

31991R2568

5.9.1991

URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI

L 248/1

**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**

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Uredbe Sveta št. 136/66/EGS z dne 22. septembra 1966 o vzpostavitvi skupne ureditve trga za olja in masti <sup>(1)</sup>, nazadnje spremenjene z Uredbo (EGS) št. 3577/90 <sup>(2)</sup>, in zlasti člena 35a Uredbe,

ker Priloga k Uredbi št. 136/66/EGS vsebuje opise in opredelitve pojmov za oljčno olje in olje iz oljčnih tropin, ki je v prometu znotraj vsake države članice, v trgovini v Skupnosti in v trgovini s tretjimi državami;

ker naj bi se z namenom razločevanja med različnimi vrstami olja, opredelile fizikalne in kemijske lastnosti vsake od njih ter senzorične značilnosti deviškega olja, zato da se zagotovita pristnost in kakovost zadevnih proizvodov, ne da bi se posegalo v druge obstoječe določbe;

ker naj bi bile značilnosti različnih vrst olj enotno opredeljene po vsej Skupnosti; ker naj bi bile s tem namenom vzpostavljene metode kemijske analize in senzorične ocene Skupnosti; ker naj bi bila v prehodnem obdobju dovoljena uporaba drugih analiznih metod, ki se uporabljajo v državah članicah pod pogojem, da če se rezultati razlikujejo, imajo odločilen vpliv rezultati, dobljeni z uporabo navedenih metod Skupnosti;

ker opredelitev fizikalnih in kemijskih značilnosti oljčnega olja in analiznih metod povzročijo spremembo dodatnih opomb k Poglavju 15 kombinirane nomenklature;

ker metoda za ocenjevanje senzoričnih značilnosti deviškega olja vključuje ustanovitev ocenjevalnih skupin; izbranih in usposobljenih pokaševalcev; ker naj bi se zato določilo obdobje, potrebno za vzpostavitev takšne strukture; ker naj bi bilo glede na težave, s

katerimi se bodo soočale nekatere države članice pri ustanavljanju skupin pokaševalcev, odobri se uporaba skupin v drugih državah članicah;

ker naj se za zagotovitev pravnega delovanja sistema prelevmanov pri uvozu oljčnih tropin, določi enotna metoda za določanje vsebnosti olja v teh proizvodih;

da se ne bi škodilo trgovanju, je treba olje, ki je bilo predpakirano pred začetkom veljavnosti te uredbe, prodati v omejenem roku;

ker je treba razveljaviti Uredbo Komisije (EGS) št. 1058/77 <sup>(3)</sup>, nazadnje spremenjeno z Uredbo (EGS) št. 1858/88 <sup>(4)</sup>;

ker Upravljalni odbor za olja in masti ni podal svojega mnenja v roku, ki ga je določil njegov predsedujoči,

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

*Člen 1*

1. Olja, katerih značilnosti so skladne z značilnostmi, določenimi v točkah 1, 2 in 3 Priloge I k tej uredbi, veljajo za deviška oljčna olja v smislu točke 1(a), (b) in (c) Priloge k Uredbi št. 136/66/EGS.

2. Olja, katerih značilnosti so skladne z značilnostmi, določenimi v točki 4 Priloge I k tej uredbi, veljajo za deviška oljčna olja neprimerna za prehrano ljudi (lampante oljčna olja) v smislu točke 1(d) Priloge k Uredbi št. 136/66/EGS.

3. Olja, katerih značilnosti so skladne z značilnostmi, določenimi v točki 5 Priloge I k tej uredbi, veljajo za rafinirana oljčna olja v smislu točke 2 Priloge k Uredbi št. 136/66/EGS.

<sup>(1)</sup> UL 172, 30.9.1966, str. 3025/66.

<sup>(2)</sup> UL L 353, 17.12.1990, str. 23.

<sup>(3)</sup> UL L 128, 24.5.1977, str. 6.

<sup>(4)</sup> UL L 166, 1.7.1988, str. 10.

4. Olja, katerih značilnosti so skladne z značilnostmi, določenimi v točki 6 Priloge I k tej uredbi, veljajo za čista oljčna olja v smislu točke 3 Priloge k Uredbi št. 136/66/EGS.

5. Olja, katerih značilnosti so skladne z značilnostmi, določenimi v točki 7 Priloge I k tej uredbi, veljajo za olja iz oljčnih tropin v smislu točke 4 Priloge k Uredbi št. 136/66/EGS.

6. Olja, katerih značilnosti so skladne z značilnostmi, določenimi v točki 8 Priloge I k tej uredbi, veljajo za rafinirana olja iz oljčnih tropin v smislu točke 5 Priloge k Uredbi št. 136/66/EGS.

7. Olja, katerih značilnosti so skladne z značilnostmi, določenimi v točki 9 Priloge I k tej uredbi, veljajo za olja iz oljčnih tropin v smislu točke 6 Priloge k Uredbi št. 136/66/EGS.

#### Člen 2

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

- za določanje prostih maščobnih kislin, izraženih v masnem odstotnem deležu oleinske kisline, metoda, določena v Prilogi II,
- za določanje peroksidnega števila, metoda, določena v Prilogi III,
- za določanje alifatskih alkoholov, metoda, določena v Prilogi IV,
- za določanje vsebnosti sterolov, metoda, določena v Prilogi V,
- za določanje eritrodiole in uvaole, metoda, določena v Prilogi VI,
- za določanje nasičenih maščobnih kislin na položaju 2 v trigliceridu, metoda, določena v Prilogi VII,
- za določanje vsebnosti trilinoleina, metoda, določena v Prilogi VIII,
- za spektrofotometrično analizo, metoda, določena v Prilogi IX,
- za določanje sestave maščobnih kislin, metoda, določena v Prilogi X A in X B,
- za določanje hlapnih halogeniranih topil, metoda, določena v Prilogi XI,
- za določanje senzoričnih značilnosti deviškega oljčnega olja, metoda, določena v Prilogi XII,
- za postopek rafinacije, metoda, določena v Prilogi XIII.

2. Senzorične značilnosti oceni analitik in kadar je to primerno, s pomočjo strokovnjaka, v skladu s postopkom, opisanim v opombah k pokušnji, navedenih v Prilogi XII. Kadar analiza pokaže značilnosti, ki se razlikujejo od značilnosti, ki izhajajo iz opisa izdelka, mora vzorec oceniti skupina pokuševalcev v skladu z določbami Priloge XII.

Vsako drugo analizo izvajajo ocenjevalna skupina v skladu z navedenimi določbami.

Za potrditev senzoričnih značilnosti v zvezi s sistemom intervencij, ocenjevalna skupina to oceno izvrši v skladu z določbami Priloge XII.

#### Člen 3

Do 31. oktobra 1992 uvedba analiznih metod, predvidenih v členu 2, ne ovira držav članic pri uporabi druge preizkušene in znanstveno veljavne metode, pod pogojem, da se proizvodom, priznanim, da ustrezajo veljavnim predpisom v Skupnosti, dovoli prost pretok. Pred uporabo drugih metod, zadevna država članica obvesti Komisijo o teh metodah.

Kadar se z neko drugo metodo dobi rezultat, ki se razlikuje od rezultata, dobljenega z navedeno metodo Skupnosti, je odločilen rezultat, dobljen z navedeno metodo Skupnosti.

#### Člen 4

1. Za ocenjevanje senzoričnih značilnosti oljčnih olj država članica vzpostavi skupine usposobljenih in izbranih pokuševalcev v skladu s predpisi, ki jih predpisuje metoda, določena v Prilogi XII.

2. Kadar se država članica pri vzpostavljanju ocenjevalne komisije na svojem ozemlju sooča s težavami, lahko uporabi storitve ocenjevalne skupine, ki deluje v drugi državi članici.

#### Člen 5

Dodatne opombe 2, 3 in 4 k Poglavju 15 kombinirane nomenklature se nadomestijo s tistimi iz Priloge XIV.

#### 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.

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

#### Člen 7

Uporabljajo se predpisi Skupnosti v zvezi s prisotnostjo neželenih snovi, razen tistih iz Priloge XI.

#### Člen 8

1. Države članice morajo obvestiti Komisijo o ukrepih, sprejetih za izvajanje te uredbe.

2. Države članice morajo na začetku vsakega polletja poslati Komisiji poročilo o analiznih podatkih v zvezi s preskusi, opravljenimi v teku predhodne polovice leta.

Upravljalni odbor za olja in masti mora proučiti rezultate v skladu s postopkom, predpisanim v členu 39 Uredbe št. 136/66/EGS.

*Člen 9*

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

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

V Bruslju, 11. julija 1991

*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 1. januarja 1992, razen če ne zadeva postopka sistema intervencij.

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.

*Za Komisijo*

RAY MAC SHARRY

*Član Komisije*

## PRILOGE

## Vsebina

	Stran
Priloga I: Značilnosti oljčnega olja .....	372
Priloga II: Določanje prostih maščobnih kislin .....	374
Priloga III: Določanje peroksidnega števila .....	376
Priloga IV: Določanje vsebnosti alifatskih alkoholov s kapilarno plinsko kromatografijo. ....	378
Priloga V: Določanje sestave in vsebnosti sterolov s kapilarno plinsko kromatografijo .....	383
Priloga VI: Določanje eritrodiole in uvaole .....	391
Priloga VII: Določanje nasičenih maščobnih kislin na položaju 2 v trigliceridu .....	393
Priloga VIII: Določanje sestave trilinoleina .....	397
Priloga IX: Spektrofotometrično merjenje v UV področju .....	401
Priloga XA: Plinsko kromatografska analiza metilnih estrov maščobnih kislin: .....	405
Priloga XB: Priprava metilnih estrov maščobnih kislin: .....	413
Priloga XI: Določanje hlapnih halogeniranih topil v oljčnem olju .....	417
Priloga XII: Senzorična ocena deviškega oljčnega olja: .....	418
Priloga XIII: Postopek rafinacije .....	444
Priloga XIV: Dodatne opombe 2, 3 in 4 k Poglavju 15 kombinirane nomenklature .....	446
Priloga XV: Vsebnost olja v oljčnih tropinah .....	449
Priloga XVI: Določanje jodnega števila .....	451

## PRILOGA I

## ZNAČILNOSTI OLJČNEGA OLJA

Vrsta	Kislost %	Peroksidno število msq/O <sub>2</sub> /kg	Halogenirana topila, mg/kg <sup>(1)</sup>	Alifatski alkoholi, mg/kg	Nasičene maščobne kisline na položaju 2 v trigliceridu, %	Eritriol + uvaol,	Trilinolein, %	Holestero, %	Brassicasterol, %	Kampesterol, %	Stigmasterol, %	Betasitosterol, -2 % <sup>(2)</sup>	Delta-7-stigmasterol, %	Steroli skupaj, mg/kg
1. Ekstra deviško oljčno olje	M 1,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
2. Deviško oljčno olje	M 2,0	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
3. Navadno oljčno olje	M 3,3	M 20	M 0,20	M 300	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
4. Deviško oljčno olje neprimerno za prehrano ljudi (lampante)	> 3,3	>20	> 0,20	M 400	M 1,3	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	—	m 93,0	M 0,5	m 1 000
5. Rafinirano oljčno olje	M 0,5	M 10	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
6. Oljčno olje	M 1,5	M 15	M 0,20	M 350	M 1,5	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 000
7. Surovo olje iz oljčnih tropin	m 2,0	—	—	—	M 1,8	m 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	—	m 93,0	M 0,5	m 2 500
8. Rafinirano olje iz oljčnih tropin	M 0,5	M 10	M 0,20	—	M 2,0	m 12	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 800
9. Olje iz oljčnih tropin	M 1,5	M 15	M 0,20	—	M 2,0	>4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,2	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5	m 1 800

(1) Skupna zgornja meja za spojine, ki jih zazna detektor na zajemanje elektronov. Zgornja meja za ločeno zaznane sestavine je 0,10 mg/kg.

