

To besedilo je zgolj informativne narave in nima pravnega učinka. Institucije Unije za njegovo vsebino ne prevzemajo nobene odgovornosti. Verodostojne različice zadevnih aktov, vključno z uvodnimi izjavami, so objavljene v Uradnem listu Evropske unije. Na voljo so na portalu EUR-Lex. Uradna besedila so neposredno dostopna prek povezav v tem dokumentu

► **B****UREDBA KOMISIJE (EGS) št. 2568/91**

z dne 11. julija 1991

o značilnostih oljčnega olja in olja iz oljčnih tropin ter o ustreznih analiznih metodah

(UL L 248, 5.9.1991, str. 1)

spremenjena z:

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

(*) Ta akt ni bil nikoli objavljen v slovenščini.

► <u>M25</u>	Izvedbena uredba Komisije (EU) št. 299/2013 z dne 26. marca 2013	L 90	52	28.3.2013
► <u>M26</u>	Izvedbena uredba Komisije (EU) št. 1348/2013 z dne 16. decembra 2013	L 338	31	17.12.2013
► <u>M27</u>	Delegirana uredba Komisije (EU) 2015/1830 z dne 8. julija 2015	L 266	9	13.10.2015
► <u>M28</u>	Izvedbena uredba Komisije (EU) 2015/1833 z dne 12. oktobra 2015	L 266	29	13.10.2015
► <u>M29</u>	Izvedbena uredba Komisije (EU) 2016/1227 z dne 27. julija 2016	L 202	7	28.7.2016
► <u>M30</u>	Izvedbena uredba Komisije (EU) 2016/1784 z dne 30. septembra 2016	L 273	5	8.10.2016
► <u>M31</u>	Delegirana uredba Komisije (EU) 2016/2095 z dne 26. septembra 2016	L 326	1	1.12.2016

popravljena z:

- **C1** Popravek, UL L 270, 15.10.2011, str. 55 (61/2011)
- **C2** Popravek, UL L 211, 17.8.2017, str. 58 (2016/2095)

▼B**UREDBA KOMISIJE (EGS) št. 2568/91****z dne 11. julija 1991****o značilnostih oljčnega olja in olja iz oljčnih tropin ter o ustreznih
analiznih metodah****▼M20***Člen 1*

1. Olja, katerih značilnosti so skladne z značilnostmi iz točk 1 in 2 Priloge I k tej uredbi, se štejejo za deviška oljčna olja v smislu točke 1(a) in (b) Priloge k Uredbi št. 136/66/EGS.

2. Olje, katerega značilnosti so skladne z značilnostmi iz točke 3 Priloge I k tej uredbi, se šteje za lampante oljčno olje v smislu točke 1(c) Priloge k Uredbi št. 136/66/EGS.

3. Olje, katerega značilnosti so skladne z značilnostmi iz točke 4 Priloge I k tej uredbi, se šteje za rafinirano oljčno olje v smislu točke 2 Priloge k Uredbi št. 136/66/EGS.

4. Olje, katerega značilnosti so skladne z značilnostmi iz točke 5 Priloge I k tej uredbi, se šteje za oljčno olje, sestavljeno iz rafiniranih oljčnih olj in deviških oljčnih olj v smislu točke 3 Priloge k Uredbi št. 136/66/EGS.

5. Olje, katerega značilnosti so skladne z značilnostmi iz točke 6 Priloge I k tej uredbi, se šteje za surovo olje iz oljčnih tropin v smislu točke 4 Priloge k Uredbi št. 136/66/EGS.

6. Olje, katerega značilnosti so skladne z značilnostmi iz točke 7 Priloge I k tej uredbi, se šteje za rafinirano olje iz oljčnih tropin v smislu točke 5 Priloge k Uredbi št. 136/66/EGS.

7. Olje, katerega značilnosti so skladne z značilnostmi iz točke 8 Priloge I k tej uredbi, se šteje za olje iz oljčnih tropin v smislu točke 6 Priloge k Uredbi št. 136/66/EGS.

▼ M26*Člen 2*

1. Značilnosti olj, določenih v Prilogi I, se določijo v skladu z naslednjimi analiznimi metodami:

- (a) za določanje prostih maščobnih kislin, izraženih v deležu oleinske kisline, metoda, določena v Prilogi II;
- (b) za določanje peroksidnega števila, metoda, določena v Prilogi III;
- (c) za določanje vsebnosti voskov, metoda, določena v Prilogi IV;
- (d) za določanje sestave in vsebnosti sterolov in triterpenskimi dialkoholov s kapilarno plinsko kromatografijo, metoda, določena v Prilogi V;
- (e) za določanje deleža 2-gliceril monopalmitata, metoda, določena v Prilogi VII;
- (f) za spektrofotometrično analizo, metoda, določena v Prilogi IX;

▼ M28

- (g) za določanje sestave maščobnih kislin, metoda, določena v Prilogi X;

▼ M26

- (h) za določanje hlapnih halogeniranih topil, metoda, določena v Prilogi XI;
- (i) za določanje organoleptičnih značilnosti deviškega oljčnega olja, metoda, določena v Prilogi XII;
- (j) za določanje stigmastadienov, metoda, določena v Prilogi XVII;
- (k) za določanje vsebnosti trigliceridov z ECN42, metoda, določena v Prilogi XVIII;

▼ M28

- (l) za določanje vsebnosti alifatskih in triterpenskimi alkoholov, metoda, določena v Prilogi XIX;

▼ M26

- (m) za določanje vsebnosti voskov, metilnih estrov maščobnih kislin in etilnih estrov maščobnih kislin, metoda, določena v Prilogi XX.

▼ M28

▼ M26

- 2. Preverjanje organoleptičnih značilnosti deviških olj izvajajo nacionalni organi ali njihovi zastopniki v okviru ocenjevalnih komisij, ki jih odobrijo države članice.

▼ M26

Organoleptične značilnosti olja, kot so navedene v prvem pododstavku, se štejejo za skladne z deklarirano kategorijo, če ocenjevalna komisija, ki jo odobri država članica, potrdi razvrstitev.

Če ocenjevalna komisija ne potrdi deklarirane kategorije v zvezi z organoleptičnimi značilnostmi, nacionalni organi ali njihovi zastopniki na zahtevo zainteresirane strani nemudoma opravijo dve ponovljeni oceni, pri čemer ju izvedejo druge odobrene ocenjevalne komisije, vsaj eno oceno pa opravi ocenjevalna komisija, ki jo odobri zadevna država članica proizvajalka. Zadevne značilnosti se štejejo za skladne z deklariranimi značilnostmi, če vsaj dve ponovljeni oceni potrdita deklarirano razvrstitev. V nasprotnem primeru stroške ponovljenih ocen krije zainteresirana stran.

3. Ko nacionalni organi ali njihovi zastopniki preverijo značilnosti olja, kot je določeno v odstavku 1, se vzamejo vzorci v skladu z mednarodnima standardoma EN ISO 661 za pripravo preskusnih vzorcev in EN ISO 5555 za vzorčenje. Vendar pa se ne glede na točko 6.8 standarda EN ISO 5555 v primeru serij takih olj v izvirnem pakiranju vzorec vzame v skladu s Prilogo Ia k tej uredbi. V primeru nepakiranih olj, ki jih ni mogoče vzorčiti v skladu s standardom EN ISO 5555, se vzorčenje opravi v skladu z navodili pristojnega organa države članice.

Brez poseganja v standard EN ISO 5555 in poglavje 6 standarda EN ISO 661 se vzeti vzorci nemudoma spravijo v temen prostor, v katerem temperatura ni previsoka, in pošljejo v laboratorij za analizo najpozneje v petih delovnih dneh po tem, ko so bili vzeti, pri čemer se hranijo tako, da med prevozom ali hrambo ne propadejo ali se poškodujejo, preden se pošljejo v laboratorij.

4. Za preverjanje iz odstavka 3 se v primeru pakiranih proizvodov analize, navedene v prilogah II, III, IX, XII in XX, ter, kjer je primerno, vse ponovljene analize, ki jih zahteva nacionalna zakonodaja, izvedejo pred iztekom minimalnega roka trajanja. V primeru vzorčenja nepakiranih olj se navedene analize izvedejo najpozneje šest mesecev po mesecu, v katerem je bil vzorec vzet.

Za druge analize iz te uredbe ne veljajo nobeni roki.

Če se rezultati analiz ne ujemajo z značilnostmi deklarirane kategorije oljčnega olja ali olja iz oljčnih tropin, se zadevna stran o tem uradno obvesti najpozneje en mesec pred koncem obdobja iz prvega pododstavka, razen če je bil vzorec vzet manj kot dva meseca pred minimalnim rokom trajanja.

▼ **M26**

5. Za ugotavljanje značilnosti oljčnih olj z metodami, določenimi v prvem pododstavku odstavka 1, se rezultati analize neposredno primerjajo z mejnimi vrednostmi iz te uredbe.

▼ **M25***Člen 2a*

1. Za namene tega člena „oljčno olje, dano na trg“ pomeni skupno količino oljčnega olja in olja iz oljčnih tropin posamezne države članice, ki se porabi v navedeni državi članici ali se iz nje izvozi.

2. Države članice zagotovijo, da se na podlagi analize tveganja selektivno in dovolj pogosto opravijo preverjanja skladnosti, in tako zagotovijo, da je oljčno olje, dano na trg, skladno z deklarirano kategorijo.

3. Merila za ocenjevanje tveganja lahko vključujejo:

- (a) kategorijo olja, čas proizvodnje, ceno olja v primerjavi z drugimi rastlinskimi olji, mešanje in pakiranje, skladiščne prostore in razmere, državo porekla, namembno državo, prevozno sredstvo ali količino serije;
- (b) položaj izvajalcev v tržni verigi, količino in/ali vrednost, ki jo tržijo, razpon kategorij olja, ki jih tržijo, vrsto dejavnosti, ki se izvajajo, kot so mletje, skladiščenje, rafiniranje, mešanje, pakiranje ali prodaja na drobno;
- (c) ugotovitve iz prejšnjih pregledov, vključno s številom in vrsto ugotovljenih pomanjkljivosti, običajno kakovost olja, danega na trg, učinkovitost uporabljene tehnične opreme;
- (d) zanesljivost sistemov izvajalcev za zagotavljanje kakovosti ali samonadzor v zvezi s skladnostjo s tržnimi standardi;
- (e) mesto, kjer se opravi preverjanje, zlasti, če je to mesto prvega vstopa v Unijo, mesto zadnjega izstopa iz Unije, ali mesto, kjer se olje proizvaja, pakira, natovarja ali prodaja končnemu potrošniku;
- (f) kakršne koli informacije, ki bi lahko nakazovale tveganje za neskladnost.

4. Države članice vnaprej določijo:

- (a) merila za ocenjevanje tveganja za neskladnost serij;
- (b) na podlagi analize tveganja za vsako kategorijo tveganja najmanjše število izvajalcev ali serij in/ali količin, pri katerih se preverja skladnost.

▼ M25

Vsako leto je treba izvesti vsaj eno preverjanje skladnosti na tisoč ton oljčnega olja, danega na trg v državi članici.

5. Države članice preverjajo skladnost:

- (a) z izvedbo analiz, po katerem koli vrstnem redu, iz Priloge I, ali
- (b) z upoštevanjem vrstnega reda iz Priloge Ib o drevesu odločanja, dokler se ne sprejme ena od odločitev iz drevesa odločanja.

▼ M19**▼ M25***Člen 3*

Kadar se ugotovi, da olje ne ustreza opisu svoje kategorije, mora zadevna država članica, brez poseganja v kakršne koli druge kazni, uporabiti učinkovite, sorazmerne in odvračilne kazni, ki se določijo glede na resnost odkrite nepravilnosti.

Če se pri pregledih odkrijejo večje nepravilnosti, države članice opravljajo pogostejše preglede v zvezi s fazo trženja, kategorijo olja, poreklom ali drugimi merili.

▼ M5*Člen 4***▼ M19**

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

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

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

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

▼ M5

2. Če države članice naletijo na težave pri ustanavljanju skupin ocenjevalcev na svojem ozemlju, se lahko obrnejo na skupino ocenjevalcev, potrjeno v drugi državi članici.

3. Vsaka država članica sestavi seznam skupin ocenjevalcev, ki so jih ustanovile strokovne ali medpanožne organizacije v skladu s pogoji, določenimi v odstavku 1, in zagotovi, da so ti pogoji izpolnjeni.

▼ M19**▼ B***Člen 6*

1. Vsebnost olja v oljni pogači in drugi ostanki, ki nastanejo pri pridobivanju oljčnega olja (oznaki KN 2306 90 11 in 2306 90 19) se določijo z uporabo metode, predpisane v Prilogi XV.

▼B

2. Vsebnost olja, navedenega v odstavku 1, je izražena v masnem odstotnem deležu olja na maso suhe snovi.

▼M20*Člen 7*

Uporabljajo se določbe Skupnosti o prisotnosti onesnaževalcev.

Kar zadeva halogenirana topila so mejne vrednosti za vse kategorije oljčnih olj naslednje:

- največji delež vsakega zaznanega halogeniranega topila: 0,1 mg/kg,
- največji skupni delež zaznanih halogeniranih topil: 0,2 mg/kg.

▼M25*Člen 7a*

Fizične ali pravne osebe in skupine oseb, ki imajo v lasti oljčno olje in olje iz oljčnih tropin od faze pridobivanja olja v oljarni do ustekleničenja, v kakršne koli poslovne ali komercialne namene, morajo za vsako kategorijo teh olj voditi evidence dobav in izdanih količin.

Države članice zagotovijo, da je obveznost iz prvega odstavka ustrezno izpolnjena.

Člen 8

1. Države članice morajo obvestiti Komisijo o ukrepih, sprejetih za izvajanje te uredbe. Komisijo obvestijo o kakršnih koli naknadnih spremembah.

2. Države članice Komisiji vsako leto najpozneje 31. maja predložijo poročilo o izvajanju te uredbe v preteklem koledarskem letu. Poročilo vsebuje vsaj rezultate opravljenih preverjanj skladnosti oljčnega olja v skladu s predlogami iz Priloge XXI.

3. Obvestila iz te uredbe se predložijo v skladu z Uredbo Komisije (ES) št. 792/2009 ⁽¹⁾.

▼B*Člen 9*

Uredba (EGS) št. 1058/77 se s tem razveljavi.

Člen 10

1. Ta uredba začne veljati tretji dan po objavi v *Uradnem listu Evropskih skupnosti*.

Vendar se metoda, predpisana v Prilogi XII, uporablja od ►**M1** 1. november 1992 ◀, razen če ne zadeva postopka sistema intervencij.

⁽¹⁾ UL L 228, 1.9.2009, str. 3.

▼M5

Ta metoda se ne uporablja za deviško olje, ki je bilo pripravljeno za trg pred 1. novembrom 1992.

▼B

2. Ta uredba se ne uporablja za oljčno olje in oljčne tropine, predpakirane pred začetkom veljavnosti te uredbe in so v prometu do 31. oktobra 1992.

Ta uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

▼ B*PRILOGE***Vsebina**

Priloga I:	Značilnosti oljčnega olja
Priloga IA:	Vzorčenje oljčnega olja ali olja iz oljčnih tropin, dostavljenega v izvirnem pakiranju
Priloga IB:	Drevo odločanja za preverjanje, ali je vzorec oljčnega olja skladen z deklarirano kategorijo
Priloga II:	Določanje prostih maščobnih kislin, metoda v hladnem
Priloga III:	Določanje peroksidnega števila
Priloga IV:	Določevanje vsebnosti voskov s kapilarno plinsko kromatografijo
Priloga V:	Določanje sestave in vsebnosti sterolov in triterpenskimi dialkoholov s kapilarno plinsko kromatografijo
Priloga VII:	► M21 Določevanje odstotnega deleža 2-gliceril monopalmitata ◀

▼ M20**▼ B**

Priloga IX:	Spektrofotometrično merjenje na UV-območju
-------------	--

▼ M28

Priloga X:	Določanje metilnih estrov maščobnih kislin s plinsko kromatografijo
------------	---

▼ B

Priloga XI:	Določanje hlapnih halogeniranih topil v oljčnem olju
Priloga XII:	Metoda mednarodnega sveta za oljke za organoleptično ocenjevanje deviškega oljčnega olja

▼ M20**▼ M19****▼ B**

Priloga XV:	Vsebnost olja v oljčnih tropinah
Priloga XVI:	Določanje jodnega števila
Priloga XVII:	Metoda za določanje stigmastadienov v rastlinskih oljih
Priloga XVIII:	Določanje razlike med dejansko in teoretično vsebnostjo triacilglicerolov z ekvivalentnim ogljikovim številom (ECN) 42
Priloga XIX:	► M28 Določanje vsebnosti alifatskih in triterpenskimi alkoholov s kapilarno plinsko kromatografijo ◀

▼ M23

Priloga XX:	Metoda za določanje vsebnosti voskov, metilnih estrov maščobnih kislin in etilnih estrov maščobnih kislin s kapilarno plinsko kromatografijo
-------------	--

▼ M28**▼ M25**

Priloga XXI:	Rezultati preverjanj skladnosti oljčnega olja iz člena 8(2)
--------------	---

PRILOGA I

ZNAČILNOSTI OLJČNEGA OLJA

Značilnosti kakovosti

Kategorija	Vsebnost kislin (%) (*)	Peroksidno število mEq O ₂ /kg (*)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ ali K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptična ocena		Etilni estri maščobnih kislin mg/kg (*)
						Mediana napake (Md) (*)	Mediana sadežnosti (Mf) (*)	
1. Ekstra deviško oljčno olje	≤ 0,8	≤ 20	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0	≤ 35
2. Deviško oljčno olje	≤ 2,0	≤ 20	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0	—
3. Lampante oljčno olje	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 ⁽¹⁾	—	—
4. Rafinirano oljčno olje	≤ 0,3	≤ 5	—	≤ 1,25	≤ 0,16	—	—	—
5. Oljčno olje – mešanica rafiniranega oljčnega olja in deviškega oljčnega olja	≤ 1,0	≤ 15	—	≤ 1,15	≤ 0,15	—	—	—
6. Surovo olje iz oljčnih tropin	—	—	—	—	—	—	—	—
7. Rafinirano olje iz oljčnih tropin	≤ 0,3	≤ 5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—	—
8. Olje iz oljčnih tropin	≤ 1,0	≤ 15	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—	—

⁽¹⁾ Mediana napake je lahko manjša ali enaka 3,5, kadar je mediana sadežnosti enaka 0.

▼ M31

Značilnosti čistosti

Kategorija	Vsebnost maščobne kisline ⁽¹⁾						Vsota transi- zomerov oleinske kisline (%)	Vsota transi- zomerov linolne in linolenske kisline (%)	Stigmasta- dieni mg/kg ⁽²⁾	► <u>C2</u> Razlika: ECN42 (HPLC) in ECN42 (teoretični izra- čun) ◀	2-gliceril monopalmitat (%)
	Miristinska (%)	Linolenska (%)	Arahidonska (%)	Eikozanojska (%)	Behenska (%)	Lignoce- rinska (%)					
1. Ekstra deviško oljčno olje	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	► <u>C2</u> ≤ 0,2 ◀	≤ 0,9, če je skupni % palmi- tinske kisline ≤ 14 %
											≤ 1,0, če je skupni % palmi- tinske kisline > 14 %
2. Deviško oljčno olje	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	► <u>C2</u> ≤ 0,2 ◀	≤ 0,9, če je skupni % palmi- tinske kisline ≤ 14 %
											≤ 1,0, če je skupni % palmi- tinske kisline > 14 %
3. Lampante oljčno olje	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	► <u>C2</u> ≤ 0,3 ◀	≤ 0,9, če je skupni % palmi- tinske kisline ≤ 14 %
											≤ 1,1, če je skupni % palmi- tinske kisline > 14 %
4. Rafinirano oljčno olje	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	► <u>C2</u> ≤ 0,3 ◀	≤ 0,9, če je skupni % palmi- tinske kisline ≤ 14 %
											≤ 1,1, če je skupni % palmi- tinske kisline > 14 %
5. Oljčno olje – mešanica rafiniranega oljčnega olja in deviškega oljčnega olja	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	► <u>C2</u> ≤ 0,3 ◀	≤ 0,9, če je skupni % palmi- tinske kisline ≤ 14 %
											≤ 1,0, če je skupni % palmi- tinske kisline > 14 %

▼ M31

Kategorija	Vsebnost maščobne kisline ⁽¹⁾						Vsota transi- zomerov oleinske kisline (%)	Vsota transi- zomerov linolne in linolenske kisline (%)	Stigmasta- dieni mg/kg ⁽²⁾	► <u>C2</u> Razlika: ECN42 (HPLC) in ECN42 (teoretični izra- čun) ◀	2-gliceril monopalmitat (%)
	Miristinska (%)	Linolenska (%)	Arahidonska (%)	Eikozanojska (%)	Behenska (%)	Lignoce- rinska (%)					
6. Surovo olje iz oljčnih tropin	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	► <u>C2</u> ≤ 0,6 ◀	≤ 1,4
7. Rafinirano olje iz oljčnih tropin	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	► <u>C2</u> ≤ 0,5 ◀	≤ 1,4
8. Olje iz oljčnih tropin	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	► <u>C2</u> ≤ 0,5 ◀	≤ 1,2

Kategorija	Sestava sterolov						Steroli skupaj (mg/kg)	Eritrodiole in uvaole (%) ^(**)	Voski mg/kg ^(**)
	Holesterol (%)	Brasikasterol (%)	Kampesterol ⁽³⁾ (%)	Stigmasterol (%)	App β-sito- sterol (%) ⁽⁴⁾	Delta-7-stigma- stenol ⁽³⁾ (%)			
1. Ekstra deviško oljčno olje	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C^{42} + C^{44} + C^{46} \leq 150$
2. Deviško oljčno olje	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C^{42} + C^{44} + C^{46} \leq 150$
3. Lampante oljčno olje	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽⁵⁾	$C^{40} + C^{42} + C^{44} + C^{46} \leq 300$ ⁽⁵⁾
4. Rafinirano oljčno olje	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C^{40} + C^{42} + C^{44} + C^{46} \leq 350$

▼ M31

Kategorija	Sestava sterolov						Steroli skupaj (mg/kg)	Eritrodiol in uvaol (%) (**)	Voski mg/kg (**)
	Holesterol (%)	Brasikasterol (%)	Kampesterol ⁽³⁾ (%)	Stigmasterol (%)	App β-sitosterol (%) ⁽⁴⁾	Delta-7-stigmasterol ⁽³⁾ (%)			
5. Oljčno olje – mešanica rafiniranega oljčnega olja in deviškega oljčnega olja	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C^{40} + C^{42} + C^{44} + C^{46} \leq 350$
6. Surovo olje iz oljčnih tropin	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁶⁾	$C^{40} + C^{42} + C^{44} + C^{46} > 350$ ⁽⁶⁾
7. Rafinirano olje iz oljčnih tropin	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5	$C^{40} + C^{42} + C^{44} + C^{46} > 350$
8. Olje iz oljčnih tropin	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	$C^{40} + C^{42} + C^{44} + C^{46} > 350$

⁽¹⁾ Vsebnost drugih maščobnih kislin (%): palmitinske: 7,50–20,00; palmitoleinske: 0,30–3,50; heptadekanojske: ≤ 0,40; heptadecenojske: ≤ 0,60; stearinske: 0,50–5,00; oleinske: 55,00–83,00; linolne: 2,50–21,00.

⁽²⁾ Vsota izomerov, ki jih je mogoče (ali ne) ločiti s kapilarno kolono.

⁽³⁾ Glej Dodatek k tej prilogi.

⁽⁴⁾ App β-sitosterol: delta-5,23-stigmastadienol + klerosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-stigmastadienol.

⁽⁵⁾ Olja z vsebnostjo voskov med 300 mg/kg in 350 mg/kg se uvrščajo med lampante oljčna olja, če je skupna vsebnost alifatskih alkoholov nižja ali enaka 350 mg/kg ali če je vsebnost eritrodiola in uvaola nižja ali enaka 3,5 %.

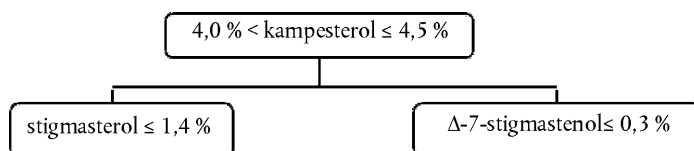
⁽⁶⁾ Olja z vsebnostjo voskov med 300 mg/kg in 350 mg/kg se uvrščajo med surova olja iz oljčnih tropin, če je skupna vsebnost alifatskih alkoholov višja od 350 mg/kg ter če je vsebnost eritrodiola in uvaola višja od 3,5 %.

Opombe:

- (a) Rezultate analiz je treba navesti na enako število decimalnih mest natančno, kot je določeno za posamezno značilnost. Zadnjo številko v številki je treba povečati za ena, če je naslednja številka večja od 4.
- (b) Če samo ena značilnost ni v skladu z navedenimi vrednostmi, se lahko olje razvrsti v drugo kategorijo ali se označi kot neustrezno glede čistosti za namene te uredbe.
- (c) Značilnosti, ki so označene z zvezdico (*) in se nanašajo na kakovost olja, pomenijo: – da sta za lampante oljčno olje lahko ustrezni mejni vrednosti hkrati različni od navedenih vrednosti; – da je za deviška oljčna olja neupoštevanje samo ene od mejnih vrednosti vzrok za spremembo kategorije, vendar olje ostane razvrščeno v eno od kategorij deviških oljčnih olj.
- (d) Značilnosti, označene z dvema zvezdicama (**), pomenijo, da sta za vse vrste olja iz oljčnih tropin lahko obe ustrezni mejni vrednosti hkrati različni od navedenih vrednosti.

▼ **M31***Dodatek***DREVO ODLOČANJA**

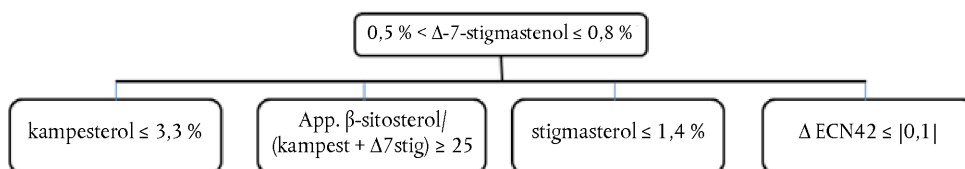
Drvo odločanja za vsebnost **kampesterola** v deviških in ekstra deviških oljčnih oljih:



Drugi parametri so skladni z mejnimi vrednostmi, določenimi v tej uredbi.

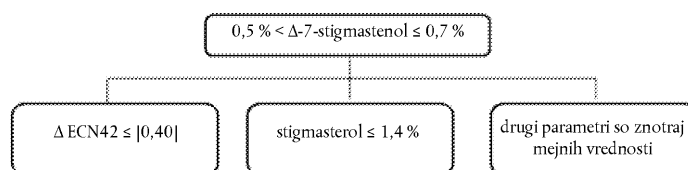
Drvo odločanja za vsebnost **delta-7-stigmastenola** v:

— ekstra deviških in deviških oljčnih oljih



Drugi parametri so skladni z mejnimi vrednostmi, določenimi v tej uredbi;

— oljih iz oljčnih tropin (surovih in rafiniranih)



▼ **M26***PRILOGA Ia***VZORČENJE OLJČNEGA OLJA ALI OLJA IZ OLJČNIH TROPIN,
DOSTAVLJENEGA V IZVIRNEM PAKIRANJU**

Ta metoda vzorčenja se uporablja za serije oljčnega olja ali olja iz oljčnih tropin v izvirnem pakiranju. Uporabljajo se različne metode vzorčenja, odvisno od tega, ali izvirno pakiranje presega 5 litrov ali ne.

„Serija“ pomeni skupek prodajnih enot, ki se proizvajajo, izdelujejo in pakirajo v takih okoliščinah, da se olje, ki ga vsebuje vsaka prodajna enota, šteje za homogeno v smislu vseh analitičnih značilnosti. Posamezne serije se določijo v skladu z Direktivo 2011/91/EU Evropskega parlamenta in Sveta ⁽¹⁾

„Posamični vzorec“ pomeni količino olja v izvirnem pakiranju, ki je vzeta iz naključnega dela serije.

1. VSEBINA PRIMARNEGA VZORCA**1.1 Izvirno pakiranje, ki ne presega 5 litrov**

„Primarni vzorec“ za izvirno pakiranje, ki ne presega 5 litrov, pomeni število posamičnih vzorcev, vzetih iz serije, v skladu s tabelo 1.

*Tabela 1***Najmanjši primarni vzorec mora vsebovati naslednje**

Če je prostornina izvirnega pakiranja	Primarni vzorec mora zajemati olje iz
(a) 1 liter ali več	(a) 1 izvirnega pakiranja
(b) manj kot 1 liter	(b) najmanjšega števila pakiranj s skupno prostornino vsaj 1,0 litra

Število pakiranj iz tabele 1, ki predstavljajo primarni vzorec, lahko vsaka država članica po lastnih potrebah poveča (na primer zaradi organoleptičnega ocenjevanja v drugem laboratoriju, kot je tisti, ki je izvedel kemijske analize, ponovljeno analizo itd.).

1.2 Izvirno pakiranje, ki presega 5 litrov

„Primarni vzorec“ za izvirno pakiranje, ki presega 5 litrov, pomeni reprezentativen del vseh posamičnih vzorcev, pridobljen z zmanjšanjem, v skladu s tabelo 2. Primarni vzorec mora biti sestavljen iz različnih primerov.

„Primer“ primarnega vzorca pomeni vsako od pakiranj, ki sestavljajo primarni vzorec.

*Tabela 2***Najmanjše število posamičnih vzorcev, ki jih je treba izbrati**

Število pakiranj v seriji	Najmanjše število posamičnih vzorcev, ki jih je treba izbrati
Do vključno 10	1
Od 11 do 150	2

⁽¹⁾ Direktiva 2011/91/EU Evropskega parlamenta in Sveta z dne 13. decembra 2011 o označbah ali znakih za identifikacijo serije, v katero spada živilo (UL L 334, 16.12.2011, str. 1).

▼ **M26**

Število pakiranj v seriji	Najmanjše število posamičnih vzorcev, ki jih je treba izbrati
Od 151 do 500	3
Od 501 do 1 500	4
Od 1 501 do 2 500	5
> 2 500 na 1 000 pakiranj	1 dodaten posamični vzorec

Da bi se zmanjšala prostornina vzorčenih izvirnih pakiranj, se vsebina vzorčenih posamičnih vzorcev homogenizira za pripravo primarnega vzorca. Odmerki različnih posamičnih vzorcev se prelijejo v skupno posodo za homogenizacijo z mešanjem, kar zagotavlja najboljšo zaščito pred zrakom.

Vsebino primarnega vzorca je treba preliti v več pakiranj z najmanjšo prostornino 1,0 litra, pri čemer vsako pakiranje predstavlja primer primarnega vzorca.

Število primarnih vzorcev lahko vsaka država članica po lastnih potrebah poveča (na primer zaradi organoleptičnega ocenjevanja v drugem laboratoriju, kot je tisti, ki je izvedel kemijske analize, ponovljeno analizo itd.).

Vsako pakiranje je treba napolniti tako, da je zračna plast na vrhu čim manjša, nato pa ustrezno zapreti in zatesniti, tako da je proizvod zaščiten pred nedovoljenimi posegi.

Te primere je treba zaradi pravilne identifikacije označiti.

2. ANALIZE IN REZULTATI

2.1 Vsak primarni vzorec je treba razdeliti na laboratorijske vzorce v skladu s točko 2.5 standarda EN ISO 5555 in analizirati po vrstnem redu, kot je prikazan v drevesu odločanja iz Priloge Ib, ali po kakršnem koli drugem naključnem vrstnem redu.

2.2 Če so vsi rezultati analiz v skladu z značilnostmi deklarirane kategorije olja, se celotna serija deklarira kot skladna.

Če eden od rezultatov analiz ni v skladu z značilnostmi deklarirane kategorije olja, se celotna serija deklarira kot neskladna.

3. PREVERJANJE KATEGORIJE SERIJE

3.1 Za preverjanje kategorije serije lahko pristojni organ poveča število primarnih vzorcev, vzetih na različnih delih serije, v skladu z naslednjo tabelo:

Tabela 3

Število primarnih vzorcev, določeno na podlagi velikosti serije

Velikost serije (v litrih)	Število primarnih vzorcev
Manj kot 7 500	2
Od 7 500 do manj kot 25 000	3
Od 25 000 do manj kot 75 000	4
Od 75 000 do manj kot 125 000	5
125 000 ali več	6 + 1 na vsakih dodatnih 50 000 litrov

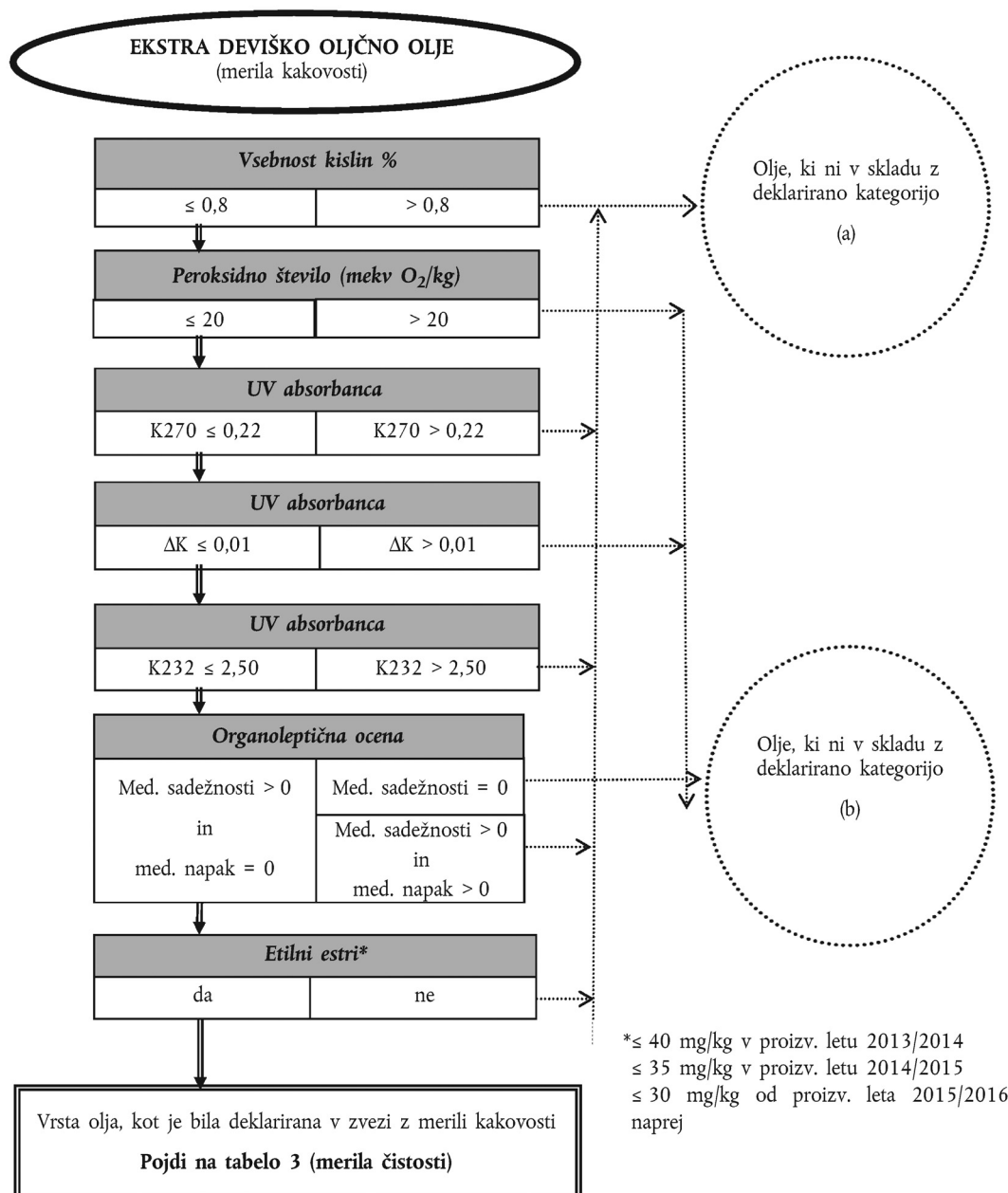
▼M26

Vsak posamični vzorec, ki predstavlja primarni vzorec, je treba vzeti na istem mestu v seriji, pri čemer je treba zabeležiti lokacijo vsakega primarnega vzorca in jo nedvoumno identificirati.

Vsak primarni vzorec je treba oblikovati v skladu s postopki iz točk 1.1 in 1.2.

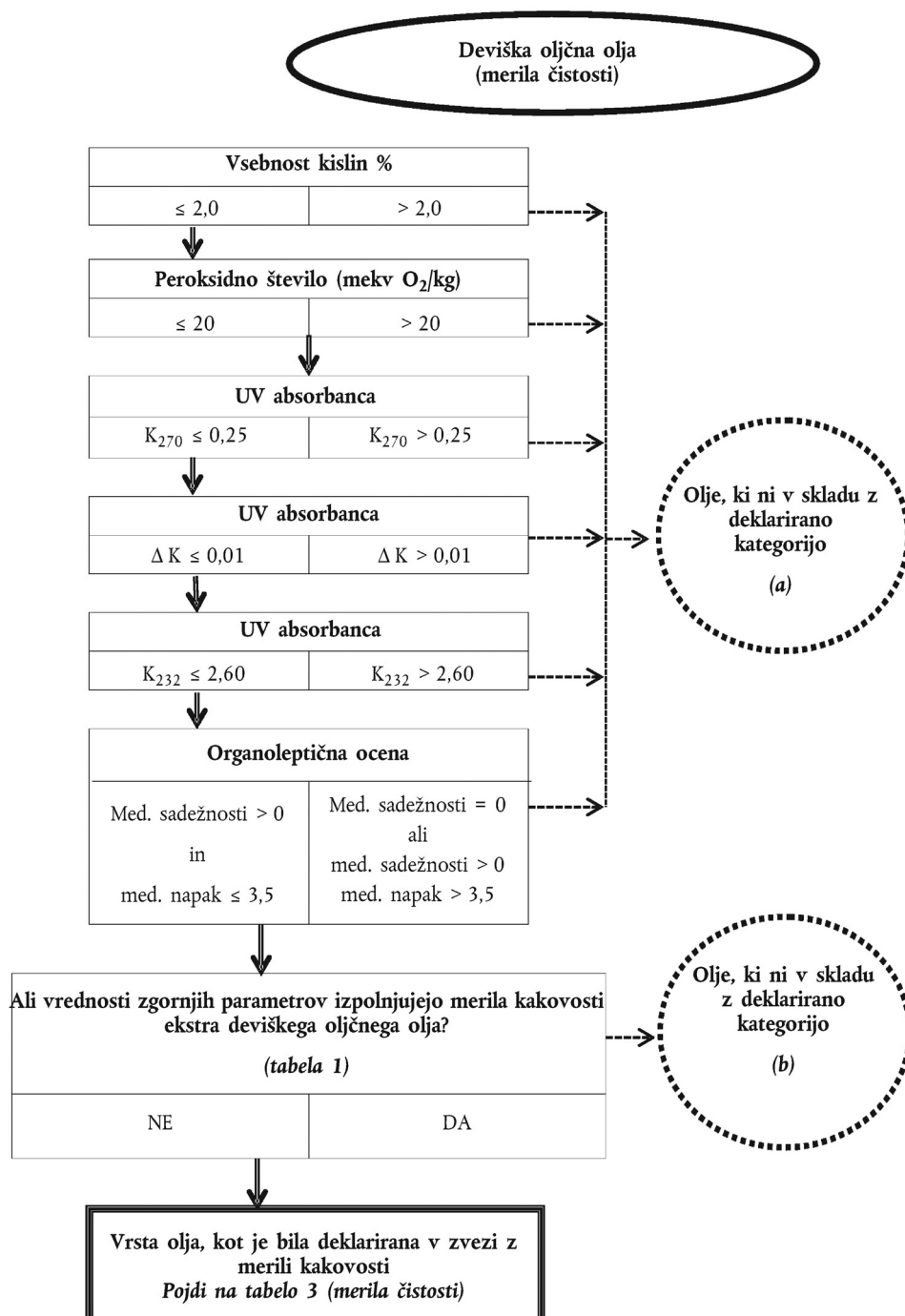
Nato se za vsak primarni vzorec izvedejo analize iz člena 2(1).

