać 5 g skrobi rozpuszczalnej z 30 ml wody, dodać tę mieszaninę do 1 000 ml wrzącej wody, gotować przez trzy minuty i odstawić do schłodzenia.

- 4.4. *tiosiarczan sodu*, mianowany roztwór objętościowy $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$, standaryzowany nie wcześniej niż siedem dni przed użyciem.

- 4.5. *roztwarzalnik*, przygotowany przez zmieszanie równych ilości cykloheksanu i kwasu octowego.

- 4.6. *odczynnik Wijsa*, zawierający monochlorek jodu w kwasie octowym. Należy zastosować odczynnik Wijsa dostępny w handlu.

5. APARATURA

Zwykła aparatura laboratoryjna, w szczególności następująca:

- 5.1. *szklane szufelki* do odważania substancji, nadające się do pobrania porcji badanej i wprowadzenia jej do kolb (6.2).

- 5.2. *kolby stożkowe*, o pojemności 500 ml, wyposażone w szlifowane korki szklane i całkowicie suche.

6. PRZYGOTOWANIE PRÓBKİ BADANEJ

Homogenizowaną próbkę suszy się nad siarczanem sodowym i filtruje.

7. PROCEDURA

- 7.1. *Porcja badana*

Masa porcji badanej zmienia się w zależności od spodziewanej liczby jodowej, jak przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Oczekiwana liczba jodowa	Masa badanej próbki
poniżej 5	3,00
5 do 20	1,00
21 do 50	0,40
51 do 100	0,20
101 to 150	0,13
151 do 200	0,10

Badaną próbkę należy odważyć z dokładnością do 0,1 mg na szklanej szalce (5.1).

7.2. Oznaczanie

Badaną próbkę umieścić w kolbie o pojemności 500 ml (6.2). Dodać 20 ml rozpuszczalnika (4.5), w celu rozpuszczenia tłuszczu. Dodać dokładnie 25 ml odczynnika Wijs'a (4.6), zakorkować, zawartość zawrócić i umieścić kolbę w ciemni. Do odczynnika Wijs'a nie wolno używać pipety doustnej.

Podobnie należy przygotować ślełą próbę z rozpuszczalnikiem i odczynnikiem, lecz z pominięciem badanej próbki.

W przypadku próbek o liczbie jodowej poniżej 150, kolby należy pozostawić na godzinę w ciemni; próbki o liczbie jodowej powyżej 150 oraz produkty poddane polimeryzacji lub utlenione w znacznym stopniu należy pozostawić na dwie godziny.

Pod koniec określonego czasu, do każdej kolby należy dodać 20 ml roztworu jodku potasu (4.2) oraz 150 ml wody (4.1).

Miareczkować przy pomocy standardowego roztworu pomiarowego tiosiarczanu sodu (4.4) aż do momentu, kiedy żółte zabarwienie od jodiny stanie się prawie niewidoczne. Dodać kilka kropli roztworu skrobiowego (4.3) i kontynuować miareczkowanie do chwili, w której niebieskie zabarwienie zniknie po bardzo energicznym wstrząśnięciu.

Uwaga: Dopuszczalne jest oznaczanie potencjometryczne punktu końcowego.

7.3. Liczba oznaczeń

Jedną próbkę analityczną oznacza się dwukrotnie.

8. Wyrażanie wyników

Liczbę jodową podaje się za pomocą wzoru

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

gdzie:

c = wartość liczbową dokładnego stężenia użytego standardowego roztworu pomiarowego tiosiarczanu sodu (4.4), wyrażona w molach na litr;

V_1 = wartość liczbową objętości standardowego roztworu pomiarowego tiosiarczanu sodu (4.4) użytego do ślepej próby, wyrażona w mililitrach;

V_2 = wartość liczbową objętości standardowego roztworu pomiarowego tiosiarczanu sodu (4.4) użytego do oznaczenia, wyrażona w mililitrach;

m = wartość liczbową masy badanej próbki (7.1), wyrażona w gramach.

Wynik będzie średnią arytmetyczną z dwóch oznaczeń, pod warunkiem spełnienia wymogu w zakresie powtarzalności (9.2).