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

Opomba:

Olje je treba zavrniti, če je katera koli od njegovih značilnosti izven predpisanih meja. M = maksimalno, m = minimalno.

Vrsta	Sestava maščobnih kislin						K <sub>232</sub>	K <sub>270</sub>	K <sub>270</sub> po aluminijevem oksida (1)	Delta K	Senzorična ocena
	Miristinska %	Linolenska %	Arašidova %	Eikozanojska %	Behenska %	Lignocerinska %					
1. Ekstra deviško oljčno olje	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 2,40	M 0,20	M 0,10	M 0,01	≥6,5
2. Deviško oljčno olje	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 2,50	M 0,25	M 0,10	M 0,01	≥5,5
3. Navadno oljčno Olje	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 2,50	M 0,25	M 0,10	M 0,01	≥3,5
4. Deviško oljčno olje neprimerno za prehrano ljudi (lampante)	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 3,70	>0,25	M 0,11	—	<3,5
5. Rafinirano oljčno olje	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 3,40	M 1,20	—	M 0,16	—
6. Oljčno olje	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 3,30	M 1,00	—	M 0,13	—
7. Surovo olje iz oljčnih tropin	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	—	—	—	—	—
8. Rafinirano olje iz oljčnih tropin	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 5,50	M 2,50	—	M 0,25	—
9. Olje iz oljčnih tropin	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	M 5,30	M 2,00	—	M 0,20	—

(1) Opomba:

v primeru olja z vsebnostjo prostih maščobnih kislin nad 3,3 % in vrednosti K<sub>270</sub> višje od 0,11 po prehodu preko aluminijevga oksida, je treba, opraviti rafiniranjem skladu metodo izvesti postopek rafinacije naveden v prilogi XIII.  
V primerih preseženih vrednosti K<sub>270</sub> za določeno kategorijo, je treba vzorec olja obdelati za aluminijevim oksidom in mu ponovno določiti K<sub>270</sub>.

## PRILOGA II

## DOLOČANJE PROSTIH MAŠČOBNIH KISLIN

## 1. DOLOČANJE KISLOSTI

Določanje prostih maščobnih kislin v oljčnih oljih. Vsebnost prostih maščobnih kislin je dogovorjeno izražena kot izračunana kislost.

## 1.1. Princip

Vzorec se raztopi v mešanici topil in obstoječe proste maščobne kisline, se titrira s pomočjo etanolne raztopine kalijevega hidroksida

## 1.2. Reagenti

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

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

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

Nevtalizirajte natančno v trenutku uporabe z raztopino kalijevega hidroksida (1.2.2), z dodatkom 0,3 ml fenolftaleinove raztopine (1.2.3) na 100 ml mešanice.

*Opomba:* 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.

## 1.2.2. Kalijev hidroksid, standardizirana etanolna raztopina, c(KOH), približno 0,1 mol/l ali, če je potrebno, c(KOH), približno 0,5 mol/l.

Tik pred uporabo moramo poznati in preveriti točno koncentracijo etanolne raztopine kalijevega hidroksida. Uporabite 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.

*Opomba:* Stabilno brezbarvno raztopino kalijevega hidroksida lahko pripravimo kot sledi. Zavremo 1 000 ml etanola z 8 g kalijevega hidroksida in 0,5 aluminijevih ostružkov in nadaljujemo z vrenjem pod povratnim hladilnikom eno uro. Takoj destiliramo. Raztopimo v destilatu zahtevano količino kalijevega hidroksida. Pustimo mirovati nekaj dni in z dekantiranjem ločimo bistro raztopino od oborine kalijevega karbonata.

Raztopino lahko brez destilacije pripravimo kot sledi: k 1 000 ml etanola dodamo 4 ml aluminijevega butilata in mešanico pustimo nekaj dni. V destilatu raztopimo zahtevano količino kalijevega hidroksida. Raztopina je pripravljena za uporabo.

## 1.2.3. Raztopina 10 g/l fenolftaleina v 95 do 96 % etanolu (v/v) ali raztopina 20 g/l alkalno modrega (v primeru močno obarvanih maščob) v 95 do 96 % etanolu (v/v).

## 1.3. Oprema

Običajna laboratorijska oprema, vključno z:

## 1.3.1. analitsko tehtnico;

## 1.3.2. 250-ml erlenmajerico;

## 1.3.3. 10-ml bireta, z razdelkom 0,05 ml.

## 1.4. Postopek

## 1.4.1. Priprava vzorca za preskus

(Preskus izvajajte na filtriranem vzorcu. Kadar so vlaga in nečistoče skupaj nižje od 1 %, uporabite vzorec brez nadaljnje obdelave; kadar presega 1 %, ga je treba filtrirati.)

## 1.4.2. Odvzem vzorca

Odvisno od predvidenega kislinkega števila natehemo vzorec v skladu z naslednjo tabelo:

Pričakovano kislinsko število	Masa vzorca (g)	Točnost tehtanja (g)
< 1	20	0,05
1 to 4	10	0,02
4 do 15	2,5	0,01
15 do 75,	0,5	0,0001
> 75	0,1	0,0002

Vzorec tehtamo v erlenmajerici (1.3.2).

#### 1.4.3 Določanje

Raztopimo vzorec (1.4.2) v 50- do 150-ml v predhodno nevtralizirani mešanici dietilnega etra in etanola (1.2.1).

Med mešanjem titriramo z 0,1 mol/l raztopino kalijevega hidroksida (1.2.2) (glej Opombo 2) do preskoka barve indikatorja. (rožnata obarvanost fenolftaleina je obstojna najmanj 10 sekund).

*Opomba 1.* Opomba 1. Standardizirano etanolno raztopino kalijevega hidroksida (1.2.2) se lahko nadomesti z vodno raztopino kalijevega ali natrijevega hidroksida pod pogojem, da količina vnešene vode ne sproži faznega ločevanja.

*Opomba 2.* Opomba 2. Če zahtevana količina 0,1 mol/l raztopine kalijevega hidroksida preseže 10 ml, uporabite 0,5 mol/l raztopino.

*Opomba 3.* Opomba 3. Če raztopina med titracijo postane motna, dodajte dovolj topil (1.2.1), da dobite prozorno raztopino.

#### 1.5 Kislost: izražena v masnem odstotnem deležu oleinske kisline

Kislost v utežnih odstotkih je enaka:

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

kjer je:

V = volumen uporabljene standardizirane raztopine kalijevega hidroksida, v mililitrih;

c = točna koncentracija v molih na liter uporabljene titrirane raztopine kalijevega hidroksida;

M = molska masa uporabljene kisline za izražanje rezultata (= 282);

m = masa vzorca v gramih.

Za rezultat je treba vzeti aritmetično povprečje dveh določitvev.

## PRILOGA III

## DOLOČANJE PEROKSIDNEGA ŠTEVILA

## 1. NAMEN

Ta standard opisuje metodo za določanje peroksidnega števila olj in masti.

## 2. PODROČJE UPORABE

Ta standard se uporablja za olja in masti živalskega in rastlinskega izvora.

## 3. DEFINICIJA POJMOV

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

## 4. PRINCIP

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

## 5. OPREMA

Vsa uporabljena oprema je brez reducirajočih ali oksidirajočih snovi.

*Opomba:* Brušenih površin ne namažite.

## 5.1 3-ml steklena ladjica.

## 5.2 Bučke z brusom kapacitete približno 250 ml predhodno osušimo z inertnim plinom (dušikom, ali še bolje, z ogljikovim dioksidom).

## 5.3 25-ml ali 50-ml bireta z razdelkom 0,1 ml.

## 6. REAGENTI

## 6.1 Kloroform, analitske čistoče, očiščen kisika s prepipovanjem s čistim, suhim inertnim plinom.

## 6.2 Ledocet, analitske čistoče, očiščen kisika s prepipovanjem s čistim, suhim inertnim plinom.

## 6.3 Nasičena vodna raztopina kalijevega jodida, sveže pripravljena, brez joda in jodatov.

## 6.4 Tik pred uporabo točno standardizirana 0,01 ali 0,002 mol/L vodna raztopina natrijevega tiosulfata.

## 6.5 Škrobovica, 10g/l vodna suspenzija, sveže pripravljena iz naravnega topnega škroba.

## 7. VZOREC

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

## 8. POSTOPEK

Preskus se izvede pri difuzni dnevni svetlobi ali pri umetni svetlobi. V skladu s pričakovanim peroksidnim številom, natehtamo na stekleni ladjici (5.1) ali, če vam to ne uspe, v bučki (5.2) s točnostjo 1 mg.

Pričakovano peroksidno število (mekv)	Masa 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

V bučko prenesemo stekleno ladjico z vzorcem. Dodamo 10 ml kloroforma (6.1). Vzorec hitro raztopimo z mešanjem. Dodamo 15 ml očetne kisline (6.2), nato 1 ml raztopine kalijevega jodida (6.3). Hitro zamašimo z zamaškom, stresamo eno minuto in pustimo točno pet minut, v temnem prostoru na temperaturi od 15 do 25 °C.

Dodamo približno 75 ml destilirane vode. Titriramo sproščeni jod z raztopino natrijevega tiosulfata (6.4) (za pričakovana peroksidna števila, nižja od 12 titriramo z 0,002 mol/L raztopino in z 0,01 mol/L raztopino za pričakovana števila, nad 12), močno tresemo, uporabimo škrobovico (6.5) kot indikator.

Na istem preskusnem vzorcu opravimo dve določitvi.

Istočasno izvedemo slepi preskus. Če rezultat presega 0,05 ml 0,01 mol/L raztopine natrijevega tiosulfata (6.4), zamenjamo reagente s čistejšimi.

#### 9. IZRAŽANJE REZULTATOV

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

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

kjer je:

V = volumen raztopine standardiziranega natrijevega tiosulfata v ml (6.4), z upoštevanim volumnom slepega preskusa;

T = točna molarost uporabljene raztopine natrijevega tiosulfata (6.4);

m = masa vzorca v gramih.

Za rezultat se vzame aritmetično povprečje dveh določitev.

## PRILOGA IV

## DOLOČANJE VSEBNOSTI ALIFATSKIH ALKOHOLOV S KAPILARNO PLINSKO KROMATOGRAFIJO

## 1. PREDMET

Ta postopek opisuje metodo za določanje vsebnosti alifatskih alkoholov v oljih in masteh.

## 2. PRINCIP METODE

Maščobna snov z dodanim 1-eikozanolom, ki služi kot interni standard, se umili z etanolnim kalijevim hidroksidom in potem se neumiljiva snov ekstrahira z dietilnim etrom.

Alkoholna frakcija se loči od neumiljive snovi s kromatografijo na plasti silikagela, impregniranega s kalijevim hidroksidom; alkoholi, dobljeni iz silikagela, se pretvorijo v trimetilsililne etre in analizirajo s kapilarno plinsko kromatografijo.