- 3.2 Če rezultati analiz iz člena 2(1), izvedeni za vsaj en primarni vzorec, niso v skladu z značilnostmi deklarirane kategorije olja, se celotna vzorčena serija deklarira kot neskladna.

▼ **M26***PRILOGA Ib***DREVO ODLOČANJA ZA PREVERJANJE, ALI JE VZOREC OLJČNEGA OLJA
SKLADEN Z DEKLARIRANO KATEGORIJJO***Tabela 1*

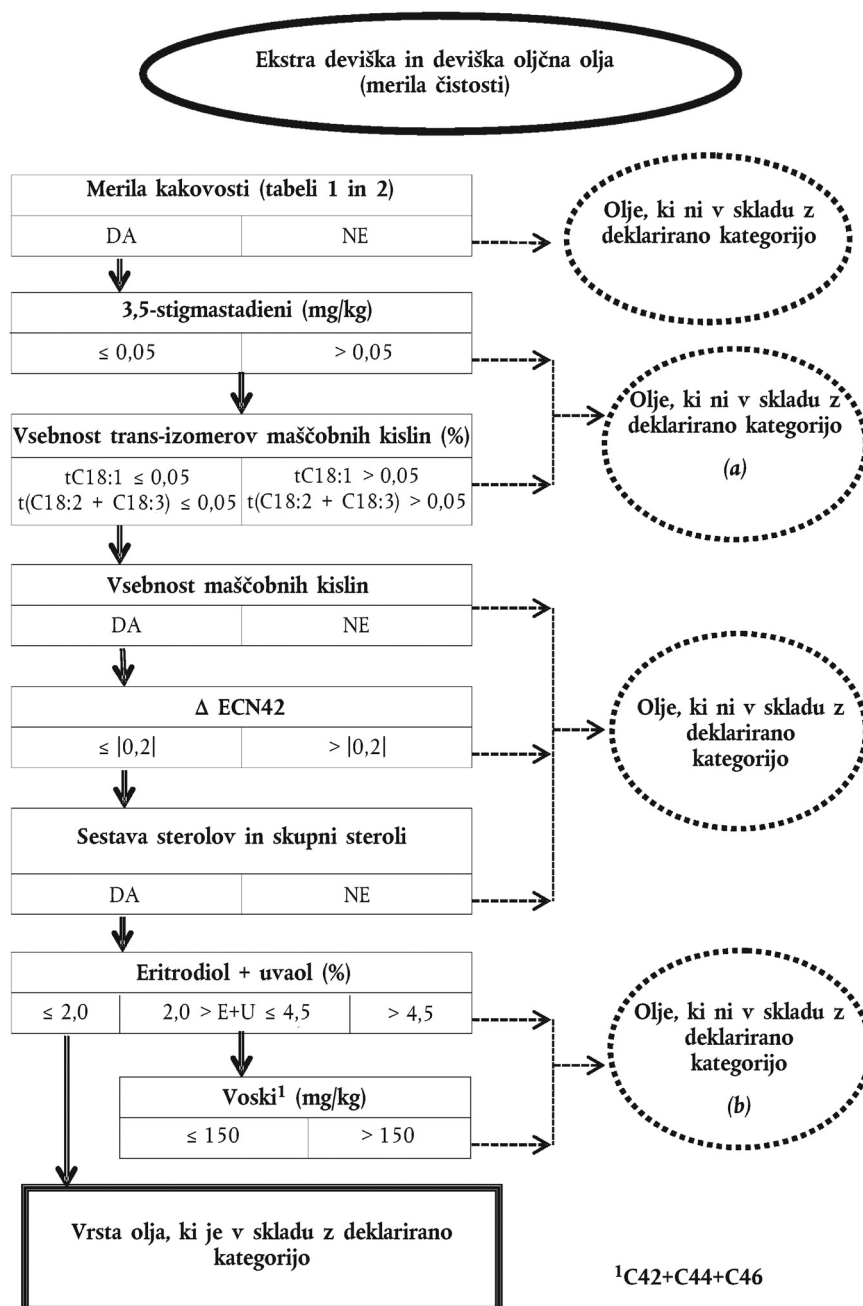
▼ M26

Tabela 2



▼ M26

Tabela 3



▼ **M26***Dodatek 1***Tabela ekvivalentnosti med prilogami k tej uredbi in analizami iz drevesa odločanja**

— Vsebnost kislin	Priloga II	Določanje prostih maščobnih kislin, metoda v hladnem
— Peroksidno število	Priloga III	Določanje peroksidnega števila
— UV absorbanca	Priloga IX	Spektrofotometrična analiza
— Organoleptična ocena	Priloga XII	Organoleptična ocena deviškega oljčnega olja
— Etilni estri	Priloga XX	Metoda za določanje vsebnosti voskov, metilnih estrov maščobnih kislin in etilnih estrov maščobnih kislin s kapilarno plinsko kromatografijo
— 3,5-stigmastadieni	Priloga XVII	Metoda za določanje stigmastadienov v rastlinskih oljih
▼ M28		
— Trans-izomeri maščobnih kislin	Priloga X	Določanje metilnih estrov maščobnih kislin s plinsko kromatografijo
— Vsebnost maščobnih kislin	Priloga X	Določanje metilnih estrov maščobnih kislin s plinsko kromatografijo
▼ M26		
— ΔECN42	Priloga XVIII	Določanje sestave trigliceridov z ECN42 (razlika med podatki HPCL in teoretično vsebnostjo)
— Sestava sterolov in steroli skupaj	Priloga V	Določanje sestave in vsebnosti sterolov in triterpenskialkoholov s kapilarno plinsko kromatografijo
— Eritrodiol in uvaol		
— Voski	Priloga IV	Določevanje vsebnosti voskov s kapilarno plinsko kromatografijo
▼ M28		
— Alifatski in triterpenski alkoholi	Priloga XIX	Določanje vsebnosti alifatskih in triterpenskialkoholov s kapilarno plinsko kromatografijo
▼ M26		
— Nasičene maščobne kisline na položaju 2	Priloga VII	Določanje deleža 2-gliceril monopalmitata

▼ **M29***PRILOGA II***DOLOČANJE PROSTIH MAŠČOBNIH KISLIN, METODA V HLADNEM****1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE**

Ta metoda opisuje določanje prostih maščobnih kislin v oljčnih oljih in oljih iz oljčnih tropin. Vsebnost prostih maščobnih kislin je izražena kot kislost, izračunana v deležu oleinske kisline.

2. PRINCIP

Vzorec se raztopi v mešanici topil in prisotne proste maščobne kisline se titirajo z uporabo raztopine kalijevega hidroksida ali natrijevega hidroksida.

3. REAGENTI

Vsi reagenti naj bodo priznane analitske kakovosti in uporabljena voda naj bo destilirana ali enakovredne čistoče.

3.1 Dietilni eter; 95 % etanol (v/v), mešanica enakih volumenskih delov.

Natančno v trenutku uporabe nevtraliziramo z raztopino kalijevega hidroksida (3.2) z dodatkom 0,3 ml fenolfaleinove raztopine (3.3) na 100 ml mešanice.

Opomba 1: Dietilni eter je zelo vnetljiv in lahko tvori eksplozivne perokside. Pri njegovi uporabi je treba biti posebno pazljiv.

Opomba 2: Če ni mogoče uporabiti dietilnega etra, se lahko uporabi mešanica topil, ki vsebujejo etanol in toluen. Če je treba, se etanol lahko nadomesti s 2-propanolom.

3.2 Kalijev hidroksid ali natrijev hidroksid, standardizirana etanolna ali vodna raztopina, približno 0,1 mol/l c(KOH) [ali c(NaOH)], ali če je potrebno, približno 0,5 mol/l c(KOH) [ali c(NaOH)]. Na voljo so raztopine v prodaji.

Pred uporabo moramo poznati in preveriti točno koncentracijo raztopine kalijevega hidroksida (ali natrijevega hidroksida). Uporabimo raztopino, ki je bila pripravljena najmanj pet dni pred uporabo in prelita v rjavo steklenico z gumijastim zamaškom. Raztopina mora biti brezbarvna ali barve slame.

Če pri uporabi vodne raztopine kalijevega hidroksida (ali natrijevega hidroksida) opazimo fazno ločevanje, nadomestimo vodno raztopino z etanolno raztopino.

Opomba 3: Stabilno brezbarvno raztopino kalijevega hidroksida (ali natrijevega hidroksida) lahko pripravimo, kot sledi. Zavremo 1 000 ml etanola ali vode z 8 g kalijevega hidroksida (ali natrijevega hidroksida) in 0,5 g aluminijevih ostrižkov in še naprej vremo pod povratnim hladilnikom eno uro. Takoj destiliramo. Raztopimo v destilatu zahtevano količino kalijevega hidroksida (ali natrijevega hidroksida). Pustimo mirovati nekaj dni in z dekantiranjem ločimo bistri supernatant od oborine kalijevega karbonata (ali natrijevega karbonata).

Raztopino lahko brez destilacije pripravimo, kot sledi: k 1 000 ml etanola (ali vode) dodamo 4 ml aluminijevega butilata in mešanico pustimo nekaj dni. Dekantiramo tekoči supernatant in raztopimo zahtevano količino kalijevega hidroksida (ali natrijevega hidroksida). Raztopina je pripravljena za uporabo.

▼ M29

- 3.3 Raztopina 10 g/l fenolftaleina v 95- do 96-odstotnem etanolu (v/v) ali raztopina 20 g/l bazičnega modrila 6B ali timolftaleina v 95- do 96-odstotnem etanolu (v/v). Pri močno obarvanih oljih se uporabljata bazično modrilo ali timolftalein.

4. APARATURA

Običajna laboratorijska oprema, vključno z:

- 4.1 analizno tehcnico,
- 4.2 250-mililitrsko erlenmajerico,
- 4.3 10-mililitrsko bireto razreda A z razdelkom 0,05 ml ali enakovredno avtomatsko bireto.

5. POSTOPEK

5.1 **Priprava vzorca**

Ko je vzorec moten, ga je treba filtrirati.

5.2 **Testni vzorec**

Odvisno od predvidene kislosti natehtamo vzorec po naslednji tabeli:

Pričakovana kislost (g oleinske kisline na 100 g)	Masa vzorca (g)	Točnost tehtanja (g)
0 do 2	10	0,02
> 2 do 7,5	2,5	0,01
> 7,5	0,5	0,001

Vzorec tehtamo v erlenmajerici (4.2).

5.3 **Določanje**

Raztopimo vzorec (5.2) v 50 do 100 ml predhodno nevtralizirane mešanice dietilnega etra in etanola (3.1).

Med mešanjem titriramo z raztopino 0,1 mol/l kalijevega hidroksida (ali natrijevega hidroksida) (3.2) (glej opombo 4) do preskoka barve indikatorja (barva obarvanega indikatorja je obstojna najmanj 10 sekund).

Opomba 4: Če zahtevana količina 0,1 mol/l kalijevega hidroksida (ali natrijevega hidroksida) preseže 10 ml, uporabimo raztopino 0,5 mol/l ali spremenimo maso vzorca po pričakovani prosti kislosti v navedeni tabeli.

Opomba 5: Če raztopina med titracijo postane motna, dodamo dovolj topil (3.1), da dobimo bistro raztopino.

Vsebnost določamo drugič le, če je prvi rezultat višji od omejitve, navedene za kategorijo olja.

▼ M29

6. IZRAŽANJE REZULTATOV

Kislost kot odstotek oleinske kisline je enaka:

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

pri čemer:

V = volumen uporabljene standardizirane raztopine kalijevega hidroksida (ali natrijevega hidroksida) v mililitrih;

c = točna koncentracija v molih na liter uporabljene standardizirane raztopine kalijevega hidroksida (ali natrijevega hidroksida);

M = 282 g/mol, molska masa v gramih na mol oleinske kisline;

m = masa vzorca v gramih.

Oleinska kislina se zapiše, kot sledi:

(a) na dve decimalni mesti natančno za vrednosti od 0 do vključno 1;

(b) na eno decimalno mesto natančno za vrednosti od 1 do vključno 100.

▼ M30*PRILOGA III***DOLOČANJE PEROKSIDNEGA ŠTEVILA****1. Področje uporabe**

Ta priloga opisuje metodo za določanje peroksidnega števila olj in masti živalskega in rastlinskega izvora.

2. Opredelitev pojmov

Peroksidno število je količina tistih snovi v vzorcu, izražena v miliekvivivalentih aktivnega kisika na kilogram, ki oksidira kalijev jodid v opisanih delovnih pogojih.

3. Princip

Reakcija testnega vzorca v raztopini očetne kisline in kloroforma, z raztopino kalijevega jodida. Titracija sproščenega joda s standardizirano raztopino natrijevega tiosulfata.

4. Oprema

Vsa uporabljena oprema mora biti brez reducirajočih ali oksidirajočih snovi.

Opomba 1: Brušenih površin ne namažite.

4.1 Steklena ladjica kapacitete 3 ml.

4.2 Bučke z brušenim vratom in zamaškom, kapacitete približno 250 ml, predhodno osušimo s čistim, suhim inertnim plinom (dušikom, ali še bolje, z ogljikovim dioksidom).

4.3 Bireta, kapacitete 5 ml, 10 ml ali 25 ml, graduirana na vsaj 0,05 ml, z avtomatsko nastavitvijo ničle ali enakovredna avtomatska bireta.

4.4 Analitska tehtnica.

5. Reagenti

5.1 Kloroform, analitsko čist, očiščen kisika s prepahovanjem s čistim, suhim inertnim plinom.

5.2 Ledocet, analitsko čist, očiščen kisika s prepahovanjem s čistim, suhim inertnim plinom.

5.3 Nasičena vodna raztopina kalijevega jodida, sveže pripravljena, brez joda in jodatov. Raztopimo približno 14 g kalijevega jodida v približno 10 ml vode pri sobni temperaturi.

5.4 Tik pred uporabo točno standardizirana 0,01 mol/L (ustreza 0,01 N) vodna raztopina natrijevega tiosulfata.

Dnevno pripravimo 0,01 mol/L natrijevega tiosulfata iz 0,1 mol/L standardizirane raztopine natrijevega tiosulfata pred uporabo ali določimo točno molarnost. Izkušnje kažejo, da je stabilnost omejena, odvisna pa je od vrednosti pH in vsebnosti prostega ogljikovega dioksida. Uporabimo samo sveže prekuhano vodo za redčenje, po možnosti očiščeno z dušikom.

Priporoča se naslednji postopek za določanje točne molarnosti raztopine natrijevega tiosulfata:

▼ M30

Natehtamo 0,27 g do 0,33 g kalijevega jodata (m_{KIO_3}) s točnostjo 0,001 g v merilno bučko (250 ml ali 500 ml) in razredčimo do oznake s sveže prekuhano vodo (V_2), ohlajeno na sobno temperaturo. S pipeto prenesemo 5 ml ali 10 ml te raztopine kalijevega jodata (V_1) v erlenmajerico prostornine 250 ml. Dodamo 60 ml sveže prekuhane vode, 5 ml 4 mol/L klorovodikove kisline in 25 mg do 50 mg kalijevega jodida ali 0,5 ml nasičene raztopine kalijevega jodida. Raztopino titriramo z raztopino natrijevega tiosulfata (V_3), da določimo točno molarnost raztopine natrijevega tiosulfata.

$$T = \frac{m_{\text{KIO}_3} \times V_1 \times 6 \times 10 \times w_{\text{KIO}_3}}{M_{\text{KIO}_3} \times V_2 \times V_3}$$

Pri tem je:

m_{KIO_3} masa kalijevega jodata v gramih

V_1 volumen raztopine kalijevega jodata v mililitrih (5 ml ali 10 ml)

V_2 skupni volumen raztopine kalijevega jodata v mililitrih (250 ml ali 500 ml)

V_3 volumen raztopine natrijevega tiosulfata v mililitrih

w_{KIO_3} čistost kalijevega jodata v g/100 g

M_{KIO_3} molekulska masa kalijevega jodata (214 g/mol)

T točna molarnost raztopine natrijevega tiosulfata (mol/L).

5.5 Škrobovica, 10 g/l vodna suspenzija, sveže pripravljena iz naravnega topnega škroba. Uporabijo se lahko tudi enakovredni reagenti.

6. Vzorec

Pazimo, da vzorec jemljemo in skladiščimo v temnem, hranimo na hladnem v popolnoma zaprtih steklenih posodah. Posode so hermetično zaprte z brušenimi zamaški ali zamaški iz plute.

7. Postopek

Določitev se mora izvesti pri difuzni dnevni svetlobi ali pri umetni svetlobi. V skladu s pričakovanim peroksidnim številom natehtamo v stekleni ladjici (4.1) ali, če vam to ne uspe, v bučki (4.2) s točnostjo 0,001 g maso vzorca glede na naslednjo tabelo:

Pričakovano peroksidno število (mekv)	Masa testnega vzorca (g)
0 do 12	5,0 do 2,0
12 do 20	2,0 do 1,2
20 do 30	1,2 do 0,8
30 do 50	0,8 do 0,5
50 do 90	0,5 do 0,3

Bučko (4.2) odmašimo in vanjo prenesemo testni vzorec iz steklene ladjice. Dodamo 10 ml kloroforma (5.1). Testni vzorec hitro raztopimo z mešanjem. Dodamo 15 ml očetne kisline (5.2), nato 1 ml raztopine kalijevega jodida (5.3). Hitro zamašimo, pretresamo eno minuto in pustimo točno pet minut v temnem prostoru na temperaturi od 15 do 25 °C.

▼ M30

Dodamo približno 75 ml destilirane vode. Titriramo sproščeni jod z raztopino natrijevega tiosulfata (5.4), močno pretresemo, kot indikator uporabimo škrobovico (5.5).

Na istem preskusnem vzorcu izvedemo dve določitvi.

Istočasno izvedemo slepo določitev. Če rezultat presega 0,05 ml 0,01 N raztopine natrijevega tiosulfata (5.4), zamenjamo nečiste reagente.

8. Prikaz rezultatov

Peroksidno število (PV), izraženo v miliekvivalentih aktivnega kisika na kilogram, se izrazi s formulo:

$$PV = \frac{V \times T \times 1\,000}{m}$$

pri čemer je:

V = volumen raztopine standardiziranega natrijevega tiosulfata (5.4) v ml, uporabljen za določitev, popravljen tako, da se upošteva slepa določitev

T = točna molarnost uporabljene raztopine natrijevega tiosulfata (5.4) v mol/L

m = masa testnega vzorca v g.

Za rezultat se vzame aritmetično povprečje dveh določitev.

Rezultat določitve je treba podati na eno decimalno mesto natančno.

▼ **M21***PRILOGA IV***DOLOČEVANJE VSEBNOSTI VOSKOV S KAPILARNO PLINSKO KROMATOGRAFIJO****1. NAMEN**

Ta metoda opisuje postopek za določitev vsebnosti voskov v oljčnem olju. Voski se ločijo glede na število ogljikovih atomov. Metodo lahko uporabimo zlasti za razlikovanje med oljčnim oljem, pridobljenim s stiskanjem, in oljčnim oljem, pridobljenim z ekstrakcijo (olje iz oljčnih tropin).

2. PRINCIP

Maščobo, ki smo ji dodali ustrezen interni standard, na z vodo omočenem silikagelu frakcioniramo s kolonsko kromatografijo; eluirano frakcijo najprej ujamemo pri pogojih preskušanja (katere polarnost je manjša kot pri trigliceridih), nato jo neposredno analiziramo s kapilarno plinsko kromatografijo.

3. OPREMA

3.1 Erlenmajerica prostornine 25 ml.

3.2 Steklena kolona za plinsko kromatografijo, z notranjim premerom 15,0 mm, dolžine 30 do 40 cm in opremljena s petelinčkom.

3.3 Plinski kromatograf, primeren za uporabo s kapilarno kolono in opremljen s sistemom za neposredno injiciranje v kolono, ki obsega:

3.3.1 termostatsko kontrolirano komoro za kolone, s programatorjem temperature;

3.3.2 hladen injektor za injiciranje neposredno v kolono;

3.3.3 plamensko ionizacijski detektor in konverter-ojačevalec;

3.3.4 rekorder-integrator, primeren za uporabo s konverterjem-ojačevalcem (3.3.3), z odzivnim časom, manjšim od 1 sekunde, in nastavljivo hitrostjo pomika papirja. (Uporabimo lahko tudi računalniške sisteme, pri katerih je predvideno zajemanje podatkov plinske kromatografije prek osebnega računalnika.);

3.3.5 Steklена ali kvarčna kapilarna kolona dolžine 8 do 12 m, z notranjim premerom 0,25 do 0,32 mm, znotraj pokrita s tekočo stacionarno fazo in enotne debeline 0,10 do 0,30 μm . (Tekoče stacionarne faze, namenjene uporabi, v prodaji vrste SE 52 ali SE 54.)

3.4 10 μl -mikrobrizgalka s kaljeno iglo in z možnostjo neposrednega injiciranja v kolono.

3.5 Električni vibrator.

3.6 Rotavapor.

3.7 Žarilna peč.

3.8 Analitska tehnica, ki zagotavlja $\pm 0,1$ mg natančnost.

3.9 Običajna laboratorijska steklovina.

4. REAGENTI

4.1 Silikagel z velikostjo delcev med 60 in 200 μm .

Silikagel vsaj 4 ure žarimo pri 500 °C. Nato ga ohladimo in dodamo 2 % vode glede na količino silikagela. Dobro premešamo, da se zmes homogenizira. Pred uporabo hranimo vsaj 12 ur v temi.

▼ M21

- 4.2 n-heksan, kromatografske čistoče.
- 4.3 Dietil eter, kromatografske čistoče.
- 4.4 n-heptan, kromatografske čistoče.
- 4.5 Standardna raztopina lauril arahidata koncentracije 0,1 % (m/V) v heksanu (interni standard). (*Lahko uporabimo tudi -palmitil palmitat ali miristil stearat.*)
- 4.5.1 *Sudan 1 (1-fenilazo-2-naftol).*
- 4.6 Nosilni plin: vodik ali helij, čist, plinsko-kromatografske čistoče.
- 4.7 Pomožni plini:
- vodik, čist, plinsko-kromatografske čistoče,
 - zrak, čist, plinsko-kromatografske čistoče.

5. POSTOPEK**5.1 Priprava kromatografske kolone**

V n-heksanu (4.2) suspendiramo 15 g silikagela (4.1) in napolnimo kolono (3.2). Počakamo, da se posede. Homogenost posedanja, ki poveča homogenost kromatografskih pasov, lahko dosežemo z električnim vibratorjem (3.5). Spiramo s 30 ml n-heksana, da odstranimo vse morebitne nečistoče. S tehniko (3.8) v erlenmajerico prostornine 25 ml (3.1) natehtamo natanko 500 mg vzorca in dodamo ustrezno količino internega standarda (4.5), ki je odvisna od pričakovane vsebnosti voskov. Na primer, pri oljčnem olju dodamo 0,1 mg, pri olju iz oljčnih tropin pa 0,25 do 0,5 mg lauril arahidata. Tako pripravljen vzorec prenesemo v kromatografsko kolono, in sicer z dvema 2-ml odmerkoma n-heksana (4.2).

Topilo izpuščamo iz kolone tako dolgo, da doseže 1 mm nad zgornjim robom absorbenta, zatem spiramo z dodatnimi 70 ml n-heksana, da odstranimo morebitne naravno prisotne n-alkane. Nato začnemo kromatografsko eluiranje, in sicer zberemo 180 ml mešanice n-heksan/etilni eter v razmerju 99:1 in pri pretoku približno 15 kapljic na 10 sekund. Eluiranje vzorca mora potekati pri sobni temperaturi 22 ± 4 °C.

Opombe: — Dnevno je treba pripraviti svežo mešanico n-heksana/-etilnega etra (99:1).

- Za opazovanje pravilnega eluiranja voskov lahko vzorcu v raztopini dodamo 100 µl 1-odstotnega sudana v elucijski mešanici. Ker ima barvilo vmesno retencijo med voski in trigliceridi, je treba elucijo suspendirati, ko obarvanje doseže dno kromatografske kolone, ker so se eluirali vsi voski.

Iz tako dobljene frakcije na rotavaporju (3.6) odparimo skoraj vse topilo. Preostala 2 ml topila odstranimo z uporabo blagega toka dušika, nato dodamo 2-4 ml n-heptana.

5.2 Plinsko-kromatografska analiza**5.2.1 Predpriprava**

Kolono pritrdimo na plinski kromatograf (3.3), in sicer vstopni del na injektor, izhodnega pa na detektor. Izvedemo splošno preverjanje plinskega kromatografa (tesnjenje plinskih povezav, pravilno delovanje detektorja in rekorderja itd.).

▼ **M21**

Če kolono uporabljamo prvič, je priporočljivo, da jo kondicioniramo. Pri majhnem pretoku plina skozi kolono vključimo plinski kromatograf. Postopoma segrevamo, tako da po približno 4 urah dosežemo temperaturo 350 °C. Pri tej temperaturi kolono kondicioniramo vsaj dve uri, nato naravnamo instrument v skladu s pogoji delovanja (naravnamo pretok, prižgemo plamen, povežemo z elektronskim rekorderjem (3.3.4), naravnamo delovno temperaturo peči za kolono, naravnamo detektor itd.). Pri občutljivosti, ki je vsaj dvakrat večja od delovne, posnamemo bazno linijo. Le-ta mora biti linearna, brez kakršnih koli vrhov in odklonov.

Negativen premočrtni odklon kaže na slabo tesnjenje med kolono in instrumentom, pozitiven odklon pa na slabo kondicionirano kolono.

5.2.2 *Izbira delovnih pogojev*

Splošni delovni pogoji, ki jih je treba upoštevati, so naslednji:

— temperatura kolone:

	20 °C/ minuto		5 °C/ minuto		20 °C/ minuto	
na začetku 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10')

— temperatura detektorja: 350 °C,

— količina injicirane snovi: 1 µl raztopine (2–4 ml) n-heptana,

— nosilni plin: helij ali vodik z optimalno linearno hitrostjo izbranega plina (glej Dodatek),

— občutljivost instrumenta: taka, da izpolnjuje spodnje pogoje:

Te pogoje lahko spremenimo glede na značilnosti kolone in plinskega kromatografa, da bi dosegli ločevanje vseh voskov, zadostno resolucijo vrhov (glej sliko) in retencijski čas internega standarda C₃₂, ki mora biti 18 ± 3 minute. Najznačilnejši vrh voskov mora biti izmerjen najmanj 60 % od spodnjega dela skale.

Integracijske parametre moramo določiti tako, da dobimo pravilno vrednotenje površin vrhov.

Opomba: Glede na visoko končno temperaturo je dovoljen pozitiven odklon, ki pa ne sme biti večji od 10 % od spodnjega dela skale.

5.3 **Izvedba analize**

Z 10-µl mikrobrizgalko odvmemo 1 µl raztopine; bat izvlečemo, da se igla izprazni. Iglo vbodemo v injektor in po eni ali dveh sekundah hitro vbrizgnemo. Po približno petih sekundah iglo pazljivo izvlečemo.

Kromatogram snemamo, dokler ne eluirajo vsi voski.

▼ M21

Bazna linija mora ves čas izpolnjevati zahtevane pogoje.

5.4 Identifikacija vrhov

Različne vrhove identificiramo na podlagi retencijskih časov in s primerjavo med mešanicami voskov z znanimi retencijskimi časi, ki so bile analizirane pri enakih pogojih.

Slika prikazuje kromatogram voskov deviškega oljčnega olja.

5.5 Kvantitativna analiza

Z integratorjem izračunamo površine vrhov alifatskih estrov od C₄₀ do C₄₆ in površino vrha internega standarda.

Na podlagi naslednje formule izračunamo vsebnost voskov posameznega estra v mg/kg maščobe:

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

Kjer je:

A_x = površina vrha posameznega estra, v kvadratnih milimetrih;

A_s = površina vrha internega standarda, v kvadratnih milimetrih;

m_s = masa dodanega internega standarda, v miligramih;

m = masa odvzetega vzorca za določitev, v gramih.

6. PODAJANJE REZULTATOV

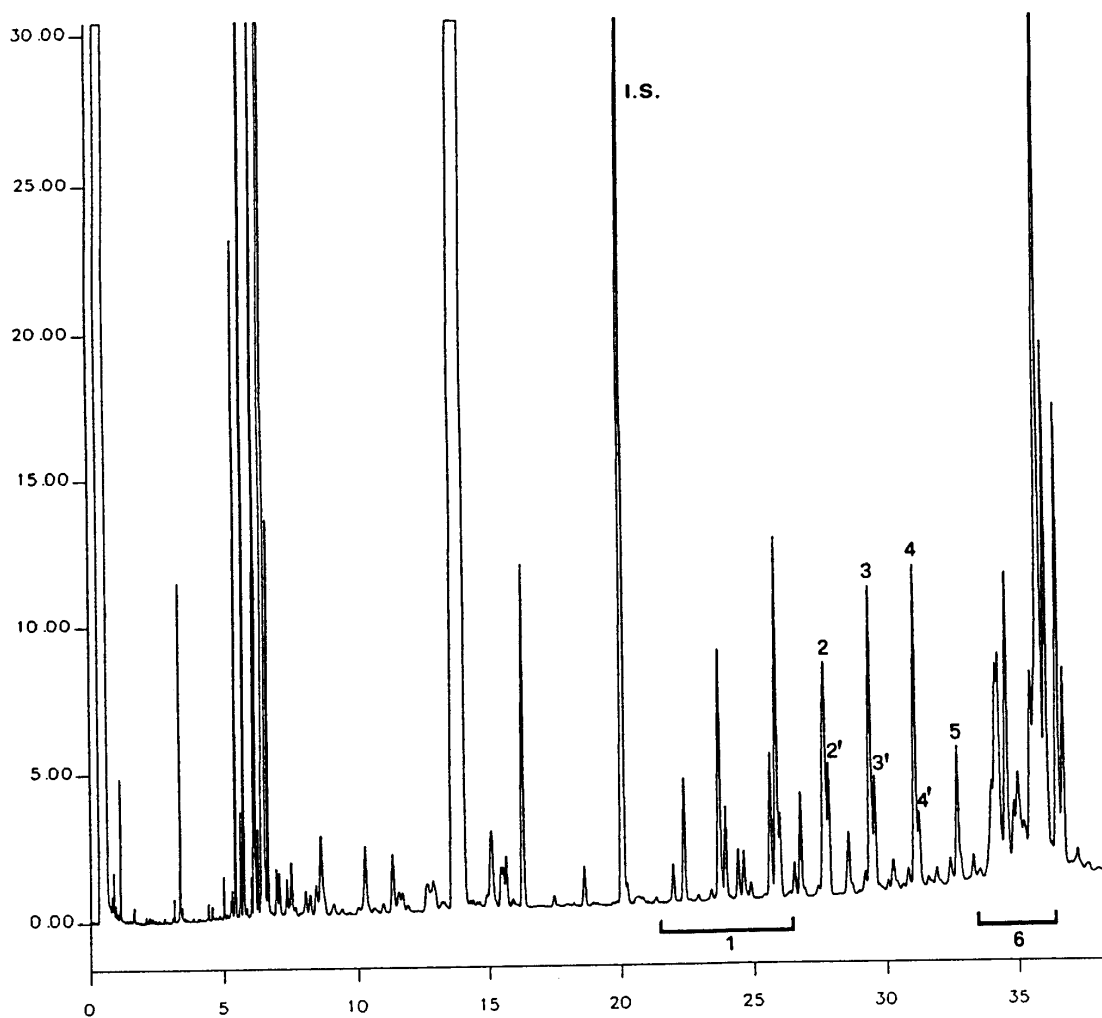
Navedemo vsoto vsebnosti posameznih sestavin različnih voskov od C₄₀ do C₄₆, v mg/kg maščobe (ppm).

Opomba: Spojine, ki jih je treba količinsko določiti, se nanašajo na vrhove s sodim številom ogljikovih atomov med estri C₄₀ do C₄₆, tako kot je to prikazano na kromatograma voskov oljčnega olja. Če sta za ester C₄₆ dva vrhova, je za njegovo identifikacijo priporočljiva analiza frakcije voskov olja iz oljčnih tropin, kjer je vrh C₄₆ dobro viden, ker je razločno večji.

Rezultate je treba izraziti na eno decimalno mesto natančno.

▼ M21

Slika

Kromatogram voskov v oljčnem olju ⁽¹⁾

Legenda:

- I.S. = lauril arahidat
- 1. = diterpenski estri
- 2 + 2' = estri C₄₀
- 3 + 3' = estri C₄₂
- 4 + 4' = estri C₄₄
- 5. = estri C₄₆
- 6. = sterolni estri in triterpenski alkoholi.

⁽¹⁾ Po eluciji sterolnih estrov kromatografska linija ne sme imeti značilnih vrhov (trigliceridi).

▼ M21*DODATEK***Določanje linearne hitrosti plina**

V plinski kromatograf, naravnan na običajne delovne pogoje, injiciramo 1 do 3 μ l metana (ali propana). Merimo čas, ki ga plin potrebuje za pot skozi kolono od trenutka vbrizga do trenutka, ko se pojavi vrh (t_M).

Linearna hitrost v cm/s je izražena s formulo L/t_M , kjer je L dolžina kolone v cm, t_M pa izmerjeni čas v sekundah.

▼ **M26***PRILOGA V***DOLOČANJE SESTAVE IN VSEBNOSTI STEROLOV IN TRITERPENSKIH DIALKOHOLOV S KAPILARNO PLINSKO KROMATOGRAFIJO****1. PODROČJE UPORABE**

Metoda opisuje postopek za določanje posamezne in skupne vsebnosti steroidov in triterpenskimi dialkoholi v oljnih oljih in oljih iz oljnih tropin.

2. PRINCIP

Olje z dodanim α -holestanolom kot internim standardom se umili s kalijevim hidroksidom in etanolno raztopino, neumiljive snovi pa se nato ekstrahirajo z etilnim etrom.

Sterolni in triterpenski dialkoholni frakciji se ločita od neumiljivih snovi s tankoplastno kromatografijo na z lugom obdelani silikagelni plošči. Frakcije, dobljene iz silikagela, se pretvorijo v trimetilsililne etre in se nato analizirajo s kapilarno plinsko kromatografijo.

3. OPREMA

Običajna laboratorijska oprema in zlasti:

- 3.1 250 ml bučka s povratnim hladilnikom in priključki iz steklenih obrušov.
- 3.2 500 ml lij ločnik.
- 3.3 250 ml bučke.
- 3.4 Celotna oprema za analizo s tankoplastno kromatografijo s steklenimi ploščami 20 × 20 cm.
- 3.5 Ultravijolična svetilka z valovno dolžino 254 ali 366 nm.
- 3.6 100 μ l in 500 μ l mikrobrizgalki.
- 3.7 Cilindrični filtrirni lij s porozno frito G3 (poroznosti 15–40 μ m), premera približno 2 cm in globine 5 cm, z nastavkom, primernim za filtriranje v vakuumu, in priključkom z zunanjim obrušom.
- 3.8 50 ml presesalna erlenmajerica s priključkom z notranjim obrušom za uporabo s filtrirnim lijem (točka 3.7).
- 3.9 10 ml epruveta s koničnim dnom in steklenim zamaškom.
- 3.10 Plinski kromatograf, primeren za uporabo s kapilarno kolono, s sistemom za vbrizgavanje z deljenjem vzorca, ki ga sestavljajo:
 - 3.10.1 termostatisirana komora za kolone, ki lahko ohranja želena temperaturo do ± 1 °C natančno;
 - 3.10.2 temperaturno nastavljen injektor z uparjalnim elementom iz persilaniziranega stekla in sistemom za vbrizgavanje z deljenjem vzorca;
 - 3.10.3 plamensko-ionizacijski detektor;
 - 3.10.4 sistem za zajemanje podatkov, ki je primeren za uporabo s plamensko-ionizacijskim detektorjem (točka 3.10.3) in omogoča ročno integracijo.
- 3.11 Kvarčna kapilarna kolona, dolžine 20 do 30 m, notranjega premera 0,25 do 0,32 mm, pokrita s 5 % difenil- in 95 % dimetilpolisiloksana (stacionarna faza SE-52 ali SE-54 ali podobno) enakomerne debeline med 0,10 in 0,30 μ m.

▼ **M26**

- 3.12 10 µl mikrobrizgalka za plinsko kromatografijo z nesnemljivo iglo, primerno za vbrizgavanje z deljenjem vzorca.
- 3.13 Eksikator, napolnjen s kalcijevim dikloridom.
4. REAGENTI
- 4.1 Kalijev hidroksid (minimalne koncentracije 85 %).
- 4.2 Etanolna raztopina kalijevega hidroksida, približno 2 N.
- Raztopite 130 g kalijevega hidroksida (točka 4.1) s hlajenjem v 200 ml destilirane vode in potem do enega litra dodajte etanol (točka 4.10). Raztopino hranite v dobro zamašenih temnih steklenicah, in sicer največ dva dni.
- 4.3 Etilni eter čistoče za analizo.
- 4.4 Etanolna raztopina kalijevega hidroksida, približno 0,2 N.
- Raztopite 13 g kalijevega hidroksida (točka 4.1) v 20 ml destilirane vode in do enega litra dodajte etanol (točka 4.10).
- 4.5 Brezvodni natrijev sulfat čistoče za analizo.
- 4.6 Steklene plošče (20 × 20 cm), premazane s silikagelom, brez indikatorja fluorescence debeline 0,25 mm (ki so naprodaj, pripravljene za uporabo).
- 4.7 Toluen kromatografske čistoče.
- 4.8 Aceton kromatografske čistoče.
- 4.9 n-heksan kromatografske čistoče.
- 4.10 Etilni eter kromatografske čistoče.
- 4.11 Etanol čistoče za analizo.
- 4.12 Etilacetat čistoče za analizo.
- 4.13 Referenčna raztopina za tankoplastno kromatografijo: holesterol ali fitosteroli in 5-odstotna raztopina eritrodiola v etilacetatu (točka 4.11).
- 4.14 2,7-diklorofluorescein, 0,2-odstotna etanolna raztopina. Naredite rahlo bazično z dodatkom nekaj kapelj alkoholne raztopine 2 N kalijevega hidroksida (točka 4.2).
- 4.15. Brezvodni piridin kromatografske čistoče (glej opombo 5).
- 4.16. Heksametil disilazan čistoče za analizo.
- 4.17. Trimetilklorosilan čistoče za analizo.
- 4.18 Vzročne raztopine sterolnih trimetilsililnih etrov.
- Pripravite jih tik pred uporabo iz sterolov in eritrodiola iz olj, ki jih vsebujejo.
- 4.19 α-holestanol več kot 99-odstotne čistoče (čistost je treba preveriti s plinskokromatografsko analizo).
- 4.20 0,2-odstotna interna standardna raztopina α-holestanola (m/V) v etilacetatu (točka 4.11).
- 4.21 Raztopina 10 g/l fenolftaleina v etanolu (točka 4.10).
- 4.22 Nosilni plin: vodik ali helij plinskokromatografske čistoče.
- 4.23 Pomožni plini: vodik, helij, dušik in zrak plinskokromatografske čistoče.

▼ **M26**

4.24 Mešanica n-heksana (točka 4.9) in etilnega etra (točka 4.10) v razmerju 65: 35 (V/V).

4.25 Reagent za sililiranje, sestavljen iz mešanice piridina, heksametildisilazana in trimetilklorosilana v razmerju 9: 3: 1 (V/V/V).

5. POSTOPEK

5.1 Priprava neumiljivih snovi

5.1.1 S 500 µl mikrobrizgalko (točka 3.6) vnesite v 250 ml bučko (točka 3.1) interno standardno raztopino α -holestanola (točka 4.20), ki vsebuje količino holestanola, ki ustreza približno 10 % vsebnosti sterolov v vzorcu. Na primer za 5 g vzorca oljčnega olja dodajte 500 µl raztopine α -holestanola (točka 4.20), za olje iz oljčnih tropin pa 1 500 µl. Po ohladitvi bučke raztopino odparite do suhega z blagim tokom dušika na parni kopeli, nato pa v isto bučko natehtajte $5 \pm 0,01$ g suhega filtriranega vzorca.

Opomba 1: Olja in masti živalskega ali rastlinskega izvora, ki vsebujejo precejšnje količine holesterola, lahko dajo vrh, ki ima retenzijski čas podoben holestanolu. V takem primeru je treba sterolno frakcijo analizirati dvakrat, in sicer z internim standardom in brez njega.

5.1.2 Dodajte 50 ml 2 N etanolne raztopine kalijevega hidroksida (točka 4.2) in nekaj plovca, namestite povratni hladilnik in segrejte na rahlo vretje do končanega umiljenja (raztopina postane bistra). S segrevanjem nadaljujte še nadaljnjih 20 minut in potem z vrha hladilnika dodajte 50 ml destilirane vode, snemite hladilnik in ohladite bučko na približno 30 °C.

5.1.3 Kvantitativno prenesite vsebino bučke v 500 ml lij ločnik (točka 3.2), in sicer z večkratnim spiranjem z destilirano vodo (50 ml). Dodajte približno 80 ml etilnega etra (točka 4.10), močno tresite približno 60 sekund ter postopoma sproščajte pritisk, tako da obrnete lij ločnik in odprete petelinčka. Pustite mirovati, dokler fazi nista popolnoma ločeni (opomba 2).

Nato milnico v celoti prelijte v drug lij ločnik. Iz vodno-alkoholne faze še dvakrat ekstrahirajte, in sicer z uporabo 60 do 70 ml etilnega etra (točka 4.10).

Opomba 2: Emulzijo je mogoče odstraniti z dodajanjem majhnih količin etanola (točka 4.11).

5.1.4 Združite etrske ekstrakte v skupnem liju ločniku, ki vsebuje 50 ml vode. Nadaljujte z izpiranjem (50 ml), dokler izpiralna voda ob dodatku kapljice raztopine fenoltaleina ni več rožnato obarvana (točka 4.21).

Potem ko je izpiralna voda odstranjena, filtrirajte skozi brezvodni natrijev sulfat (točka 4.5) v predhodno stehtani 250 ml bučki, pri tem pa lij in filter izperite z majhnimi količinami etilnega etra (točka 4.10).

5.1.5 Topilo odparite z destilacijo na rotacijskem izparilniku pri 30 °C v vakuumu. Dodajte 5 ml acetona in z blagim tokom zraka v celoti odstranite hlapno topilo. Ostanek sušite v peči 15 minut pri 103 ± 2 °C. Po ohladitvi v eksikatorju ga stehtajte z natančnostjo 0,1 mg.

▼ **M26**

5.2 Ločevanje sterolne in triterpenske dialkoholne frakcije (eritrodiol + uvaol)

5.2.1 Priprava z lugom obdelanih plošč za tankoplastno kromatografijo: silikagelne plošče (točka 4.6) za 10 sekund potopite približno 4 cm globoko v raztopino 0,2 N etanolnega kalijevega hidroksida (točka 4.5) in jih potem pustite dve uri, da se sušijo v digestoriju, na koncu pa jih dajte v peč na 100 °C za eno uro.

Vzemite jih iz peči in jih do uporabe hranite v eksikatorju, napolnjenem s kalcijevim kloridom (točka 3.13) (na ta način obdelane plošče je treba uporabiti v 15 dneh).

Opomba 3: Kadar se za ločevanje sterolnih frakcij uporabljajo z lugom obdelane silikagelne plošče, neumljivih frakcij ni treba tretirati z aluminijevim oksidom. Na ta način se vse sestavine, ki so kisle narave (maščobne kisline in druge), obdržijo na mestu naprstitve, pas sterolov pa se jasno loči od pasov alifatskih in triterpenskih alkoholov.

5.2.2 Mešanico heksana in etilnega etra (točka 4.24) (opomba 4) vstavite v razvijalno komoro na globino približno 1 cm. Komoro zaprite z ustreznim pokrovom in jo tako pustite najmanj pol ure na hladnem, da se lahko med hlapi in tekočino ustvari ravnotežje. Trakovi filtrirnega papirja, namočeni v eluent, se lahko položijo na notranje površine komore. To skrajša razvijalni čas za približno eno tretjino ter omogoča enotnejšo in bolj homogeno elucijo sestavin.

Opomba 4: Razvijalno mešanico je treba zamenjati za vsak preskus, zato da se dosežejo popolnoma ponovljivi pogoji elucije. Kot alternativa se lahko uporabi mešanica n-heksana in etilnega etra v razmerju 50: 50 (V/V).

5.2.3 Pripravite približno 5-odstotno raztopino neumljivih snovi (točka 5.1.5) v etilacetatu (točka 4.12) ter s pomočjo 100 µl mikrobrizgalke nanesite 0,3 ml raztopine na tanko in homogeno progo na nižjem koncu (2 cm) kromatografske plošče (točka 5.2.1). Vzporedno s progo nanesite 2 do 3 µl materialne referenčne raztopine (točka 4.13), tako da se po razvijanju sterolna in triterpenska dialkoholna pasova lahko identificirata.

5.2.4 Ploščo vstavite v razvijalno komoro, pripravljeno, kot je navedeno v točki 5.2.2. Temperaturo okolja je treba vzdrževati med 15 in 20 °C (opomba 5). Komoro takoj zaprite s pokrovom in pustite, da poteka eluiranje, dokler fronta topila ne doseže razdalje 1 cm od vrhnjega roba plošče. Vzemite ploščo iz razvijalne komore in odparite topilo s tokom vročega zraka ali tako, da ploščo nekaj časa pustite v digestoriju.

Opomba 5: Višja temperatura lahko negativno vpliva na ločevanje.

5.2.5 Rahlo in enakomerno napršite ploščo z raztopino 2,7-diklorofluoresceina (točka 4.14) ter pustite, da se posuši. Če se plošča opazuje pod ultravijolično svetlobo, se sterolna in triterpenska dialkoholna pasova lahko identificirata tako, da se poravnata s pikami, dobljenimi iz referenčne raztopine (točka 4.13). S črnim svinčnikom označite meje pasov vzdolž roba fluorescence (glej tankoplastno kromatografijo na sliki 3).

5.2.6 S kovinsko žličko odstragajte silikagel na označeni površini. Odstranjen, v fin prah zdrobljen material dajte v filtrirni lij (točka 3.7). Dodajte 10 ml vročega etilacetata (točka 4.12), s kovinsko žličko previdno zmešajte in v vakuumu filtrirajte, tako da filtrat zberete v erlenmajerici (točka 3.8), ki je pritrjena na filtrirni lij.

▼ **M26**

Ostanek v erlenmajerici trikrat izperite z etilnim etrom (točka 4.3) (vsakokrat približno z 10 ml), tako da zberete filtrat v isti erlenmajerici, ki je pritrjena na lij. Odparite filtrat do prostornine 4 do 5 ml, prenesite preostanek raztopine v predhodno stehtano 10 ml epruveto (točka 3.9), odparite do suhega z rahlim segrevanjem v blagem toku dušika, ponovno dolijte nekaj kapelj acetona (točka 4.8) in spet odparite do suhega.

Ostanek v epruveti mora biti sestavljen iz sterolnih in triterpenskimi dialkoholnih frakcij.

5.3 Priprava trimetilsililnih etrov

- 5.3.1 Reagent za sililiranje (točka 4.25) (opomba 6), v razmerju 50 µl za vsak miligram sterolov in triterpenskimi dialkoholov, dodajte v epruveto, ki vsebuje sterolsko in triterpensko dialkoholno frakcijo, tako da se izognete kakršnemu koli vnosu vlage (opomba 7).

Opomba 6: Raztopine, pripravljene za uporabo, se dobijo v prodaji. Na voljo so tudi drugi reagenti za sililiranje, kot je na primer bis-trimetilsilil trifluoroacetamid + 1-odstoten trimetilklorosilan, ki ga je treba razredčiti z enako količino brezvodnega piridina.

Piridin se lahko zamenja z enako količino acetonitrila.

- 5.3.2 Zamašite epruveto in jo previdno pretresite (ne da bi jo prevračali), dokler niso sestavine popolnoma raztopljene. Pustite jo pri sobni temperaturi najmanj 15 minut, nato pa nekaj minut centrifugirajte. Prozorna raztopina je pripravljena za plinskokromatografsko analizo.

Opomba 7: Rahla opalescenca, ki lahko nastane, je normalna in ne povzroča nobenih nepravilnosti. Tvorjenje belega flokulata ali pojav rožnate obarvanosti sta znaka prisotnosti vlage ali pokvarjenosti reagenta. V takem primeru je treba preskus ponoviti (le če se uporabi heksametildisilazan/trimetilklorosilan).

5.4 Plinskokromatografska analiza

5.4.1 Predhodni postopki, kondicioniranje kapilarne kolone

- 5.4.1.1 Kolono (točka 3.11) pritrdite na plinski kromatograf, in sicer vstopni del na injektor z deljenjem vzorca, izhodnega pa na detektor.

Opravite splošne preglede plinskega kromatografa (tesnjenje tokokroga plinov, učinkovitost detektorja, učinkovitost sistema za vbrizgavanje z deljenjem vzorca in sistema beleženja itd.).

- 5.4.1.2 Če kolono uporabljate prvič, je priporočljivo, da jo kondicionirate, in sicer tako, da skozi kapilarno kolono spustite blag tok plina, nato pa vključite plinski kromatograf in začnete postopno segrevanje do temperature najmanj 20 °C nad delovno temperaturo (opomba 8). To temperaturo vzdržujte najmanj dve uri, nato pa vzpostavite delovne pogoje (nastavitev pretoka plina in deljenja vzorca, vžig plamena, priključitev na računalniški sistem, prilagoditev temperature kolone, detektorja in injektorja itd.) in beležite signal z občutljivostjo, ki je najmanj dvakrat večja od tiste, ki je predvidena za analize. Potek bazne linije mora biti linearen, brez kakršnih koli vrhov, in ne sme imeti odklona.

▼ M26

Negativen premočrtni odklon kaže na slabo tesnjenje med kolono in instrumentom, pozitiven odklon pa na slabo kondicionirano kolono.

Opomba 8: Temperatura kondicioniranja mora vedno biti najmanj 20 °C nižja od najvišje temperature, določene za uporabljeno stacionarno fazo.

5.4.2 Izbor delovnih pogojev

5.4.2.1 Delovni pogoji so naslednji:

- temperatura kolone: 260 ± 5 °C,
- temperatura injektorja: 280–300 °C,
- temperatura detektorja: 280–300 °C,
- linearna hitrost nosilnega plina: 20 do 35 cm/s za helij, 30 do 50 cm/s za dušik,
- delilno razmerje: od 1: 50 do 1: 100,
- občutljivost instrumenta: 4- do 16-kratna minimalna atenuacija,
- občutljivost beleženja: 1 do 2 mV celotne skale,
- količina vbrizgane snovi: 0,5 do 1 µl raztopine TMSE.

Ti pogoji se lahko spremenijo glede na značilnosti kolone in plinskega kromatografa, tako da se dobijo kromatogrami, ki izpolnjujejo naslednje zahteve:

- retenzijski čas β -sitosterola mora biti 20 ± 5 minut,
- vrh za kampesterol mora biti: za oljčno olje (povprečna vsebnost 3 %) 20 ± 5 % celotne skale; za sojino olje (povprečna vsebnost 20 %) 80 ± 10 % celotne skale,
- vsi prisotni steroli morajo biti ločeni. Poleg tega, da so ločeni, morajo biti vrhovi tudi popolnoma razdvojeni, tj. signal vrha se mora pred začetkom novega vrha vrniti na bazno linijo. Vendar je nepopolna resolucija sprejemljiva pod pogojem, da se vrh pri TRR 1.02 (sitostanol) lahko količinsko opredeli s pomočjo pravokotnice.

5.4.3 Analizni postopek

5.4.3.1 Z 10 µl mikrobrizgalko odmerite 1 µl heksana, 0,5 µl zraka in 0,5 do 1 µl vzorčne raztopine. Dvignite bat mikrobrizgalke, tako da se igla izprazni. Iglo potisnite skozi membrano injektorja in po eni do dveh sekundah raztopino hitro vbrizgajte in potem po približno petih sekundah iglo počasi izvlecite.

Uporabi se lahko tudi avtomatski injektor.

5.4.3.2 Beležite, dokler TMSE prisotnih triterpenskimi dialkoholov popolnoma ne eluirajo. Bazna linija mora vedno ustrezati zahtevam (točka 5.4.1.2).

5.4.4 Identifikacija vrhov

Identificirajte posamezne vrhove na podlagi retenzijskih časov in s primerjavo z mešanico sterolnih in triterpenskimi dialkoholnih TMSE, analiziranih v enakih pogojih (glej Dodatek).

▼ M26

Steroli in triterpenski dialkoholi eluirajo v naslednjem zaporedju: holesterol, brasikasterol, ergosterol, 24-metilen holesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ^7 -kampesterol, $\Delta^5,23$ -stigmastadienol, klerosterol, β -sitosterol, sitostanol, Δ^5 -avenasterol, $\Delta^5,24$ -stigmastadienol, Δ^7 -stigmastenol, Δ^7 -avenasterol, eritrodiol in uvaol.

Retenzijska časa za β -sitosterol za koloni SE-52 in SE-54 sta prikazana v tabeli 1.

Sliki 1 in 2 prikazujeta tipične kromatograme nekaterih olj.

5.4.5 Kvantitativna ocena

5.4.5.1 Z računalniškim sistemom izračunajte površine vrhov za α -holestanol ter sterole in triterpenske dialkohole. Ne upoštevajte vrhov za tiste spojine, ki niso vključene med tiste, navedene v tabeli 1 (ergosterol se ne računa). Za odzivni faktor α -holestanola je treba šteti, da je enak 1.

5.4.5.2 Izračunajte koncentracijo vsakega posameznega sterola v mg/kg maščobe:

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

pri čemer je:

A_x = površina vrha za sterol x, izračunana z računalniškim sistemom;

A_s = površina vrha za α -holestanol, izračunana z računalniškim sistemom;

m_s = masa dodanega α -holestanola, v miligramih;

m = masa vzorca, uporabljenega za določanje, v gramih.

6. IZRAŽANJE REZULTATOV

6.1. Zabeležite posamezne koncentracije sterola kot mg/kg maščobe in njihovo vsoto kot „steroli skupaj“.

Sestavo vsakega posameznega sterola ter eritrodiola in uvaola je treba izraziti na eno decimalno mesto natančno.

Vsoto skupnih sterolov je treba izraziti brez decimalk.

▼ M28

6.2. Izračunajte odstotek za vsak posamezni sterol iz razmerja med ustrezno površino vrha in površino vseh sterolnih vrhov:

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

pri čemer:

A_x = površina vrha x;

$\sum A$ = površina vseh sterolnih vrhov.

▼ M26

6.3. Navidezni β -sitosterol: $\Delta^5,23$ -stigmastadienol + klerosterol + β -sitosterol + sitostanol + Δ^5 -avenasterol + $\Delta^5,24$ -stigmastadienol.

▼ M26

6.4. Izračunajte delež eritrodiola in uvaola:

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

pri čemer je

ΣA = površina vseh vrhov za sterol, izračunana z računalniškim sistemom;

Er = površina vrha za eritrodiol, izračunana z računalniškim sistemom;

Uv = površina vrha za uvaol, izračunana z računalniškim sistemom.

▼ **M26***Dodatek***Določanje linearne hitrosti plina**

Pri nastavitvi plinskega kromatografa na normalne delovne pogoje vbrizgajte 1 do 3 µl metana (ali propana) in izmerite čas, ki ga plin potrebuje za pot skozi kolono, od trenutka vbrizganja do trenutka, ko se pojavi vrh (tM).

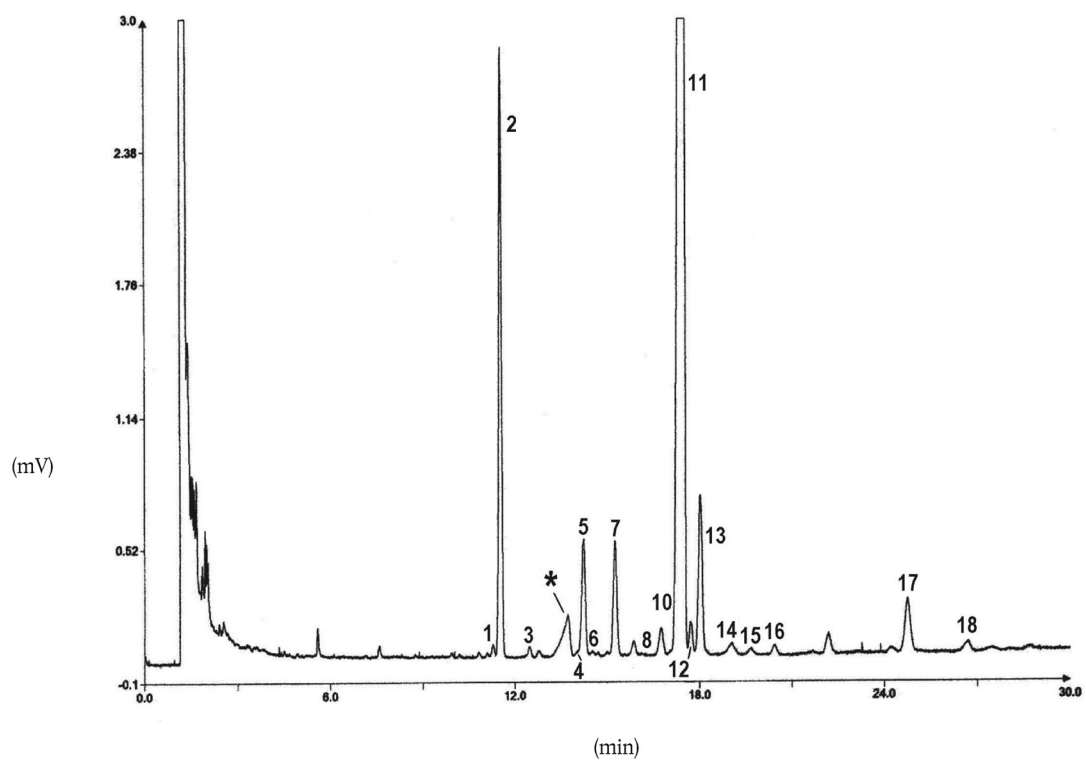
Linearna hitrost v cm/s je podana z L/t_M , pri čemer je L dolžina kolone v centimetrih in tM izmerjeni čas v sekundah.

*Tabela 1***Relativni retenzijski časi sterolov**

Vrh	Identifikacija		Relativni retenzijski čas	
			Kolona SE 54	Kolona SE 52
1	holesterol	Δ -5-holesten-3 β -ol	0,67	0,63
2	holestanol	5 α -holestan-3 β -ol	0,68	0,64
3	brasikasterol	[24S]-24-metil- Δ -5,22-holestadien-3 β -ol	0,73	0,71
*	ergosterol	[24S]-24-metil- Δ -5-7-22-holestatrien-3 β -ol	0,78	0,76
4	24-metilen-holesterol	24-metilen- Δ -5,24-holestadien-3 β -ol	0,82	0,80
5	kampesterol	(24R)-24-metil- Δ -5-holesten-3 β -ol	0,83	0,81
6	kampestanol	(24R)-24-metil-holestan-3 β -ol	0,85	0,82
7	stigmasterol	(24S)-24-etil- Δ -5,22-holestadien-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ -7-kampesterol	(24R)-24-metil- Δ -7-holesten-3 β -ol	0,93	0,92
9	Δ -5,23-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,23-holestadien-3 β -ol	0,95	0,95
10	klerosterol	(24S)-24-etil- Δ -5,25-holestadien-3 β -ol	0,96	0,96
11	β -sitosterol	(24R)-24-etil- Δ -5-holesten-3 β -ol	1,00	1,00
12	sitostanol	24-etil-holestan-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ -5-avenasterol	(24Z)-24-etiliden- Δ -holesten-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ -5-24-stigmastadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,24-holestadien-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ -7-stigmastenol	(24R,S)-24-etil- Δ -7-holesten-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasterol	(24Z)-24-etiliden- Δ -7-holesten-3 β -ol	1,16	1,16
17	eritrodiol	5 α -olean-12-en-3 β 28-diol	1,41	1,41
18	uvaol	Δ 12-ursen-3 β 28-diol	1,52	1,52

▼ **M26***Slika 1*

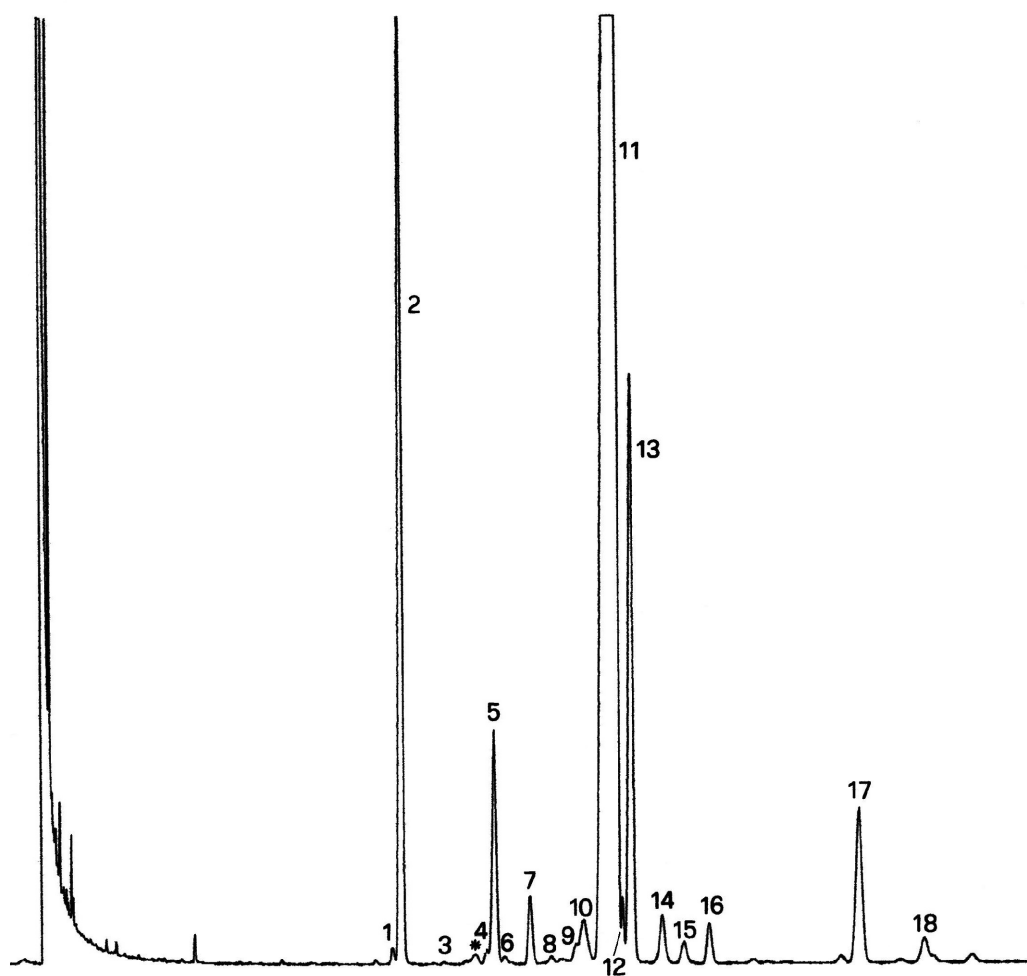
Plinski kromatogram sterolnih in triterpenskih dialkoholnih frakcij lampante oljčnega olja (z dodanim notranjim standardom)



▼ M26

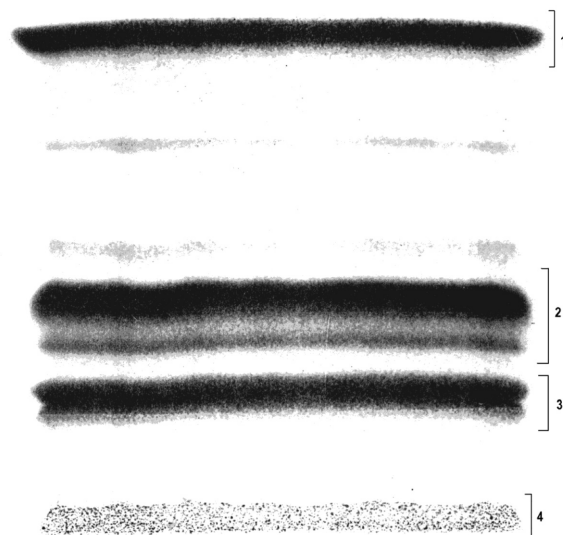
Slika 2

Plinski kromatogram sterolnih in triterpenskih dialkoholnih frakcij rafiniranega oljčnega olja
(z dodanim notranjim standardom)



▼ **M26***Slika 3*

Tankoplastna kromatografija olja iz oljčnih tropin s površino, s katere je treba odstraniti silikagel za določitev sterolov in triterpenskih dialkoholov



- 1 – skvalen
- 2 – triterpensi in alifatski alkoholi
- 3 – steroli in triterpensi dialkoholi
- 4 – začetne in proste maščobne kisline

▼ **M21***PRILOGA VII***DOLOČANJE ODSOTNEGA DELEŽA 2-GLICERIL MONOPALMITATA****1. PREDMET UREJANJA IN PODROČJE UPORABE**

S to metodo je opisan analitski postopek za določevanje odstotnega deleža palmitinske kisline na položaju 2 v trigliceridih z ovrednotenjem 2-gliceril monopalmitata.

To metodo uporabljamo za rastlinska olja, tekoča pri sobni temperaturi (20 °C).

2. PRINCIP

Po pripravi pustimo, da na vzorec olja učinkuje pankreatična lipaza: poteče delna hidroliza, specifična za položaja 1 in 3 v molekuli triglicerida, ki povzroči nastanek 2-monoacilglicerolov. Odstotni delež 2-gliceril monopalmitata v monoacilglicerolni frakciji se po sililiranju določi s kapilarno plinsko kromatografijo.

3. APARATURE IN OBIČAJNA LABORATORIJSKA OPREMA

3.1 Erlenmajerica, 25 ml

3.2 Čaše 100, 250 in 300 ml

3.3 Steklena kromatografska kolona z notranjim premerom 21–23 mm, dolžine 400 mm, opremljena s sintrano stekleno ploščico in petelinčkom

3.4 Merilni valji prostornine 10, 50, 100 in 200 ml

3.5 Bučke prostornine 100 in 250 ml

3.6 Rotavapor

3.7 Epruvete za centrifugiranje prostornine 10 ml s koničnim dnom in obrušenim zamaškom

3.8 Centrifuga za epruvete prostornine 10 in 100 ml

3.9 Termostat, ki omogoča vzdrževanje temperature pri 40 °C ± 0,5 °C

3.10 Merilni pipeti prostornine 1 in 2 ml

3.11 Brizgalka prostornine 1 ml

3.12 Mikrobrizgalka prostornine 100 µl

3.13 Lij-ločnik, 1 000 ml

3.14 Plinski kromatograf za kapilarne kolone, opremljen z injicirnim sistemom za hladno injiciranje vzorca neposredno v kolono in pečjo, ki lahko vzdržuje izbrano temperaturo znotraj 1 °C

3.15 Injektor za hladno injiciranje vzorca neposredno v kolono

3.16 Plamensko ionizacijski detektor in elektrometer

3.17 Rekorder-integrator, kompatibilen z elektrometrom, z odzivnim časom, manjšim od 1 sekunde, in nastavljivo hitrostjo pomika papirja

3.18 Steklena ali kvarčna kapilarna kolona dolžine 8 do 12 m, z notranjim premerom 0,25 do 0,32 mm, pokrita z metilpolisiloksanom ali 5-odstotnim fenil metilpolisiloksanom, debeline 0,10–0,30 µm, ki jo je mogoče uporabiti pri 370 °C

▼ **M21**

- 3.19 Mikrobrizgalka prostornine 10 µl z nesnemljivo, vsaj 7,5 cm dolgo iglo, za neposredno vbrizganje na začetek kolone

4. REAGENTI

- 4.1 Silikagel z velikostjo delcev med 0,063 in 0,200 mm (70/280 mesh), pripravljen na naslednji način: silikagel damo v porcelansko posodico, ga pri 160 °C 4 ure sušimo v sušilniku, nato pa pustimo, da se na sobni temperaturi ohladi v eksikatorju. Nato dodamo količino vode, ki ustreza 5 % teže silikagela: v erlenmajerico prostornine 500 ml natehemo 152 g silikagela in dodamo 8 g destilirane vode, zamašimo ter homogeniziramo. Pred uporabo pustimo mirovati vsaj 12 ur.

- 4.2 n-heksan (kromatografske čistoče)

- 4.3 Izopropanol

- 4.4 Izopropanol, vodna raztopina 1/1 (V/V)

- 4.5 Pankreatična lipaza. Aktivnost uporabljene lipaze mora biti med 2,0 in 10 lipaznimi enotami na mg (*V prodaji so pankreatične lipaze z aktivnostjo med 2 in 10 enotami na mg encima.*)

- 4.6 Pufirska raztopina tris-hidroksi-metilaminometana: 1 M vodna raztopina, ki ji s koncentrirano HCl (1/1 V/V) uravnamo pH na vrednost 8 (preverimo s pH-metrom)

- 4.7 Natrijev holat, encimske čistosti, 0,1-odstotna vodna raztopina (to raztopino je treba uporabiti v petnajstih dneh po pripravi)

- 4.8 Kalcijev klorid, 22-odstotna vodna raztopina

- 4.9 Dietil eter kromatografske čistoče

- 4.10 Elucijsko topilo: mešanica n-heksana/dietilnega etra (87/13) (V/V)

- 4.11 Natrijev hidroksid, 12-odstotna raztopina v masnih odstotkih

- 4.12 Fenolftalein, 1-odstotna raztopina v etanolu

- 4.13 Nosilni plin: vodik ali helij, za plinsko kromatografijo

- 4.14 Pomožna plina: vodik, najmanj 99-odstoten, brez vlage in organskih snovi, in zrak, za plinsko kromatografijo in enake čistoče

- 4.15 Regent za silaniziranje: mešanica piridina, heksametildisilazana, trimetilklorosilana v razmerju 9:3:1 (V/V/V) (V prodaji so raztopine, pripravljene za uporabo. Uporabimo lahko tudi druge reagentne za silaniziranje, zlasti bis-trimetilsilil trifluoroacetamid + 1-odstoten trimetilklorosilan, razredčen z enako količino brezvodnega piridina.)

- 4.16 Referenčni vzorci: čisti monogliceridi ali mešanice monogliceridov, za katere je znano, da imajo podobno odstotkovno sestavo kot vzorec.

5. POSTOPEK

5.1 Priprava vzorca

- 5.1.1 Olj z deležem prostih kislin, manjšim od 3 %, pred kolonsko kromatografijo ni treba nevtralizirati s silikagelom. Olja, katerih delež prostih kislin je večji od 3 %, je treba nevtralizirati v skladu s točko 5.1.1.1.

▼ **M21**

- 5.1.1.1 V lij-ločnik prostornine 1 000 ml (3.13) vlijemo 50 g olja in 200 ml n-heksana. Dodamo 100 ml izopropanola in tako količino 12-odstotne raztopine natrijevega hidroksida (4.11), da ustreza deležu prostih kislin, povečanemu za 5 odstotkov. Eno minuto močno stresamo. Dodamo 100 ml destilirane vode, ponovno pretresemo in pustimo, da se usede.

Po ločevanju odstranimo spodnjo plast, ki vsebuje mila. Odstranimo morebitne vmesne plasti (sluz in netopne snovi). Heksansko raztopino nevtraliziranega olja izpiramo z zaporednimi 50- do 60-mililitrskimi odmerki raztopine izopropanola in vode 1/1 (V/V) (4.4) tako dolgo, da je izpiralna faza nevtralna na fenolftalein.

Večino heksana odstranimo z destilacijo v vakuumu (uporabimo na primer rotavapor) in olje prelijemo v 100-mililitrsko bučko (3.5). Olje sušimo v vakuumu, dokler se topilo v celoti ne odstrani.

Po koncu tega postopka mora biti vsebnost kislin v olju manjša od 0,5 %.

- 5.1.2 V erlenmajerico prostornine 25 ml damo 1,0 g olja, pripravljenega po spodnjih navodilih (3.1), in ga raztopimo v 10 ml razvijalne mešanice (4.10). Pred kolonsko kromatografijo s silikagelom raztopino pustimo mirovati najmanj 15 minut.

Če je raztopina motna, jo centrifugiramo, da zagotovimo optimalne pogoje za kromatografijo. (Uporabimo lahko komercialne 500-mg silikagelne kartuše SPE.)

- 5.1.3 *Priprava kromatografske kolone*

V kolono (3.3) vlijemo približno 30 ml razvijalnega topila (4.10), s stekleno paličko v spodnji del kolone vstavimo košček vate; stisnemo, da odstranimo zrak.

V čaši pripravimo raztopino 25 g silikagela (4.1) v približno 80 ml razvijalne raztopine in jo z lijakom prelijemo v kolono.

Preverimo, da smo v kolono dali ves silikagel; speremo z elucijskim topilom (4.10), odpremo petelinček in pustimo, da raven tekočine seže približno 2 mm nad zgornjo raven silikagela.

- 5.1.4 *Kolonska kromatografija*

V erlenmajerico prostornine 25 ml (3.1.) natehramo natanko 1,0 g vzorca, ki smo ga pripravili v skladu s točko 5.1.

Vzorec raztopimo v 10 ml elucijskega topila (4.10). Raztopino prelijemo v kromatografsko kolono, ki smo jo pripravili v skladu s točko 5.1.3. Pazimo, da ne premešamo površine kolone.

Odpremo ventil in pustimo raztopino vzorca odtekati, dokler ne doseže ravni silikagela. Eluiramo s 150 ml razvijalnega topila. Količino pretoka nastavimo na 2 ml/min (tako da 150 ml odteče v kolono v približno 60–70 minutah).

Eluat zberemo v 250-mililitrsko bučko z znano maso. V vakuumu odparimo topilo in njegove zadnje sledi odstranimo s tokom dušika.

Bučko stehamo in izračunamo pridobljeni ekstrakt

▼ M21

(Če uporabljamo silikagelne kartuše SPE, storimo naslednje: v kartuše, ki smo jih predhodno kondicionirali s 3 ml n-heksana, vlijemo 1 ml raztopine (5.1.2).

Po filtraciji raztopine razvijemo s 4 ml n-heksana/dietilnega etra 9/1 (V/V).

Eluat zberemo v 10-mililitrsko epruveto in ga z uvajanjem toka dušika odparimo do suhega.

Na suhem preostanku pustimo učinkovati pankreatično lipazo (5.2). Ključno je, da pred in po uporabi kartuše SPE preverimo sestavo maščobnih kislin.

5.2 Hidroliza s pankreatično lipazo

5.2.1 V epruveto centrifuge natehemo 0,1 g olja, pripravljenega v skladu s točko 5.1. Dodamo 2 ml pufrske raztopine (4.6), 0,5 ml raztopine natrijevega holata (4.7) in 0,2 ml raztopine kalcijevega klorida, pri čemer po vsakem dodajanju dobro pretresemo. Epruveto zapremo z obrušnim zamaškom in jo namestimo v termostat, naravn na $40 \pm 0,5$ °C.

5.2.2 Dodamo 20 mg lipaze, previdno pretresemo (pazimo, da ne zmočimo zamaška) in damo epruveto za natanko 2 minuti v termostat, nato jo damo ven, jo natanko 1 minuto močno stresamo in pustimo, da se ohladi.

5.2.3 Dodamo 1 ml dietilnega etra, zamašimo in močno stresamo, nato centrifugiramo ter raztopino etra z mikrobrizgalko prenesemo v čisto in suho epruveto.

5.3 Priprava silaniziranih derivatov in plinska kromatografija

5.3.1 Z mikrobrizgalko prenesemo 100 µl raztopine (5.2.3) v epruveto prostornine 10 ml s koničastim dnom.

5.3.2 Topilo odstranimo z uvajanjem rahlega toka dušika, dodamo 200 µl reagenta za silaniziranje (4.15), zamašimo epruveto in pustimo mirovati 20 minut.

5.3.3 Po 20 minutah dodamo 1 do 5 ml n-heksana (odvisno od kromatografskih pogojev): raztopina, ki jo dobimo, je nared za plinsko kromatografijo.

5.4 Plinska kromatografija

Pogoji za postopek so naslednji:

- temperatura injektorja (injektor za vbrizgavanje v kolono) mora biti nižja od temperature vrelišča topila (68 °C),
- temperatura detektorja: 350 °C,
- temperatura kolone: programiranje temperature peči: 1 minuto pri 60 °C, s hitrostjo segrevanja 15 °C na minuto, dokler ne dosežemo temperature 180 °C, nato s hitrostjo 5 °C na minuto, dokler ne dosežemo temperature 340 °C, nato 13 minut pri 340 °C,
- nosilni plin: vodik ali helij, nastavljen na ustrezno linearno hitrost, da dosežemo resolucijo, navedeno na Sliki 1. Retencijski čas triglicerida C₅₄ mora biti 40 + 5 minut (glej Sliko 2); (Pogoji za spodaj navedene postopke so okvirni. Vsak izvajalec jih mora optimizirati, da doseže želeno resolucijo. Najmanjša višina vrha za 2-gliceril monopalmitat mora biti enaka 10 % polne skale rekorderja.),

▼ M21

— količina injicirane snovi: 0,5-1 µl raztopine (5 ml) n-heksana (5.3.3).