## 3. OPREMA

- 3.1 250-ml steklenica z okroglim dnom, s povratnim hladilnikom in z brušenimi nastavki..
  - 3.2 Lij ločniki kapacitete 500 ml.
  - 3.3 Bučke kapacitete 250 ml.
  - 3.4 Kromatografska komora za tankoplastno kromatografsko analizo, za steklene plošče dimenzij 20 × 20 cm.
  - 3.5 UV svetloba valovne dolžine 366 ali 254 nm, za pregled plošč TLC.
  - 3.6 Mikrobrizgalka za vnos 100 µl in 500 µl.
  - 3.7 Filtrirni liji iz sintranega stekla s porozno frito G 3 (poroznost 15 do 40 µm), premera približno 2 cm in višine približno 5 cm, primerni za filtriranje v vakuumu in nastavek 12/21 z zunanjim obrusom.
  - 3.8 Presesalna erlenmajerica kapacitete 50 ml z nastavkom 12/21 z notranjim obrusom za uporabo s filtrirnim lujem (3.7).
  - 3.9 Epruveta kapacitete 10 ml s konusnim dnom in zamaškom.
  - 3.10 Plinski kromatograf s kapilarno kolono in opremljen s sistemom split-splitles, sestavljen iz:
    - 3.10.1 termostatisirane peči s temperaturno natančnostjo ± 1 stopinje C;
    - 3.10.2 termostatisiranega uparjalnika (injektorja) iz silaniziranega stekla;
    - 3.10.3 plamensko ionizacijskega detektorja in pretvornika signala z ojačevalnikom;
    - 3.10.4 registrator z integratorjem za delovanje opremljen s pretvornikom signala in z ojačevalnikom (3.10.3), z odzivnim časom, ki ne presega ene sekunde in s spremenljivo hitrostjo papirja.
  - 3.11 Steklena ali kvarčna kapilarna kolona, dolžine 20 do 30 m, notranjega premera 0,25 do 0,32 mm, s SE-52 ali SE-54 ali ekvivalentno tekočo fazo, debeline med 0,10 in 0,30 µm.
  - 3.12 µl Mikrobrizgalka za plinsko kromatografijo, kapacitete 10 µl s konico iz kaljenega jekla.
4. REAGENTI
- 4.1 Kalijev hidroksid, približno 2 mol/L etanolne raztopine: 130 g kalijevega hidroksida (minimalne koncentracije 85 %) se med hlajenjem raztopi, v 200 ml distilirane vode in se potem dopolni do enega litra z etanolom. Raztopino je treba hraniti v dobro zamašeni temni steklenici.
  - 4.2 Dietilni eter analitske čistote.
  - 4.3 Brezvodni natrijev sulfat analitske čistote.

- 4.4 Silikagelne steklene plošče za tankoplastno kromatografijo, brez indikatorja fluorescence, debeline 0,25 mm (komercialno dobavljive).
- 4.5 Kalijev hidroksid, približno 0,2 mol/L etanolne raztopina; 13 g kalijevega hidroksida se raztopi v 20 ml destilirane vode in doda etanol do enega litra.
- 4.6 Benzen kromatografske čistoče. (glej 5.2.2).
- 4.7 Aceton kromatografske čistoče. (glej 5.2.2).
- 4.8 Heksan kromatografske čistoče. (glej 5.2.2).
- 4.9 Dietilni eter kromatografske čistoče. (glej 5.2.2).
- 4.10 Kloroform kromatografske čistoče.
- 4.11 Referenčna raztopina za tankoplastno kromatografijo: 5 % mešanica alkoholov C<sub>20</sub> do C<sub>28</sub> v kloroformu.
- 4.12 0,2-% raztopina 2,7-diklorofluoresceina v etanolu. To se naredi rahlo bazično z dodatkom nekaj kapelj raztopine 2 mol/L kalijevega hidroksida.
- 4.13 Brezvodni piridin kromatografske čistoče.
- 4.14 Heksametildisilazan.
- 4.15 Trimetilklorosilan.
- 4.16 Standardne raztopine trimetilsililnih etrov alifatskih alkoholov od C<sub>20</sub> do C<sub>28</sub>. Lahko se jih pripravi iz mešanic čistih alkoholov tik pred uporabo.
- 4.17 0,1 % (m/v) raztopina 1-eikozanola v CHCl<sub>3</sub> (interni standard).
- 4.18 Nosilni plini: vodik in helij kromatografske čistoče.
- 4.19 Pomožni plini:  
— čisti vodik plinsko-kromatografske čistoče,  
— zrak plinsko-kromatografske čistoče.
5. POSTOPEK
- 5.1 Priprava neumiljivih snovi.
- 5.1.1 S 500 µl mikrobrizgalko vnesite v 250-ml bučko z okroglim dnom volumen raztopine 0,1-% 1-eikozanola (lahko se uporabi tudi 1-heneikozanol) (4.17), ki vsebuje količino 1-eikozanola, ki je približno enaka 10 % vsebnosti alifatskega alkohola v deležu vzorca, ki se ga vzame za analizo. Na primer, k 5 g vzorca dodajte 250 µl 0,1 % eikozanojske raztopine v primeru oljčnega olja ali semenskega olja in 1 500 µl, v primeru olja iz oljčnih tropin. Odparite raztopino internega standarda do suhega v dušikovi atmosferi.
- V bučko natehtajte približno 5 g suhega, prefiltriranega vzorca.
- 5.1.2 Doda se 50 ml etanolne raztopine 2 mol/L kalijevega hidroksida, namesti povratni hladilnik in aparaturo segreje do rahlega vretja na parni kopeli in se v teku celotnega procesa neprekinjeno meša, vse dokler ne poteče umiljenje (raztopina postane bistra). S segrevanjem se nadaljuje še nadaljnih 20 minut in se potem skozi hladilnik doda 50 ml destilirane vode, potem se hladilnik sname in bučko ohladi na približno 30 °C.
- 5.1.3 Vsebinsko bučke se kvantitativno prenese v lij ločnik kapacitete 500 ml z dvema dodatkom po 25 ml destilirane vode. Doda se približno 80 ml dietilnega etra, vse skupaj se močno pretresa 30 sekund in potem pusti, da se fazi ločita (Opomba 1).
- Spodnja vodna faza se prenese v drugi lij ločnik. Iz vodne faze še dvakrat ekstrahiramo, vsakič z uporabo 60 do 70 ml dietilnega etra.
- Opomba 1. Emulzijo se lahko odstrani s pršenjem majhnih količin etilnega ali metilnega alkohola.
- 5.1.4 Ekstrakte dietilnega etra združimo v lij ločniku in izpiramo z destilirano vodo (vsakokrat s po 50 ml), vse dokler izpiralna voda ne da nevtralne reakcije.
- Zavržite vodno fazo, etrsko fazo osušite z brezvodnim natrijevim sulfatom in prefiltrirajte v bučko kapacitete 250 ml, ki je bila vnaprej stehtana, lij in filter se izpirata z majhnimi količinami dietilnega etra, ki se dodajo k celoti.

5.1.5 Eter se odpari z rahlim stresanjem na nekaj ml in se ga potem osuši v rahlem vakuumu ali pod tokom dušika; sušenje se zaključi v peči pri 100 °C po približno 15 minutah, po ohlaiditvi v eksikatorju se ostanek stehta.

5.2 Ločevanje alkoholnih frakcij.

5.2.1 Priprava osnovnih plošč TLC (4.4) za 10 sekund se jih popolnoma potopi v raztopino 0,2 mol/L kalijevega hidroksida (4.5) potem se jih pusti sušiti v digestoriju dve uri in na koncu se jih da v peč na 100 °C za eno uro.

Plošče se vzame iz peči in se jih do uporabe shrani v eksikatorju, napolnjenim s kalcijevim kloridom. Tako pripravljene plošče je treba uporabiti v roku dveh tednov.

*Opomba 2.* Kadar se za ločevanje alkoholnih frakcij uporabljajo z lugom obdelane silikagelne plošče, neumljivih snovi ni treba tretirati z  $Al_2O_3$ . Sledi, da se vse kisle snovi (maščobne kisline in druge) zadrži na začetku ploščice in se tako dobi pas alifatskih in pas terpenskih alkoholov, ki sta oba razločno ločena od pasu sterolov.

5.2.2 Raztopino acetona in benzena v razmerju 95 vol. % benzena in 5 vol. % acetona se uvede v razvijalno komoro do globine približno 1 cm. Alternativno se lahko uporabi mešanico heksana in dietilnega etra v razmerju 65 vol. % heksana in 35 vol. % dietilnega etra. Komoro se zapre in počaka se najmanj pol ure, da se lahko med hlapi in tekočino ustvari ravnotežje. Trakovi filtrirnega papirja, namočeni v eluent, so lahko pritrjeni na notranje površine komore, da se zmanjša razvijalni čas za približno eno tretjino in da se doseže bolj homogena elucija sestavin.

*Opomba 3.* Razvijalno raztopino je treba zamenjati za vsako analizo, zato da se dosežejo ponovljivi pogoji razvijanja.

5.2.3 Pripravi se približno 5-% raztopina neumljivih snovi (5.1.5) v kloroformu in 300  $\mu$ l raztopine se nanese v homogeno progo minimalne debeline s pomočjo mikrobrizgalke kapacitete 100  $\mu$ l na TLC plošči približno 2 cm od dna TLC plošče. Poravnano z nanešeno progo, se 2 ali 3  $\mu$ l referenčne raztopine alifatskih alkoholov (4.11) naprši za identifikacijo pasu alifatskih alkoholov potem, ko se zaključi razvijanje.

5.2.4 Plošča se vloži v razvijalno komoro, kot je navedeno v 5.2.2. Temperaturo je treba vzdrževati med 15 in 20 °C. Komoro se takoj zapre in vzorec se pusti razvijati dokler frontalni del topila ne doseže razdalje 1 cm od vrha plošče. Ploščo se potem vzame iz razvijalne komore in odpari topilo pod tokom vročega zraka ali pa se plošča nekaj časa pusti v digestoriju.

5.2.5 Na ploščo se rahlo in enakomerno naprši raztopina 2,7-diklorofluoresceina: ko se plošča opazuje pod ultravijolično svetlobo, je pas alifatskih alkoholov v primerjavi z alifatskimi alkoholi v pasu tik nad tem, ki je pas triterpenskih alkoholov. Oba pasova se skupaj obkroži s črto.

*Opomba 4.* Razlog za zahtevo, da se pasova alifatskih alkoholov in triptenskih alkoholov odstrani hkrati, je možna migracija nekaterih alifatskih alkoholov v pas triptenskih alkoholov.

5.2.6 Silikagel, ki je v definiranem obdanem območju, se odstrga s kovinsko žličko. Odstranjeni material se razdrobi na fine delce in se ga vloži v filtrirni lij (3.7), doda se 10 ml vročega kloroforma in vsebino se popolnoma premeša s kovinsko žličko in v vakumu filtrira, filtrat se zbere v bučki (3.8), ki je povezana s filtrirnim lijem.