5.4.1 *Identifikacija vrhov*

Posamezne monoacilglicerole identificiramo na podlagi dobljenih retencijskih časov in glede na čase, dobljene za standardne mešanice mono-gliceridov, analizirane pri enakih pogojih.

5.4.2 *Kvantitativna analiza*

Površina vsakega vrha se izračuna z elektronskim integratorjem.

6. **PODAJANJE REZULTATOV**

Odstotek gliceril monopalmitata izračunamo iz razmerja med ustrezno površino vrha in vsoto površin vrhov vseh monoacilglicerolov (glej Sliko 2), in sicer na podlagi formule:

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

kjer je:

A_x = površina vrha gliceril monopalmitata

ΣA = vsota površin vseh vrhov monoacilglicerolov

Rezultat je treba podati na eno decimalno natančno.

7. **POROČILO O ANALIZI**

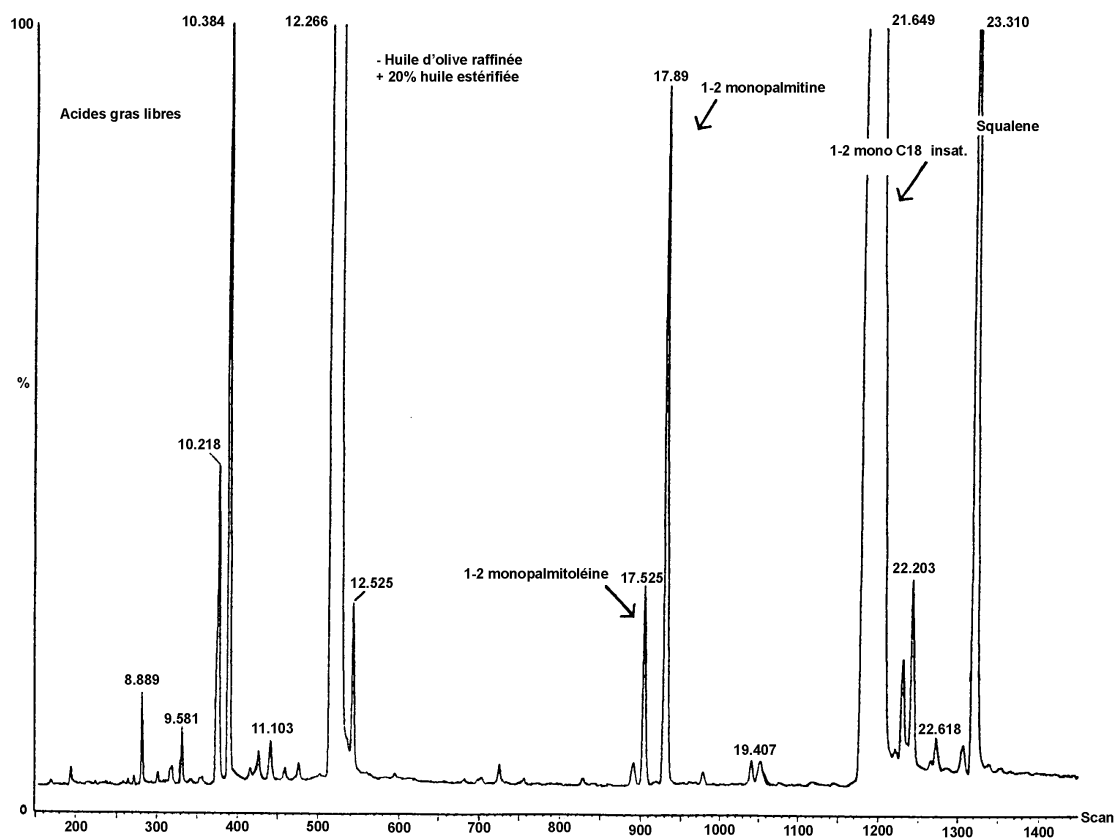
V poročilu o analizi je treba podrobno navesti:

- sklicevanje na to metodo,
- vse informacije, potrebne za popolno identifikacijo vzorca,
- rezultat analize,
- vsako odstopanje od te metode, ne glede na to, ali gre za odločitev zadevnih oseb ali zaradi kakega drugega razloga,
- podrobne podatke o laboratoriju, datum analize in podpis njenih odgovornih oseb.

▼ M21

Slika 1

Kromatogram proizvodov reakcije silaniziranja, dobljenih z delovanjem lipaze na rafiniranem oljčnem olju, ki mu je dodanih 20 % 100 % zaestrenega olja



Legenda: Acides gras libres = proste maščobne kisline Huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée = rafinirano oljčno olje + 20 % zaestrenega olja 1-2 monopalmitate = 1-2 monopalmitat 1-2 monopalmitoléine = 1-2 monopalmitolein 1-2 mono C₁₈ insat. = 1-2 mono C₁₈ nenasič. squalène = skvalen.

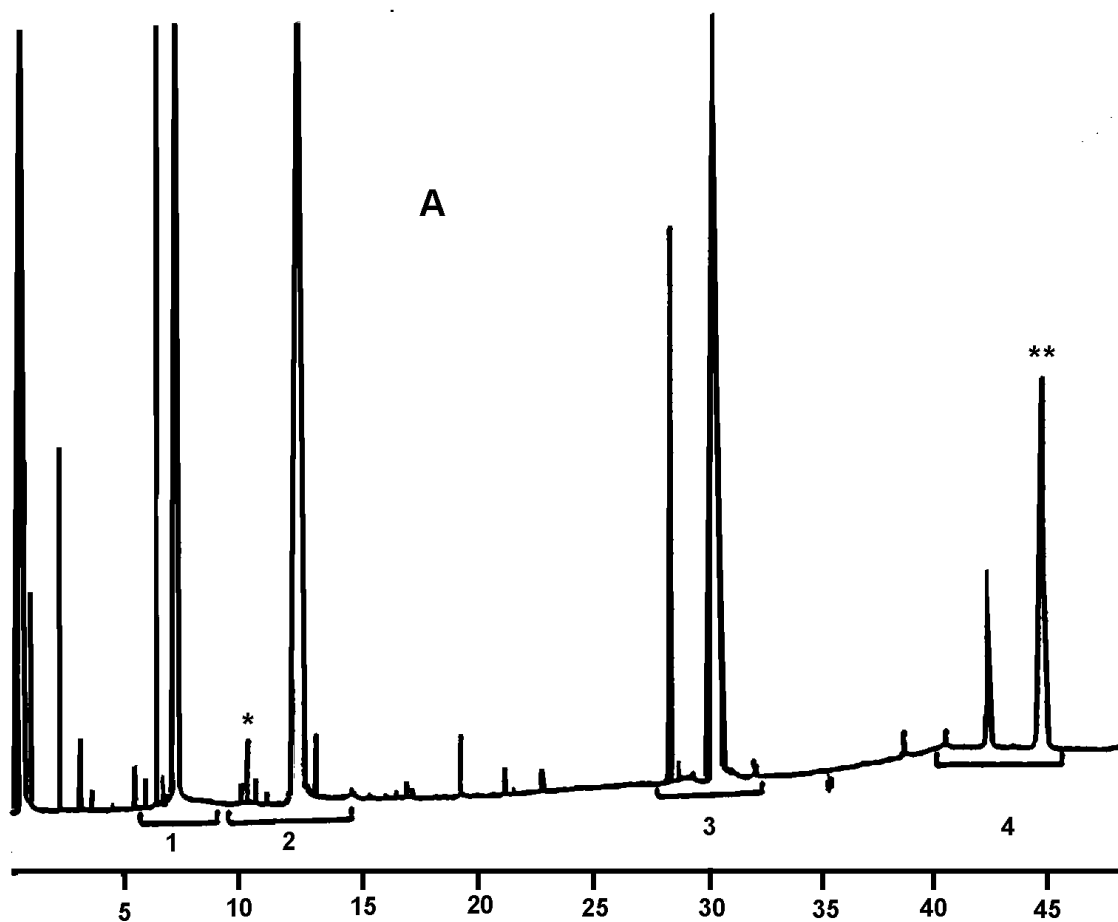
▼ **M21**

Slika 2

Kromatogram

(A) nezaestrenega oljčnega olja po delovanju lipaze, in silaniziranega; pri teh pogojih (kapilarna kolona 8–12 m) frakcija voskov eluira hkrati s frakcijo diacilglicerolov ali malo zatem.

Vsebnost triacilglicerolov po lipazi ne sme preseči 15 %.

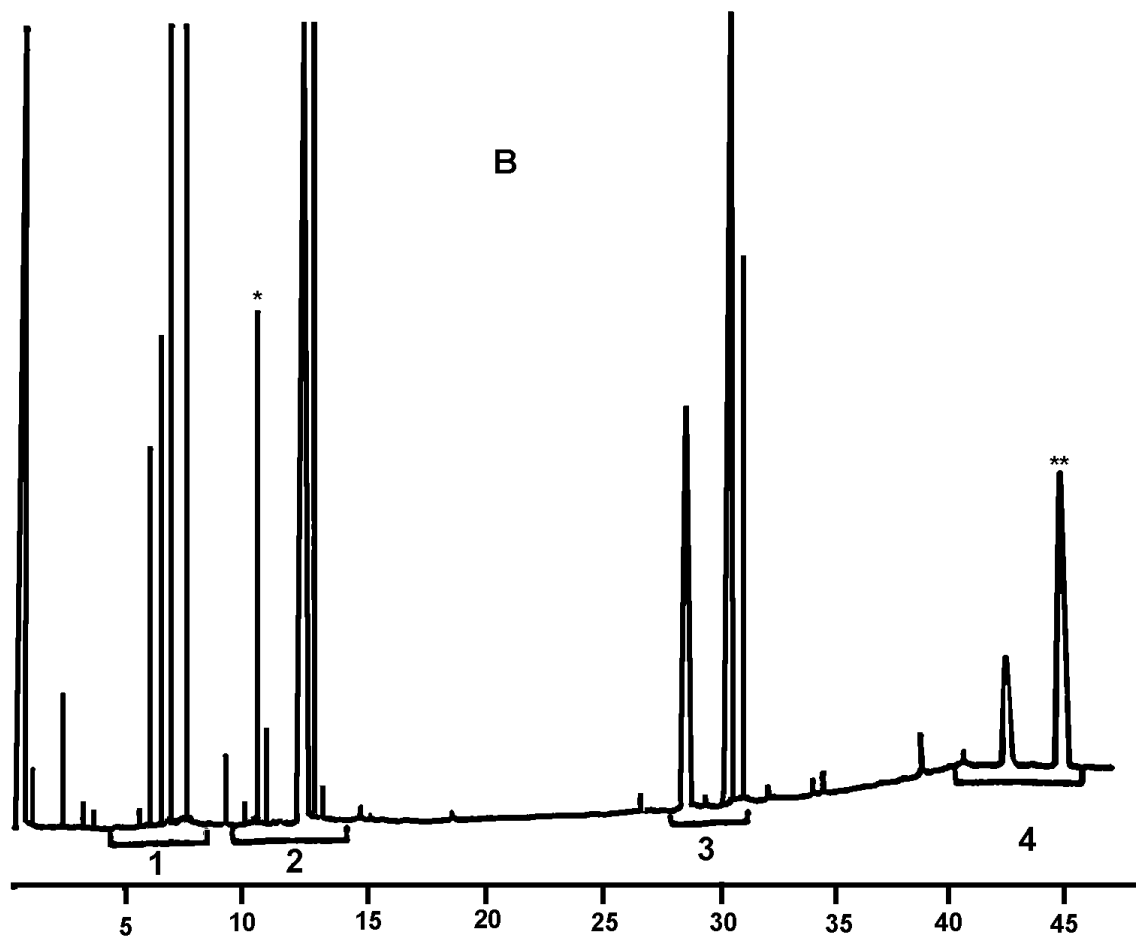
*Legenda:*

- 1 = Proste maščobne kisline
- 2 = Monoacilgliceroli
- 3 = Diacilgliceroli
- 4 = Triacilgliceroli
- (*) = 2-monopalmitin
- (**) = Triacilglicerol C₅₄

▼ **M21****Kromatogram:**

(B) zaestrenega olja po delovanju lipaze; po silaniziranju; pri teh pogojih (kapilarna kolona 8–12 m) frakcija voskov eluira hkrati s frakcijo diglicerida ali malo zatem.

Vsebnost trigliceridov po lipazi ne sme preseči 15 %

*Legenda:*

- 1 = Proste maščobne kisline
- 2 = Monogliceridi
- 3 = Digliceridi
- 4 = Trigliceridi
- (*) = 2-monopalmitin
- (**) = Triglicerid C₅₄

▼ **M21**

8. OPOMBE

Opomba 1. PRIPRAVA LIPAZE

Lipaze z zadostno aktivnostjo so komercialno dostopne. Lahko jih pripravimo tudi v laboratoriju, in sicer na naslednji način:

5 kg sveže prašičje trebušne slinavke ohladimo na 0 °C. Odstranimo okoliško trdo maščevje in vezno tkivo ter jo zmeljemo v mlinčku z rezili, da dobimo kašasto tekočino. To tekočino 4 do 6 ur mešamo z 2,5 litra brezvodnega acetona in nato centrifugiramo. Izvleček naredimo še trikrat z enako količino acetona, nato dvakrat z mešanico acetona/dietilnega etra (1/1) (V/V) in dvakrat z dietilnim etrom.

Preostanek 48 ur sušimo v vakuumu, da dobimo stabilen prah, ki ga je treba dolgo časa hraniti v hladilniku in pred vlago.

Opomba 2. PREVERJANJE AKTIVNOSTI LIPAZE

Oljno emulzijo pripravimo na naslednji način:

V mešalniku 10 minut mešamo mešanico 165 ml raztopine gumarabikuma (100 g/l), 15 g zdrobljenega ledu in 20 ml predhodno nevtraliziranega oljčnega olja.

V čašo prostornine 50 ml zaporedoma damo 10 ml te emulzije, nato 0,3 ml raztopine natrijevega holata (0,2 g/ml) in 20 ml destilirane vode.

Čašo damo v termostat, naravnan na 37 °C; namestimo elektrode pH metra in spiralni mešalnik.

Z bireto po kapljicah dodajamo raztopino natrijevega hidroksida 0,1 N, dokler ne dobimo pH vrednosti 8,3.

Dodamo ustrezno količino v vodi raztopljene lipaze v prahu (0,1 g/ml lipaze). Takoj ko pH meter pokaže pH 8,3, sprožimo štoparico in po kapljah dodajamo raztopino natrijevega hidroksida, in sicer s tako hitrostjo, da ohranimo pH vrednost 8,3. Vsako minuto odčitamo volumen porabljene raztopine.

Podatke zabeležimo v sistem koordinatnih osi, in sicer odčitke časa navedemo kot absciso, kot ordinato pa ml alkalne raztopine 0,1 N, ki smo jih porabili za ohranitev konstantnega pH. Dobiti moramo linearen graf.

Aktivnost lipaze, izmerjena v lipaznih enotah na mg, je izražena z naslednjo formulo:

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

kjer je:

A aktivnost v lipaznih enotah/mg

V število ml raztopine natrijevega hidroksida 0,1 N na minuto (izračunano iz grafa)

N normalnost raztopine natrijevega hidroksida

m masa vzorca lipaze v mg.

Lipazna enota je opredeljena kot količina encima, ki sprosti 10 mikro-ekvivalentov kisline na minuto.

▼ **M20**

▼ M28

PRILOGA IX

SPEKTROFOTOMETRIČNO MERJENJE NA UV-OBMOČJU

PREGOVOR

Spektrofotometrično merjenje na UV-območju lahko daje informacije o kakovosti maščobe, njenem stanju ohranitve in spremembah, ki so jih v njej povzročili tehnološki procesi. Absorpcijo valovnih dolžin, določenih v postopku, povzroči prisotnost konjugiranih dienov in trienov, ki so posledica oksidacije in/ali rafinacije. Te absorpcije so izražene kot specifične ekstinkcije $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (ekstinkcija 1-odstotne w/v raztopine maščobe v specifičnem topilu, v 10-milimetrski kivetki), konvencionalno označene s K (imenuje se tudi „ekstinkcijski koeficient“).

1. NAMEN

Ta priloga opisuje postopek za izvajanje spektrofotometričnega merjenja oljčnega olja na UV-območju.

2. PRINCIP METODE

Vzorec se raztopi v zahtevanem topilu in absorbanca raztopine se izmeri pri specifični valovni dolžini glede na čisto topilo.

Specifične ekstinkcije pri 232 nm in 268 nm v izooktanu ali 232 nm in 270 nm v cikloheksanu se izračunajo za koncentracijo 1 % w/v v 10-milimetrski kivetki.

3. OPREMA

- 3.1 Spektrofotometer, primeren za meritve pri ultravijoličnih valovnih dolžinah (220 nm do 360 nm), z zmožnostjo odčitavanja posameznih nanometričnih enot. Redni pregledi so priporočljivi zaradi natančnosti in obnovljivosti lestvic absorbance in valovnih dolžin ter zaradi razpršene svetlobe.

- 3.1.1 *Lestvica valovnih dolžin*: preveriti jo je mogoče z referenčnim materialom, ki ga sestavlja filter iz optičnega stekla s holmijevim oksidom ali raztopino holmijevega oksida (zatesnjeno ali ne), ki ima izrazite absorpcijske pasove. Referenčni material je namenjen preverjanju in kalibriranju lestvic valovnih dolžin spektrofotometrov za vidno in ultravijolično svetlobo z nominalnimi spektralnimi širinami 5 nm ali manj. Meritve se izvedejo proti zraku kot slepemu vzorcu v razponu valovnih dolžin od 640 do 240 nm v skladu z navodili, priloženimi referenčnemu materialu. Pri vsaki spremembi širine špranje se izvede korekcija bazne linije s prazno potjo svetlobnega pramena. Valovne dolžine v skladu s standardom so navedene v potrdilu referenčnega materiala.

- 3.1.2 *Lestvica absorbance*: preveriti jo je mogoče z zatesnjenim referenčnim materialom, ki je v prodaji in ki ga sestavljajo kisle raztopine kalijevega dikromata, v določenih koncentracijah in certificiranih vrednostih absorbance pri valovni dolžini maksimalne absorbance (v nadaljnjem besedilu: λ_{max}) (iz 4 raztopin kalijevega dikromata in perklorove kisline, ki so zaprti v štirih ultravijoličnih kvarčnih kivetah za merjenje linearnosti in fotometrične natančnosti na ultravijoličnem območju). Raztopine kalijevega dikromata se izmerijo proti slepemu vzorcu uporabljene kisline, po korekciji bazne linije, v skladu z navodili, priloženimi referenčnemu materialu. Vrednosti absorbance so navedene v potrdilu referenčnega materiala.

Drug način preverjanja odzivnosti fotocelice in fotopomnoževalke je naslednji: natehtajte 0,2000 g čistega kalijevega dikromata za spektrofotometrijo in raztopite 0,05 raztopine N kalijevega hidroksida v 1 000-mililitrsko graduirano bučko in dolijte do oznake. Vzemite natančno 25 ml dobljene raztopine, prenesite jo v 500-mililitrsko graduirano bučko in razredčite do oznake z isto raztopino kalijevega hidroksida.

▼M28

Izmerite ekstinkcijo tako dobljene raztopine pri 275 nm, raztopino kalijevega hidroksida uporabite kot referenco. Ekstinkcija, izmerjena z uporabo 1 cm kivete, bi morala biti $0,200 \pm 0,005$.

- 3.2 Pravokotne kvarčne kivete, s pokrovčki, primerne za meritve pri ultravijoličnih valovnih dolžinah (220 do 360 nm), z optičnim dosegom 10 mm. Če jih napolnimo z vodo ali drugim primernim topilom, ne smejo kazati razlik med njimi za več kot 0,01 ekstinkcijske enote.

- 3.3 Merilne bučke z eno oznako s prostornino 25 ml, razred A.

- 3.4 Analitska tehnica, ki omogoča tehtanje do 0,0001 g natančno.

4. REAGENTI

Če ni določeno drugače, pri analizi uporabite le reagente priznane čistoče za analizo in destilirano ali demineralizirano vodo ali vodo enakovredne čistoče.

Topilo: izooktan (2,2,4-trimetilpentan) za merjenje pri 232 nm in 268 nm ter cikloheksan za merjenje pri 232 nm in 270 nm z absorbanco, manjšo od 0,12 pri 232 nm in manjšo od 0,05 pri 270 nm, proti destilirani vodi, izmerjeno v 10-milimetrski kiveti.

5. POSTOPEK

- 5.1 Vzorec mora biti popolnoma homogen in brez suspendiranih nečistoč. Sicer ga je treba filtrirati skozi papir pri temperaturi približno 30 °C.

- 5.2 Točno natehtajte približno 0,25 g (na 1 mg natančno) tako pripravljenega vzorca v 25-mililitrsko merilno bučko, dopolnite do oznake s specifičnim topilom in homogenizirajte. Tako pripravljena raztopina mora biti popolnoma čista. Če je raztopina opalescentna ali motna, hitro prefiltrirajte skozi papir.

OPOMBA: Na splošno za merjenje absorbance deviških in ekstra deviških oljčnih olj pri 268 nm in 270 nm zadostuje masa 0,25–0,30 g. Za merjenje pri 232 nm je običajno potrebnega 0,05 g vzorca, zato se običajno pripravi dve ločeni raztopini. Za merjenje absorbance olj iz oljčnih tropin, rafiniranih oljčnih olj in oljčnih olj s primesmi je zaradi njihove večje absorbance običajno potreben manjši vzorec, npr. 0,1 g.

- 5.3 Če je potrebno, popravite bazno linijo (220–290 nm) s topilom v obeh kvarčnih kivetah (vzorčni in referenčni), potem napolnite vzorčno kvarčno kiveto s preskusno raztopino in izmerite ekstinkcije pri 232, 268 ali 270 nm nasproti topilu, ki se uporabi kot referenca.

Izmerjene ekstinkcijske vrednosti morajo biti v razponu od 0,1 do 0,8 ali v razponu linearnosti spektrofotometra, ki jo je treba preveriti. Če niso, je treba meritve ponoviti z ustreznimi bolj koncentriranimi ali bolj razredčenimi raztopinami.

- 5.4 Po opravljenih meritvah absorbance pri 268 ali 270 nm izmerite absorbanco pri $\lambda_{\max}$, $\lambda_{\max} + 4$ in $\lambda_{\max} - 4$. Na podlagi teh vrednosti absorbance se določi variacija specifične ekstinkcije (ΔK).

OPOMBA: $\lambda_{\max}$ se obravnava kot 268 nm za izooktan, ki se uporablja kot topilo, in 270 nm za cikloheksan.

▼ M28

6. IZRAŽANJE REZULTATOV

- 6.1 Zapišite specifične ekstinkcije (ekstinkcijske koeficiente) pri različnih valovnih dolžinah, izračunane, kot sledi:

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

pri čemer:

$K\lambda$ = specifična ekstinkcija pri valovni dolžini λ ;

$E\lambda$ = ekstinkcija, izmerjena pri valovni dolžini λ ;

c = koncentracija raztopine v g/100 ml;

s = dolžina poti kvarčne kivete v cm;

izražene na dve decimalni mesti natančno.

6.2 Variacija specifične ekstinkcije (ΔK)

Variacija absolutne vrednosti ekstinkcije (ΔK) se izračuna na naslednji način:

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

pri čemer je K_m specifična ekstinkcija pri valovni dolžini maksimalne absorbance pri 270 nm in 268 nm, odvisno od uporabljenega topila.

Rezultati se izrazijo na dve decimalni mesti natančno.

▼ **M28***PRILOGA X***DOLOČANJE METILNIH ESTROV MAŠČOBNIH KISLIN S PLINSKO KROMATOGRAFIJO****1. NAMEN**

V tej prilogi so navodila za določanje prostih in vezanih maščobnih kislin v masti in oljih rastlinskega izvora s plinsko kromatografijo po njihovi pretvorbi v metil estre maščobnih kislin (FAME).

Vezane maščobne kisline triacilglicerolov (TAG) in glede na metodo esterifikacije proste maščobne kisline (FFA) se pretvorijo v metil estre maščobnih kislin (FAME), ki se določijo s kapilarno plinsko kromatografijo.

Metoda iz te priloge omogoča določitev FAME od C₁₂ do C₂₄, vključno z nasičenimi, cis in trans mononenasičenimi ter cis in trans polinenasičenimi metil estri maščobnih kislin.

2. PRINCIP

Plinska kromatografija se uporablja za kvantitativno analizo FAME. FAME se pripravijo v skladu z delom A. Potem se vbrizgajo v injektor in v njem uparijo. Ločevanje FAME se izvaja z analitskimi kolonami s specifično polarnostjo in dolžino. Za ugotavljanje prisotnosti FAME se uporablja plamensko-ionizacijski detektor. Pogoji analize so določeni v delu B.

Kot nosilni plin (mobilna faza) v plinski kromatografiji FAME s plamensko-ionizacijskim detektorjem se lahko uporabi vodik ali helij. Vodik pospeši ločevanje in zagotovi ostrejša vrhove. Stacionarna faza je mikroskopska plast tankega tekočega filma na inertni trdni podlagi iz zlitega silicijevega dioksida.

Pri prehodu skozi kapilarno kolono hlapne spojine, ki se analizirajo, reagirajo s stacionarno fazo, ki je nanosena na notranji površini kolone. Zaradi različnih reakcij različnih spojin je čas eluiranja teh spojin različen, tj. retenzijski čas spojine za določen sklop analiznih parametrov. Primerjava retenzijskih časov se uporablja za določanje različnih spojin.

DEL A**PRIPRAVA METILNIH ESTROV MAŠČOBNIH KISLIN IZ OLJČNEGA OLJA IN OLJA IZ OLJČNIH TROPIN****1. NAMEN**

Ta del določa pripravo metilnih estrov maščobnih kislin. Vključuje metode za pripravo metilnih estrov maščobnih kislin iz oljčnega olja in olja iz oljčnih tropin.

2. PODROČJE UPORABE

Priprava metilnih estrov maščobnih kislin iz oljčnega olja in olja iz oljčnih tropin se izvaja s transesterifikacijo z metanolno raztopino kalijevega hidroksida pri sobni temperaturi. Potreba po čiščenju vzorca pred transesterifikacijo je odvisna od vsebnosti prostih maščobnih kislin v vzorcu in analitskega parametra, ki se lahko določi glede na naslednjo preglednico:

▼ **M28**

Kategorija olja	Metoda
Deviško oljčno olje z vsebnostjo kislin $\leq 2,0$ %	1. maščobne kisline 2. transmaščobne kisline 3. Δ ECN42 (po čiščenju z ekstrakcijo v trdni fazi na silikagelnih kartušah)
Rafinirano oljčno olje	
Oljčno olje, sestavljeno iz rafiniranih oljčnih olj in deviških oljčnih olj	
Rafinirano oljčno olje iz oljčnih tropin	
Oljčno olje iz oljčnih tropin	
Deviško oljčno olje z vsebnostjo kislin $> 2,0$ % Surovo oljčno olje iz oljčnih tropin	
	1. maščobne kisline (po čiščenju z ekstrakcijo v trdni fazi na silikagelnih kartušah) 2. transmaščobne kisline (po čiščenju z ekstrakcijo v trdni fazi na silikagelnih kartušah) 3. Δ ECN42 (po čiščenju z ekstrakcijo v trdni fazi na silikagelnih kartušah)

3. METODOLOGIJA

3.1 **Transesterifikacija z metanolno raztopino kalijevega hidroksida pri sobni temperaturi**3.1.1 *Princip*

Metilni estri se pripravijo s transesterifikacijo z metanolno raztopino kalijevega hidroksida kot vmesna stopnja pred izvedbo umiljenja.

3.1.2 *Reagenti*

3.1.2.1 Metanol, ki vsebuje največ 0,5 % (m/m) vode.

3.1.2.2 Heksan kromatografske čistoče.

3.1.2.3 Heptan kromatografske čistoče.

3.1.2.4 Dietil eter, stabiliziran za analizo.

3.1.2.5 Aceton kromatografske čistoče.

3.1.2.6 Elucijsko topilo za čiščenje olja s kolonsko kromatografijo/kromatografijo z ekstrakcijo v trdni fazi, mešanica heksana/dietilnega etra 87/13 (v/v).

3.1.2.7 Kalijev hidroksid, približno 2 M metanolne raztopine: raztopite 11,2 g kalijevega hidroksida v 100 ml metanola.

3.1.2.8 Silikagelne kartuše, 1 g (6 ml), za ekstrakcijo v trdni fazi.

3.1.3 *Oprema*

3.1.3.1 Epruvete z navojnim zamaškom (s prostornino 5 ml), opremljene s priključkom iz politetrafluoroetilena.

3.1.3.2 Merilna in avtomatska pipeta, prostornine 2 ml in 0,2 ml.

▼ **M28**

3.1.4 Čiščenje vzorcev olj

Vzorci se po potrebi očistijo, pri čemer se olje spusti skozi silikagelno kartušo za ekstrakcijo v trdni fazi. Silikagelna kartuša (3.1.2.8) se vstavi v vakuumsko napravo za eluiranje in izpere s 6 ml heksana (3.1.2.2); izpiranje se izvede brez vakuum. Potem se v kolono vnese raztopina olja (približno 0,12 g) v 0,5 ml heksana (3.1.2.2). Raztopina gre skozi kolono in nato eluira z 10 ml heksana/dietil etra (87:13 v/v) (3.1.2.6). Združena eluata se homogenizirata in ločita na dva enaka dela. Alikvot se odpari do suhega v rotacijskem izparilniku pod znižanim pritiskom in pri sobni temperaturi. Ostanek se raztopi v 1 ml heptana in raztopina je pripravljena na analizo maščobnih kislin s plinsko kromatografijo. Drugi alikvot se odpari in ostanek se raztopi v 1 ml acetona za analizo trigliceridov s HPLC, če je to potrebno.

3.1.5 Postopek

V epruveti z navojnim zamaškom in prostornino 5 ml (3.1.3.1) natehtajte približno 0,1 g vzorca olja. Dodajte 2 ml heptana (3.1.2.2) in pretresite. Dodajte 0,2 ml metanolne raztopine kalijevega hidroksida (3.1.2.7), zaprite epruveto z zamaškom, opremljenim s priključkom iz politetrafluoroetilena, in ga čvrsto zamažite ter močno tresite 30 sekund. Pustite, da se razsloji, dokler zgornja raztopina ne postane bistra. Z dekantiranjem ločite zgornjo plast, ki vsebuje metilne estre. Raztopina heptana je pripravljena za vbrizganje v plinski kromatograf. Priporočljivo je, da se raztopina do analize s plinsko kromatografijo hrani v hladilniku. Hramba raztopine več kot 12 ur ni priporočljiva.

DEL B

ANALIZA METILNIH ESTROV MAŠČOBNIH KISLIN S PLINSKO KROMATOGRAFIJO

1. NAMEN

Ta del vključuje splošne smernice za uporabo plinske kromatografije s kapilarnimi kolonami za določanje kvalitativne in kvantitativne sestave mešanice metilnih estrov maščobnih kislin, dobljenih v skladu z metodo iz dela A.

Ta del se ne uporablja za polimerizirane maščobne kisline.

2. REAGENTI

2.1 Nosilni plin

Inertni plin (helij ali vodik), popolnoma posušen in z vsebnostjo kisika, nižjo od 10 mg/kg.

Opomba 1: Vodik lahko podvoji hitrost analize, vendar je nevaren. Varnostne naprave so na voljo.

2.2 Pomožni plini

2.2.1 Vodik (čistost $\geq 99,9\%$), brez organskih nečistoč.

2.2.2 Zrak ali kisik, brez organskih nečistoč.

2.2.3 Dušik (čistost $> 99\%$).

2.3 Referenčni standard

Mešanica metilnih estrov čistih maščobnih kislin ali metilnih estrov maščobe poznane sestave, po možnosti podobne maščobi, ki jo je treba analizirati. Cis in trans izomeri oktadecenojskih, oktadekadienojskih in oktadekatrienojskih metilnih estrov so uporabni za določanje trans izomerov nenasičenih kislin.

Treba je paziti, da se prepreči oksidacija polinenasičenih maščobnih kislin.

▼ **M28****3. OPREMA**

Navedena navodila se nanašajo na običajno opremo, ki se uporablja za plinsko kromatografijo, z uporabo kapilarnih kolon in plamensko ionizacijskega detektorja.

3.1 Plinski kromatograf

Plinski kromatograf vključuje naslednje elemente:

3.1.1 Sistem za vbrizgavanje

Uporabite sistem za vbrizgavanje s kapilarnimi kolonami, pri čemer mora biti sistem za vbrizgavanje posebej izdelan za uporabo s takšnimi kolonami. Lahko je tip sistema z deljenjem vzorca ali brez deljenja vzorca v koloni.

3.1.2 Peč

Peč je takšna, da lahko segreje kapilarno kolono na temperaturo najmanj 260 °C in ohranja želeno temperaturo do $\pm 0,1$ °C natančno. Zadnja zahteva je zlasti pomembna, kadar se uporablja kapilarna kolona.

Uporaba programiranega temperaturnega gretja se priporoča v vseh primerih in zlasti za maščobne kisline z manj kot 16 ogljikovimi atomi.

3.1.3 Kapilarna kolona

3.1.3.1 Kolona, iz materiala, inertnega na snovi, ki naj bi se analizirale (običajno steklo ali kvarčno steklo). Notranji premer je med 0,20 in 0,32 mm. Notranja površina mora biti ustrezno obdelana (npr. površinska obdelava, pasiviranje) pred nanosom stacionarne faze. Za maščobne kisline ter cis in trans izomere maščobnih kislin zadostuje dolžina 60 m.

3.1.3.2 Primerne so kolone z vezano (zamreženo) stacionarno fazo tipa polarni polisiloksan (cianopropilsilikon).

Opomba 2: Obstaja nevarnost, da polarni polisiloksani povzročijo težave pri določanju in ločevanju linolenske kisline in pri kislinah C₂₀.

Nanosi so tanki, tj. 0,1 do 0,2 µm.

3.1.3.3 Namestitev in kondicioniranje kolone

Upoštevajte običajne varnostne ukrepe za montažo kapilarnih kolon, tj. namestitev kolone v peči (nosilec), izbira in montaža priključkov (tesnjenje), pozicioniranje končnih mest kolone v injektorju in na detektorju (zmanjšanje mrtvih volumnov). Pretok nosilnega plina za kolono dolžine 25 m in notranjega premera 0,3 mm naj bo 0,3 bara (30 kPa).

Kondicionirajte kolono s temperaturnim programiranjem peči s hitrostjo 3 °C/min od temperature okolja na temperaturo 10 °C pod temperaturo razpada stacionarne faze. Vzdržujte tako temperaturo peči eno uro do stabilizacije bazne linije. Ohladite jo na 180 °C in nadaljujte pod izotermičnimi pogoji.

Opomba 3: Ustrezno predhodno kondicionirane kolone so na voljo v prodaji.

3.1.4 Plamensko ionizacijski detektor in konverter-ojačevalac**3.2 Brizgalka**

Brizgalka je maksimalne kapacitete 10 µl z razdelki na 0,1 µl.

3.3 Sistem za pridobivanje podatkov

Sistem za pridobivanje podatkov je prek spleta povezan z detektorji in se uporablja s programsko opremo, primerno za integracijo in normalizacijo vrhov.

▼ **M28**

4. POSTOPEK

Postopki, opisani v 4.1 do 4.3, se nanašajo na uporabo plamensko ionizacijskega detektorja.

4.1 Preskusni pogoji

4.1.1 Izbor optimalnih delovnih pogojev za kapilarne kolone

Zaradi učinkovitosti in prepustnosti kapilarnih kolon sta ločevanje sestavin in trajanje analize v veliki meri odvisna od pretoka nosilnega plina v koloni. Zato bo treba optimizirati delovne pogoje s prilagoditvijo tega parametra (ali preprosto izgube glave kolone), odvisno od tega, ali je cilj izboljšati ločevanje ali pospešiti analizo.

Naslednji pogoji so se izkazali za primerne za ločevanje FAME (C₄ do C₂₆). Primeri kromatogramov so navedeni v Dodatku B:

Temperatura injektorja:	250 °C
Temperatura detektorja:	250 °C
Temperatura peči:	165 °C (8 min) do 210 °C pri 2 °C/min
Nosilni plin hidrogen:	tlak v glavi kolone, 179 kPa
Skupni pretok:	154,0 ml/min
Delilno razmerje:	1:100
Volumen, ki se vbrizga:	1 µl

4.1.2 Določanje resolucije (glej Dodatek A)

Izračunajte resolucijo R dveh sosednjih vrhov I in II na podlagi naslednje formule:

$$R = 2 \times ((d_{r(II)} - d_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ ali } R = 2 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ (USP) (Farmakopeja Združenih držav Amerike)}$$

ali

$$R = 1,18 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)})/(\omega_{0,5(I)} + \omega_{0,5(II)})) \text{ (EP, BP, JP, DAB)} \\ \text{(JP (Japonska farmakopeja), EP (Evropska farmakopeja), BP (Britanska farmakopeja))}$$

pri čemer je:

$d_{r(I)}$ retenzijska razdalja vrha I;

$d_{r(II)}$ retenzijska razdalja vrha II;

$t_{r(I)}$ retenzijski čas vrha I;

$t_{r(II)}$ retenzijski čas vrha II;

$\omega_{(I)}$ širina baze vrha I;

$\omega_{(II)}$ širina baze vrha II;

$\omega_{0,5}$ širina vrha določene spojine na sredini višine vrha.

Če velja $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$, izračunajte R na podlagi naslednje formule:

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

pri čemer je:

σ običajno odstopanje (glej sliko 1 v Dodatku A).

▼ **M28**

Če je razdalja dr med dvema vrhovoma $d_{r(II)} - d_{r(I)}$ enaka 4σ , je faktor ločljivosti $R = 1$.

Če vrhova nista popolnoma ločena, se tangenti na prevojnih točkah sekata na točki C. Da bi bila vrha popolnoma ločena, mora biti razdalja med njima enaka:

$d_{r(II)} - d_{r(I)} = 6 \sigma$, pri čemer je $R = 1,5$ (glej sliko 3 v Dodatku A).

5. IZRAŽANJE REZULTATOV

5.1 Kvalitativna analiza

Identificirajte vrhove metilnih estrov v vzorcu iz kromatograma iz slike 1 v Dodatku B, po potrebi z interpolacijo ali primerjavo z referenčnimi mešanici za vrhove metilnih estrov (kot je navedeno v točki 2.3).

5.2 Kvantitativna analiza

5.2.1 Določanje sestave

Izračunajte masni delež w_i posameznih metilnih estrov maščobnih kislin, izražen kot masni odstotni delež metilnih estrov, na naslednji način:

5.2.2 Metoda izračuna

5.2.2.1 Splošni primer

Izračunajte vsebnost dane komponente i , izražene kot masni odstotni delež metilnih estrov, tako da določite površinski delež zadevnega vrha glede na vsoto površin vseh vrhov, na podlagi naslednje formule:

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

pri čemer je:

A_i površina vrha posameznega metilnega estra maščobnih kislin i ;

ΣA vsota površin vseh vrhov vseh metilnih estrov maščobnih kislin.