Ostanek znotraj lija se izpere s  $3 \times 10$  ml dietilnega etra, s tem da se zbere filtrat v isti steklenici, ki je pritrjena na lij. Filtrat se odpari do približno 4 do 5 ml volumna in preostanek raztopine se vlije v poprej steh-tano epruveto kapacitete 10 ml (3.9); epruveto se z rahlim segrevanjem osuši v toku dušika. Ponovno raztopite ostanek z nekaj kapljami acetona, ponovno osušite in potem segrevajte v peči na 105° C približno 10 minut, ohladite v eksikatorju in potem stehtajte.

Ostanek v epruveti je alkoholna frakcija.

5.3 Priprava trimetilsililnih etrov.

5.3.1 Reagent za siliranje, sestavljen iz mešanice piridina, heksametilidisilazana in trimetilklorosilana v razmerju 9:3:1 (Opomba 5), po 50  $\mu$ l na vsak miligram alkoholov, se doda v epruveto, ki vsebuje alkoholno frakcijo, tako da se izogne kakršni koli absorpciji vlage (Opomba 6).

*Opomba 5.* Raztopine, pripravljene za uporabo, se dobijo v prodaji; reagenti za silaniranje kot so N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamid + 1 % trimetilklorosilan za mešanje z enakim volumnom brezvodnega piridina.

- 5.3.2 Epruveto se previdno zamaši in pretrese, ne da bi jo prevračali, dokler niso alkoholi raztopljeni. Potem se jo najmanj 15 minut pusti pri sobni temperaturi in zatem nekaj minut centrifugira; prozorna raztopina je pripravljena za kromatografsko analizo.
- Opomba 6.* Kakršno koli tvorjenje rahle opalescence je normalno in ne tvori interferenc. Tvorjenje bele oborine ali pojav rožnate obarvanosti sta znaka prisotnosti vlage ali pokvarjenosti reagenta. V tem primeru je treba preskus ponoviti.
- 5.4 Plinsko-kromatografska analiza.
- 5.4.1 Predhodni postopki in kondicioniranje kapilarne kolone.
- 5.4.1.1 Kapilarno kolono se pritrdi v plinski kromatograf s priključitvijo začetka kolone na uparjalnik, ki je povezan s sistemom deljenja (split/splitless), in konca kolone na detektor.
- Naredi se splošen pregled plinskega kromatografa (tesnost priključkov za plin, učinkovitost detektorja, učinkovitost sistema deljenja, sistema beleženja itd.).
- 5.4.1.2 Kapilarne kolone, ki se uporabljajo prvič, je treba kondicionirati. Skozi kapilarno kolono se pusti, da steče malo nosilnega plina in potem se vključi plinski kromatograf in se ga postopno segreva, da se doseže temperatura najmanj 20 °C nad delovno temperaturo (glej Opombo 7). To temperaturo se vzdržuje najmanj dve uri in potem se aparaturo pripravi, da doseže delovne pogoje (regulacija pretoka plina, vžig plamena deljenja, priključitev na elektronski rekorder, prilagoditev temperature peči, detektor in injektor itd.) in signal se naravna na občutljivost, ki je najmanj dvakrat tako visoka, kot je to nivo, načrtovan za izvedbo analize. Bazna linija mora biti linearna, brez vrhov kakršne koli narave in ne kaže nobenih znakov odklona.
- Negativni premočrtni odklon kaže na nepopolno tesnenje priključkov kolone, medtem ko pozitivni odklon kaže na nezadostno kondicioniranje kolone.
- Opomba 7.* Temperatura kondicioniranja mora biti najmanj 20 °C nižja od maksimalne temperature uporabljene tekoče faze.
- 5.4.2 Izbor delovnih pogojev.
- 5.4.2.1 Splošni delovni pogoji so naslednji:
- temperatura kolone: začetna izotermalna se nastavi na 180 °C za osem minut in se potem programira na 5 °C/min do 260 °C in nadaljnih 15 minut na 260 °C.
  - temperatura uparjalnika: 280 °C,
  - temperatura detektorja: 290 °C,
  - linear velocity of carrier gas: helium 20 to 35 cm/s, hydrogen 30 do 50 cm/s,
  - delilno razmerje: 1:50 ali 1:100,
  - občutljivost instrumenta: 4 do 16-kratna minimalna atenuacija,
  - občutljivost beleženja: 1 do 2 mV polne skale,
  - hitrost papirja: 30 do 60 cm/h,
  - količina injicirane snovi: 0,5 do 1 µl raztopine TMSE.
- Zgornje pogoje se lahko spremeni v skladu z lastnostmi kolone in plinskega kromatografa, zato da se doseže kromatograme, ki zadoščajo naslednjim pogojem:
- retenzijski čas alkohola C<sub>26</sub> je 18 ± 5 minut.
  - vrh alkohola C<sub>22</sub> je 80 ± 20 % polne skale za oljčno olje in 40 ± 20 % polne skale za semensko olje.
- 5.4.2.2 Zgoraj omenjene zahteve se kontrolira s ponovljenim injiciranjem standardne TSE mešanice alkoholov in delovne pogoje se prilagodi, da dajo najboljše možne rezultate.
- 5.4.2.3 Parametri za integracijo vrhov se nastavijo tako, da se dobi pravilna ocena območij proučevanih vrhov.
- 5.4.3 Execution of analysis.
- 5.4.3.1 Z mikrobrizgalko kapacitete 10 µl vsrkajte 1 µl heksana, ki mu sledi 0,5 µl zraka in zatem 0,5 do 1 µl raztopine vzorca; bat mikrobrizgalko se izvleče, da se igla izprazni.
- Iglo se uvede skozi septo injektorja in po eni ali dveh sekundah se raztopino hitro vbrizga in iglo se po približno petih sekundah počasi izvleče.
- 5.4.3.2 Beleženje se izvaja, dokler TMSE prisotnih alkoholov popolnoma ne eluirajo. Bazna linija mora vedno ustrezati zahtevam 5.4.1.2.
- 5.4.4 Identificiranje vrhov.
- Identificiranje posameznih vrhov se izvede v skladu z retenzijskimi časi in s primerjavo s standardno TMSE mešanico, analizirano pri enakih pogojih.
- Kromatogram alkoholne frakcije deviškega oljčnega olja je prikazan na Sliki 1.
- 5.4.5 Kvantitativna ocena.
- 5.4.5.1 Območja vrhov 1-eikozanola in alifatskih alkoholov C<sub>22</sub> in C<sub>28</sub> se izračuna z elektronsko integracijo.

5.4.5.2 Vsebnost vsakega alkohola, izražena v mg/100 g maščobe se izračuna kot sledi:

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

kjer je:

$A_x$  = površina vrha alkohola  $x$ , v kvadratnih milimetrih;

$A_s$  = površina vrha 1-eikozanola v kvadratnih milimetrih;

$m_s$  = masa 1-eikozanola v miligramih;

$m$  = masa vzorca, v gramih;

## 6. IZRAŽANJE REZULTATOV

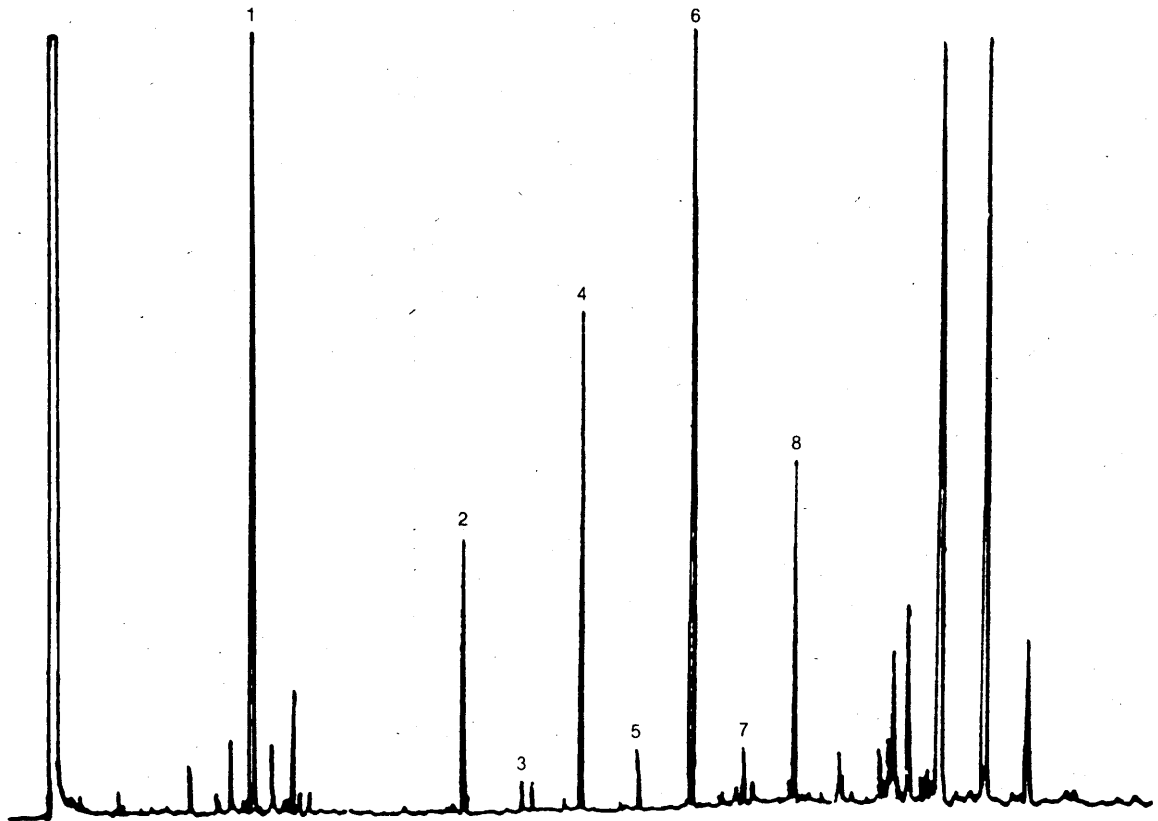
Navede se vsebnosti posameznih alifatskih alkoholov v mg/100 g maščobe in vsota „skupnih alifatskih alkoholov“.

### DODATEK

#### Določanje linearne hitrosti plina

1 do 3  $\mu$ l metana ali propana se vbrizga v plinski kromatograf, nastavljen na normalne delovne pogoje in meri čas ( $t_M$ ), ki je potreben, da metan ali propan prideta do detektorja, s pomočjo štoparice.

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



Slika 1 Kromatogram alkoholne frakcije deviškega oljčnega olja.

1 = Eikozanol (SI)

5 = Pentakozanol,

2 = Dokožanol,

6 = Heksakozanol,

3 = Trikožanol,

7 = Heptakozanol,

4 = Tetrakozanol,

8 = Oktakozanol.

## PRILOGA V

## DOLOČANJE SESTAVE IN VSEBNOSTI STEROLOV S KAPILARNO PLINSKO KROMATOGRAFIJO

## 1. NAMEN

Ta metoda opisuje postopek za določanje vsebnosti posameznih in celokupnih sterolov v maščobah.

## 2. PRINCIP METODE

Maščoba z dodanim  $\beta$ -holestanolom kot internim standardom, se umili s kalijevim hidroksidom in etanolno raztopino in potem se neumljive snovi ekstrahirajo z dietilnim etrom.

Sterolna frakcija se loči od neumljivega ekstrakta s kromatografijo na z lugom obdelani silikagelni plošči. Steroli, dobljeni iz silikagela, se pretvorijo v trimetilsililne etre in se jih analizira s kapilarno plinsko kromatografijo.

## 3. OPREMA

3.1 250-ml steklenica, s povratnim hladilnikom, s priključki iz steklenih obrusov.

3.2 500-ml liji ločniki.

3.3 250-ml bučke.

3.4 Celotna oprema za analizo s tankoplastno kromatografijo s steklenimi ploščami  $20 \times 20$  cm.

3.5 Ultravijolična svetilka z valovno dolžino 366 ali 254 nm.

3.6 100- $\mu$ l in 500- $\mu$ l mikrobrizgalke.

3.7 Cilindrični filtrirni liji s porozno frito G3 (poroznosti 15 do 40  $\mu$ m), premera približno 2 cm in globine približno 5 cm, z nastavkom, primernim za filtriranje v vakuumu in priključek 12/21 z zunanjim obrusom.

3.8 50-ml presesalna erlenmajerica z 12/21 priključkom z notranjim obrusom za uporabo s filtrirnim lijem (3.7).

3.9 Epruveta kapacitete 10 ml s koničnim dnom in zamaškom.

3.10 Plinski kromatograf, primeren za uporabo s kapilarno kolono, opremljen s sistemom deljenja, ki ga sestavljajo:

3.10.1 termostatorirana komora za kolone, ki lahko vzdržuje željeno temperaturo s točnostjo  $\pm 1$  °C;

3.10.2 temperaturno nastavljen uparjalnik z uparjalnim elementom iz persilaniziranega stekla;

3.10.3 plamensko ionizacijski detektor in pretvornik z ojačevalnikom;

3.10.4 registrator z integratorjem za delovanje s pretvornikom z ojačevalnikom (3.10.3), z odzivnim časom, ki ne presega ene sekunde in s spremenljivo hitrostjo papirja.

3.11 Steklena ali kvarčna kapilarna kolona, dolžine 20 do 30 m, notranjega premera 0,25 do 0,32 mm, popolnoma prekrita s stacionarno fazo SE-52 ali SE-54 ali podobno, enakomerne debeline med 0,10 in 0,30  $\mu$ m.

3.12 10- $\mu$ l mikrosiringa za plinsko kromatografijo s konico iz kaljenega jekla.

## 4. REAGENTI

4.1 Kalijev hidroksid, približno 2 mol/L etanolna raztopina: Raztopite 130 g kalijevega hidroksida (minimalne koncentracije 85 %) s hlajenjem, v 200 ml destilirane vode in potem do enega litra dodajte etanol. Raztopino hranite v dobro zamašenih temnih steklenicah.

- 4.2 Dietilni eter, čistoče za analizo.
- 4.3 Brezvodni natrijev sulfat, čistoče za analizo.
- 4.4 Steklene plošče, premazane s silikagelom, brez indikatorja fluorescence, debeline 0,25 mm (ki se jih dobi v prodaji, pripravljene za uporabo).
- 4.5 Kalijev hidroksid, približno 0,2 mol/L etanolna raztopina; Raztopite 13 g kalijevega hidroksida v 20 ml destilirane vode in do enega litra dodajte etanol.
- 4.6 Benzen, kromatografske čistoče (Glej 5.2.2).
- 4.7 Aceton, kromatografske čistoče. (Glej 5.2.2)
- 4.8 Heksan, kromatografske čistoče. (Glej 5.2.2)
- 4.9 Dietilni eter, kromatografske čistoče. (Glej 5.2.2)
- 4.10 Kloroform,, kromatografske čistoče. (Glej 5.2.2)
- 4.11 Referenčna raztopina za tankoplastno kromatografijo: holesterol ali fitosteroli, 5-% raztopina v kloroformu.
- 4.12 2,7-diklorofluorescein, 0,2-% etanolna raztopina. Naredite rahlo bazično z dodatkom nekaj kapelj alkoholne raztopine 2 mol/L kalijevega hidroksida.
- 4.13 Brezvodni piridin, kromatografske čistoče.
- 4.14 Hexametil disilazan.
- 4.15 Trimetilklorosilan.
- 4.16 Referenčne raztopine sterolnih trimetilsililnih etrov. Pripravimo jih tik pred uporabo iz čistih sterolov ali iz mešanic sterolov iz olj, ki jih vsebujejo.
- 4.17  $\beta$ -holestanol, 0,2 % raztopina (m/V) v kloroformu (interni standard).
- 4.18 Nosilni plin: vodik ali helij, plinsko-kromatografske čistoče.
- 4.19 Pomožni plini:  
— hydrogen, gas-chromatographic purity,– vodik, plinsko-kromatografske čistoče,  
— air, gas-chromatographic purity.– zrak, plinsko-kromatografske čistoče.
5. POSTOPEK
- 5.1 Priprava neumiljivih snovi.
- 5.1.1 S 500- $\mu$ l mikrobrizgalko, v 250-ml bučko vnesite volumen raztopine 0,2 % 1  $\beta$ -holestanola (4.17), ki vsebuje količino holestanola, ki ustreza približno 10 % vsebnosti sterolov v alikvotu vzorca, vzete za določanje. Na primer, k 5 g vzorca dodajte 500  $\mu$ l 0,2 %  $\alpha$ -holestanolne raztopine v primeru oljčnega olja in 1 500  $\mu$ l za semenska olja ali olja iz oljčnih tropin.
- Odparite do suhega v toku dušika in potem natehtajte točno 5 g suhega filtriranega vzorca v isto bučko.
- Živalske maščobe ali rastlinska olja, ki vsebujejo precejšnje količine holesterola, lahko dajo vrh, ki ima retenzijski čas identičen holestanolu. Če se to pojavi, je treba sterole analizirati z internim standardom in brez njega.
- 5.1.2 Dodajte 50 ml raztopine 2 mol/L etanolnega kalijevega hidroksida, namestite povratni hladilnik in segrejte na rahlo vretje na parni kopeli in stalno močno mešajte do končanega umiljenja (raztopina postane bistra). S segrevanjem nadaljujte še nadaljnih 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, z večkratnim spiranjem z destilirano vodo v skupnem volumnu približno 50 ml. Dodajte približno 80 ml dietilnega etra, močno tresite 30 sekund in potem pustite, da se usede (Opomba 1).
- Odločite spodnjo vodno fazo, tako da jo pretočite v drugi lij ločnik. Iz vodne faze še dvakrat ekstrahiramo, vsakič z uporabo 60 do 70 ml dietilnega etra.

Opomba 1. Emulzijo se lahko odstrani s pršenjem majhnih količin etilnega ali metilnega alkohola.

- 5.1.4 Združite etrske ekstrakte v skupnem liju ločniku in jih izperite z distilirano vodo (vsakokrat s 50 ml), dokler izpiralna voda ne da nevtralne reakcije.

Potem, ko je izpiralna voda odstranjena, osušite z brezvodnim natrijevim sulfatom in filtrirajte skozi brezvodni natrijev sulfat v poprej stehani 250-ml steklenici, pri tem pa lij in filter izperite z majhnimi količinami dietilnega etra.

- 5.1.5 Destilirajte eter na nekaj ml, potem ga posušite v rahlem vakuumu ali v toku dušika, s tem da zaključite sušenje s približno četrt urnim sušenjem v peči pri 100 °C in ga po ohladitvi v eksikatorju stehajte.

- 5.2 Ločevanje sterolne frakcije.

- 5.2.1 Priprava bazičnih plošč. Silikagelne plošče (4.4) za 10 sekund popolnoma potopite v raztopino 0,2 mol/L etanolnega kalijevega hidroksida (4.5) in jih potem pustite dve uri, da se sušijo v digestoriju in jih na koncu dajte v sušilnik na 100 °C za eno uro.

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

*Opomba 2.* Kadar se za ločevanje sterolnih frakcij uporabljajo z lugom obdelane silikagelne plošče, neumiljivih snovi ni treba tretirati z aluminijevim oksidom. Na ta način se vse sestavine, ki so kisle narave (maščobne kisline in druge) obdržijo na mestu napršitve in se pas sterolov jasno loči od pasu alifatskih in triterpenskih alkoholov.

- 5.2.2 Mešanico benzena in acetona v razmerju 95 vol. % benzena in 5 vol. % acetona se uvede v razvijalno komoro na približno globino 1 cm. Alternativno se lahko uporabi mešanico heksana in dietilnega etra v razmerju 65 vol. % heksana in 35 vol. % dietilnega etra. Komoro zaprite z ustreznim pokrovom in pustite tako najmanj pol ure, da se lahko med hlapi in tekočino ustvari ravnotežje. Trakove filtrirnega papirja, namočene v eluent, se lahko namesti na notranje površine komore. To skrajša razvijalni čas za približno eno tretjino in omogoča bolj enotno in homogeno elucijo sestavin.

*Opomba 3.* Razvijalno raztopino je treba zamenjati za vsako analizo, zato da se doseže popolnoma ponovljive pogoje elucije.

- 5.2.3 Pripravite približno 5-% raztopino neumiljivih snovi (5.1.5) v kloroformu in je s pomočjo 100 µl mikrobrižgalke nanesite 300 µl na kromatografsko ploščo (5.2.1) približno 2 cm od enega konca v progi, ki je čimbolj tanka in homogena. S progo poravnajte 2 ali 3 µl sterolne referenčne raztopine (4.11) na enem koncu plošče, tako da se po razvijanju sterolni pas lahko identificira.

- 5.2.4 Ploščo vložite v razvijalno komoro, kot je navedeno v 5.2.2. Temperaturo okolja je treba vzdrževati med 15 in 20 °C. Komoro takoj zaprite s pokrovom in pustite, da eluira, dokler fronta topila ne doseže razdalje približno 1 cm od vrhnjega roba plošče. Vzemite ploščo iz razvijalne komore in odparite topilo pod tokom vročega zraka ali pa tako, da ploščo nekaj časa pustite v digestoriju.

- 5.2.5 Rahlo in enokomerno ploščo napršite z raztopino 2,7-diklorofluorosceina. Če se ploščo opazuje pod ultravijolično svetlobo, se sterolni pas lahko identificira tako, da se ga poravna z madežem, dobljenim iz referenčne raztopine. Označite meje pasu vzdolž roba fluorescence s črnim svinčnikom.

- 5.2.6 S kovinsko žličko odstrgajte 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.

Ostanek v lij ločniku trikrat izperite z dietilnim etrom (vsakokrat približno z 10 ml), tako da zberete filtrat v isti steklenici, pritrjeni na lij. Odparite filtrat do volumna 4 ali 5 ml, prenesite preostanek raztopine v poprej stehano 10-ml 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 in stehajte.

Ostanek znotraj epruvete je sestavljen iz sterolne frakcije.

- 5.3 Priprava trimetilsililnih etrov.

- 5.3.1 Reagent za siliranje, sestavljen iz mešanice piridina, heksametildisilazana in trimetilklorosilana v razmerju 9:3:1(v/v/v), (Opomba 4), po 50 µl na vsak miligram sterolov, dodajte v epruveto, ki vsebuje sterolno frakcijo, tako da se izognete kakršnemu koli vnosu vlage (Opomba 5).

*Opomba 4.* Raztopine, pripravljene za uporabo, se dobijo v prodaji; Na voljo so tudi drugi reagenti za silaniranje, kot so na primer bis-trimetilsilil, trifluoracetamid + 1 % trimetil klorosilan, ki jih je treba razredčiti z enakim volumenom brezvodnega piridina.