Rezultati se izrazijo na dve decimalni mesti natančno.

Opomba 4: Pri maščobah in oljih je masni delež metilnih estrov maščobnih kislin enak masnemu deležu triacilglicerolov v gramih na 100 g. V primerih, ko ta predpostavka ni dovoljena, glej 5.2.2.2.

5.2.2.2 Uporaba korekcijskih faktorjev

V določenih primerih, na primer ob prisotnosti maščobnih kislin z manj kot osmimi ogljikovimi atomi ali kislinami s sekundarnimi skupinami, se površine popravijo s specifičnimi korekcijskimi faktorji (F_{ci}). Ti faktorji se določijo za vsak instrument. V ta namen se uporabi primeren referenčni material s certificirano sestavo maščobnih kislin v ustreznem razponu.

Opomba 5: Ti korekcijski faktorji niso enaki teoretičnim korekcijskim faktorjem plamensko-ionizacijskega detektorja iz Dodatka A, ki vključujejo tudi uspešnost sistema za vbrižgavanje itd. Vendar bi bilo treba v primeru večjih razlik preveriti uspešnost celotnega sistema.

▼M28

Za to referenčno mešanico je masni odstotni delež FAME i podan s formulo:

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

pri čemer:

m_i je masa FAME i v referenčni mešanici;

Σm je vsota mas vseh sestavin kot FAME v referenčni mešanici.

Iz kromatograma referenčne mešanice izračunajte odstotni delež površine FAME i , kot sledi:

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

pri čemer:

A_i je površina FAME i v referenčni mešanici;

ΣA je vsota vseh površin vseh FAME v referenčni mešanici.

Korekcijski faktor F_c se izračuna:

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

V vzorcu se masni odstotni delež posameznega FAME i izračuna:

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

Rezultati se izrazijo na dve decimalni mesti natančno.

Opomba 6: Izračunana vrednost ustreza masnemu odstotnemu deležu posamezne maščobne kisline, ki je izračunan kot triacilgliceroli na 100 g maščobe.

5.2.2.3 Uporaba internega standarda

Pri nekaterih analizah (na primer, kadar vse maščobne kisline niso kvantificirane, kot v prisotnosti kislin s štirimi ali šestimi ogljiki ob kislinah s 16 ali 18 ogljikovimi atomi ali kadar je treba določiti absolutno količino maščobne kisline v vzorcu) je treba uporabiti interni standard. Pogosto se uporabljajo maščobne kisline s 5, 15 ali 17 ogljikovimi atomi. Treba je določiti (morebitni) korekcijski faktor za interni standard.

Masni odstotni delež sestavine i , izražen kot metilni estri, je potem podan s formulo:

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

pri čemer:

A_i je površina FAME i ;

A_{IS} je površina internega standarda;

F_i je korekcijski faktor maščobne kisline i , izražene kot FAME;

F_{IS} je korekcijski faktor internega standarda;

m je masa vzorca za analizo v miligramih;

m_{IS} je masa internega standarda v miligramih.

Rezultati se izrazijo na dve decimalni mesti natančno.

▼ M28**6. POROČILO O PRESKUSU**

V poročilu o preskusu se navedejo metode, uporabljene za pripravo metilnih estrov in za analizo s plinsko kromatografijo. Navedejo se tudi vse delovne podrobnosti, ki v tej standardni metodi niso določene ali veljajo za neobvezne, skupaj s podrobnostmi kakršnega koli dogodka, ki bi lahko vplival na rezultate.

Poročilo o preskusu vključuje vse informacije, potrebne za popolno identifikacijo vzorca.

7. TOČNOST**7.1 Rezultati medlaboratorijskega preskusa**

Podrobnosti medlaboratorijskega preskusa glede točnosti metode so določene v Prilogi C k standardu IOC/T.20/Dok. št. 33. Vrednosti, ki izhajajo iz tega medlaboratorijskega preskusa, mogoče ne bodo ustrezale razponom koncentracij in matricam, ki se od danih razlikujejo.

7.2 Ponovljivost

Absolutna razlika med rezultatoma dveh neodvisnih posameznih preskusov, ki ju v kratkem časovnem presledku po enaki metodi na enakem preskusnem materialu v istem laboratoriju izvede isti izvajalec z uporabo iste opreme, ne sme biti v več kot 5 % primerov večja od vrednosti r iz preglednic 1 do 14 iz Priloge C k standardu IOC/T.20/Dok. št. 33.

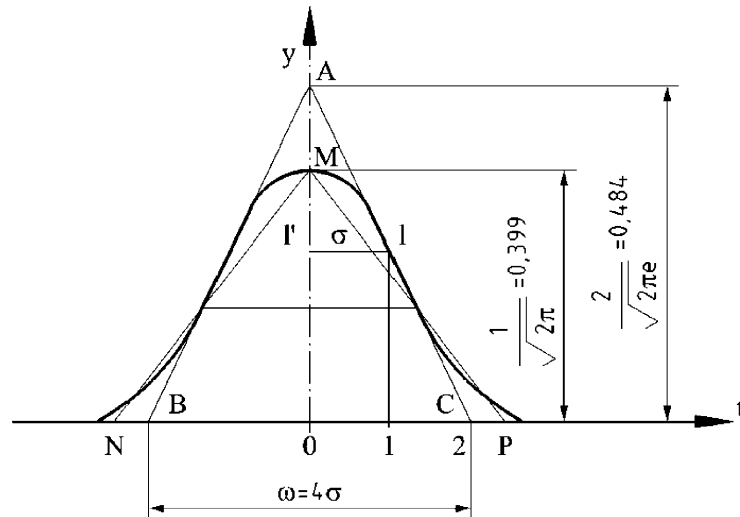
7.3 Obnovljivost

Absolutna razlika med rezultatoma dveh posameznih preskusov, ki sta bila pridobljena po enaki metodi na enakem preskusnem materialu v različnih laboratorijih pri različnih izvajalcih, ki so uporabljali različno opremo, bo v največ 5 % primerov večja od vrednosti R iz preglednic 1 do 14 iz Priloge C k standardu IOC/T.20/Dok. št. 33.

▼ M28

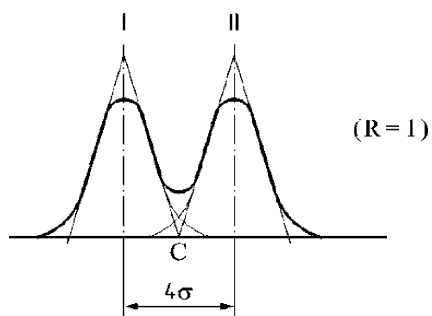
Dodatek A

Slika 1

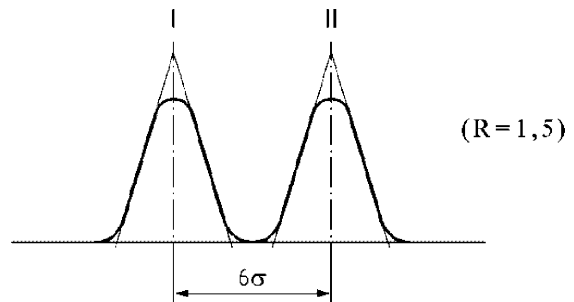


S širino $\omega_{0,5}$ na polovici višine trikotnika (ABC) in širino b na polovici višine trikotnika (NPM).

Slika 2



Slika 3

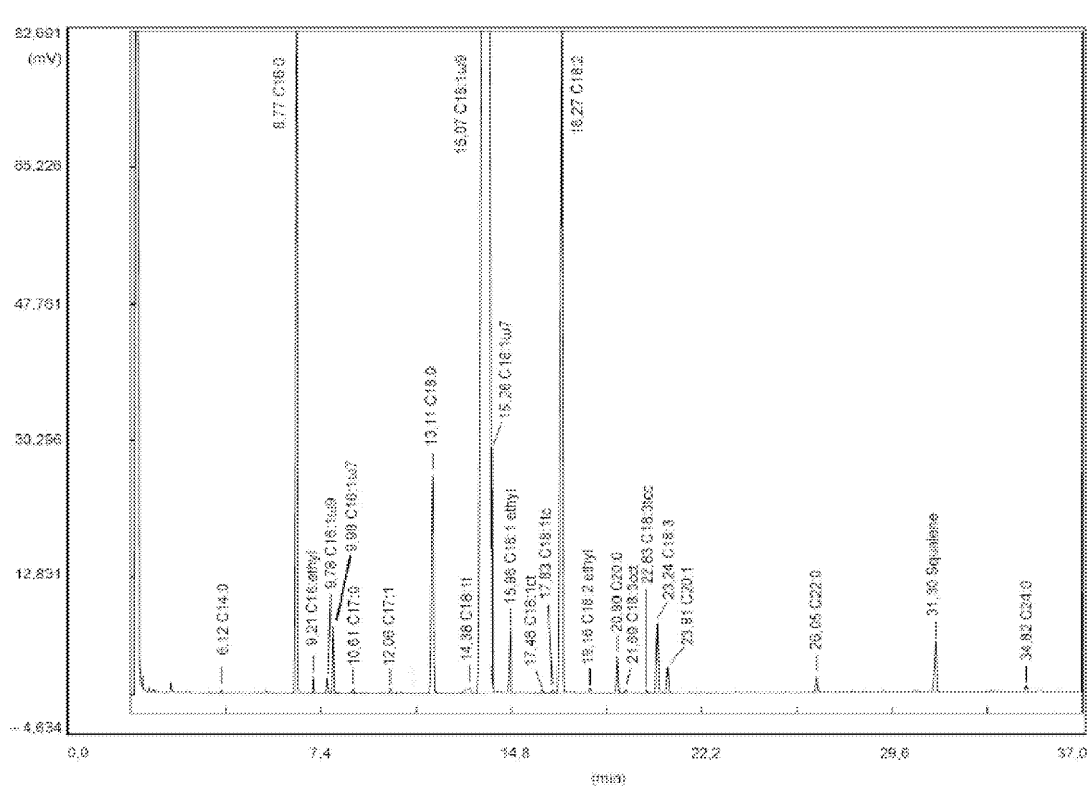


▼ M28

Dodatek B

Slika 1

Plinsko-kromatografski profil, pridobljen z metodo hladnega metiliranja iz olja iz oljčnih tropin



Kromatografski vrhi ustrezajo metilnim in etilnim estrom, razen če je navedeno drugače.



PRILOGA XI

DOLOČANJE HLAPNIH HALOGENIRANIH TOPIL V OLJČNEM OLJU

1. METODA

Analiza s plinsko kromatografijo z uporabo tehnike „head space“.

2. OPREMA

2.1 Plinski kromatograf, opremljen z detektorjem na zajemanje elektronov (ECD).

2.2 Naprava „head space“.

2.3 Steklена kolona za plinski kromatograf, 2 m dolžine in z notranjim premerom 2 mm, z 10 % stacionarne faze OV101 (ali enakovredne) na nosilcu iz kalcinirane, kislinsko sprane in silanizirane diatomejske zemlje, velikosti delcev 80 do 100 mesh.

2.4 Prenosni in pomožni plin: dušik za plinsko kromatografijo, primeren za detekcijo na zajemanje elektronov.

2.5 Steklene fiole, 10- do 15-ml, s teflonsko prevleko in aluminijastim zamaškom z napravo za brizgalko.

2.6 Objemke, ki hermetično zatesnijo.

2.7 Steklена brizgalka 0,5- do 2-ml.

3. REAGENTI

Standard: halogenirana topila, plinsko-kromatografske čistoče.

4. POSTOPEK

4.1 Točno natehtajte približno 3 g olja v fiolo (ni za ponovno uporabo); hermetično jo zaprite. Položite jo v termostat na 70 °C za eno uro. Z brizgalko previdno odstranite 0,2 do 0,5 ml parne faze, ki je v ravnotežju s tekočino (head space). Injicirajte to v kolono plinskega kromatografa, ki je nastavljen sledeče:

— temperatura injektorja: 150 °C,

— temperatura kolone: 70 do 80 °C,

— temperatura detektorja: 200 do 250 °C,

Lahko se uporabi druge temperature, pod pogojem, da ostanejo rezultati ekvivalentni.

4.2 Referenčne raztopine: pripravite standardne raztopine z uporabo rafiniranega oljčnega olja, ki je brez sledu topil, s koncentracijami med 0,05 do 1 ppm (mg/kg) in ustreza domnevni vsebnosti vzorca. Halogenirana topila se lahko razredči z uporabo pentana.

4.3 Kvantitativna določitev: naredite korelacijo med površino ali višino vrhov vzorca in standardne raztopine za koncentracijo, ki je domnevno najbližja. Če je deviacija večja od 10 %, je treba analizo ponoviti v primerjavi z drugo standardno raztopino, dokler deviacija ni znotraj 10 %. Deviacija se določi na podlagi povprečja začetnih injiciranj.

4.4 Izračun rezultatov: v ppm (mg/kg). Meja detekcije za postopek je 0,01 mg/kg.

▼ **M26**

PRILOGA XII

METODA MEDNARODNEGA SVETA ZA OLJKE ZA ORGANOLEPTIČNO OCENJEVANJE DEVIŠKEGA OLJČNEGA OLJA▼ **M28**

1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Namen mednarodne metode iz te priloge je določiti postopek za ocenjevanje organoleptičnih značilnosti deviškega oljčnega olja v smislu točke 1 dela VIII Priloge VII k Uredbi (EU) št. 1308/2013 Evropskega parlamenta in Sveta ⁽¹⁾ ter na podlagi teh značilnosti določiti način za razvrščanje olj. Metoda vsebuje tudi navedbe za neobvezno etiketiranje.

Opisana metoda se uporablja samo za deviška oljčna olja ter razvrščanje ali etiketiranje teh olj glede na intenzivnost odkritih napak in sadežnosti, kot jo določi skupina izbranih, usposobljenih in preverjenih pokuševalcev, ki sestavljajo ocenjevalno komisijo.

Uporabljajo se najnovejše razpoložljive različice standardov Mednarodnega sveta za oljke, ki so navedeni v tej prilogi.

▼ **M26**

2. OSNOVNI SPLOŠNI BESEDNJAK ZA ORGANOLEPTIČNO ANALIZO

Glej standard IOC/T.20/Dok. št. 4 „Organoleptična analiza: osnovni splošni besednjak“

3. POSEBNI BESEDNJAK

3.1 **Negativne lastnosti**

Pregreto/morklja Značilna aroma olja iz oljk, ki so bile zložene ali skladiščene v takšnih pogojih, da so dosegle visoko stopnjo anaerobne fermentacije, ali olja, ki je ob pretakanju v rezervoarjih ali sodih ostalo v stiku z usedlinami, pri katerih je prav tako prišlo do anaerobne fermentacije.

Plesnivo – vlažno – zemlja Značilna aroma olja iz oljk, na katerih so se zaradi večdnenevnega skladiščenja v vlagi razvile plesni in kvasovke, ali olja iz oljk, ki so bile pobrane umazane z zemljo ali blatom in niso bile oprane.

Zakisano/kiselkasto Značilna aroma nekaterih olj, ki spominja na vino ali kis. Aroma nastane zaradi aerobne fermentacije oljk ali ostankov oljčne drozge v nepravilno opranih slojnicah, kar povzroči nastanek očetne kisline, etilacetata in etanola.

Žarko Aroma olj, pri katerih je prišlo do intenzivne oksidacije.

Zmrznjene oljke (vlažen les) Značilna aroma olj iz oljk, ki so na drevju zmrznile.

⁽¹⁾ Uredba (EU) št. 1308/2013 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 17. decembra 2013 o vzpostavitvi skupne ureditve trgov kmetijskih proizvodov in razveljavitvi uredb Sveta (EGS) št. 922/72, (EGS) št. 234/79, (ES) št. 1037/2001 in (ES) št. 1234/2007 (UL L 347, 20.12.2013, str. 671).

▼ **M28**3.1.1 *Druge negativne lastnosti*

<i>Segreto ali zažgano</i>	Značilna aroma olj, ki so jih med predelavo preveč in/ali predolgo segrevali, zlasti med termičnim mešanjem oljčne drozge pod neustreznimi temperaturnimi pogoji.
<i>Seno – les</i>	Značilna aroma nekaterih olj iz suhih oljk.
<i>Grobo</i>	Grob in gost občutek pri nekaterih starih oljih, ki ob pokušanju obložijo ustno votlino.
<i>Strojno olje</i>	Aroma olja, ki spominja na dizel, maščobe ali mineralna olja.
<i>Rastlinska voda</i>	Aroma, ki jo olje pridobi ob daljšem stiku s fermentirano rastlinsko vodo.
<i>Slanica</i>	Aroma olja iz oljk, hranjenih v slanici.
<i>Kovinsko</i>	Aroma, ki spominja na kovino. Značilna je za olje, ki je bilo med mletjem, mešanjem, stiskanjem ali skladiščenjem dolgo v stiku s kovinskimi površinami.
<i>Športa</i>	Značilna aroma olja iz oljk, stiskanih v novih športah. Razlikuje se glede na to, ali so slojnice izdelane iz zelenega ali posušenega materiala.
<i>Črvido</i>	Aroma olja iz oljk, ki so jih napadle ličinke oljčne muhe (<i>Bactrocera oleae</i>).
<i>Kumara</i>	Aroma olja, ki nastane, kadar je olje predolgo neprepustno zaprto, zlasti v pločevinkah, in jo pripisujejo nastanku 2,6-nonadienala.

3.2 **Pozitivne lastnosti**

<i>Sadežno</i>	Skupek vonjev, ki je odvisen od sorte oljk ter izhaja iz zdravih in svežih zrelih ali nezrelih oljk. Zaznava se neposredno in/ali retronazalno.
<i>Grenko</i>	Značilen osnovni okus olja iz zelenih oljk ali oljk na stopnji zorenja. Zaznava se s papilami, ki so na korenu jezika v obliki črke V.
<i>Pikantno</i>	Skeleč tipni občutek v ustih, značilen za olja, proizvedena na začetku proizvodnega leta, v glavnem iz še nezrelih oljk. Zaznava se v celotni ustni votlini, zlasti v grlu.

▼ **M29**3.3 **Neobvezna terminologija za etiketiranje**

Vodja ocenjevalne komisije lahko na zahtevo potrdi, da so ocenjena olja skladna z opredelitvami in razponi, ki glede intenzivnosti in zaznavanja lastnosti ustrezajo izrazom v nadaljevanju.

▼ **M29**

Pozitivne lastnosti (sadežno, grenko in pikantno): glede na intenzivnost zaznavanja:

— *močno*, če je mediana lastnosti višja od 6;

— *srednje*, če je mediana lastnosti med 3 in 6;

— *blago*, če je mediana lastnosti nižja od 3.

Sadežnost Skupek vonjev, ki je odvisen od sorte oljk ter izhaja iz zdravih in svežih oljk, pri katerih ne prevladuje niti sadežnost zelenih oljk niti sadežnost zrelih oljk. Zaznava se neposredno in/ali retronazalno.

Zelena sadežnost Skupek vonjev, ki spominja na zelene sadeže, je odvisen od sorte oljk ter izhaja iz zdravih in svežih zelenih oljk. Zaznava se neposredno in/ali retronazalno.

Zrela sadežnost Skupek vonjev, ki spominja na zrele sadeže, je odvisen od sorte oljk ter izhaja iz zdravih in svežih oljk. Zaznava se neposredno in/ali retronazalno.

Uravnoteženo Olje, ki ni neuravnoteženo po vonju, okusu in tipnem občutku v ustih ter pri katerem mediana lastnosti grenko in mediana lastnosti pikantno nista več kot za dve točki višji od mediane sadežnosti.

Zelo blago olje Olje, pri katerem znaša mediana lastnosti grenko in pikantno 2 ali manj.

Seznam izrazov glede na intenzivnost zaznavanja:

Izrazi, za katere je treba predložiti potrdilo organoleptičnega preskusa	Mediana lastnosti
Sadežnost	—
Zrela sadežnost	—
Zelena sadežnost	—
Blaga sadežnost	manj kot 3
Srednja sadežnost	med 3 in 6
Močna sadežnost	več kot 6
Blaga zrela sadežnost	manj kot 3
Srednja zrela sadežnost	med 3 in 6
Močna zrela sadežnost	več kot 6
Blaga zelena sadežnost	manj kot 3

▼ **M29**

Izrazi, za katere je treba predložiti potrdilo organoleptičnega preskusa	Mediana lastnosti
Srednja zelena sadežnost	med 3 in 6
Močna zelena sadežnost	več kot 6
Blaga grenkost	manj kot 3
Srednja grenkost	med 3 in 6
Močna grenkost	več kot 6
Blaga pikantnost	manj kot 3
Srednja pikantnost	med 3 in 6
Močna pikantnost	več kot 6
Dobro uravnoteženo olje	Mediana lastnosti grenko in mediana lastnosti pikantno nista več kot 2 točki višji od mediane sadežnosti.
Zelo blago olje	Mediana lastnosti grenko in mediana lastnosti pikantno ne znašata več kot 2.

▼ **M26**

4. KOZARCI ZA DEGUSTACIJO OLJA

Glej standard IOC/T.20/Dok. št. 5 „Kozarci za degustacijo olja“.

5. PROSTOR ZA OCENJEVANJE

Glej standard IOC/T.20/Dok. št. 6 „Navodila za ureditev prostora za ocenjevanje“.

6. DODATKI

Da bi lahko pokuševalci pravilno opravili svojo nalogo, morajo biti v vsaki kabini zagotovljeni in zlahka dostopni naslednji dodatki:

- kozarci (standardizirani), ki vsebujejo vzorce, so oštevilčeni s kodo, pokriti z urnim steklom in hranjeni pri temperaturi 28 ± 2 °C,
- ocenjevalni list (glej sliko 1) v tiskani obliki (ali elektronski, če so izpolnjeni pogoji za ocenjevalni list), vključno z navodili za njegovo uporabo, če je to potrebno,
- kemični svinčnik ali pisalo z neizbrisljivim črnilom,
- pladnji s koščki jabolka in/ali vodo, vodo z dodanim ogljikovim dioksidom in/ali prepečencem,
- kozarec vode sobne temperature,
- list s splošnimi pravili iz oddelkov 8.4 in 9.1.1,
- pljuvalniki.

▼ **M26****7. VODJA OCENJEVALNE KOMISIJE IN POKUŠEVALCI****7.1 Vodja ocenjevalne komisije**

Vodja ocenjevalne komisije mora biti ustrezno usposobljen in imeti strokovno znanje o vrstah olj, s katerimi se bo med delom srečeval. Ima ključno vlogo v ocenjevalni komisiji ter je odgovoren za njeno organizacijo in delovanje.

Vodja ocenjevalne komisije mora imeti osnovno znanje o delu z orodji za organoleptično analizo, organoleptične izkušnje, mora biti natančen pri pripravi, organizaciji in izvedbi pokušenj ter mora znati te pokušnje potrpežljivo in znanstveno načrtovati in izvesti.

Vodja ocenjevalne komisije ima izključno odgovornost za izbiro, usposabljanje in preverjanje pokuševalcev za določitev ravni njihovih sposobnosti. To pomeni, da je odgovoren za oceno pokuševalcev, ki mora biti vedno objektivna ter za katero mora vodja oblikovati posebne postopke na podlagi pokušenj in zanesljivih meril za sprejem ali zavrnitev. Glej standard IOC/T.20/Dok. št. 14 „Navodila za izbiro, usposabljanje in preverjanje kvalificiranih pokuševalcev deviških oljčnih olj“.

Vodja ocenjevalne komisije je odgovoren za uspešnost komisije in posledično za njeno oceno, za katero mora zagotoviti zanesljiva in objektivna dokazila. V vsakem primeru mora biti vedno zmožen dokazati, da so metoda in pokuševalci pod nadzorom. Priporočljivo je redno usposabljanje ocenjevalne komisije (IOC/T.20/Dok. št. 14, točka 5).

Vodja ocenjevalne komisije ima končno odgovornost za vodenje njenih evidenc. Slednje morajo biti vedno sledljive. Poleg tega mora vodja izpolnjevati zahteve glede zagotavljanja kakovosti, ki so določene v mednarodnih standardih za organoleptično analizo, in zagotoviti, da so vzorci ves čas anonimni.

Vodja ocenjevalne komisije je odgovoren za inventuro opreme, potrebne za izpolnitev specifikacij te metode, pri tem pa mora zagotoviti, da je ta oprema ustrezno očiščena in vzdrževana, o čemer mora imeti pisna dokazila, vključno z dokazilom o izpolnjevanju pogojev za pokušanje.

Vodja ocenjevalne komisije je odgovoren za sprejem in shranjevanje vzorcev, ko prispejo v laboratorij, ter njihovo shranjevanje po pokušanju. Pri tem mora zagotoviti, da so vzorci ves čas anonimni in ustrezno shranjeni, za kar mora oblikovati pisne postopke za zagotovitev sledljivosti in zanesljivosti celotnega procesa.

Poleg tega je vodja ocenjevalne komisije odgovoren za pripravo, kodiranje in predstavitev vzorcev pokuševalcem v skladu z ustreznim načrtom pokušanja in predhodno določenimi protokoli ter za zbiranje in statistično obdelavo podatkov, ki jih pridobijo pokuševalci.

Vodja ocenjevalne komisije je odgovoren za razvoj in oblikovanje kakršnih koli drugih postopkov, ki so morda potrebni za izpolnitev tega standarda in zagotovitev pravilnega delovanja komisije.

Vodja ocenjevalne komisije mora poiskati načine, kako primerjati rezultate komisije z rezultati drugih komisij, ki so analizirale deviško oljčno olje, da bi ugotovil, ali komisija deluje pravilno.

▼ **M26**

Vodja ocenjevalne komisije mora spodbujati člane komisije, tako da spodbuja njihovo zanimanje in radovednost ter konkurenco med njimi. V ta namen se zelo priporoča, da vodja zagotavlja neovirano izmenjavo informacij s člani komisije, tako da jih obvešča o vseh opravljenih nalogah in dobljenih rezultatih. Poleg tega vodja zagotavlja, da njegovo mnenje ostane anonimno, in ne dovoli drugim vodjem, da bi vsiljevali svoja merila drugim pokuševalcem.

Vodja ocenjevalne komisije pravočasno povabi pokuševalce in odgovori na kakršna koli poizvedovanja glede izvedbe pokušenj, vendar pri tem ne razkrije nobenega mnenja o vzorcu.

▼ **M28**7.1.1 *Namestnik vodje ocenjevalne komisije*

Vodjo ocenjevalne komisije lahko na podlagi utemeljenih razlogov nadomesti namestnik vodje ocenjevalne komisije, ki lahko namesto njega opravlja naloge v zvezi z izvedbo pokušenj. Ta namestnik mora imeti vse potrebne spretnosti, ki se zahtevajo za vodjo ocenjevalne komisije.

7.2 **Pokuševalci**

Osebe, ki imajo vlogo pokuševalcev pri organoleptičnih pokušnjah oljčnih olj, to počnejo prostovoljno. Zato je priporočljivo, da kandidati vložijo pisno vlogo. Vodja ocenjevalne komisije izbere, usposablja in preverja kandidate glede na njihove sposobnosti razlikovanja med podobnimi vzorci, pri čemer je treba upoštevati, da se bo njihova natančnost med usposabljanjem povečala.

Pokuševalci morajo ravnati kot pravi degustatorji, pri čemer ne smejo upoštevati svojih osebnih okusov, temveč poročati le o občutkih, ki jih zaznavajo. Zato morajo vedno delati v tišini ter sproščeno in brez hitenja, tako da se lahko čim bolj osredotočijo na vzorec, ki ga pokušajo.

Za vsako pokušnjo je potrebnih 8 do 12 pokuševalcev, vendar je priporočljivo, da so na voljo dodatni pokuševalci, ki lahko nadomestijo morebitne odsotne pokuševalce.

▼ **M26**8. **POGOJI ZA OCENJEVANJE**8.1 **Predstavitev vzorca**

Vzorec olja za analizo je predstavljen v standardiziranih kozarcih za degustacijo, ki izpolnjujejo standard IOC/T.20/Dok. št. 5 „Kozarci za degustacijo olja“.

Kozarec vsebuje 14–16 ml olja (ali 12,8–14,6 g, če se vzorci tehtajo) in je pokrit z urnim steklom.

Vsak kozarec je označen s kodo, sestavljeno iz naključno izbranih števil ali kombinacije črk in števil. Koda ne sme imeti nobenega vonja.

8.2 **Temperatura prostora za ocenjevanje in vzorca**

Vzorci olja, namenjeni pokušanju, se skozi celotno pokušnjo hranijo v kozarcih pri temperaturi 28 ± 2 °C. Ta temperatura je bila izbrana zato, ker omogoča lažje opazovanje organoleptičnih razlik kot pri sobni temperaturi in ker pri nižjih temperaturah aromatične spojine, značilne za ta olja, slabo izhlapevajo, medtem ko pri višjih temperaturah nastajajo hlapne spojine, značilne za segreta olja. Za metodo, ki jo je treba uporabiti za segrevanje vzorcev v kozarcu, glej standard IOC/T.20/Dok. št. 5 „Kozarci za degustacijo olja“.

▼ M26

Temperatura prostora za ocenjevanje mora biti med 20 in 25 °C (glej IOC/T.20/Dok. št. 6).

8.3 Čas za ocenjevanje

Jutro je najboljši čas za pokušanje olj. Dokazano je, da obstajajo določeni časi v dnevu, ki so optimalni za zaznavanje okusa in vonja. Pred obroki se občutljivost za zaznavanje vonjev in okusov poveča, medtem ko je po obrokih ta občutljivost manjša.

Vendar tega merila ni treba upoštevati do skrajnosti, saj lahko lakota zamoti pokuševalce in zmanjša njihovo sposobnost razlikovanja. Zato se priporoča, da pokušnje potekajo med 10. in 12. uro.

8.4 Pokuševalci: splošna pravila ravnanja

Priporočila v nadaljevanju veljajo za ravnanje pokuševalcev med delom.

Pokuševalci se na vabilo vodje ocenjevalne komisije udeležijo organoleptične pokušnje ob predhodno določenem času in upoštevajo naslednje:

- Ne kadijo ali pijejo kave vsaj 30 minut pred pokušnjo.
- Ne smejo predhodno uporabiti nobene dišave, kozmetičnega izdelka ali mila, katerega vonj bi bilo mogoče zaznati tudi med pokušnjo. Roke si morajo umiti z neodišavljenim milom, pri čemer si jih morajo tolikokrat splakniti in posušiti, dokler morebitnega vonja ni več mogoče zaznati.
- Ne jedo vsaj eno uro pred pokušanjem.
- Če se pokuševalci fizično ne počutijo dobro, zlasti če je zmanjšan njihov občutek za vonj ali okus, ali če se iz kakršnega koli psihološkega razloga ne morejo osredotočiti na svoje delo, se vzdržijo pokušanja in o tem ustrezno obvestijo vodjo ocenjevalne komisije.
- Če so pokuševalci izpolnili zgornja priporočila, mirno in tiho zasedejo svoje mesto v dodeljeni kabini.
- Pazljivo preberejo navodila z ocenjevalnega lista in ne začnejo ocenjevati vzorca, dokler niso popolnoma pripravljeni na nalogo, ki jo morajo opraviti (sproščeno in brez hitenja). V primeru kakršnih koli dvomov bi se morali o tem na samem pogovoriti z vodjo ocenjevalne komisije.
- Naloge morajo opravljati v tišini.
- Mobilne telefone morajo imeti ves čas izklopljene, da ne bi motili svojih kolegov pri osredotočanju in delu.

9. POSTOPEK ZA ORGANOLEPTIČNO OCENJEVANJE IN RAZVRŠČANJE DEVIŠKEGA OLJČNEGA OLJA**9.1 Tehnika pokušanja****▼ M29**

- 9.1.1 Pokuševalci vzamejo kozarec, pri čemer ga držijo pokritega z urnim steklom, in ga počasi nagnejo; nato v tem položaju popolnoma zavrtijo kozarec, da se njegova notranjost kar čim več omoči. Ko to storijo, snamejo urno steklo ter s počasnimi in globokimi vdihli vohajo vzorec, da bi ocenili olje. Vzorca ne smejo vohati več kot 30 sekund. Če do takrat ne pridejo do nobenega sklepa, začnejo znova po kratkem počitku.

▼ **M29**

Ko je vohanje vzorca končano, pokuševalci ocenijo občutke, ki jih vzorec vzbudi (retronazalni vonj, okus in tipni občutek v ustih). To naredijo tako, da naredijo majhen požirek približno 3 ml olja. Zelo pomembno je, da olje razporedijo po vsej ustni votlini, od sprednjega dela ust in jezika, ob strani proti zadnjemu delu, nebu in grlu, saj je intenzivnost zaznavanja okusov in občutkov v ustih odvisna od območja na jeziku, nebu in grlu.

Poudariti je treba, da je bistveno, da pokuševalec ustrezno količino olja zelo počasi razporedi od zadnjega dela jezika proti nebu in grlu, medtem ko se osredotoča na vrstni red zaznave grenkosti in pikantnosti. V nasprotnem primeru se lahko pri nekaterih oljih zgodi, da ni mogoče zaznati niti enega od teh dražljajev ali da pikantnost prekrije grenkost.

Kratki in zaporedni vdih skozi usta pokuševalcu omogočajo, da razporedi vzorec po vsej ustni votlini in retronazalno zazna hlapne aromatične sestavine.

Opomba: Če pokuševalci ne zaznajo sadežnosti v vzorcu in intenzivnost negativne razvrstitvene lastnosti je 3,5 ali manj, vodja ocenjevalne komisije lahko poskrbi, da pokuševalci ponovno analizirajo vzorec pri sobni temperaturi (COI/T.20/Doc. št. 6/Rev. z dne 1. septembra 2007, oddelek 3 – Splošne specifikacije za postavitve preskusnega prostora), medtem ko pojasni okoliščine in pojem sobne temperature. Ko vzorec doseže sobno temperaturo, ga pokuševalci ponovno ocenijo, samo da preverijo, ali se zazna sadežnost. Če se, označijo njeno intenzivnost na lestvici.

Upoštevati je treba tudi tipni občutek pikantnosti v ustih. Zato je priporočljivo olje zaužiti.

▼ **M26**

9.1.2 Pri organoleptičnem ocenjevanju deviškega oljčnega olja je priporočljivo, da se na vsaki pokušnji ocenijo največ ŠTIRJE VZORCI in da se pokuševalec udeleži največ treh pokušenj na dan, s čimer se izogne kontrastu, do katerega bi prišlo, če bi različne vzorce pokušal neposredno enega za drugim.

Ker se zaradi zaporednega pokušanja vzorcev občutljivost zmanjša ali izgubi, je treba ostanke olja odstraniti iz ust.

Priporoča se žvečenje majhnega koščka jabolka, ki se lahko potem, ko se prežveči, izpljune v pljuvalnik. Potem se usta splaknejo z vodo sobne temperature. Med koncem ene pokušnje in začetkom druge mora preteči najmanj 15 minut.

9.2 Uporaba ocenjevalnega lista s strani pokuševalcev

Ocenjevalni list, ki ga morajo uporabiti pokuševalci, je podrobneje prikazan na sliki 1 v tej prilogi.

Vsak pokuševalec v ocenjevalni komisiji povoha in pokusi ⁽¹⁾ olje, ki se ocenjuje. Nato na 10-centimetrski lestvici na ocenjevalnem listu navede intenzivnost zaznave vsake od negativnih in pozitivnih lastnosti.

⁽¹⁾ Pokušanja olja se lahko vzdržijo, če neposredno z vohanjem zaznajo zelo intenzivno negativno lastnost, pri čemer v takem primeru to izredno okoliščino zabeležijo na ocenjevalni list.

▼ M26

Če pokuševalci zaznajo negativne lastnosti, ki niso navedene v oddelku 4, jih zabeležijo v rubriko „Drugo“, pri čemer uporabijo izraz ali izraze, ki te lastnosti najbolj natančno opisujejo.

▼ M28**9.3 Uporaba podatkov s strani vodij ocenjevalnih komisij**

Vodja ocenjevalne komisije zbere ocenjevalne liste, ki jih je izpolnil vsak pokuševalec, in preveri intenzivnost posameznih lastnosti. Če ugotovi nepravilnost, od pokuševalca zahteva, da ponovno pregleda svoj ocenjevalni list in po potrebi ponovi pokušnjo.

Vodja ocenjevalne komisije vnese podatke o ocenjevanju, ki jih zagotovi vsak član ocenjevalne komisije, v računalniški program, kot je določen s standardom IOC/T.20/Dok. št. 15, da se na podlagi izračunane mediane statistično izračunajo rezultati analize. Glej točko 9.4 in Dodatek k tej prilogi. Podatki za določen vzorec se vnesejo z uporabo matrike, sestavljene iz 9 stolpcev, ki predstavljajo 9 organoleptičnih lastnosti, in n vrstic, ki predstavljajo n uporabljenih članov ocenjevalne komisije.

Če je ugotovljeno napako v rubriko „Drugo“ vneslo vsaj 50 % ocenjevalne komisije, vodja ocenjevalne komisije izračuna mediano napake in določi ustrežno razvrstitev.

Vrednost grobega koeficienta variacije, ki določa razvrstitev (napaka z največjo intenzivnostjo in lastnostjo sadežno), mora biti enaka ali nižja od 20 %.

V nasprotnem primeru mora vodja ocenjevalne komisije ponoviti oceno določenega vzorca v drugi pokušnji.

Če se to pogosto pojavlja, se priporoča, da vodja ocenjevalne komisije zagotovi pokuševalcem posebno dodatno usposabljanje (IOC/T.20/Dok. št. 14, točka 5) ter na podlagi indeksa ponovljivosti in indeksa odstopanja preveri uspešnost pokuševalca (IOC/T.20/Dok. št. 14, točka 6).

▼ M29**9.4 Razvrstitev olja**

Olje se razvrsti v skladu s spodaj navedenimi opisi na podlagi mediane napak in mediane lastnosti sadežno. Mediana napak je mediana napake, ki se zazna z največjo intenzivnostjo. Mediana napak in mediana lastnosti sadežno sta izraženi na eno decimalno mesto natančno.

Razvrstitev olja se izvede s primerjavo vrednosti mediane napak in mediane lastnosti sadežno z referenčnimi razponi, navedenimi spodaj. Ker so bile meje razponov določene ob upoštevanju napak metode, veljajo za absolutne. Programska oprema omogoča prikaz razvrstitve v obliki tabele s statističnimi podatki ali grafa.

- (a) Ekstra deviško oljčno olje: mediana napak je enaka 0, mediana lastnosti sadežno pa je višja od 0.
- (b) Deviško oljčno olje: mediana napak je višja od 0 in enaka ali nižja od 3,5, mediana lastnosti sadežno pa je višja od 0.
- (c) Lampante deviško oljčno olje: mediana napak je višja od 3,5 ali pa je nižja ali enaka 3,5 in mediana sadežnosti je enaka 0.

▼ M29

Opomba 1: Če je mediana lastnosti grenko in/ali pikantno višja od 5,0, vodja ocenjevalne komisije to navede na potrdilu o pokušnji.

Pri ocenah, katerih namen je spremljanje skladnosti, se opravi ena pokušnja. V primeru ponovljene ocene, se ocena izvede dvakrat pri različnih pokušnjah. Rezultati dvakratne analize morajo biti statistično homogeni. (glej točko 9.5). Če niso, je treba vzorec spet dvakrat analizirati. Končna vrednost mediane razvrstitvenih lastnosti se izračuna iz povprečja obeh median.