- 5.3.2 Zamašite epruveto, previdno pretresite (ne da bi jo prevračali), dokler niso steroli popolnoma raztopljeni. Potem jo najmanj 15 minut pustite pri sobni temperaturi in zatem nekaj minut centrifugirajte. Prozorna raztopina je pripravljena za kromatografsko analizo.

*Opomba 5.* Rahla opalescenca, ki bi lahko nastala, je normalna in ne povzroča nobene interference. Tvorjenje belega flokulata ali pojav rožnate obarvanosti sta znaka prisotnosti vlage ali pokvarjenosti reagenta. Če se to pojavi, je treba preskus ponoviti.

- 5.4 Plinsko kromatografska analiza

- 5.4.1 Predhodni postopki, priprava kolone.

- 5.4.1.1 Kapilarno kolono se pritrdi v plinski kromatograf s priključitvijo začetka kolone na uparjalnik, ki je povezan s sistemom deljenja in s koncem kolone na detektor.

Naredite splošne preglede enot kromatografa (tesnenje tokokroga plinov, učinkovitost detektorja, učinkovitost sistema deljenja in sistema zapisovanja, itd.).

- 5.4.1.2 Če se kolono uporablja prvič, je priporočljivo, da se jo kondicionira. Skozi kapilarno kolono spustite malo plina in potem vključite plinski kromatograf in začnite postopno segrevanje do temperature najmanj 20 °C nad delovno temperaturo (glej Opombo 6). To temperaturo vzdržujete najmanj dve uri in potem se celoten sklop spravite v stanje delovnih pogojev (nastavitev pretoka plina in deljenja, vžig plamena, priključitev na elektronski rekorder, prilagoditev peči za kolono, prilagoditev temperature detektorja in injektorja itd.) in potem snemajte signal z občutljivostjo, ki je najmanj dvakrat večja od tiste, ki je nameravana za analize. Potek bazne linije mora biti linearen, brez kakršnih koli vrhov in ne sme imeti odklona.

Negativni odklon bazne linije kaže na slabo tesnenje v priključkih kolone; pozitiven odklon kaže na nezadostno kondicioniranje kolone.

*Opomba 6.* Temperatura kondicioniranja mora biti najmanj 20 °C nižja od maksimalne temperature, določene za uporabljeno stacionarno fazo.

- 5.4.2 Izbor delovnih pogojev.

- 5.4.2.1 Splošni delovni pogoji so naslednji:

- temperatura kolone: 260 ± 5 °C,
- temperatura evaporatorja: 280 °C,
- temperatura detektorja: 290 °C,
- linearna hitrost nosilnega plina: helij 20 do 35 cm/s, dušik 30 do 50 cm/s,
- delilno razmerje: od 1:50 do 1:100,
- občutljivost instrumenta: 4 do 16 kratna minimalna atenuacija,
- občutljivost beleženja: 1 do 2 mV polne skale,
- hitrost papirja: 30 do 60 cm/h,
- količina injicirane snovi: 0,5 do 1 µl raztopine TMSE.

Te pogoje se lahko spreminja glede na lastnosti kolone in plinskega kromatografa, tako da se dobijo kromatogrami, ki izpolnjujejo naslednje zahteve:

- retencijski čas β-sitosterola naj bi bil 20 ± 5 minut.
- vrh kampesterola naj bi bil: za oljčno olje (povprečna vsebnost 3 %) 15 ± 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, t.j., signal vrha se mora pred začetkom novega vrha vrniti na bazno linijo. Vendar se nepopolno ločenje vrhov tolerira pod pogojem, da se pik pri TRR 1.02 lahko kvantificira s pomočjo pravokotnice.

- 5.4.3 Analizni postopek

- 5.4.3.1 Z mikrobrizgalko kapacitete 10 µl vsrkajte 1 µl heksana, ki mu sledi 0,5 µl zraka in zatem 0,5 do 1 µl raztopine vzorca; Dvignite bat mikrobrizgalko, tako da se igla izprazni. Iglo uvedite skozi membrano injektorja in po eni do dveh sekundah raztopino hitro vbrizgnite in potem po približno petih sekundah iglo počasi izvlecite.

- 5.4.3.2 Beleženje nadaljujte, dokler TMSE prisotnih sterolov popolnoma ne eluirajo.

Bazna linija mora vedno ustrezati zahtevam 5.4.1.2.

- 5.4.4 Identificiranje vrhov.

Identificirajte posamezne vrhove na osnovi retencijskih časov in s primerjavo z mešanicami sterolnih TMSE, analiziranih v enakih pogojih.

Steroli eluirajo v naslednjem zaporedju: holesterol, brasikasterol, 24-metilen holesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol,  $\Delta$  7-kampesterol,  $\Delta$ -5,23-stigmastadienol, klerosterol,  $\beta$ -sistosterol, sitostanol,  $\Delta$ -5-avenasterol,  $\Delta$ -5,24-stigmastadienol,  $\Delta$ -7-stigmasterol,  $\Delta$ -7-avenasterol.

Retenzijski časi časa za 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 Izračunajte površine vrhov  $\beta$ -holestanola in sterolov s pomočjo integratorja. Ne upoštevajte vrhov tistih spojin, ki niso vključene med tiste, navedene v Tabeli 1. Odzivni koeficient  $\beta$ -holestanola mora biti enak 1.

5.4.5.2 Izračunajte koncentracijo vsakega posameznega sterola v mg/100 g maščobe kot sledi:

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

kjer je:

$A_x$  = površina vrhasterola  $x$ , v kvadratnih millimetrih;

$A_s$  = površina vrha  $\beta$ -holestanola, v kvadratnih millimetrih;

$m_s$  = masa dodanega  $\beta$ -holestanola, v miligramih;

$m$  = masa vzorca, uporabljenega za določanje, v gramih;

## 6. IZRAŽANJE REZULTATOV

6.1 Zabeležite posamezne koncentracije sterola kot mg/100 g maščobe in njihovo vsoto kot „celokupni steroli“.

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

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

kjer je:

$A_x$  = površina vrha  $x$ ;

$\sum A$  = površina vseh sterolnih vrhov.

## DODATEK

### Določanje linearne hitrosti plina

Pri nastavitvi plinskega kromatografa na normalne delovne pogoje injicirajte 1 do 3  $\mu$ l metana (ali propana) in izmerite čas, ki je potreben, da se plin pretoči skozi kolono, od trenutka injiciranja 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.

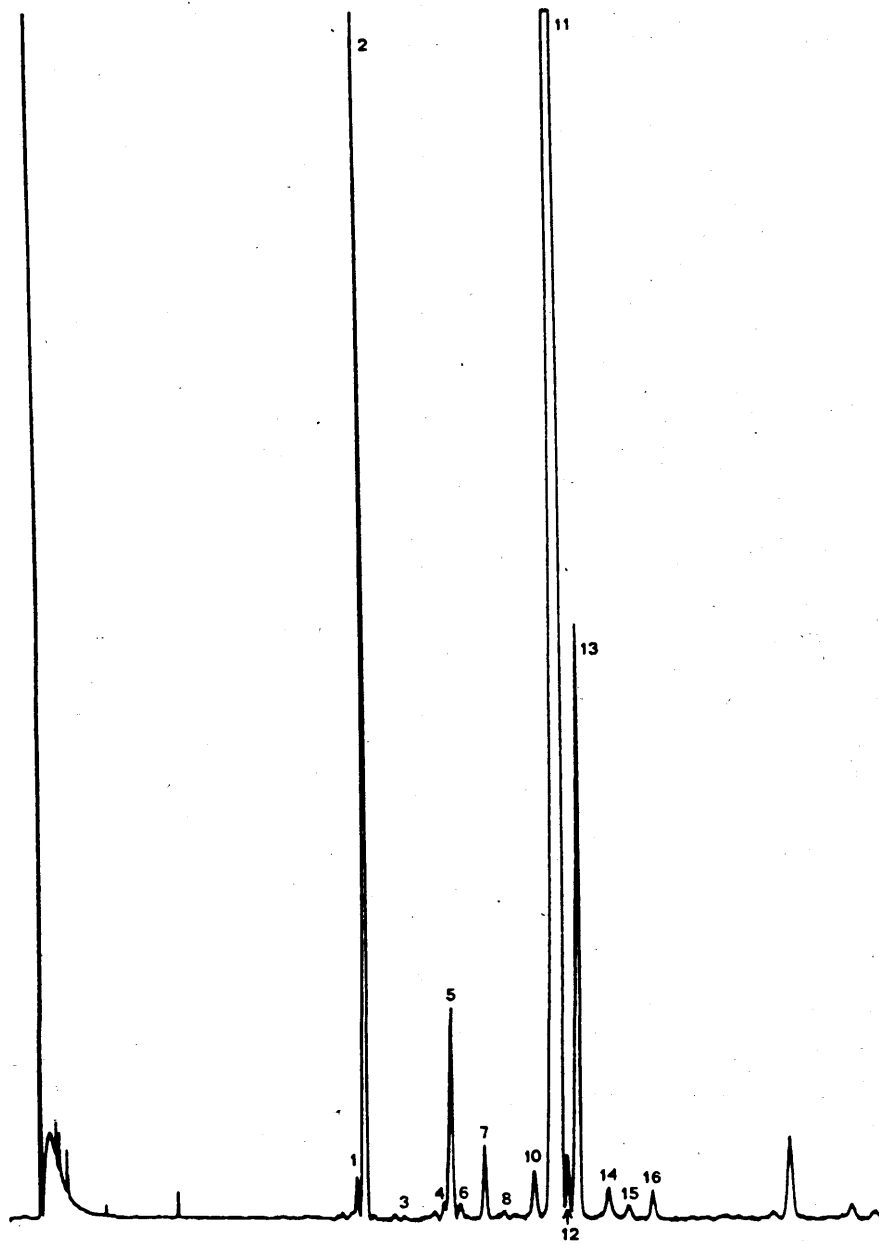
**Tabela 1**

Relativni retenzijski časi sterolov

Pik	Identifikacija		Relativni retenzijski čas	
			SE 54 kolona	SE 52 kolona
1	holesterol	$\Delta$ -5-holesten-3 $\beta$ -ol	0,67	0,63
2	holestanol	5 $\alpha$ -holestan-3 $\beta$ -ol	0,68	0,64
3	Brasikasterol	[24S]-24-metil- $\Delta$ -5,22-holestadien-3 $\beta$ -o1	0,73	0,71
4	24-metilen-holesterol	24-metilen- $\Delta$ -5,24-holesten-3 $\beta$ -ol	0,82	0,80
5	kampesterol	[24R]-24-metil- $\Delta$ -5-holesten-3 $\beta$ -o1	0,83	0,81
6	kampestanol	[24R]-24-metil-holestan-3 $\beta$ -ol	0,85	0,82
7	stigmasterol	[24R]-24-etil- $\Delta$ -5,22-holestadien-3 $\beta$ -o1	0,88	0,87
8	$\Delta$ -7-kampesterol	[24R]-24-metil- $\Delta$ -7-holesten-3 $\beta$ -o1	0,93	0,92
9	$\Delta$ -5,23-stigmastadienol	[24R,S]-24-etil- $\Delta$ -5,23-holestadien-3 $\beta$ -o1	0,95	0,95
10	klerosterol	[24S]-24-etil- $\Delta$ -5,25-holestadien-3 $\beta$ -ol	0,96	0,96
11	$\beta$ -sitosterol	[24R]-24-etil- $\Delta$ -5-holestan-3 $\beta$ -ol	1,00	1,00
12	sitostanol	24-etil-holestan-3 $\beta$ -ol	1,02	1,02
13	$\Delta$ -5-avenasterol	[24Z]-24-etiliden-5-holesten-3 $\beta$ -o1	1,03	1,03
14	$\Delta$ -5,24-stigmastadienol	[24R,S]-24-etil- $\Delta$ -5,24-holestadien-3 $\beta$ -o1	1,08	1,08
15	$\Delta$ -7-stigmastenol	[24R,S]-24-etil- $\Delta$ -7,24-holestadien-3 $\beta$ -ol	1,12	1,12
16	$\Delta$ -7-avenasterol	[24Z]-24-etiliden- $\Delta$ -7-holesten-3 $\beta$ -o1	1,16	1,16