9.5 Merila za sprejem ali zavrnitev dvojnikov

Normirana napaka, kot je opredeljena spodaj, se uporabi za določitev, ali so oboji rezultati dvakratne analize homogeni ali statistično sprejemljivi:

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

pri čemer sta Me_1 in Me_2 mediani dvakratne analize (prva oziroma druga analiza), U_1 in U_2 pa sta povečani merilni negotovosti za obe vrednosti, izračunani kot sledi in je opredeljeno v Dodatku:

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

za povečano merilno negotovost, $c = 1,96$; zato

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

pri čemer je CV_r grobi koeficient variacije.

Za določitev, da vrednosti nista statistično različni, mora biti vrednost E_n enaka ali manjša kot 1,0.

▼ **M26***Dodatek***Metoda izračuna mediane in intervalov zaupanja****Mediana**

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

Mediana je realno število X_m , za katerega je značilno, da je verjetnost (p), da so vrednosti distribucije (X) nižje od tega števila (X_m), enaka ali manjša od 0,5 in da je hkrati verjetnost (p), da so vrednosti distribucije (X) enake ali nižje od X_m , enaka ali višja od 0,5. Bolj praktična opredelitev je, da je mediana 50. percentil distribucije števil, urejenih po naraščajočem vrstnem redu. Povedano enostavneje, je mediana vrednost na sredini lihega števila urejenih vrednosti v nizu ali povprečje dveh vrednosti na sredini sodega števila urejenih vrednosti v nizu.

Grobi standardni odklon

Za zanesljivo oceno variabilnosti povprečja je treba upoštevati grobi standardni odklon po Stuartu in Kendallu (4). Formula izraža asimptotičen grobi standardni odklon, tj. grobo oceno variabilnosti upoštevanih podatkov, pri čemer sta N število opazanj in IQR interkvartilni interval, ki zajema točno 50 % primerov določene distribucije verjetnosti.

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

Interkvartilni interval se izračuna tako, da se izračuna velikost razpona med 75. in 25. percentilom.

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

Percentil je vrednost X_{pc} , za katero je značilno, da je verjetnost (p), da so vrednosti distribucije nižje od X_{pc} , enaka ali manjša od določene stotine in da je hkrati verjetnost (p), da so vrednosti distribucije nižje ali enake X_{pc} , enaka ali višja od navedene določene stotine. Stotina označuje izbrani delež distribucije. V primeru mediane je ta enak 50/100.

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

V praksi je percentil vrednost distribucije, ki ustreza določenemu območju, zarisane od krivulje distribucije ali gostote. Tako, na primer, 25. percentil predstavlja vrednost distribucije, ki ustreza območju 0,25 ali 25/100.

Pri tej metodi se percentili izračunajo na podlagi dejanskih vrednosti v podatkovni matriki (postopek za izračun percentilov).

Grobi koeficient variacije (%)

$CV\%$ predstavlja čisto število, ki označuje delež variabilnosti analiziranega niza števil. Zato je ta koeficient zelo koristen za preverjanje zanesljivosti članov ocenjevalne komisije.

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

▼ M26**95-odstotni intervali zaupanja pri mediani**

95-odstotni intervali zaupanja (vrednost napake prve vrste je enaka 0,05 ali 5 %) predstavljajo interval, v katerem bi se vrednost mediane lahko spremenila, če bi bilo mogoče preskus ponoviti nešteto krat. V praksi ta interval označuje interval variabilnosti poskusne pod izbranimi delovnimi pogoji ob predpostavki, da se poskusnja lahko ponovi večkrat. Tako kot pri $CVr\%$ ta interval pomaga oceniti zanesljivost poskusne.

$$IC_{sup} = Me + (c \times s^*)$$

$$IC_{inf} = Me - (c \times s^*)$$

pri čemer je C v primeru 95-odstotnega intervala zaupanja enak 1,96.

Primer izračuna je predstavljen v Prilogi I k standardu IOC/T.20/Dok. št. 15.

Viri

- (1) Wilkinson, L. 1990. Systat: The system for statistics. Evanston, IL. SYSTAT Inc.
- (2) Cicchitelli, G. 1984. Probabilità e Statistica. Maggioli Editore, Rimini.
- (3) Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, Y.; Michotte, L. 1988. Chemometrics. A textbook. Elsevier. Amsterdam.
- (4) Kendall, M.G.; Stuart, A. 1967. The advanced theory of statistics. Vol. 1. Hafner Publishing Co.
- (5) McGill, R.; Tukey, J.W.; Larsen, W.A. 1978. Variation of Box Plots. The American Statistician, 32, (2), str. 12–16.
- (6) IOC/T.28/Dok. št. 1, september 2007, Smernice za akreditacijo laboratorijev za organoleptično ocenjevanje s posebnim poudarkom na oljčnem olju v skladu s standardom ISO/IEC 17025:2005.
- (7) IOC/T.20/Dok. št. 14.
- (8) IOC/T.20/Dok. št. 15.
- (9) ISO/IEC 17025:05.

▼ M20

▼ M19

▼B*PRILOGA XV***1. VSEBNOST OLJA V OLJČNIH TROPINAH****1.1 Oprema**

- primerna aparatura za ekstrakcijo z 200–250-ml bučko z okroglim dnom,
- električno greta kopel (na primer peščena ali vodna kopel) ali grelna plošča,
- analitska tehtnica,
- sušilnik, nastavljen na temperaturo največ 80 °C
- električno gret sušilnik s termostatom, nastavljen na 103 ± 2 °C, z možnostjo prepihovanja z zrakom pri znižanem tlaku,
- mehanski mlin, ki se lahko čisti in v katerem je možno zmleti oljčne tropine brez zvišanja njihove temperature ali kakršne koli znatne spremembe vsebnosti vlage, hlapnih snovi ali snovi, ki se lahko ekstrahirajo s heksanom,
- kartuša in vata ali filtrirni papir, s katerega so tik pred uporabo odstranjene snovi, ki se lahko ekstrahirajo s heksanom,
- eksikator,
- sito z odprtini 1 mm,
- majhni koščki predhodno osušenega plovca.

1.2 Reagenti

Normalni heksan, v katerem po popolnem sušenju suhi ostanek ne sme biti višji od 0,002 g v 100 ml.

2. POSTOPEK**2.1 Priprava vzorca**

Če je potrebno, s predhodno dobro očiščenim mehanskim mlinom zmeljemo laboratorijski vzorec do velikosti delcev, ki v celoti preidejo skozi sito.

S približno dvanajstino vzorca očistimo mlin, zmleti material zavržemo, zmeljemo preostali del vzorca in ga takoj analiziramo.

2.2 Vzorec za pokušanje

Takoj po končanem mletju natehtamo približno 10 g vzorca s točnostjo 0,01 g.

2.3 Priprava kartuše

Natehtani vzorec prenesemo v kartušo, ki jo pokrijemo z vato. Pri uporabi filtrirnega papirja vzorec v papir zavijemo.

2.4 Predhodno sušenje

Če so oljčne tropine zelo vlažne (to je, če je vsebnost hlapnih snovi višja od 10 %), izvedemo predhodno sušenje tako, da napolnjeno kartušo (ali filtrirni papir) postavimo v sušilnik, v katerem temperatura ni višja od 80 °C, da vsebnost vlage in hlapnih snovi znižamo na manj od 10 %.

▼B**2.5 Priprava bučke z okroglim dnom**

S točnostjo 1 mg stehtamo bučko, v kateri se nahaja en do dva koščka plovca, ki smo ga predhodno sušili pri 103 ± 2 °C in v eksikatorju hladili eno uro.

2.6 Začetna ekstrakcija

V aparaturo za ekstrakcijo vstavimo kartušo (ali filtrirni papir) z vzorcem. V bučko vlijemo zahtevano količino heksana. Bučko spojimo z aparaturo za ekstrakcijo in jo postavimo na električno greto kopel. Hitrost gretja nastavimo tako, da je hitrost refluksa najmanj tri kaplje na sekundo (srednje, ne burno vretje). Po štirih urah ohladimo. Kartušo vzamemo iz aparature za ekstrakcijo in s tokom zraka odstranimo večji del topila.

2.7 Druga ekstrakcija

Vsebino iz kartuše prenesemo v mikro drobilec in jo čim bolj zdrobimo. Zdrobljeno mešanico kvantitativno vrnemo v kartušo, ki jo ponovno vstavimo v aparaturo za ekstrakcijo.

Nadaljujemo z ekstrakcijo nadaljnji dve uri ob uporabi iste bučke z okroglim dnom, v kateri se nahaja ekstrakt iz začetne ekstrakcije.

Dobljena raztopina v ekstrakcijski bučki mora biti bistra. Če ni, jo filtriramo skozi filtrirni papir in originalno bučko ter filtrirni papir nekočkrat speremo s heksanom. Filtrat in raztopino za izpiranje lovimo v drugo predhodno osušeno bučko, stehtano s točnostjo 1 mg.

2.8 Odstranjevanje topila in tehtanje ekstrakta

Večino topila odstranimo z destilacijo na električno greti kopeli. Zadnje ostanke topila odstranimo s segrevanjem bučke v sušilniku pri 103 ± 2 °C 20 minut. Odstranjevanje topila lahko pospešimo s prepihanjem z zrakom ali, še bolje, z inertnim plinom v časovnih presledkih ali pri znižanem tlaku.

Bučko hladimo v eksikatorju najmanj eno uro in jo nato stehtamo s točnostjo 1 mg.

Pod enakimi pogoji ponovno grejemo 10 minut, ohladimo v eksikatorju in ponovno tehtamo.

Razlika med obema tehtanjema ne sme biti večja od 10 mg. Če je večja, ponovno grejemo 10 minut, ohladimo in stehtamo ter postopek ponavljamo, dokler razlika med dvema tehtanjema ni manjša od 10 mg. Zabeležimo zadnjo maso bučke.

Izvedemo dve vzporedni določitvi.

3. IZRAŽANJE REZULTATOV**3.1 Metoda izračuna in formula**

(a) Ekstrakt, izražen kot odstotni masni delež glede na izdelek, kot ga je prejel laboratorij:

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

▼B

kjer je: S = odstotni masni delež ekstrakta v izdelku, kot ga je prejel laboratorij,

m_0 = masa preiskovanega vzorca, v g,

m_1 = masa ekstrakta po sušenju, v g.

Rezultat je aritmetična sredina dveh vzporednih določitev, pod pogojem, da so izpolnjeni kriteriji ponovljivosti.

Rezultat izrazimo z enim decimalnim mestom.

(b) Ekstrakt glede na suho snov izrazimo po formuli:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{odstotni masni delež lja v ekstraktuglede na suho snov}$$

kjer je: S = odstotni masni delež ekstrakta izdelka, kot ga je prejel laboratorij (glej a),

U = vsebnost vlage in hlapnih snovi.

3.2 Ponovljivost

Razlika med dvema vzporednima določitvama, ki jih izvede isti analitik istočasno ali v kratkem časovnem intervalu, ne sme biti večja od 0,2 g heksanskega ekstrakta v 100 g vzorca.

Če ta pogoj ni izpolnjen, analizo ponovimo z dvema drugima deloma vzorca. Če je tudi v tem primeru razlika večja od 0,2 g, je rezultat srednja vrednost štirih določitev.



Priloga XVI

DOLOČANJE JODNEGA ŠTEVILA

1. NAMEN

V tem mednarodnem standardu je opisana metoda za določanje jodnega števila v maščobah in oljih živalskega in rastlinskega izvora, v nadaljevanju maščobah.

2. DEFINICIJA

Za namene tega mednarodnega standarda se uporablja naslednja opredelitev:

- 2.1 *Jodno število.* Jodno število je masa joda, ki jo absorbira vzorec pri pogojih dela, kot so opisani v tem mednarodnem standardu.

Jodno število izrazimo v gramih joda na 100 g vzorca.

3. PRINCIP

Vzorec raztopimo v topilu ob dodatku Wijs-ovega regenta. Po določenem času dodamo raztopino kalijevega jodida v vodi in sproščeni jod titriramo z raztopino natrijevega tiosulfata.

4. REAGENTI

Vsi reagenti morajo biti priznane čistoče za analizo.

- 4.1 *Voda*, stopnja 3, mora ustrezati zahtevam ISO 3969.

- 4.2 *Kalijev jodid*, 100g/L, brez jodata ali prostega joda.

- 4.3 *Raztopina škroba.*

5 g škroba zmešamo s 3 ml vode in to mešanico vlijemo v 1 000 ml vrele vode ter pustimo vreti tri minute. Ohladimo.

- 4.4 *Natrijev tiosulfat*, standardna raztopina, $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$, pred uporabo standardizirana (manj kot sedem dni).

- 4.5 *Topilo*, pripravljeno z mešanjem enakih delov cikloheksana in očetne kisline.

- 4.6 *Wijsov reagent*, ki vsebuje jodov monoklorid v očetni kislini. Uporabljati moramo komercialno dostopen reagent.

5. OPREMA

Običajna laboratorijska oprema, posebno:

- 5.1 *Steklene ladjice za tehtanje*, primerne za količino vzorca in za prenos vzorca v bučko (6.2).

- 5.2 *Erlenmajerice*, 500-ml, z brušenim zamaškom, popolnoma suhe.

6. PRIPRAVA VZORCA ZA ANALIZO

Homogeniziran vzorec osušimo nad natrijevim sulfatom in filtriramo.

7. POSTOPEK

- 7.1 Vzorec za analizo

Masa vzorca za analizo je odvisna od pričakovanega jodnega števila, kot je prikazano v tabeli 1.

▼ B*Tabela 1*

Pričakovano jedno število	Masa vzorca za analizo (g)
manj kot 5	3,00
5 do 20	1,00
21 do 50	0,40
51 do 100	0,20
101 do 150	0,13
151 do 200	0,10

Vzorec natehtamo v stekleno ladjico s točnostjo 0,1 mg.

7.2 Določitev

Vzorec za analizo prenesemo v 500-ml erlenmajerico (6.2). Dodamo 20 ml topila (4.5), da raztopimo maščobo. Dodamo točno 25 ml Wijs-ovega reagenta (4.6), zamašimo, premešamo vsebino in erlenmajerico postavimo na temno. Za Wijs-ov regent ne smemo uporabiti ustne pipete!

Na enak način pripravimo s topilom in reagentom slepo probo brez vzorca.

Vzorci z jednim številom nižjim od 150 pustimo stati na temnem eno uro; vzorce z jednim številom višjim od 150, polimerizirane izdelke in znatno oksidirane izdelke pustimo na temnem dve uri.

Po pretečenem času dodamo v vsako od erlenmajeric po 20 ml raztopine joda (4.2) in 150 ml vode (4.1).

Titriramo s standardno raztopino natrijevega tiosulfata (4.4), dokler ne izgine rumena barva joda. Dodamo nekaj kapljic raztopine škroba (4.3) in nadaljujemo s titracijo, dokler po močnem stresanju ne izgine modra barva.

Opomba: Dopustna je potenciometrična titracija.

7.3 Število določitev

Na istem vzorcu izvedemo dve določitvi.

8. IZRAŽANJE REZULTATOV

Jedno število podaja izraz

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

kjer je:

c = numerična vrednost uporabljene standardne raztopine natrijevega tiosulfata (4.4) s točno koncentracijo v mol/L;

V_1 = volumen standardne raztopine natrijevega tiosulfata (4.4), porabljen pri slepi probi, v ml;

▼B

V_2 = volumen standardne raztopine natrijevega tiosulfata (4.4), porabljen pri določitvi, v ml;

m = masa vzorca, v g (7.1).

Rezultat je aritmetična sredina dveh določitev, pod pogojem, da so izpolnjeni pogoji ponovljivosti (9.2).

▼ **M11***PRILOGA XVII***METODA ZA DOLOČANJE STIGMASTADIENOV V RASTLINSKIH OLJIH**

1. NAMEN

Določitev stigmastadienov v rastlinskih oljih z nizko vsebnostjo teh ogljikovodikov, predvsem v deviškem oljčnem olju in v surovem olju iz oljčnih tropin.

2. PODROČJE

Metodo lahko uporabljamo za vsa rastlinska olja, čeprav so določitve zanesljive le v primerih, ko je vsebnost teh ogljikovodikov med 0,01 in 4,0 mg/kg. Metoda je še posebej primerna za ugotavljanje prisotnosti rafiniranih rastlinskih olj (oljčnih, oljčnih tropin, sončničnih, palmovih itd.) v deviških oljčnih oljih, kajti rafinirana olja vsebujejo stigmastadiene, deviška olja pa ne.

3. PRINCIP

Izolacija neumiljivih snovi. Ločitev steroidne ogljikovodične frakcije s kolonsko kromatografijo na silikagelu ter analiza s kapilarno plinsko kromatografijo.

4. OPREMA

4.1 250-ml bučke za povratni hladilnik.

4.2 500-ml liji ločniki.

4.3 100-ml bučke z okroglim dnom.

4.4 Rotavapor.

4.5 Steklena kromatografska kolona (notranjega premera 1,5 do 2,0 cm in dolžine 50 cm) s teflonskim petelinčkom in kosmom steklene volne ali sintrano stekleno ploščico na dnu. Za uporabo jo pripravimo tako, da vanjo vlijemo toliko heksana, da sega 5 cm od njenega dna, nato pa jo napolnimo s suspenzijo silikagela v heksanu (15 g v 40 ml) s pomočjo dodatkov heksana. Počakamo, da se silikagel usede, zatem pa z uporabo rahlih vibracij silikagel dokončno posedemo. Dodamo brezvodni natrijev sulfat do višine približno 0,5 cm in končno izpustimo odvečni heksan.

4.6 Plinski kromatograf, opremljen s plamensko ionizacijskim detektorjem, s split injektorjem ali injektorjem, ki omogoča neposredne vbrizge na začetek (hladne) kolone (cold-on-column) in z možnostjo temperaturne nastavitve na ± 1 °C.

4.7 Kvarčna kapilarna kolona za plinsko kromatografijo (z notranjim premerom 0,25 ali 0,32 mm in dolžino 25 m), z notranjim nanosom 5 % fenilmetilsilikonske faze v debelini 0,25 mm.

Opomba 1:

Uporabimo lahko tudi kolone s podobno ali manjšo polarnostjo.

4.8 Integrator-rekorder z možnostjo uporabe integracijskega načina dolina-dolina.

4.9 5 do 10- μ l mikrobrizgalke za plinsko kromatografijo z nesnemljivo iglo.

4.10 Električni grelni plašč ali grelna površina.

▼M11**5. REAGENTI**

Vsi reagenti morajo biti analizne čistoče, razen če ni drugače določeno. Voda, ki se uporabi, mora biti destilirana ali vsaj enakovredne čistoče.

- 5.1 Heksan ali mešanica alkanov z intervalom vrelišč 65 do 70 °C, destiliran z ločevalno kolono.

Opomba 2:

Topilo moramo destilirati, da odstranimo nečistoče.

- 5.2 96 % v/v etanol.

- 5.3 Brezvodni natrijev sulfat.

- 5.4 10 % alkoholna raztopina kalijevega hidroksida. K 50 g kalijevega hidroksida dodamo 10 ml vode in mešanico raztopimo v etanolu, da je skupni volumen 500 ml.

Opomba 3:

Etanolni kalijev hidroksid sčasoma porjavi, zato ga moramo pripravljati dnevno in hraniti v dobro zaprtih temnih steklenicah.

- 5.5 Silikagel 60 za kolonsko kromatografijo, 70 do 239 mesh, (Merck, kat. št. 7734 ali podoben).

Opomba 4:

Ponavadi je silikagel primeren za takojšnjo uporabo. Včasih pa lahko s svojo šibko aktivnostjo vpliva na poslabšanje kromatografskega ločevanja. V takih primerih ga je treba obdelati na naslednji način: aktiviramo ga tako, da ga grejemo vsaj štiri ure pri 550 °C. Po segrevanju damo silikagel v eksikator medtem, ko se hladi, in ga nato prenesemo v bučko z obrusom. Dodamo 2 % vode ter zmes tako premešamo, da v njej ni več grudic in da je sipka.

Če se kromatografski vrhovi prekrivajo, moramo silikagel aktivirati na zgoraj opisani način. Kot alternativa se lahko uporabi posebno čist silikagel 60 (Merck, kat. št. 7754).

- 5.6 Koncentrirana raztopina (200 ppm) holesta-3,5-diena (Sigma, čistoče 99 %) v heksanu (10 mg v 50 ml).

- 5.7 Standardna raztopina holesta-3,5-diena v heksanu koncentracije 20 ppm, ki jo dobimo z redčenjem gornje raztopine.

Opomba 5:

Raztopini iz 5.6 in 5.7 sta stabilni vsaj štiri mesece, če ju hranimo pri temperaturi manj kot 4 °C.

- 5.8 Raztopina n-nonakozana v heksanu koncentracije približno 100 ppm.

- 5.9 Nosilni plin za kromatografijo: helij ali vodik, čistoče 99,9990 %.

- 5.10 Pomožna plina za plamensko ionizacijski detektor: vodik čistoče 99,9990 % in očiščen zrak.

▼M11**6. POSTOPEK****6.1 Priprava neumiljivih snovi**

- 6.1.1 V 250-ml bučko (4.1) natehtamo 20 ± 0 , 1 g olja, dodamo 1 ml standardne raztopine holesta-3,5-diena ($20 \mu\text{g}$), 75 ml 10 % alkoholne raztopine kalijevega hidroksida, jo povežemo s povratnim hladilnikom ter ob šibkem vrenju refluktiramo 30 minut. Odstranimo bučko, ki vsebuje vzorec, in rahlo ohladimo (ne preveč, sicer se vzorec usede). Dodamo 100 ml vode in raztopino s pomočjo 100 ml heksana prelijemo v lij ločnik (4.2). Mešanico močno stresamo 30 sekund in počakamo, da se fazi ločita.

Opomba 6:

Če se tvori emulzija, ki ne izgine hitro, dodamo manjše količine etanola.

- 6.1.2 Spodnjo vodno fazo prenesemo v drug lij ločnik in jo ponovno ekstrahiramo s 100 ml heksana. Spet odločimo vodno fazo in speremo heksanska ekstrakta (združena v drugem liju ločniku) trikrat s po 100 ml mešanice etanol-voda (1:1) dokler ne dosežemo nevtralnega pH.

- 6.1.3 Heksansko raztopimo osušimo tako, da jo prelijemo prek 50 g brezvodnega natrijevega sulfata, ki ga speremo z 20 ml heksana in nato na rotavaporju pri 30°C odparimo ves heksan.

6.2 Ločitev steroidne ogljikovodične frakcije

- 6.2.1 S pomočjo dveh 1-ml dodatkov heksana prenesemo suhi ostanek v kolono, damo vzorec v kolono tako, da raven raztopine pade na vrh natrijevega sulfata in začnemo s kromatografsko elucijo s heksanom pri pretoku približno 1 ml/min. Zavrzemo prvih 25 do 30 ml eluata in nato zberemo naslednjo 40-ml frakcijo. Po zbiranju prestavimo to frakcijo v 100-ml bučko z okroglim dnom (4.3).

Opomba 7:

Prva frakcija vsebuje nasičene ogljikovodike (slika 1a) in druga steroidne ogljikovodike. Preostale frakcije pa vsebujejo še skvalen in skvalenu sorodne spojine. Če hočemo dobro ločiti steroidne ogljikovodike od nasičenih, moramo poskrbeti za optimizacijo frakcijskih volumnov. Volumen prve frakcije mora biti tolikšen, da so vrhovi nasičenih ogljikovodikov pri analizi druge frakcije nizki (glej sliko 1c). Če le-teh ni, intenziteta vrha internega standarda pa je nizka, moramo volumen zmanjšati. Popolna ločitev med spojinami iz prve in druge frakcije ni potrebna; kajti vrhovi se med GC analizo ne prekrivajo, če so pogoji GC prilagojeni, kot je navedeno v odstavku 6.3.1. Optimizacija volumna druge frakcije v glavnem ni potrebna, saj obstaja dobra ločitev z nadaljnjimi komponentami. Kljub temu pa je prisotnost velikega vrha skvalena s približno 1,5 minute krajšim retencijskim časom od retencijskega časa vrha internega standarda dokaz za slabo ločevanje.

- 6.2.2 Drugo frakcijo odparimo na rotavaporju pri 30°C pod zmanjšanim pritiskom in preostanek takoj raztopimo v 0,2 ml heksana. Raztopino hranimo v hladilniku do analize.

Opomba 8:

Preostankov iz 6.1.3 in 6.2.2 ne smemo hraniti na sobni temperaturi v suhi obliki. Takoj ko ju pridobimo, jima moramo dodati topilo in raztopino shraniti v hladilniku.

▼ M11**6.3 Plinska kromatografija****6.3.1 Delovni pogoji za split injiciranje:**

- temperatura injektorja: 300 °C,
- temperatura detektorja: 320 °C,
- integrator-rekorder: integracijski parametri morajo biti takšni, da omogočajo točno določitev površin. Priporočljiva je integracija dolina-dolina (valley-valley),
- občutljivost: 16-kratna najmanjša atenuacija,
- količina injicirane raztopine: 1 µl,
- programiranje temperature peči: začetna temperatura 235 °C za šest minut in nato segrevanje s hitrostjo 2 °C/minuto do 285 °C,
- injektor z 1: 15 razdelilcem pretoka,
- nosilni plin: helij ali vodik s pritiskom približno 120 kPa.

Te pogoje lahko prilagodimo v skladu z značilnostmi kromatografa in kolone tako, da dobimo kromatograme, ki ustrezajo naslednjim merilom: retencijski čas internega standarda se ne sme razlikovati za več kot pet minut od časa, ki je podan v 6.3.2; višina vrha internega standarda mora segati vsaj do 80 % višine polne skale.

Plinsko kromatografski sistem moramo preveriti še z injiciranjem mešanice koncentrirane raztopine holestadiena (5.6) in raztopine n-nonakozana (5.8). Retencijski čas holesta-3,5-diena mora biti manjši od retencijskega časa n-nonakozana (slika 1c). Če temu ni tako, lahko to popravimo na dva načina: ali znižamo temperaturo kolone in/ali uporabimo manj polarno kolono.

6.3.2 Identifikacija vrhov

Vrh internega standarda se pojavlja na približno 19 minut, relativni retencijski čas 3,5-stigmastadiena pa je približno 1,29 (glej sliko 1b). 3,5-stigmastadien se pojavlja v spremstvu manjših količin svojega izomera; oba ponavadi eluirata kot en kromatografski vrh. Če pa je kromatografska kolona preveč polarna ali pa zelo dobro ločuje, se lahko izomer pojavi kot majhen vrh pred in blizu stigmasta-3,5-diena (slika 2). Da se zagotovi, da so stigmastadieni eluirani kot en vrh, je priporočljivo kolono zamenjati z manj polarno ali pa s tako, ki ima večji notranji premer.

Opomba 9:

Referenčne stigmastadiene lahko dobimo z analizo rafiniranega rastlinskega olja z uporabo manjše količine vzorca (1 do 2 g). Stigmastadieni tvorijo značilen in dobro viden vrh.

6.3.3 Kvantitativna analiza

Vsebina stigmastadienov se določi v skladu s formulo:

$$\text{mg/kg stigmastadienov} = \frac{A_s \times M_e}{A_e \times M_o}$$

▼ M11

kjer je A_s = površina stigmastadienskega vrha (če je vrh razdeljen v dva izomera, seštejemo površini obeh),

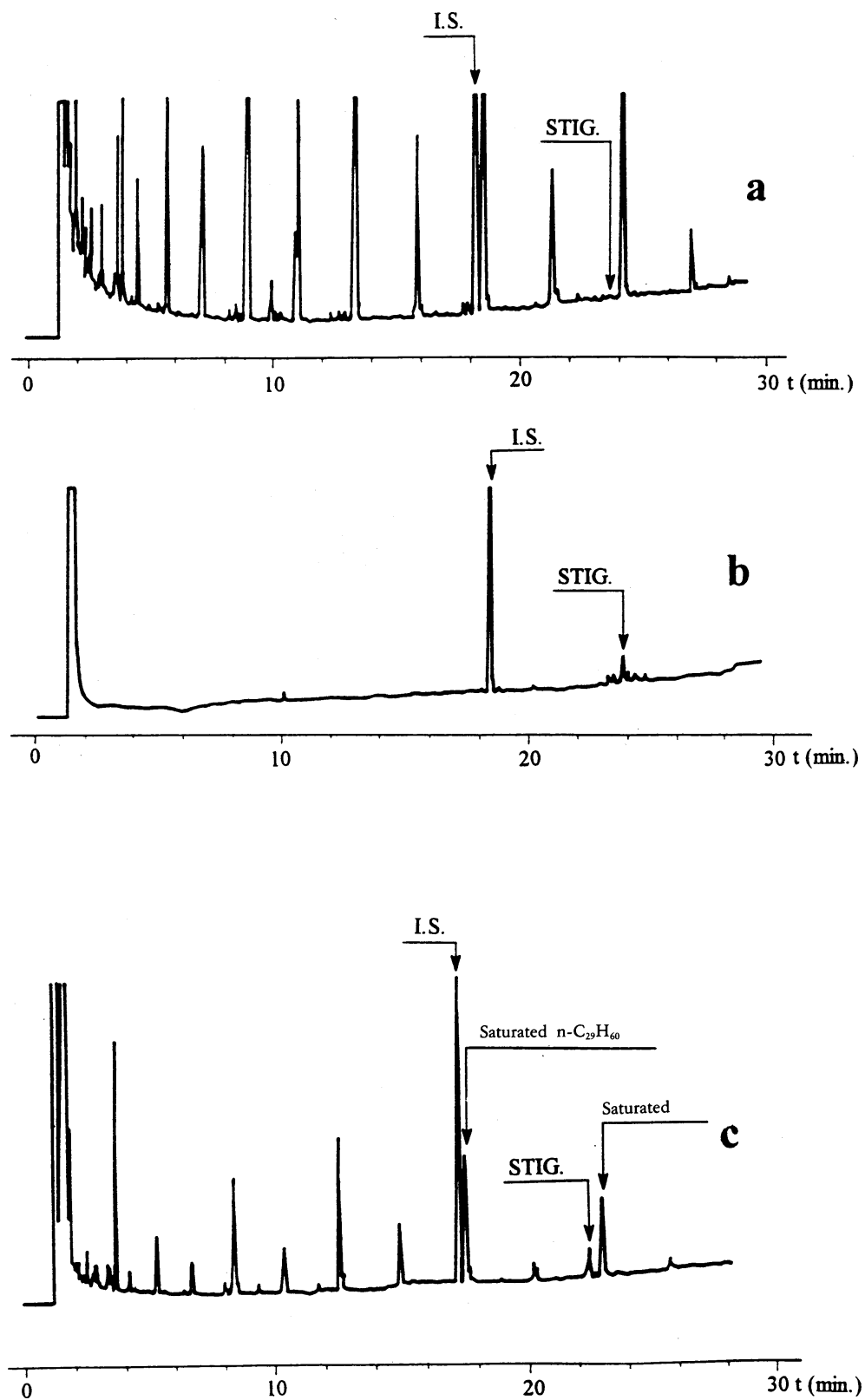
A_c = površina internega standarda (holastadien),

M_c = masa dodanega standarda v mikrogramih,

M_o = masa vzetega olja v gramih.

Meja detekcije: približno 0,01 mg/kg.

▼ M11

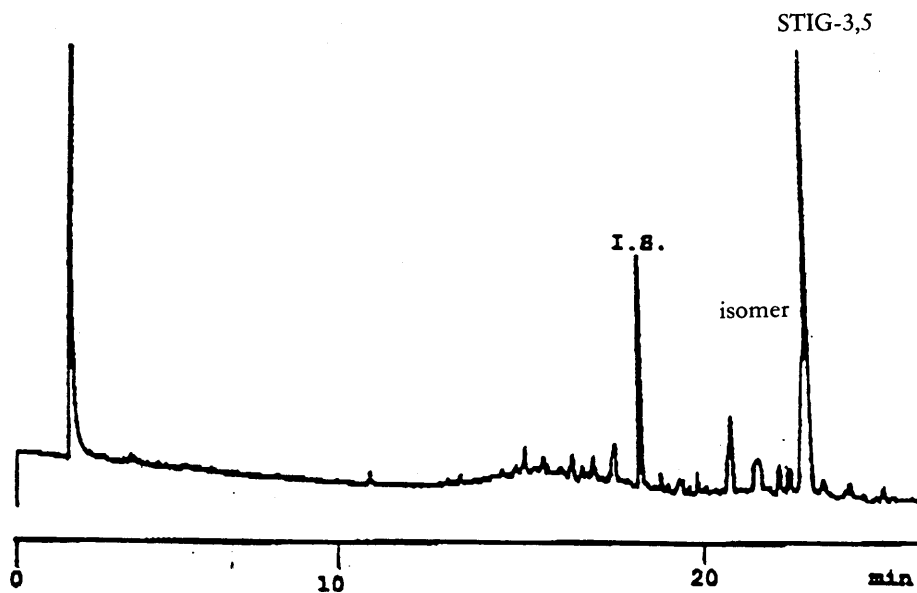


Slika 1

Plinski kromatogrami vzorcev oljčnega olja, analizirani na kapilarni koloni (z notranjim premerom 0,25 mm, dolžine 25 m) z notranjim nanosom 5 % -fenil-metilsilikonske faze v debelini 0,25 μm).

▼ M11

- (a) Prva frakcija (30 ml) iz deviškega olja z dodanim standardom.
- (b) Druga frakcija (40 ml) iz oljčnega olja z vsebnostjo 0,10 mg/kg stigmastadienov.
- (c) Druga frakcija (40 ml), ki vsebuje nizek delež prve frakcije.

**Slika 2**

Plinski kromatogram, pridobljen iz vzorca rafiniranega oljčnega olja, analiziranega na DB-5 koloni, kaže izomer 3,5-stigmastadiena.

▼ **M25***PRILOGA XVIII***DOLOČANJE RAZLIKE MED DEJANSKO IN TEORETIČNO VSEBNOSTJO TRIACILGLICEROLOV Z EKVIVALENTNIM OGLJIKOVIM ŠTEVILOM (ECN) 42****1. NAMEN**

Določanje absolutne razlike med eksperimentalnimi vrednostmi triacilglicerolov (TAG) z ekvivalentnim ogljikovim številom 42 (ECN_{42HPLC}) v olju, dobljenimi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, in teoretično vrednostjo triacilglicerolov z ekvivalentnim ogljikovim številom 42 (ECN 42_{teoretično}), izračunano na podlagi sestave maščobnih kislin.

2. PODROČJE UPORABE

Standard se uporablja za oljna olja. Metoda se uporablja za odkrivanje prisotnosti majhnih količin semenskih olj (bogatih z linolno kislino) v vsaki posamezni kategoriji oljčnih olj.

3. PRINCIP

Vsebnost triacilglicerolov z ECN 42, določena z analizo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC), in teoretična vsebnost triacilglicerolov z ECN 42 (izračunana na podlagi določitve sestave maščobnih kislin s plinsko-tekočinsko kromatografijo) sta v okviru določene mejne vrednosti za pristna oljna olja. Če je razlika večja od vrednosti, sprejetih za posamezno vrsto olja, to pomeni, da olje vsebuje semenska olja.

4. METODA

Metoda za izračun teoretične vsebnosti triacilglicerolov z ECN 42 in razlike glede na podatke tekočinske kromatografije visoke ločljivosti se v bistvu izvaja z uskladitvijo analitičnih podatkov, dobljenih z drugimi metodami. Razlikovati je mogoče med tremi fazami: določanjem sestave maščobnih kislin s kapilarno plinsko kromatografijo, izračunom teoretične sestave triacilglicerolov z ECN 42 in določanjem triacilglicerolov z ECN 42 s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.

4.1 Oprema

4.1.1 Bučke z okroglim dnom, 250 in 500 ml.

4.1.2 Čaše, 100 ml.

4.1.3 Steklена kromatografska kolona z notranjim premerom 21 mm, dolžine 450 mm, s petelinčkom in standardiziranim konusom (z notranjim obrušom) na vrhu.

4.1.4 Liji ločniki, 250 ml, s standardiziranim konusom (z zunanjim obrušom) na dnu, primerni za pritrditev na vrh kolone.

4.1.5 Steklена paličica dolžine 600 mm.

4.1.6 Steklени lij s premerom 80 mm.

4.1.7 Merilne bučke, 50 ml.

4.1.8 Merilne bučke, 20 ml.

4.1.9 Rotacijski izparilnik.

4.1.10 Kromatograf za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, ki omogoča termostatski nadzor temperature kolone.

4.1.11 Injektorji za vnos 10 µl.

4.1.12 Detektor: diferencialni refraktometer. Občutljivost celotne skale mora biti najmanj 10⁻⁴ enote lomnega količnika.

▼ M25

4.1.13 Kolona: jeklena cevka, dolga 250 mm in z notranjim premerom 4,5 mm, polnjena z delci silicijevega dioksida premera 5 µm, z 22 do 23 % ogljika v obliki oktaedecilsilana.

4.1.14 Programska oprema za obdelavo podatkov.

4.1.15 Stekleničke (viale) s prostornino približno 2 ml, s teflonskimi tesnili in navojnimi zamaški.

4.2 Reagenti

Reagenti morajo biti analitsko čisti. Elucijska topila morajo biti razplinjena in se jih lahko večkrat reciklira brez vpliva na ločevanje.

4.2.1 Petroleter 40–60 °C za kromatografijo ali heksan.

4.2.2 Sveže destilirani etil eter brez peroksidov.

4.2.3 Elucijsko topilo za čiščenje olja s kolonsko kromatografijo, mešanica petroletra/etil etra 87/13 (v/v).

4.2.4 Silikagel, 70–230 mesh, tip Merck 7734, s standardizirano 5-odstotno vsebnostjo vode (w/w/).

4.2.5 Steklena volna.

4.2.6 Aceton za HPLC.

4.2.7 Acetonitril ali propionitril za HPLC.

4.2.8 Elucijsko topilo za HPLC: acetonitril + aceton (treba je prilagoditi deleže, da se doseže želeno ločevanje; začnite z mešanico 50: 50) ali propionitril.

4.2.9 Topilo za raztapljanje vzorca: aceton.

4.2.10 Referenčni trigliceridi: uporabijo se lahko komercialni trigliceridi (tripalmitin, triolein itd.) in se potem retencijski časi zapisujejo glede na ekvivalentno ogljikovo število; ali alternativno, referenčni kromatogram, dobljen s sojinim oljem, mešanico 30: 70 sojino olje – oljčno olje in čistim oljčnim oljem (glej opombi 1 in 2 ter slike 1 do 4).

4.2.11 6-mililitrska kolona za ekstrakcijo v trdni fazi, s fazo 1 g silikagela.

4.3 Priprava vzorcev

Ker lahko zaradi številnih motečih snovi dobimo lažno pozitivne rezultate, je treba vzorec vedno očistiti po metodi IUPAC št. 2507, ki se uporablja za določanje polarnih spojin v maščobah za cvrtje.

4.3.1 Priprava kromatografske kolone

V kolono (4.1.3) vlijemo približno 30 ml elucijskega topila (4.2.3), nato v kolono vstavimo nekaj steklene volne (4.2.5) in jo s stekleno paličico potisnemo na dno (4.1.5).

V 100-mililitrski čaši raztopimo 25 g silikagela (4.2.4) v 80 ml elucijske mešanice (4.2.3.), nato jo skozi stekleni lij prenesemo v kolono (4.1.6).

Da zagotovimo popoln prenos silikagela v kolono, speremo čašo z elucijsko mešanico in tudi to tekočino prenesemo v kolono.

Odpremo petelinček in pustimo, da topilo eluira iz kolone, dokler ne sega približno 1 cm nad silikagel.

▼ **M25**4.3.2 *Kolonska kromatografija*

Z natančnostjo 0,001 g natehtamo $2,5 \pm 0,1$ g olja, po potrebi predhodno prefiltriranega, homogeniziranega in dehidriranega, v 50-mililitrsko merilno bučko (4.1.7).

Raztopimo ga v približno 20 ml elucijskega topila (4.2.3). Po potrebi nekoliko segrejemo, da pospešimo raztapljanje. Ohladimo pri sobni temperaturi in volumen prilagodimo z elucijskim topilom.

Z merilno pipeto vnesemo 20 ml raztopine v kolono, pripravljeno v skladu s točko 4.3.1, odpremo petelinček in pustimo, da topilo eluira do višine plasti silikagela.

Nato eluiramo s 150 ml elucijskega topila (4.2.3.), pri čemer hitrost pretoka topila prilagodimo na približno 2 ml/min (150 ml bo šlo skozi kolono v približno 60–70 minutah).

Eluat se zbira v 250-mililitrski bučki z okroglim dnom (4.1.1), ki je bila predhodno tarirana v peči in natančno stehtana. Topilo odstranimo pri znižanem tlaku v rotacijskem izparilniku (4.1.9) in stehtamo ostanek, ki se bo uporabil za pripravo raztopine za analizo HPLC in pripravek metil estra.

Izkoristek vzorca iz kolone mora biti najmanj 90-odstoten za kategorije oljčnega olja ekstra deviško, deviško, navadno in rafinirano, ter najmanj 80-odstoten za lampante oljčno olje in olje iz oljčnih tropin.

4.3.3 *Čiščenje z ekstrakcijo v trdni fazi*

Kolona s silikagelom za ekstrakcijo v trdni fazi se aktivira s 6 ml heksana (4.2.3) v vakuumu, pri čemer je treba preprečiti izsušitev.

Z natančnostjo 0,001 g natehtamo 0,12 g v 2-mililitrsko vialo (4.1.15) in razredčimo z 0,5 ml heksana (4.2.3).

Raztopino vnesemo v kolono za ekstrakcijo v trdni fazi in eluiramo z 10 ml heksana/dietil etra (87: 13 v/v) (4.2.3) v vakuumu.

Zbrana frakcija se v rotacijskem izparilniku (4.1.9) odpari do suhega pod znižanim tlakom pri sobni temperaturi. Ostanek se raztopi v 2 ml acetona (4.2.6) za analizo triacilglicerolov (TAG).

4.4 **Analiza HPLC**4.4.1 *Priprava vzorcev za kromatografsko analizo*

5-odstotno raztopino vzorca za analizo pripravimo tako, da v 10-mililitrsko merilno bučko natehtamo $0,5 \pm 0,001$ g vzorca in dolijemo topilo do oznake 10 ml (4.2.9).

4.4.2 *Postopek*

Pripravimo kromatografski sistem. Elucijsko topilo (4.2.8) črpamo s hitrostjo 1,5 ml/min, da očistimo celotni sistem. Počakamo, da dobimo stabilno bazno linijo.

Vbrizgamo 10 µl vzorca, pripravljenega v skladu s točko 4.3.

4.4.3 *Izračun in izražanje rezultatov*

Uporabimo metodo normalizacije površine, tj. predpostavimo, da je vsota površin vrhov, ki ustreza triacilglicerolom z ekvivalentnim ogljikovim številom od ECN 42 do ECN 52, enaka 100 %.

Izračunamo relativni odstotni delež posameznega triglicerida z uporabo enačbe:

$$\% \text{ triglicerida} = \text{površina vrha} \times 100 / \text{vsota površin vrhov}.$$

Rezultate je treba podati na vsaj dve decimalni mesti natančno.

Glej opombe od 1 do 4.

▼ **M25****4.5 Izračun sestave triacilglicerolov (mol %) na podlagi podatkov o sestavi maščobnih kislin (površinski %)****4.5.1 Določanje sestave maščobnih kislin**

Sestava maščobnih kislin se določi na podlagi standarda ISO 5508 s kapilarno kolono. Metil estri se pripravijo v skladu z dokumentom Mednarodnega sveta za oljčno olje COI/T.20/Dok. št. 24.

4.5.2 Maščobne kisline za izračun

Gliceridi se razvrstijo glede na ekvivalentno ogljikovo število (ECN), pri čemer se upoštevajo naslednje ekvivalence med ECN in maščobnimi kislinami. Upoštevane so bile samo maščobne kisline s 16 in 18 ogljikovimi atomi, ker so samo te pomembne za oljčno olje. Maščobne kisline je treba normalizirati do 100 %.

Maščobna kislina (MK)	Kratika	Molekulska masa (M)	ECN
Palmitinska kislina	P	256,4	16
Palmitoleinska kislina	Po	254,4	14
Stearinska kislina	S	284,5	18
Oleinska kislina	O	282,5	16
Linolna kislina	L	280,4	14
Linolenska kislina	Ln	278,4	12

4.5.3 Pretvorba površinskega % v mole za vse maščobne kisline (1)

$$\begin{aligned} \text{mol P} &= \frac{\text{površinski \% P}}{M P} & \text{mol S} &= \frac{\text{površinski \% S}}{M S} & \text{mol Po} &= \frac{\text{površinski \% Po}}{M Po} \\ \text{mol O} &= \frac{\text{površinski \% O}}{M O} & \text{mol L} &= \frac{\text{površinski \% L}}{M L} & \text{mol Ln} &= \frac{\text{površinski \% Ln}}{M Ln} \end{aligned}$$

4.5.4 Normalizacija maščobnih kislin do 100 % (2)

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

Rezultat pomeni odstotni delež posamezne maščobne kisline v mol % na vseh (1, 2, 3) položajih triacilglicerolov.

Nato so izračunata vsoti nasičenih maščobnih kislin P in S (NMK) ter nenasičenih maščobnih kislin Po, O, L in Ln (NEMK)(3):

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

$$\text{mol \% NEMK} = 100 - \text{mol \% NMK}$$

▼ **M25**4.5.5 *Izračun sestave maščobnih kislin na položajih 2 ter 1 in 3 triacilglicerolov*

Maščobne kisline so razdeljene na naslednje tri skupine: ena za položaj 2 in dve enaki za položaja 1 in 3, z različnimi koeficienti za nasičene (P in S) in nenasičene kisline (Po, O, L in Ln).

4.5.5.1 Nasičene maščobne kisline na položaju 2 [P(2) in S(2)] (4)

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

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

4.5.5.2 Nenasičene maščobne kisline na položaju 2 [Po(2), O(2), L(2) in Ln(2)] (5):

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

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

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

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

4.5.5.3 Maščobne kisline na položajih 1 in 3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) in Ln(1,3)] (6):

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

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

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

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

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

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

4.5.6 *Izračun triacilglicerolov*

4.5.6.1 TAG s samo eno maščobno kislino (AAA, tukaj LLL, PoPoPo) (7)

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

4.5.6.2 TAG z dvema maščobnima kislinama (AAB, tukaj PoPoL, PoLL) (8)

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

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

▼ **M25**

- 4.5.6.3 TAG s tremi različnimi maščobnimi kislinami (ABC, tukaj OLLn, PLLn, PoOLn, PPoLn) (9)

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

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

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

- 4.5.6.4 Triacilgliceroli z ekvivalentnim ogljikovim številom (ECN 42)

Triacilgliceroli z ECN 42 se izračunajo po enačbah 7, 8 in 9, nato pa se navedejo v vrstnem redu pričakovane elucije v HPLC (običajno samo trije vrhovi).

LLL

PoLL in položajni izomer LPoL

OLLn ter položajna izomera OLnL in LnOL

PoPoL in položajni izomer PoLPo

PoOLn ter položajna izomera OPoLn in OLnPo

PLLn ter položajna izomera LLnP in LnPL

PoPoPo

SLnLn in položajni izomer LnSLn

PPoLn ter položajna izomera PLnPo in PoPLn

Triacilglicerole z ECN 42 dobimo z vsoto devetih triacilglicerolov, vključno z njihovimi položajnimi izomeri. Rezultate je treba podati na vsaj dve decimalni mesti natančno.

5. VREDNOTENJE REZULTATOV

Primerjata se izračunana teoretična vsebnost in vsebnost, določena z analizo HPLC. Če je absolutna razlika, ki jo dobimo, ko od podatkov HPLC odštejemo teoretične podatke, večja od vrednosti, navedenih za ustrezno kategorijo olja v standardu, vzorec vsebuje semensko olje.

Rezultati so podani na dve decimalni mesti natančno.

6. PRIMER (ŠTEVILKE SE NANAŠAJO NA ODDELKE V BESEDILU METODE)

— 4.5.1 *Izračun mol % maščobnih kislin na podlagi podatkov plinsko-tekočinske kromatografije (normaliziran površinski %)*

Glede sestave maščobnih kislin s plinsko-tekočinsko kromatografijo dobimo naslednje podatke:

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

▼ **M25**

- 4.5.3 *Pretvorba površinskega % v mole za vse maščobne kisline (glej enačbo 1)*

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

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

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

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

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

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

$$\text{Skupaj} = 0,35821 \text{ mol TAG}$$

- 4.5.4 *Normalizacija molov maščobnih kislin do 100 % (glej enačbo 2)*

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

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

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

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

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

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

$$\text{Skupaj mol \%} = 100 \%$$

Vsota nasičenih in nenasičenih maščobnih kislin na položajih 1, 2 in 3 TAG (glej enačbo 3):

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

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

- 4.5.5 *Izračun sestave maščobnih kislin na položajih 2 ter 1 in 3 TAG*

- 4.5.5.1 *Nasičene maščobne kisline na položaju 2 [P(2) in S(2)] (glej enačbo 4)*

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

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

- 4.5.5.2 *Nenasičene maščobne kisline na položaju 2 [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) in Ln(1,3)] (glej enačbo 5)*

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

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

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

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

▼ **M25**

- 4.5.5.3 Maščobne kisline na položajih 1 in 3 [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) in Ln(1,3)] (glej enačbo 6)

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

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

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

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

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

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

- 4.5.6 *Izračun triacilglicerolov*

Iz izračunane sestave maščobnih kislin na položajih sn-2 in sn-1,3:

MK in	Položaja 1 in 3	Položaj 2
P	16,004 %	0,653 %
S	4,325 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,262 %
O	68,526 %	85,296 %
L	9,204 %	11,457 %
Ln	0,927 %	1,153 %
Vsota	100,0 %	100,0 %

se izračunajo naslednji triacilgliceroli:

LLL

PoPoPo

PoLL z enim položajnim izomerom

SLnLn z enim položajnim izomerom

PoPoL z enim položajnim izomerom

PPoLn z dvema položajnima izomeroma

OLLn z dvema položajnima izomeroma

PLLn z dvema položajnima izomeroma

PoOLn z dvema položajnima izomeroma

- 4.5.6.1 TAG z eno maščobno kislino (LLL, PoPoPo) (glej enačbo 7)

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

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

▼ **M25**

— 4.5.6.2 TAG z dvema maščobnima kislinama (PoLL, SLnLn, PoPoL) (glej enačbo 8)

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

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

0,03210 mol PoLL

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

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

0,00094 mol SLnLn

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

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

0,00354 mol PoPoL

— 4.5.6.3 TAG s tremi različnimi maščobnimi kislinami (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) Glej enačbo 9

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

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

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

0,00761 mol PPLn

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

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

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

0,43655 mol OLLn

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

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

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

0,06907 mol PLLn

▼ **M25**

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

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

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

0,04812 mol PoOLn

ECN 42 = 0,69512 mol TAG

Opomba 1: Vrstni red elucije se lahko določi z izračunom ekvivalentnih ogljikovih števil, pogosto definiranih z odnosom $ECN = CN - 2n$, kjer je CN ogljikovo število in n število dvojnih vezi; veliko bolj natančno jo je mogoče izračunati z upoštevanjem izvora dvojnih vezi. Če so n_o , n_l in n_{ln} števila dvojnih vezi, ki se pripisujejo oleinski, linolni oziroma linolenski kislini, se ekvivalentno ogljikovo število lahko izračuna s pomočjo relacije v enačbi:

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

kjer se koeficienti d_o , d_l in d_{ln} lahko izračunajo s pomočjo referenčnih trigliceridov. Pod pogoji, določenimi v tem postopku, bo dobljena relacija približno:

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

Opomba 2: Z več referenčnimi trigliceridi je mogoče izračunati tudi resolucijo glede na triolein:

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

z uporabo reduciranega retenzijskega časa $RT^1 = RT - RT \text{ topilo}$

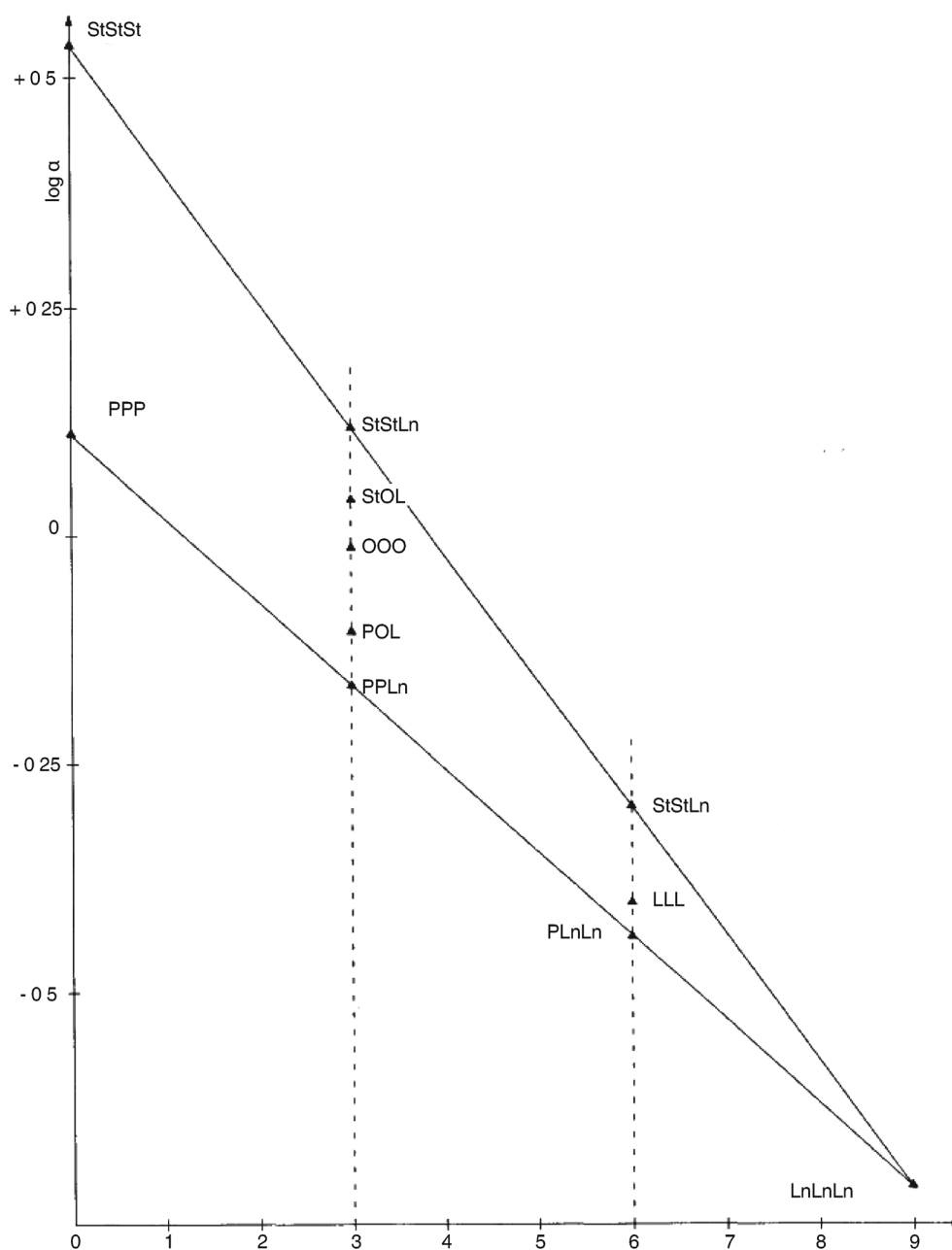
Graf $\log \alpha$ kot funkcija f (število dvojnih vezi) omogoča, da se določijo retenzijske vrednosti za vse trigliceride maščobnih kislin, vsebovanih v referenčnih trigliceridih – glej sliko 1.

Opomba 3: Učinkovitost kolone mora omogočati jasno ločevanje vrha trilinoleina od vrhov trigliceridov s sosednjim retenzijskim časom. Elucija se izvede do vrha ECN 52.

Opomba 4: Pravilna meritev površin vseh vrhov, upoštevanih za to določanje, je zagotovljena, če drugi vrh za ECN 50 pokriva 50 % celotne lestvice rekorderja.

▼ **M25**

Slika 1

Graf $\log a$ kot funkcija f (število dvojnih vezi)

Število dvojnih vezi

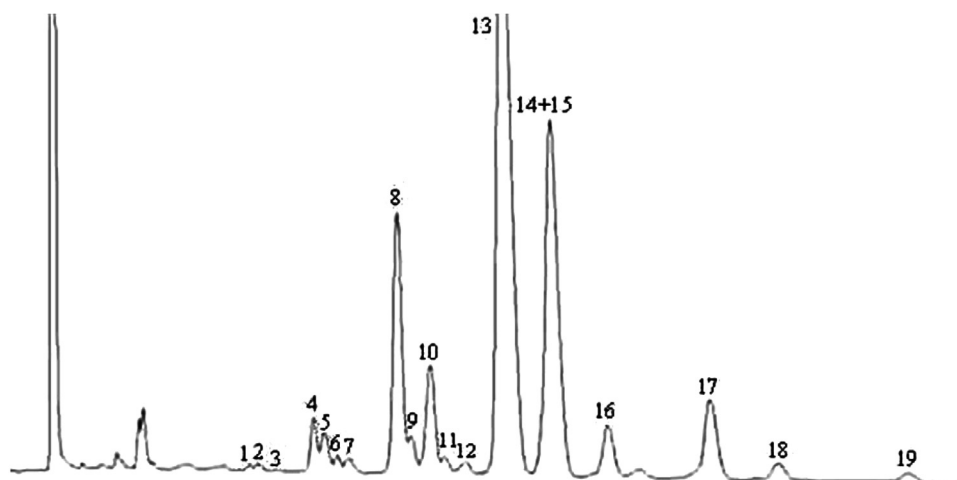
La: lavrinska kislina; My: miristinska kislina; P: palmitinska kislina; S: stearinska kislina; O: oleinska kislina; L: linolna kislina; Ln: linolenska kislina

▼ **M25**

Slika 2

Oljčno olje z nizko vsebnostjo linolne kisline

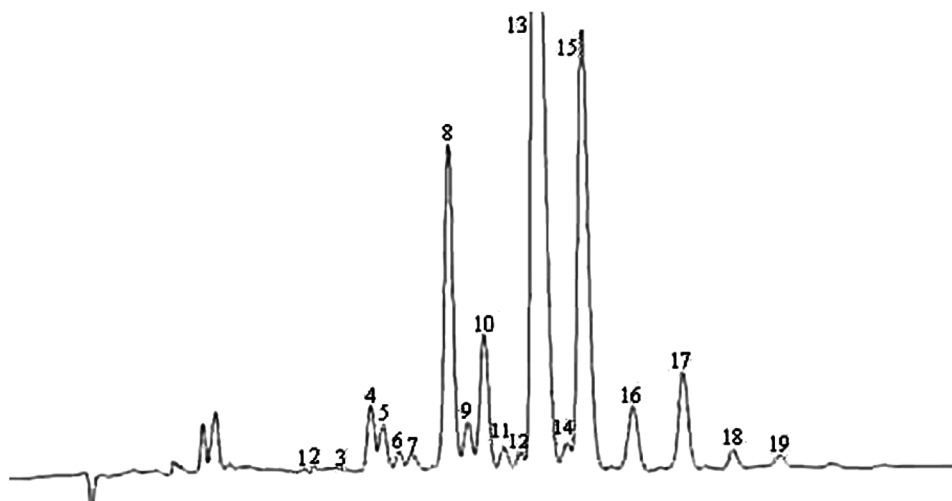
(a)



S topilom: aceton/acetonitril.

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

(b)



S topilom: propionitril

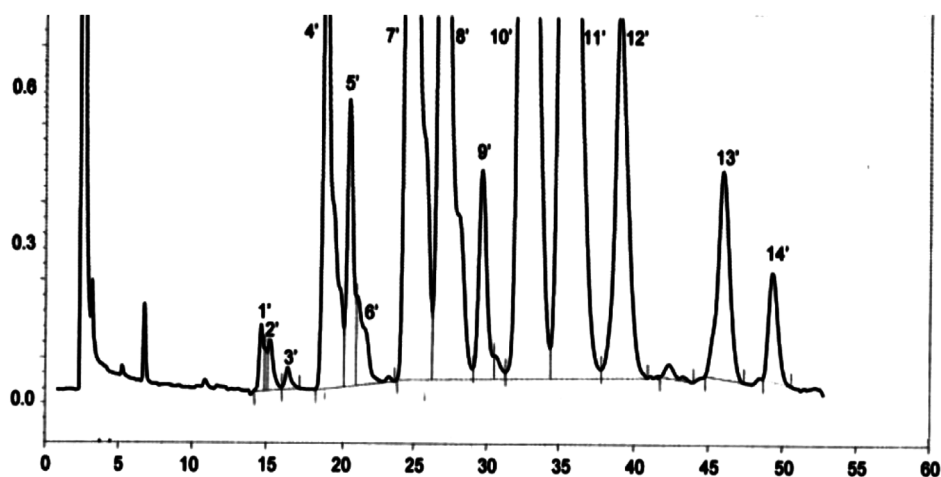
PROFIL b: Glavne sestavine kromatografskih vrhov: **ECN42**: (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPoPo + PPoL; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP; (14)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

▼ M25

Slika 3

Oljčno olje z visoko vsebnostjo linolne kisline

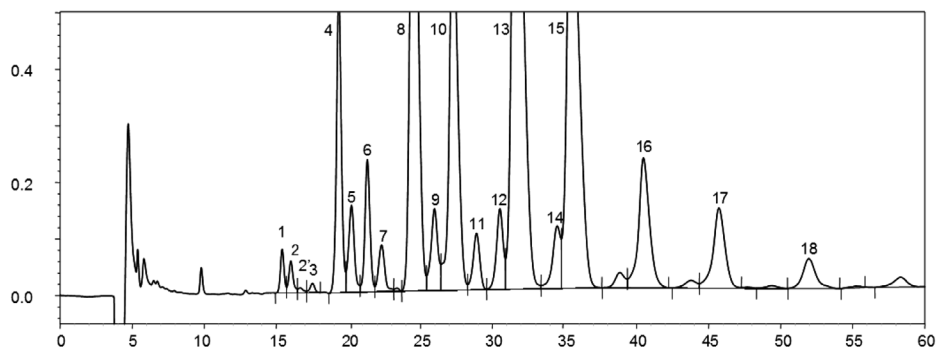
(a)



S topilom: aceton/acetonitril (50:50).

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

(b)



S topilom: propionitril.

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

▼ M19*ANNEX XIX***▼ M28****DOLOČANJE VSEBNOSTI ALIFATSKIH IN TRITERPENSKIH
ALKOHOLOV S KAPILARNO PLINSKO KROMATOGRAFIJO****1. PREDMET UREJANJA**

Ta priloga opisuje metodo za določanje vsebnosti alifatskih in triterpen-
skih alkoholov v oljih in maščobah.

▼ M19**2. PRINCIPLE OF THE METHOD**

The fatty substance, with 1-eicosanol added as internal standard, is
saponified with ethanolic potassium hydroxide and then the unsaponi-
fiable matter extracted with ethyl ether. The alcoholic fraction is sepa-
rated from the unsaponifiable matter by chromatography on a basic
silica gel plate; the alcohols recovered from the silica gel are trans-
formed into trimethylsilyl ethers and analysed by capillary gas chroma-
tography.

3. EQUIPMENT

3.1. 250 ml round-bottomed flask fitted with a reflux condenser having
ground-glass joints.

3.2. 500 ml separating funnel.

3.3. 250 ml round-bottomed flasks.

3.4. Chromatographic tank for thin-layer chromatographic analysis, for glass
plates of dimensions 20 x 20 cm.

3.5. Ultraviolet lamp having a wavelength of 366 or 254 nm.

3.6. 100 µl and 500 µl microsyringes.

3.7. A cylindrical filter funnel with a G3 porous septum (porosity 15 to
40 µm) of diameter approximately 2 cm and a depth of some 5 cm,
with an attachment suitable for filtration under vacuum and a 12/21
male ground glass joint.

3.8. 50 ml vacuum conical flask with a 12/21 ground-glass female joint
which can be fitted to the filter funnel (3.7).

3.9. A 10 ml test tube with a tapering bottom and a sealing stopper.

3.10. Gas chromatograph for use with a capillary column, and provided with
a splitting system composed of:

3.10.1. Thermostatic chamber for columns (column oven) to hold the tempera-
ture desired with a precision of ± 1 °C.

3.10.2. A temperature-adjustable injection unit with a persilanised glass vapo-
rising element.

3.10.3. A flame ionisation detector and converter-amplifier.

3.10.4. Recorder-integrator for operation with the converter-amplifier (3.10.3),
with response time not exceeding one second and with variable paper-
speed.

3.11. Glass or fused silica capillary column, of length 20 to 30 m, internal
diameter 0,25 to 0,32 mm, with SE-52 or SE-54 liquid phase or equi-
valent, with a film thickness between 0,10 and 0,30 µm.

3.12. Microsyringe for gas chromatography, of 10 µl capacity with hardened
needle.

3.13. Analytical balance sensitive to 1 mg (with 0,1 mg display).

▼ M19

4. REAGENTS

- 4.1. Potassium hydroxide, approximately 2 N ethanolic solution: 130 g potassium hydroxide (minimum concentration 85 %) is dissolved, with cooling, in 200 ml distilled water and then made up to one litre with ethanol. The solution should be stored in a well-stoppered opaque glass bottle.
- 4.2. Ethyl ether, pure for analysis.
- 4.3. Anhydrous sodium sulphate, analytical purity.
- 4.4. Glass plates coated with silica gel, without fluorescence indicator, thickness 0,25 mm (commercially available ready for use).
- 4.5. Potassium hydroxide, approximately 0,2 N ethanolic solution; 13 g of potassium hydroxide are dissolved in 20 ml of distilled water and made up to one litre with ethanol.
- 4.6. Benzene, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.7. Acetone, for chromatography (See 5.2.2).
- 4.8. Hexane, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.9. Ethyl ether, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.10. Chloroform, for chromatography.

▼ M28

- 4.11. Referenčna raztopina za tankoplastno kromatografijo: 0,5 % mešanica alkoholov C₂₀ do C₂₈ v kloroformu ali alkoholna frakcija, dobljena iz neumiljive snovi olja iz oljčnih tropin v skladu s točko 5.2.

▼ M19

- 4.12. 0,2 % solution of 2', 7'-dichlorofluorescein in ethanol. Make slightly basic by adding a few drops of 2 N alcoholic potassium hydroxide solution.
- 4.13. Anhydrous pyridine, for chromatography.
- 4.14. Hexamethyl disilazane.
- 4.15. Trimethylchlorosilane.
- 4.16. Standard solutions of trimethylsilyl ethers of aliphatic alcohols from C₂₀ to C₂₈. They may be prepared from mixtures of pure alcohols at the time they are required for use.
- 4.17. A 0,1 % (m/v) solution of 1-eicosanol in chloroform (internal standard).
- 4.18. Carrier gas: hydrogen or helium, gas-chromatographic purity.
- 4.19. Auxiliary gas: nitrogen, gas-chromatographic purity.
- 5. PROCEDURE
- 5.1. **Preparation of the unsaponifiables**
- 5.1.1. Using a 500 µl microsyringe place, into a 250 ml round-bottom flask, a volume of 0,1 % 1-eicosanol solution in chloroform (4.17) containing a quantity of 1-eicosanol approximately equal to 10 % of the aliphatic alcohols content in that portion of sample to be taken for analysis. For example, to 5 g of sample add 250 µl of the 0,1 % 1-eicosanol solution if olive oil and 1 500 µl if olive pomace oil.

Evaporate to dryness in current of nitrogen and then weigh accurately 5 g of the dry filtered sample into the same flask.

▼ M19

5.1.2. Add 50 ml of 2 N potassium hydroxide ethanolic solution, fit the reflux condenser and heat the apparatus to slight boiling on a steam bath, stirring continuously throughout the heating process until saponification has taken place (the solution becomes clear). Continue heating for a further 20 minutes and then add 50 ml of distilled water through the condenser. The condenser is then disconnected and the flask cooled to approximately 30 °C.

5.1.3. The contents of the flask are quantitatively transferred to a separating funnel of 500 ml capacity by adding distilled water several times, using a total of around 50 ml distilled water. Add approximately 80 ml of ethyl ether, shake vigorously for approximately 30 seconds and allow to settle (Note 1).

Separate off the lower aqueous phase collecting it in a second separating funnel. Two further extractions are effected on the aqueous phase, in the same manner, using each time 60 to 70 ml ethyl ether.

Note 1: Emulsions may be eliminated by adding, using as a spray, small quantities of ethyl alcohol or methyl alcohol.

5.1.4. The ethyl ether extracts are combined in a separating funnel and washed with distilled water (50 ml at a time) until the washing water gives a neutral reaction.

Discard the washing water, dry with anhydrous sodium sulphate and filter, into a flask of 250 ml capacity which has been weighed beforehand, the funnel and filter being washed with small quantities of ethyl ether which are added to the total.

5.1.5. Distil the ether down to a few ml, then bring to dryness under a slight vacuum or in a current of nitrogen, completing drying in an oven at 100 °C for approximately a quarter of an hour, and then weigh after cooling in a desiccator.

5.2. Separation of alcoholic fractions

5.2.1. Preparation of basic TLC plates: the silica gel plates (4.4) are immersed completely, in 0,2 N potassium hydroxide solution (4.5) for 10 seconds, and then left to dry for two hours under an extractor hood and finally placed in an oven at 100 °C for one hour.

Remove from the oven and keep in a calcium chloride desiccator until required for use (plates treated in this way must be used within 15 days).

Note 2: When basic silica gel plates are used to separate the alcoholic fraction there is no need to treat the unsaponifiables with alumina. It follows that all acid compounds (fatty acids and others) are retained at the origin thereby obtaining both aliphatic alcohol and terpenic alcohol bands which are both separated distinctly from the sterol band.

5.2.2. Place a 65/35 by volume hexane/ethyl ether mixture in the plate-developing chamber to a depth of approximately 1 cm ⁽¹⁾.

Close the chamber using an appropriate cover and leave for half an hour to allow equilibration between vapour and liquid. Strips of filter paper dipping into the eluent may be affixed to the inside surfaces of the tank to reduce the development time by approximately one third and obtain more uniform, regular elution of the components.

⁽¹⁾ In these cases in particular, a 95/5 by volume benzene/acetone eluent mixture must be used to obtain distinct band separation.

▼ M19

Note 3: The developing solution must be replaced for each analysis in order to obtain reproducible developing conditions.

- 5.2.3. An approximately 5 % solution of unsaponifiable matter (5.1.5) in chloroform is prepared and 0,3 ml of the solution is streaked as a uniform strip of minimum thickness, using the 100 µl microsyringe, on a TLC plate at approximately 2 cm from the bottom of the TLC plate. Aligned with the origin, 2 to 3 µl of the aliphatic alcohols reference solution (4.11) are spotted for the identification of the aliphatic alcohols band after development has been completed.
- 5.2.4. Place the plate inside the development tank as stated in 5.2.2. The ambient temperature should be maintained between 15 and 20 °C. Immediately close the chamber with the cover and allow to elute until the solvent front reaches approximately 1 cm from the upper edge of the plate.

The plate is then removed from the development chamber and the solvent evaporated under a hot air current or the plate is left for a while under the extractor hood.

▼ M28

- 5.2.5. Kadar se plošča opazuje pod ultravijolično svetlobo, se rahlo in enakomerno naprši z raztopino 2,7-diklorofluorosceina. Pas alifatskih alkoholov se lahko identificira tako, da se poravna z madežem, dobljenim iz referenčne raztopine: s črnim svinčnikom označite meje pasu; skupaj orišite pas alifatskih alkoholov in pas neposredno nad njim, ki je pas terpenskih alkoholov (opomba 4).

Opomba 4: Pas alifatskih alkoholov in pas terpenskih alkoholov se združita zaradi možnosti prehajanja nekaterih alifatskih alkoholov v pas triterpenskih alkoholov. Primer ločevanja s tankoplastno kromatografijo je prikazan na sliki 1 v Dodatku.

- 5.2.6. S kovinsko žličko postrgajte silikagel v označenem območju. Odstranjen, v fin prah zdrobljen material vnesite v filtrirni lij (3.7). Dodajte 10 ml vročega kloroforma, s kovinsko žličko previdno zmešajte in v vakuumu filtrirajte, tako da filtrat zberete v erlenmajerici (3.8), ki je pritrjena na filtrirni lij.

Silikagel v erlenmajerici trikrat izperite z etilnim etrom (vsakokrat približno z 10 ml), tako da zberete filtrat v isti erlenmajerici, pritrjeni na lij. Odparite filtrat do volumna 4 ali 5 ml, prenesite preostanek raztopine v poprej stehtano 10-mililitrsko epruveto (3.9), odparite do suhega z rahlim segrevanjem v rahlem toku dušika, ponovno dolijte nekaj kapelj acetona, spet odparite do suhega, dajte v peč na 105 °C za približno 10 min in potem pustite, da se ohladi v eksikatorju, ter stehtajte.

Ostane v epruveti sestoji iz alkoholne frakcije.

▼ M19

5.3. **Preparation of the trimethylsilyl ethers**

- 5.3.1. The reagent for silylation, consisting of a mixture of 9:3:1 by volume (Note 5) of pyridine-hexamethyldisilazane-trimethylchlorosilane in the proportion of 50 µl for each milligram of aliphatic alcohols, is added to the test tube containing the alcoholic fraction, avoiding all absorption of moisture (Note 6).

▼ M19

Note 5: Solutions which are ready for use are available commercially. Other silanising reagents such as, for example, bis-trimethylsilyl, trifluor acetamide + 1 % trimethyl chlorosilane, which has to be diluted with an equal volume of anhydrous pyridine, are also available.

Note 6: The slight opalescence which may form is normal and does not cause any interference. The formation of a white floc or the appearance of a pink colour are indicative of the presence of moisture or deterioration of the reagent. If these occur the test must be repeated.

- 5.3.2. Stopper the test tube, shake carefully (without overturning) until the aliphatic alcohols are completely dissolved. Stand for at least 15 minutes at ambient temperature and then centrifuge for a few minutes. The clear solution is ready for gas chromatographic analysis.

5.4. **Gas chromatography analysis**

5.4.1. Preliminary operations, column packing

- 5.4.1.1. Fit the column in the gas chromatograph, attaching the inlet end to the injector connected to the splitting system and the outlet end to the detector. Carry out a general check of the gas chromatography assembly (tightness of gas fittings, efficiency of the detector, efficiency of the splitting system and of the recording system, etc.).

- 5.4.1.2. If the column is being used for the first time it is recommended that it should be subjected to conditioning. A little carrier gas is passed through the capillary column and then the gas chromatography assembly is switched on and gradually heated until a temperature not less than 20 °C above the operating temperature (see Note 7) is attained. That temperature is held for not less than two hours and then the assembly is brought to the operating conditions (regulation of gas flow, split flame ignition, connection to the electronic recorder, adjustment of the temperature of the capillary column oven, the detector and the injector, etc.) and the signal is adjusted to a sensitivity not less than twice the highest level contemplated for the execution of the analysis. The course of the base line must be linear, without peaks of any kind, and must not drift. A negative straight-line drift indicates leakage from the column connections; a positive drift indicates inadequate conditioning of the column.

Note 7: The conditioning temperature shall be at least 20 °C less than the maximum temperature contemplated for the liquid phase employed.

5.4.2. Choice of operating conditions

- 5.4.2.1. The guideline operating conditions are as follows:

— column temperature: the initial isotherm is set at 180 °C for eight minutes and then programmed at 5 °C/minute to 260 °C and a further 15 minutes at 260 °C,

— temperature of evaporator: 280 °C,

— temperature of detector: 290 °C,

— linear velocity of carrier gas: helium 20 to 35 cm/s, hydrogen 30 to 50 cm/s,

— splitting ratio: 1:50 to 1:100,

— sensitivity of instrument: 4 to 16 times the minimum attenuation,

▼ M19

- sensitivity of recording: 1 to 2 mV fs,
- paper speed: 30 to 60 cm/h,
- quantity of substance injected: 0,5 to 1 µl of TMSE solution.

The above conditions may be modified according to the characteristics of the column and of the gas chromatograph to obtain chromatograms satisfying the following conditions:

- alcohol C₂₆ retention time shall be 18 ± 5 minutes,
- the alcohol C₂₂ peak shall be 80 ± 20 % of the full scale value for olive oil and 40 ± 20 % of the full scale value for seed oil.

5.4.2.2. The above requirements are checked by repeated injection of the standard TMSE mixture of alcohols and the operating conditions are adjusted to yield the best possible results.

5.4.2.3. The parameters for the integration of peaks shall be set so that a correct appraisal of the areas of the peaks considered is obtained.

5.4.3. Analytical procedure

5.4.3.1. Using the microsyringe of 10 µl capacity draw in 1 µl of hexane followed by 0,5 µl of air and subsequently 0,5 to 1 µl of the sample solution; raise the plunger of the syringe further so the needle is emptied. Push the needle through the membrane of the injection unit and after one to two seconds inject rapidly, then slowly remove the needle after some five seconds.

5.4.3.2. Recording is effected until the TMSE of the aliphatic alcohols present have been eluted completely. The base line shall always correspond to the requirements of 5.4.1.2.

▼ M28

5.4.4. Identifikacija vrhov

Identifikacija posameznih vrhov se izvede v skladu z retenzijskimi časi in s primerjavo s standardno mešanico TMSE, analiziranih pod enakimi pogoji.

Primeri kromatograma alkoholne frakcije rafiniranega oljčnega olja so prikazani na slikah 2 in 3 v Dodatku.

▼ M19

5.4.5. Quantitative evaluation

5.4.5.1. The peak areas of 1-eicosanol and of the aliphatic alcohols C₂₂, C₂₄, C₂₆ and C₂₈ are calculated by electronic integration.