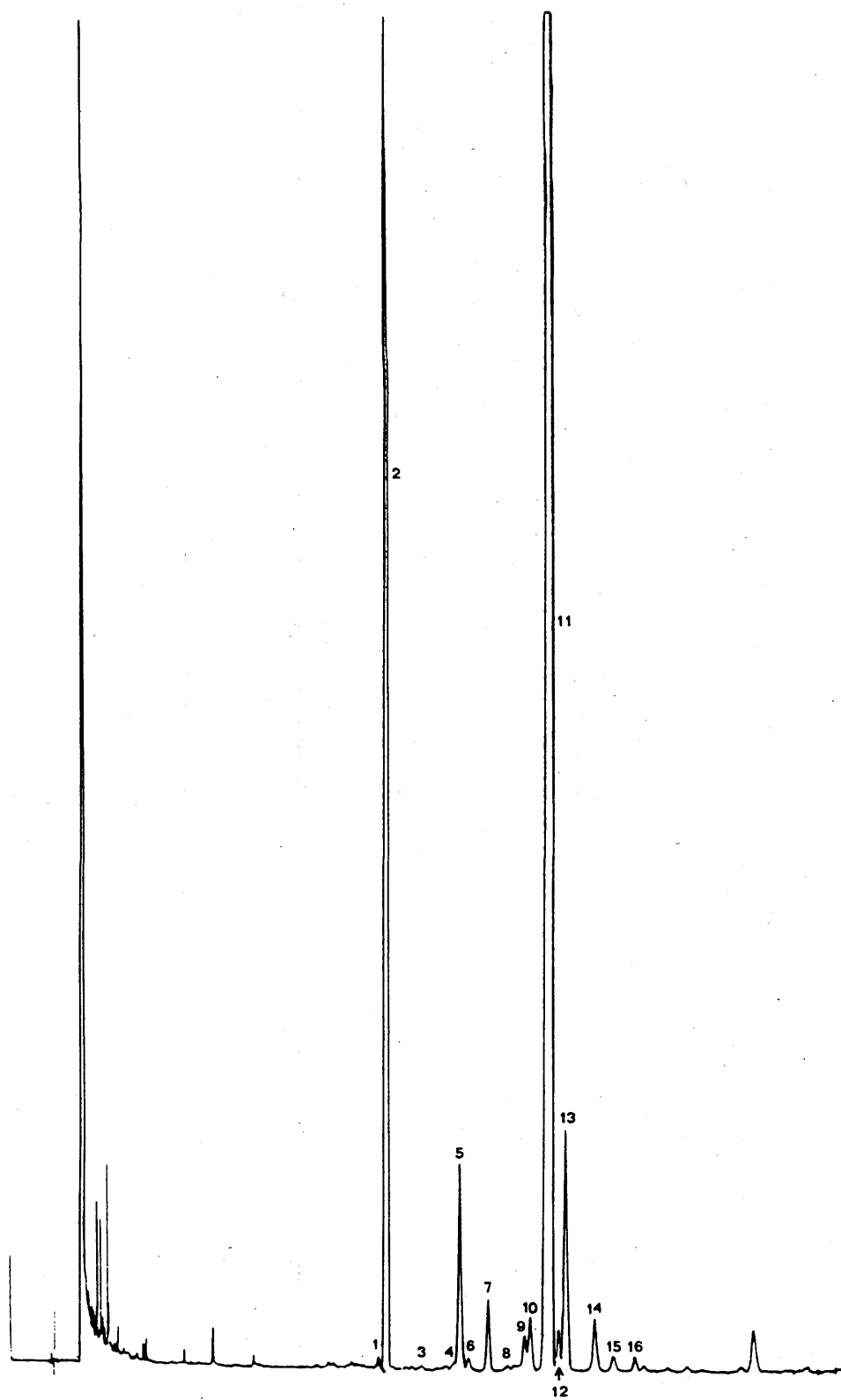
## Slika 1

Plinski kromatogram sterolne frakcije nerafiniranega oljčnega olja.



## Slika 2

Plinski kromatogram sterolne frakcije rafiniranega oljčnega olja.



## PRILOGA VI

## DOLOČANJE ERITRODIOLA IN UVAOLA

## UVOD

Eritrodiol (ki se ga običajno podaja kot vsoto glikolov eritrodiola in uvaola) je sestavina neumiljive frakcije, značilna za nekatere vrste maščob. V bistveno višjih koncentracijah se nahaja v oljčnem olju, ekstrahiranem s topili, kot pa v drugih oljih, kot sta prešano oljčno olje in olje iz grozdnih pešk, ki ga tudi vsebujeta in tako njegova prisotnost lahko potrdi prisotnost oljčnega olja, ekstrahiranega s topili.

## 1. NAMEN

Ta metoda opisuje postopek za določanje eritrodiola v maščobah.

## 2. PRINCIP METODE

Maščobo umilimo z etanolno raztopino kalijevega hidroksida. Neumiljivo frakcijo, potem ekstrahiramo z dietilnim etrom in očistimo s prehodom skozi kolono, napolnjeno z aluminijevim oksidom.

Neumiljive snovi tretiramo s tankoplastno kromatografijo na silikagelni plošči, dokler se ne ločijo pasovi, ki ustrezajo frakcijam sterola in eritrodiola. Steroli in eritrodiol, dobljeni s plošče, se pretvorijo v trimetilsililne etre in mešanico se analizira s plinsko kromatografijo.

Rezultati so izraženi v odstotnem deležu eritrodiola in mešanice eritrodiola in sterolov.

## 3. OPREMA

## 3.1 Oprema, kot je specificirana v Prilogi V (določanje vsebnosti sterolov).

## 4. REAGENTI

## 4.1 Reagenti, kot so specificirani v Prilogi V (določanje vsebnosti sterolov).

## 4.2 Referenčna raztopina eritrodiola, 0,5-% raztopina v kloroformu.

## 5. POSTOPEK

5.1 **Priprava neumiljivih snovi.**

Kot je opisano v odstavku 5.1.2 Priloge V.

5.2 **Ločevanje eritrodiola in sterolov.**

## 5.2.1 Glej odstavek 5.2.1 Priloge V.

## 5.2.2 Glej odstavek 5.2.2 Priloge V.

## 5.2.3 Pripravite 5-% raztopino neumiljivih snovi v kloroformu.

Z 0,1 µl mikrobrizgalko nanesite na kromatografsko ploščo 0,3 ml raztopine, približno 1,5 cm od spodnjega roba v progi, ki je čimbolj tanka in homogena.

Na en konec plošče nanesite nekaj mikrolitrov raztopin holesterola in eritrodiola, ki naj služita kot referenca.

## 5.2.4 Ploščo vložite v razvijalno komoro, pripravljeno kot je navedeno v 5.2.1. Temperatura okolja mora biti približno 20 °C. Takoj zaprite komoro 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 pod tokom vročega zraka.

## 5.2.5 Rahlo in enokomerno napršite ploščo z alkoholno raztopino 2,7-diklorofluorosceina. Če se ploščo opazuje pod ultravijolično svetlobo, se pasova sterola in eritrodiola lahko identificirata tako, da se ju poravna z referencami. Označite s piko izven robov fluorescence.

5.2.6 S kovinsko žličko odstrgajte silikagel v označenih območjih. Material s plošče dajte v 50-ml bučko. Dodajte 15 ml vročega kloroforma, dobro pretresite in filtrirajte skozi lij s ploščo iz sintranega stekla, tako da silikagel prenesete na filter. Trikrat sperite z vročim kloroformom (vsakokrat z 10 ml), tako da zberete filtrat v 100-ml bučki. Odparite filtrat na približno 4 do 5 ml volumna, prenesite v kalibrirano 10-ml epruveto za centrifugiranje s konusnim dnom, posušite z rahlim segrevanjem v toku dušika in stehtajte.

### 5.3 Priprava trimetilsililnih estrov

Kot je opisano v odstavku 5.3 Priloge V.

### 5.4 Plinsko kromatografska analiza

Kot je opisano v odstavku 5.4 zgoraj navedenega postopka. Delovni pogoji plinskega kromatografa morajo biti pri analizi takšni, da se izvede analiza sterolov in loči TMSE od eritrodiola in uvaola.

Potem, ko je bil vzorec vbrizgan, nadaljujte z beleženjem, dokler prisotni steroli, eritrodiol in uvaol ne eluirajo. Potem identificirajte vrhove (retenzijska časa za eritrodiol in uvaol glede na  $\beta$ -sitosterol sta okrog 1,45 oziroma 1,55) in površine izračunajte kot za sterole.

## 6. IZRAŽANJE REZULTATOV

$$\text{Erythrodiol \%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{sterols}}} \times 100$$

kjer je:

$A_1$  = površina vrha eritrodiola v kvadratnih millimetrih;

$A_2$  = površina vrha uvaola v kvadratnih millimetrih;

$\sum A_{\text{steroli}}$  = vsota površin vrhov sterolov v kvadratnih millimetrih.

Rezultat se izrazi na eno decimalno mesto.

## PRILOGA VII

**DOLOČANJE MAŠČOBNIH KISLIN NA POLOŽAJU 2 V TRIGLICERIDIH OLJ IN MASTI**

## 1. NAMEN

Ta standard opisuje metodo za določanje sestave tiste frakcije maščobnih kislin olja ali masti, ki je esterificirana na položaju 2 (ali internem položaju) glicerola.

## 2. PODROČJE UPORABE

Ta standard se uporablja za olja in masti, ki imajo tališče pod 45 °C, zaradi posebnosti delovanja lipaze iz pankreasa.

Ta standard se ne uporablja brez omejitev za olja in masti, ki vsebujejo bistvene količine: maščobnih kislin z 12 ali manj atomi ogljika (kokosovo ali palmovo olje, maščoba iz masla ali visoko nenasičene maščobne kisline (z več kot štirimi dvojnimi vezmi), ki vsebujejo 20 ali več atomov ogljika (ribja olja in olja morskih organizmov), ali maščobne kisline, ki vsebujejo oksigenirane skupine, razen karboksilne skupine.

## 3. POSTOPEK

Morebitna nevtralizacija kislih olj in masti v topilu. Čiščenje z uvajanjem skozi kolono aluminijevega oksida. Delna hidroliza trigliceridov z lipazo iz pankreasa v določenem času. Ločevanje formiranih monogliceridov s tankoplasnto kromatografijo in metanoliza teh monogliceridov Analiza teh metilnih estrov s plinsko kromatografijo.