5.4.5.2. The contents of each aliphatic alcohol, expressed in mg/1 000 g fatty substance, are calculated as follows:

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

where:

A_x = area of the alcohol peak x

A_s = area of 1-eicosanol

m_s = mass of 1-eicosanol in milligrams

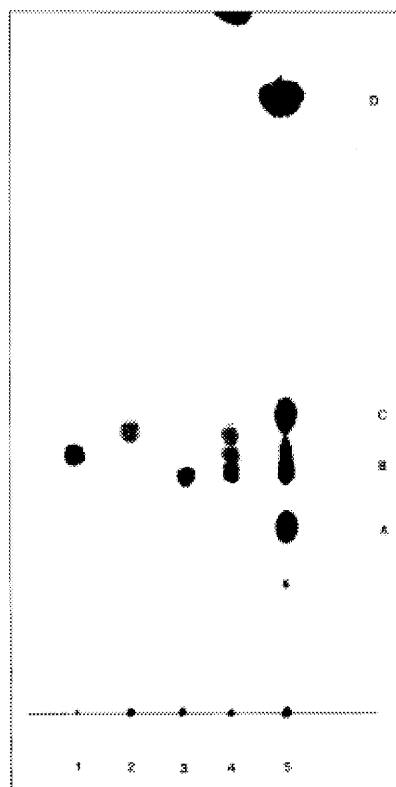
m = mass of sample drawn for determination, in grams.

6. EXPRESSION OF THE RESULTS

The contents of the individual aliphatic alcohols in mg/1 000 g of fatty substance and the sum of the „total aliphatic alcohols“ are reported.

▼ **M28***Dodatek***Primer ločevanja s tankoplastno kromatografijo in primeri kromatograma***Slika 1*

Tankoplastna kromatografska plošča neumiljive frakcije iz oljčnega olja, ki eluira s heksanom/etil etrom (65/35)

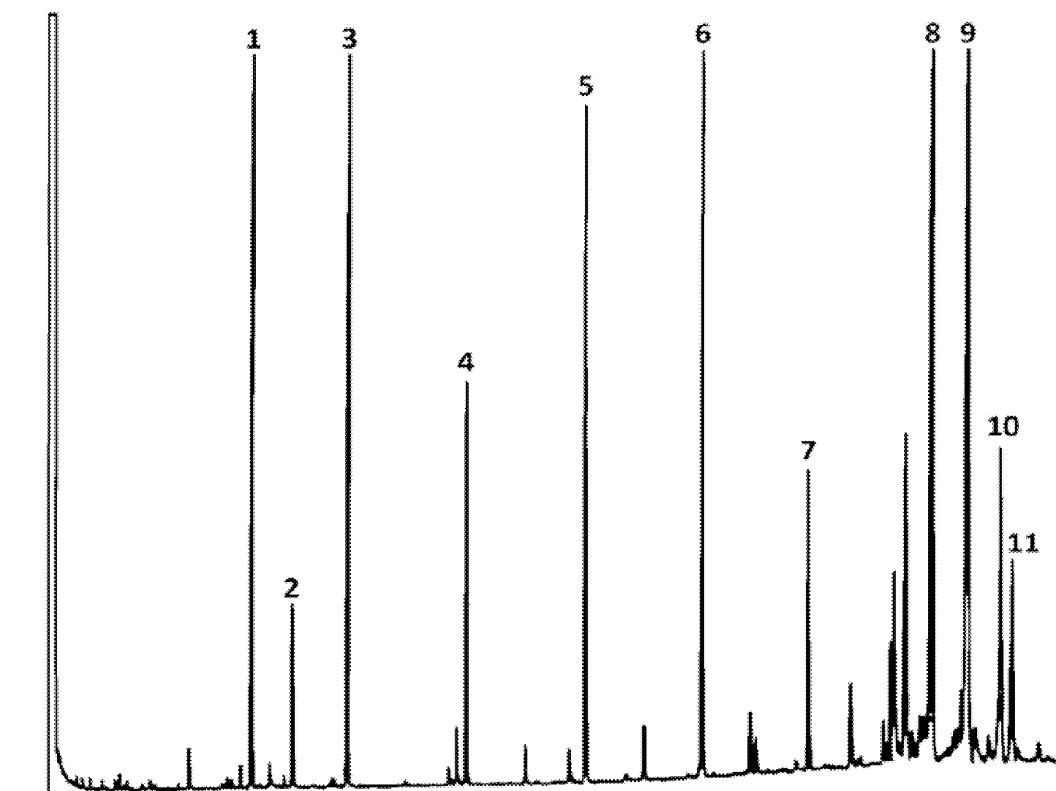


- | | | | |
|---|---|---|-----------------------|
| 1 | Alkohol C ₂₆ | A | Steroli |
| 2 | Alkohol C ₃₀ | B | Alifatski alkoholi |
| 3 | Alkohol C ₂₀ | C | Triterpenski alkoholi |
| 4 | Mešanica alkoholov C ₂₀₋₂₂₋₂₆₋₃₀ | D | Skvalen |
| 5 | Ekstra deviško neumiljivo | | |

▼ **M28**

Slika 2

Kromatogram alkoholne frakcije rafiniranega oljčnega olja



1 = Fitol

2 = Geranilgeraniol

3 = Alkohol C₂₀ (IS)4 = Alkohol C₂₂5 = Alkohol C₂₄6 = Alkohol C₂₆7 = Alkohol C₂₈

8 = Cikloartenol

9 = 24-metilen-cikloartenol

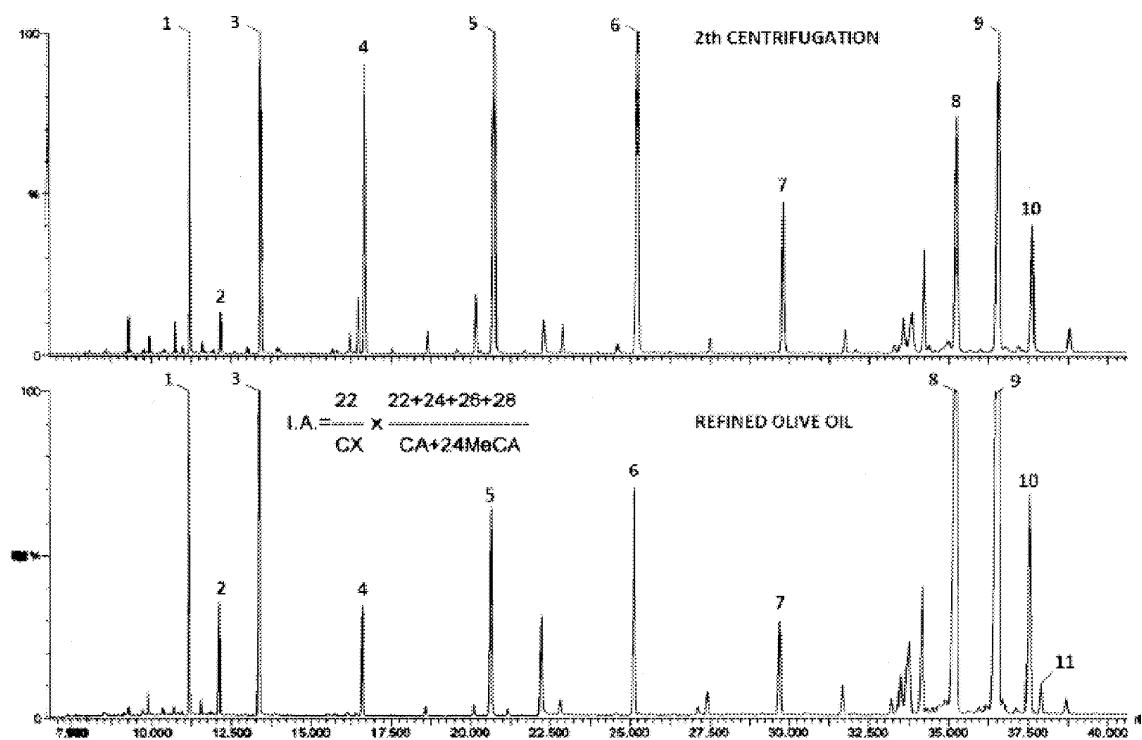
10 = Citrostadienol

11 = Ciklobranol

▼ M28

Slika 3

Alifatski in triterpenski alkoholi rafiniranega oljčnega olja in oljčno olje, dobljeno po drugem centrifugiranju



1 = Fitol

2 = Geranilgeraniol (CX)

3 = Alkohol C₂₀4 = Alkohol C₂₂5 = Alkohol C₂₄6 = Alkohol C₂₆7 = Alkohol C₂₈

8 = Cikloartenol (CA)

9 = 24-metilen-cikloarteno
(24MeCA)

10 = Citrostadienol

11 = Ciklobranol

▼ **M23***PRILOGA XX***Metoda za določanje vsebnosti voskov, metilnih estrov maščobnih kislin in etilnih estrov maščobnih kislin s kapilarno plinsko kromatografijo**

1. NAMEN

Metoda je namenjena določanju vsebnosti voskov, metilnih estrov maščobnih kislin in etilnih estrov maščobnih kislin v oljčnih oljih. Posamezni voski in alkilni estri se ločijo glede na število atomov ogljika. Metoda se priporoča kot orodje za ločevanje med oljčnim oljem in oljem iz oljčnih tropin ter kot parameter kakovosti za ekstra deviška oljčna olja, s katerim je mogoče ugotavljati nepravne mešanice ekstra deviških oljčnih olj z olji slabše kakovosti, torej z deviškimi, lampante ali nekaterimi razdišavljenimi olji.

2. PRINCIP

Olje, ki smo mu dodali ustrezne interne standarde, na z vodo omočenem silikagelu frakcioniramo s kolonsko kromatografijo. Ujamemo eluirano frakcijo najprej pri pogojih preskušanja (katere polarnost je manjša kot pri trigliceridih) in neposredno analiziramo s pomočjo kapilarne plinske kromatografije.

3. APARAT

3.1. Erlenmajerica prostornine 25 ml.

3.2. **Steklena kolona** za tekočinsko kromatografijo z notranjim premerom 15 mm, dolžine 30 do 40 cm in opremljena z ustreznim ventilom.3.3. **Plinski kromatograf**, primeren za uporabo s kapilarno kolono, opremljen z injicirnim sistemom za injiciranje vzorca neposredno v kolono, ki zajema:3.3.1. **Termostatsko kontrolirano peč s programirano temperaturo.**3.3.2. **Injicirni sistem za hladno injiciranje** neposredno v kolono.3.3.3. **Plamensko ionizacijski detektor in konverter-ojačevalec.**3.3.4. **Registrator z integratorjem** (opomba 1) za delovanje s pretvornikom z ojačevalnikom (točka 3.3.3), z odzivnim časom, ki ne presega ene sekunde in s spremenljivo hitrostjo papirja.

Opomba 1: Računalniški sistemi se lahko uporabijo tudi, kadar se podatki o plinski kromatografiji vnesejo prek osebnega računalnika.

3.3.5. **Kvarčno kapilarno kolono (za analizo voskov ter metilnih in etilnih estrov)**, dolžine 8–12 m, notranjega premera 0,25–0,32 mm, znotraj prevlečena s tekočo fazo (opomba 2) do enotne debeline 0,10–0,30 µm.

Opomba 2: Za ta namen so na voljo ustrezne tekoče faze za komercialne namene, kakršne so SE52, SE54 in druge.

3.4. **Mikrobrizgalka**, 10 µl, z utrjeno iglo, za neposredno vbrizganje na začetek kolone.3.5. **Električni vibrator.**▼ **C1**3.6. **Rotavapor.**▼ **M23**3.7. **Žarilna peč.**3.8. **Analitska tehtnica**, ki zagotavlja $\pm 0,1$ mg natančnost.

▼ **M23**

- 3.9. Običajna laboratorijska steklovina.

4. REAGENTI

- 4.1. **Silikagel**, 60–200 µm mesh. Silikagel vsaj 4 ure žarimo v žarilni peči pri 500 °C. Pustimo, da se ohladi, in potem dodamo 2 % vode glede na količino uporabljenega silikagela. Dobro premešamo, da se suspenzija homogenizira, in pred uporabo hranimo vsaj 12 ur v eksikatorju.

- 4.2. ► **M24 N-heksan**, kromatografske stopnje ali stopnje ostanka (čistost je treba preveriti).

OPOZORILO – Hlapi se lahko vnamejo. Ne približujte virom toplote, iskram ali neposrednemu ognju. Prepričajte se, da so steklenice vedno dobro zaprte. Med uporabo zagotovite ustrezno prezračevanje. Preprečiti je treba zbiranje hlapov in odstraniti vsa možna tveganja za izbruh ognja, ki jih povzročajo na primer grelniki ali električni aparati, ki niso proizvedeni iz nevnetljivih materialov. Škodljivi pri vdihavanju, ker lahko poškodujejo živčne celice. Ne vdihavajte hlapov. Če je potrebno, za dihanje uporabite ustrezen pripomoček. Preprečite stik z očmi ali poškodovano kožo. ◀

- 4.3. ► **C1 Etil eter, za kromatografijo.** ◀

OPOZORILO – Zelo vnetljiv in zmerno toksičen. Draži kožo. Škodljiv pri vdihavanju. Lahko poškoduje oči. Lahko učinkuje s časovnim zamikom. Formira lahko eksplozivne peroksidge. Hlapi se lahko vnamejo. Ne približujte virom toplote, iskram ali neposrednemu ognju. Prepričajte se, da so steklenice vedno dobro zaprte. Med uporabo zagotovite ustrezno prezračevanje. Preprečiti je treba zbiranje hlapov in odstraniti vsa možna tveganja za izbruh ognja, ki jih povzročajo na primer grelniki ali električni aparati, ki niso proizvedeni iz nevnetljivih materialov. Ne izparevajte do suhega ali skoraj suhega. Dodajanje vode ali ustreznega redukta lahko reducira oblikovanje peroksidge. Ne pijte. Ne vdihavajte hlapov. Izogibajte se daljšemu ali večkratnemu stiku s kožo.

- 4.4. ► **C1 N-heptan za kromatografijo ali izo-oktan.** ◀

OPOZORILO – Vnetljiv. Škodljiv pri vdihavanju. Ne približujte virom toplote, iskram ali neposrednemu ognju. Prepričajte se, da so steklenice vedno dobro zaprte. Med uporabo zagotovite ustrezno prezračevanje. Ne vdihavajte hlapov. Izogibajte se daljšemu ali večkratnemu stiku s kožo.

- 4.5. **Standardna raztopina lauril arahidata** (*opomba 3*) koncentracije 0,05 % (m/V) v heptanu (interni standard za voske).

Opomba 3: Uporabijo se lahko tudi palmitil palmitat, miristil stearat ali arahidil laureat.

- 4.6. **Standardna raztopina metilnega heptadekanoata** koncentracije 0,02 % (m/V) v heptanu (interni standard za metilne in etilne estre).

- 4.7. **Sudan 1 (1-fenilazo-2-naftol).**

▼ **M23**4.8. ► **C1** Nosilni plin: vodik ali helij, čist, za plinsko kromatografijo. ◀

OPOZORILO

Vodik. Pod pritiskom zelo vnetljiv. Ne približujte virom toplote, iskram, neposrednemu ognju ali električnim aparatom, ki niso proizvedeni iz nevnetljivih materialov. Prepričajte se, da je ventil steklenice zaprt, kadar se vodik ne uporablja. Vedno uporabljajte z reducentom pritiska. Preden odprete ventil steklenice, sprostite napetost vzmeti reducenta. Pri odpiranju ventila ne stojte pred odprtino steklenice. Med uporabo zagotovite ustrezno prezračevanje. Ne pretakajte vodika iz ene steklenice v drugo. V steklenici ne mešajte plina. Prepričajte se, da steklenic ni mogoče prevrniti. Ne hranite jih na svetlobi in ob virih toplote. Hranite jih v okolju, ki je odporno na korozijo. Ne uporabljajte poškodovanih steklenic ali steklenic brez nalepke.

Helij. Stisnjen plin pod visokim pritiskom. Zmanjša količino kisika na voljo za dihanje. Steklenica naj bo zaprta. Med uporabo zagotovite ustrezno prezračevanje. Ne vstopajte v prostore za hranjenje, razen če so ustrezno prezračeni. Vedno uporabljajte z reducentom pritiska. Preden odprete ventil steklenice, sprostite napetost vzmeti reducenta. Ne pretakajte plina iz ene steklenice v drugo. Prepričajte se, da steklenic ni mogoče prevrniti. Pri odpiranju ventila ne stojte pred odprtino steklenice. Ne hranite jih na svetlobi in ob virih toplote. Hranite jih v okolju, ki je odporno na korozijo. Ne uporabljajte poškodovanih steklenic ali steklenic brez nalepke. Ne vdihavajte. Uporabljajte samo za tehnične namene.

4.9. **Pomožna plina:**▼ **C1**

— Vodik, čist, za plinsko kromatografijo.

— Zrak, čist, za plinsko kromatografijo.

▼ **M23**

OPOZORILO

Zrak. Stisnjen plin pod visokim pritiskom. Uporabljajte previdno v prisotnosti vnetljivih snovi, saj je temperatura, potrebna za samovžig večine organskih sestavin zraka pod visokim pritiskom znatno nižja. Prepričajte se, da je ventil steklenice zaprt, kadar se vodik ne uporablja. Vedno uporabljajte reducent pritiska. Preden odprete ventil steklenice, sprostite napetost vzmeti reducenta. Pri odpiranju ventila ne stojte pred odprtino steklenice. Ne pretakajte plina iz ene steklenice v drugo. V steklenici ne mešajte plina. Prepričajte se, da steklenic ni mogoče prevrniti. Ne hranite jih na svetlobi in ob virih toplote. Hranite jih v okolju, ki je odporno na korozijo. Ne uporabljajte poškodovanih steklenic ali steklenic brez nalepke. Zraka za tehnične namene se ne sme uporabljati za vdihavanje ali dihalne naprave.

5. POSTOPEK

5.1. **Priprava kromatografske kolone**

V n-heksanu (točka 4.2) suspendiramo 15 g silikagela (točka 4.1) in napolnimo kolono (točka 3.2). Počakamo, da se posede. Homogenost posedanja, ki omogoči homogene kromatografske pasove, lahko dosežemo z uporabo električnega vibratorja. Spiramo s 30 ml n-heksana, da odstranimo vse morebitne nečistoče. V 25-ml bučko (točka 3.1) z analitsko tehtnico (točka 3.8) natehtamo natanko 500 mg vzorca in dodamo ustrezno količino internega standarda (točka 4.5), ki je odvisna od pričakovane vsebnosti voskov, npr. pri oljčnem olju dodamo 0,1 mg lauril arahidata, pri olju iz oljčnih tropin 0,25 do 0,50 mg in 0,05 mg metil heptadekanoata pri oljčnih oljih (točka 4.6).

▼ **M23**

Tako pripravljen vzorec prenesemo v kromatografsko kolono s pomočjo dveh 2-ml odmerkov n-heksana (točka 4.2).

Topilo izpuščamo iz kolone tako dolgo, da doseže 1 mm nad zgornjim robom absorbenta. Nadalje spiramo z n-heksanom/etilnim etrom (99:1) in zberemo 220 ml pri pretoku približno 15 kapljic vsakih 10 sekund. (**Ta frakcija vsebuje metilne in etilne estre ter voske**). (opomba 4) (opomba 5).

Opomba 4: Vsak dan je treba pripraviti svežo mešanico n-heksana/etilnega etra (99:1).

Opomba 5: Za opazovanje pravilnega eluiranja voskov lahko vzorcu v raztopini dodamo 100 µl 1-odstotnega sudana I v elucijski mešanici.

Barvilo ima vmesno retencijo med voski in trigliceridi. Zato je treba elucijo suspendirati, ko obarvanje doseže dno kromatografske kolone, ker so se eluirali vsi voski.

Iz tako dobljene frakcije na rotavaporju odparimo skoraj vse topilo. Preostala 2 ml odstranimo s pomočjo blagega toka dušika. Zbrano frakcijo, ki vsebuje metilne in etilne estre, razredčimo z 2 do 4 ml n-heptana ali izo-oktana.

5.2. Plinsko kromatografska analiza

5.2.1. Postopek

Kolono pritrdimo na plinski kromatograf (točka 3.3), in sicer vstopni del na injektor, izhodnega pa na detektor. Preverimo plinski kromatograf (plinske povezave, pravilno delovanje detektorja in rekorderja itd.).

Če kolono uporabljamo prvič, jo je priporočljivo kondicionirati. Pri majhnem pretoku plina skozi kolono vključimo plinski kromatograf. Postopoma segrevamo, tako da po približno 4 urah dosežemo temperaturo 350 °C.

Pri tej temperaturi kolono kondicioniramo vsaj 2 uri, nato uravnamo instrument v skladu s pogoji delovanja (uravnamo pretok plina, prižgemo plamen, povežemo z elektronskim rekorderjem (točka 3.3.4), naravnamo delovno temperaturo peči, naravnamo detektor itd.). Pri občutljivosti, ki je vsaj dvakrat večja od delovne, posnamemo bazno linijo. Le-ta mora biti linearna, brez vrhov in brez kakršnih koli odstopanj.

Negativno premočrtni odklon kaže na slabo tesnjenje med kolono in instrumentom, pozitiven odklon pa na slabo kondicionirano kolono.

5.2.2. Izbira delovnih pogojev za voske ter metilne in etilne estre (opomba 6).

Splošni delovni pogoji, ki jih je treba upoštevati, so naslednji:

— Temperatura kolone:

20 °C/min 5 °C/min

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

— Temperatura detektorja: 350 °C.

— Brizg: 1 µl raztopine (2–4 ml) n-heptana.

▼ M23

- Nosilni plin: helij ali vodik z optimalno linearno hitrostjo izbranega plina (glej Dodatek A).
- Občutljivost instrumenta: primerna za izpolnjevanje zgoraj navedenih pogojev.

Opomba 6: Zaradi visoke končne temperature je pozitivni odklon dovoljen, a ne sme preseči 10 % polne vrednosti skale.

Te pogoje lahko spremenimo, da bi zadostili značilnostim kolone in plinskega kromatografa, ločili vse voske ter metilne in etilne estre maščobnih kislin ter dosegli zadovoljivo najvišjo separacijo (glej slike 2, 3 in 4) in retencijski čas, ki za interni standard lauril arahidata znaša 18 ± 3 minute. Najznačilnejši vrh voskov mora biti najmanj 60 % od spodnjega dela skale, interni standard metilnega heptadekanoata za metilne in etilne estre pa mora doseči polno vrednost skale.

Vrhove integracijskih parametrov moramo določiti na tak način, da bomo dobili pravilno vrednotenje zadevnih površin vrhov.

5.3. Izvedba analize

Z 10- μ l mikrobrizgalko vzamemo 10 μ l raztopine; bat potegnemo nazaj, da se igla izprazni. Iglo vbodemo v injektor in po eni ali dveh sekundah hitro vbrižgamo. Iglo po približno petih sekundah nežno izvlečemo.

Kromatogram snemamo, dokler ne eluirajo vsi voski oziroma stigmastadieni, odvisno od frakcije, ki jo analiziramo.

Bazna linija mora ves čas izpolnjevati zahtevane pogoje.

5.4. Identifikacija vrhov

Vrhove identificiramo s pomočjo retencijskih časov s primerjavo med mešanicami voskov z znanimi retencijskimi časi, ki so bili analizirani pri istih pogojih. Alkilni estri se določijo iz mešanic metilnih in etilnih estrov glavnih maščobnih kislin v oljčnih oljih (palmitinskih in oleinskih).

Slika 1 prikazuje kromatogram voskov deviškega oljčnega olja. Sliki 2 in 3 prikazujeta kromatograma dveh ekstra deviških oljčnih olj v prodaji, od katerih eno vsebuje metilne in etilne estre, drugo pa ne. Slika 4 prikazuje kromatogram za ekstra deviško oljčno olje najvišje kakovosti in isto olje, mešano z 20 % razdišavljenega olja.

5.5. Kvantitativna analiza voskov

S pomočjo integratorja določimo površine vrhov alifatskih estrov od C_{40} do C_{46} in površino vrhov internega standarda lauril arahidata.

Skupno vsebnost voskov določimo z dodajanjem vsakega voska posebej v mg/kg maščobe, kot sledi:

$$\text{Voski, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

▼ M23

kjer je:

A_x = površina vrha za posamezni ester z računalniškim preštevanjem;

A_s = površina vrha za interni standard lauril arahidata ester z računalniškim preštevanjem;

m_s = masa dodanega internega standarda lauril arahidata, v miligramih;

m = masa vzorca za določanje, v gramih.

5.5.1. Kvantitativna analiza metilnih in etilnih estrov

S pomočjo integratorja določimo površine vrhov internega standarda metil heptadekanoata, maščobnih kislin metilnih estrov C_{16} in C_{18} ter maščobnih kislin etilnih estrov C_{16} in C_{18} .

Določimo vsebnost vsakega alkilnega estra v mg/kg maščobe, kot sledi

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

kjer je:

A_x = površina vrha za posamezni ester C_{16} in C_{18} z računalniškim preštevanjem;

A_s = površina vrha za interni standard metil heptadekanoata z računalniškim preštevanjem;

m_s = masa dodanega internega standarda metil heptadekanoata, v miligramih;

m = masa vzorca za določanje, v gramih.

6. PODAJANJE REZULTATOV

Podamo vsoto vsebnosti različnih voskov od C_{40} do C_{46} (*opomba 7*) v miligramih na kilogram maščobe.

Podamo vsoto vsebnosti metilnih estrov in etilnih estrov od C_{16} do C_{18} ter vsoto obeh skupaj.

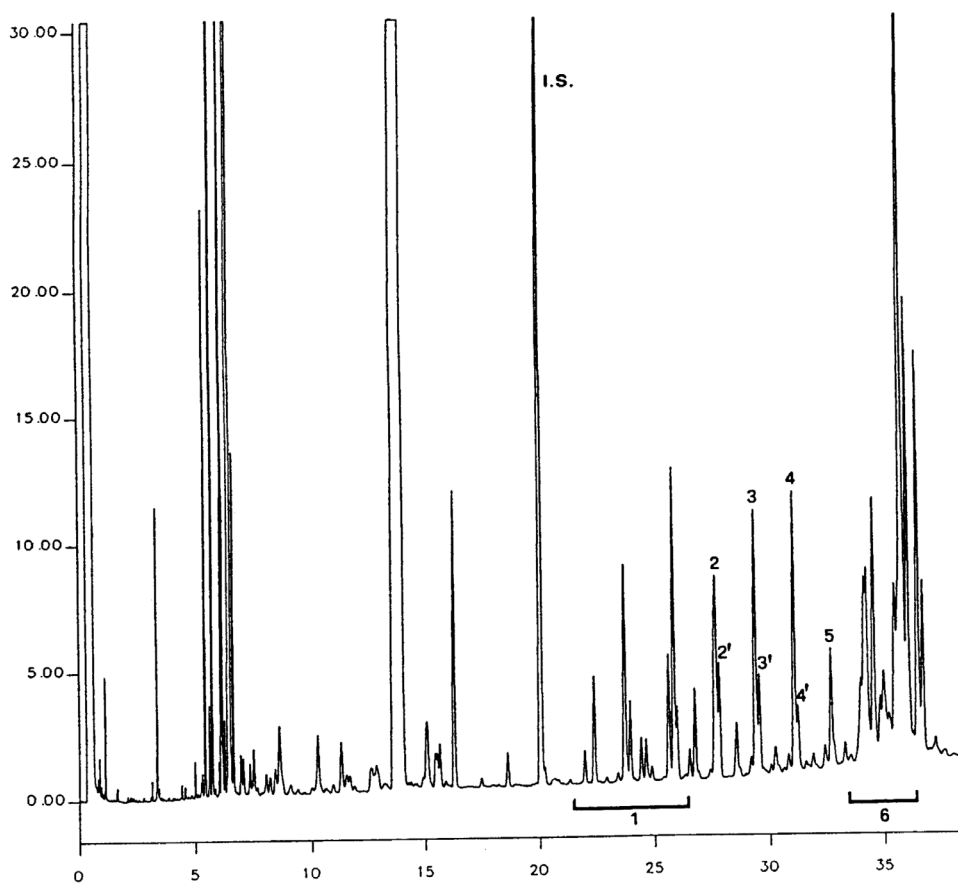
Rezultate izrazimo do najbližjega mg/kg.

Opomba 7: Spojine, ki jih je treba količinsko določiti, se nanašajo na vrhove s sodim številom ogljikovih atomov med estri C_{40} do C_{46} , tako kot je to prikazano na primeru kromatograma voskov oljčnega olja v priloženi sliki. ► **C1** Za namene določanja se v primeru, da je ester C_{46} razdeljen, priporoča, da se analizira frakcija voskov olja iz oljčnih tropin, pri čemer je vrh C_{46} razločen, ker je jasno prevladuje. ◀

Podamo razmerje med etilnimi estri in metilnimi estri.

▼ M23

Slika 1

Primer plinskega kromatograma frakcije voskov oljčnega olja ⁽¹⁾

Vrhovi z retencijo med 5 in 8 min metilnih in etilnih estrov maščobnih kislin

Ključ:

I.S. = lauril arahidat

1 = diterpenski estri

2+2' = estri C₄₀

3+3' = estri C₄₂

4+4' = estri C₄₄

5 = estri C₄₆

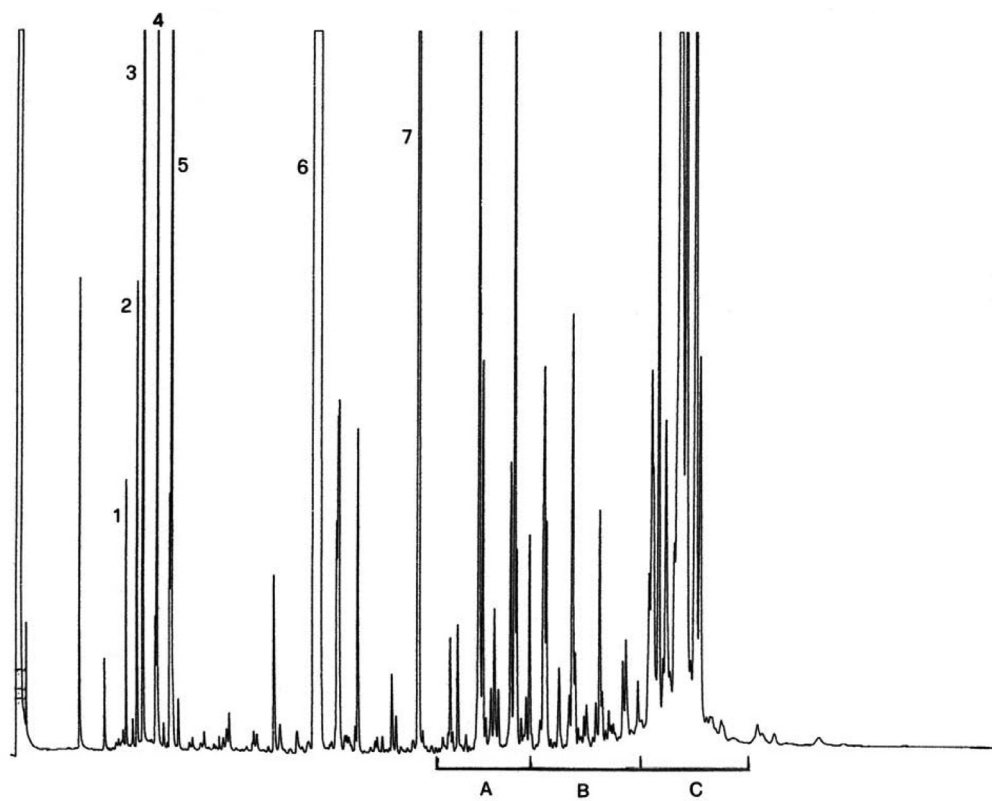
6 = sterolni estri in triterpenski alkoholi

⁽¹⁾ Po eluciji sterolnih estrov kromatogram ne sme imeti izpostavljenih vrhov (trigliceroli).

▼ **M23**

Slika 2

Metilni estri, etilni estri in voski v deviškem oljčnem olju



Ključ:

1 – metil C₁₆2 – etil C₁₆

3 – IS metil heptadekanoat

4 – metil C₁₈5 – etil C₁₈

6 – skvalen

7 – I.S. lauril arahidata

A – diterpenski estri

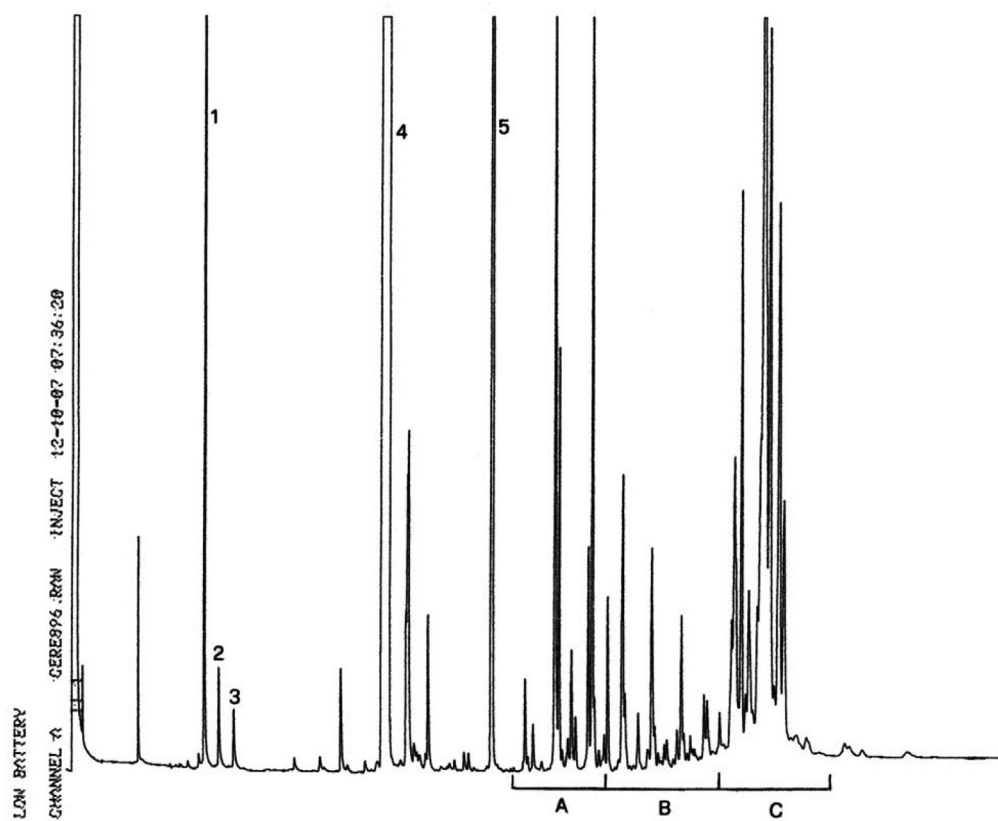
B – voski

C – sterolni estri in triterpenski estri

▼ **M23**

Slika 3

Metilni estri, etilni estri in voski v ekstra deviškem oljčnem olju



Ključ:

1 – IS metil heptadekanoat

2 – metil C₁₈3 – etil C₁₈

4 – skvalen

5 – I.S. lauril arahidata

A – diterpenski estri

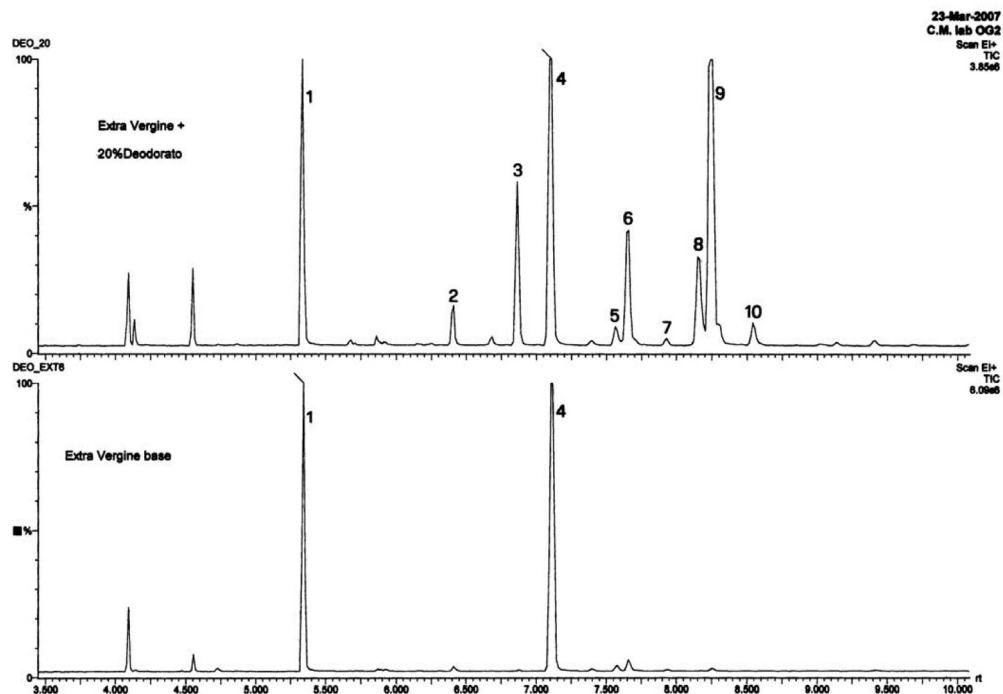
B – voski

C – sterolni estri in triterpenski estri

▼ M23

Slika 4

Del kromatograma za ekstra deviško oljčno olje in isto olje, mešano z razdišavljenim oljem



Ključ:

- 1 – IS metil miristat
- 2 – metil palmitat
- 3 – etil palmitat
- 4 – IS metil heptadekanoat
- 5 – metil linoleat
- 6 – metil oleat
- 7 – metil stearat
- 8 – etil linoleat
- 9 – etil oleat
- 10 – etil stearat

▼ M23*Dodatek A***Določitev linearne hitrosti plina**

V plinski kromatograf, ki je naravnan na delovne pogoje, vbrizgnemo 1:3 μ l metana (propana). Merimo čas, ki ga plin potrebuje za pot skozi kolono od trenutka vbrizga do trenutka, ko se pojavi vrh (t_M).

Linearna hitrost v cm/s je podana z L/t_M , pri čemer je L dolžina kolone v centimetrih in t_M izmerjeni čas v sekundah.

▼ M28

PRILOGA XXI

Rezultati preverjanj skladnosti oljčnega olja iz člena 8(2)

				Označevanje						Kemijski parametri			Senzorične značilnosti ⁽⁴⁾			Končni sklep	
Vzorec	Kategorija	Država porekla	Kraj inšpekcijskega pregleda ⁽¹⁾	Uradno ime	Označba porekla	Pogoji skladiščenja	Napačni podatki	Čitljivost	S/NS ⁽³⁾	Parametri zunaj mejnih vrednosti DA/NE	Če je tako, navedite, kateri ⁽²⁾	S/NS ⁽³⁾	Mediana napak	Mediana sadežnosti	S/NS ⁽³⁾	Zahtevan ukrep	Kazen

⁽¹⁾ Notranji trg (oljarna, polnilci, faza prodaje na drobno), izvoz, uvoz.
⁽²⁾ Vsaka značilnost oljčnega olja iz Priloge I ima oznako.
⁽³⁾ Skladno/neskladno.
⁽⁴⁾ Ne zahteva se za oljčno olje in olje iz oljčnih tropin.