## 4. OPREMA

- 4.1 100-ml bučka z okroglim dnom.
- 4.2 25-ml bučka z okroglim dnom in priključkom z brusom.
- 4.3 Zračni hladilnik, dolžine 1 m, ki se ga namesti na bučko 4.2.
- 4.4 250-ml erlenmajerica.
- 4.5 50-ml čaša.
- 4.6 500-ml lij ločnik.
- 4.7 Steklena kromatografska kolona, internega premera 13 mm, dolžine 400 mm, opremljena s steklenim diskom s frito in čepom.
- 4.8 10-ml epruveta za centrifugiranje, s steklenim zamaškom z brusom.
- 4.9 5-ml graduirana bireta, z razdelkom 0,05 ml.
- 4.10 1-ml brizgalka s tanko iglo.
- 4.11 Mikrobrizgalka za doziranje 3 do 4 µl kapelj.
- 4.12 Pršilec za tankoplastno kromatografijo.
- 4.13 Steklene plošče za tankoplastno kromatografijo, 20 × 20 cm.
- 4.14 Steklena razvijalna komora za tankoplastno kromatografijo, s pokrovom s stekleno frito za plošče dimenzij 20 × 20.
- 4.15 Sprej za tankoplastno kromatografijo.
- 4.16 Peč segrejmo na 103 ± 2 °C.
- 4.17 Termostat, nastavljen med 30 in 45 °C z natančnostjo nastavitve na 0,5 °C.
- 4.18 Rotavapor.
- 4.19 Vibracijski električni stresalnik, ki omogoča močno tresenje epruvete za centrifugo.
- 4.20 Ultravijolična svetilka za preglede tankoplastnih plošč.

*Za kontrolo aktivnosti lipaze:*

- 4.21 pH meter.
- 4.22 Spiralni mešalec.
- 4.23 5-ml bireta.
- 4.24 Štoparica.

*Za morebitno pripravo lipaze:*

- 4.25 Laboratorijski mešalec, primeren za dispergiranje in mešanje heterogenih snovi.

## 5. REAGENTI

- 5.1 n-heksan, ali lahki petrolej (z vreliščem 30 do 50 °C), kromatografske čistoče.
- 5.2 2-propanol, ali etanol, 95 % (v/v), čistoče za analizo.
- 5.3 2-propanol, ali etanol, 1/1 vodna raztopina.
- 5.4 Dietilni eter, brez peroksidov.
- 5.5 Aceton.
- 5.6 Mravljična kislina, najmanj 98 % (m/m).
- 5.7 Razvijalno topilo: mešanica n-heksana (5.1), dietilnega etra in mravljične kisline (5.6) v razmerju 70/30/1 (v/v/v).
- 5.8 Aktiviran aluminijev oksid za kromatografijo, nevtralen, I kakovosti po Brockmannu.
- 5.9 Silicijev dioksid, z vezivom, ustrezne kakovosti za tankoplastno kromatografijo.
- 5.10 Lipaza iz pankreasa ustrezne kakovosti (Opombi 1 in 2).
- 5.11 Natrijev hidroksid, 120 g/l vodna raztopina.
- 5.12 Solna kislina, vodna raztopina 6 mol/L.
- 5.13 Kalcijev klorid (CaCl<sub>2</sub>), 220 g/l vodna raztopina.
- 5.14 Natrijev holat (encimatske kvalitete), 1 g/l vodna raztopina.
- 5.15 Puferna raztopina: 1 M vodno raztopino tris-hidroksimetilaminometana nastavite na pH 8 z dodatkom solne kisline (5.12) (preverite s pH metrom).
- 5.16 Fenolftalein, 10 g/l raztopina v 95 % (v/v) etanola.
- 5.17 Raztopina 2',7'-diklorofluoresceina, 2g/l raztopina v 95 % (v/v) etanolu, nastavljena rahlo alkalna, z dodatkom ene kaplje 1 N raztopine natrijevega hidroksida na 100 ml.

*Za kontrolo aktivnosti lipaze:*

- 5.18 Nevtralizirano olje.
- 5.19 Natrijev hidroksid, 0,1 M vodna raztopina.
- 5.20 Natrijev holat (encimske kakovosti), 200 g/l vodna raztopina.
- 5.21 Gumiarabikum, 100 g/l vodna raztopina.

## 6. PRIPRAVA VZORCA

Če ima vzorec kislost pod 3 %, določeno skladno s Prilogo II, očistite neposredno preko aluminijevega oksida skladno s 6.2.

Če ima vzorec kislost pod 3 %, določeno skladno s Prilogo II, nevtralizirajte z alkalijami v prisotnosti topila skladno s 6.1, potem ga uvedite preko aluminijevega oksida skladno s 6.2.

- 6.1 Nevtralizacija z alkalijami v prisotnosti topila

V lij ločnik (4.6) uvedite približno 10 g surovega olja in dodajte 100 ml heksana (5.1), 50 ml 2-propanola (5.2), nekaj kapelj raztopine fenolftaleina (5.16) in količino raztopine natrijevega hidroksida (5.11), ki ustreza vsebnosti prostih maščobnih kislin olj plus 0,3 % presežek. Eno minuto močno stresajte, dodajte 50 ml destilirane vode, ponovno pretresite in pustite, da se usede.

Po ločitvi odstranite sloj milnice, ki je na dnu. Odstranite tudi vse vmesne sloje (sluz, netopno snov). Izperite heksansko raztopino nevtraliziranega olja z zaporednimi 25 do 30 ml odmerki 2-propanolne raztopine (5.3), dokler rožnata obarvanost fenolfaleina ne izgine.

Večino heksana odstranite z destilacijo v vakuumu v rotavaporju (4.18), sušite olje pri 30 do 40 °C v vakuumu s tokom čistega dušika, dokler ni heksan popolnoma odstranjen.

## 6.2 Čiščenje preko aluminijevega oksida

Pripravite 15 g suspenzijo aktiviranega aluminijevega oksida (5.8) v 50 ml heksana (5.1) in jo, medtem ko jo mešate, vlijte v kromatografsko kolono (4.7). Pustite, da se aluminijev oksid enakomerno usede in pustite, da nivo topila pade od 1 do 2 mm nad absorbentom. V kolono previdno vlijte raztopino 5 g olja in 25 ml heksana (5.1); zberite celoten iztok iz kolone v bučki z okroglim dnom (4.1).

## 7. Priprava kromatografskih plošč.

Temeljito očistite steklene plošče (4.13) z etanolom, lahkim petrolejem in acetonom, da odstranite vsakršno sled maščob.

V erlenmajerico (4.4) uvedite 30 g silicijevega dioksida (5.9). Dodajte 60 ml distilirane vode. Začepite in močno stresajte eno minuto. Goščo takoj prenesite na nanašalec (4.12) in prekrijte čiste plošče s plastjo debeline 0,25 mm.

Plošče sušite na zraku 15 minut in potem eno uro v peči (4.16) pri  $103 \pm 2$  °C. Pred uporabo ohladite plošče v eksikatorju na sobno temperaturo.

Pripravljene plošče se dobijo v prodaji.

## 8. POSTOPEK

### 8.1 Hidroliza z lipazo iz pankreasa.

V epruveto za centrifugiranje (4.8) natehtajte približno 0,1 g pripravljenega vzorca, če je vzorec tekoče olje nemudoma ravnajte tako, kot je navedeno spodaj.

Dodajte 20 mg lipaze (5.10) in 2 ml puferne raztopine (5.15). Dobro, vendar previdno pretresite in potem dodajte 0,5 ml raztopine natrijevega holata (5.14) in 0,2 ml raztopine kalcijevega klorida (5.13). Zaprite epruveto z zamaškom z brusom, previdno pretresite (pazite, da ne zmočite zamaška) in dajte epruveto takoj v termostatski (4.17), ki je vzdrževan na  $40 \pm 5$  °C in z roko pretresajte natančno eno minuto.

Vzemite epruveto iz termostata in s pomočjo električnega stresalnika (4.19) natančno dve minuti močno stresajte.

Takoj ohladite pod tekočo vodo; dodajte 1 ml solne kisline (5.12) in 1 ml dietilnega etra (5.4). Zamašite in močno stresajte z električnim stresalnikom. Pustite, da stoji in odstranite organski sloj z brizgalko (4.10), če je to po centrifugiranju potrebno.

### 8.2 Ločevanje monogliceridov s tankoplastno kromatografijo

Z mikrobrizgalko (4.11) na kromatografsko ploščo nanesite približno 1,5 cm od spodnjega roba tanko homogeno črto, ki je čimbolj ozka. Ploščo dajte v nasičeno razvijalno komoro (4.14) in jo razvijajte z razvijalnim topilom (5.7) na približno 20 °C, do približno 1 cm od zgornjega roba plošče.

Osušite ploščo na zraku pri temperaturi komore in jo napršite z raztopino 2',7'-diklorofluoresceina (5.17). Identificirajte monogliceridni pas ( $R_f$  približno 0,035) pod ultravijolično svetlobo (4.20).

### 8.3 Analiza monogliceridov s plinsko kromatografijo.

S spatulo odstranite pas, dobljen v 8.2 (pazite, da ne odstranite sestavin, ki ostanejo na bazni liniji) in prenesite v steklenico za metiliranje (4.2).

Zbran silicijev dioksid tretirajte po opisanih postopkih, opisanih v Prilogi X B, tako da monogliceride pretvorite v metilne estre in potem analizirajte estre s plinsko kromatografijo, kot je opisano v Prilogi X A.

## 9. IZRAŽANJE REZULTATOV

Izračunajte sestavo maščobnih kislin na položaju 2 na eno decimalno mesto (Opomba 3).

## 10. OPOMBE

*Opomba 1:* Preverjanje aktivnosti lipaze

Pripravite oljno emulzijo tako, da v ustreznem mešalniku pretresete mešanico 165 ml raztopine gumirabikuma (5.21), 15 g zdrobljenega ledu in 20 ml nevtraliziranega olja (5.18).

V čašo (4.5) uvedite 10 ml te emulzije, nato zaporedoma uvedite 0,3 ml raztopine natrijevega holata (5.20) in 20 ml destilirane vode.

Dajte čašo v termostat, ki je vzdrževan na  $37 \pm 5$  °C (Opomba 4); uvedite elektrode pH metra (4.21) in spiralni mešalec (4.22).

Z bireto (4.23) po kapljah dodajajte raztopino natrijevega hidroksida (5.19), dokler pH ne doseže 8,5.

Dodajte dovolj vodne suspenzije lipaze (glej spodaj). Takoj ko pH meter pokaže pH 8,3 začnite meriti čas (4.24) in po kapljah dodajajte raztopino natrijevega hidroksida (5.19) s tako hitrostjo, da ohranjate pH na 8,3. Vsako minuto odčitajte volumen porabljene alkalne raztopine.

Zapišite opažanja v obliki grafa, tako da uporabite odčitke časa kot absciso in ml alkalne raztopine, potrebne da se ohranja pH konstantna, kot ordinate. Dobiti je treba nov linearni graf.

Zgoraj navedena lipazna suspenzija je 1:1000 (m/m) vodna suspenzija. Za vsak preskus naj se uporabi dovolj te suspenzije, tako da je približno 1 ml te alkalne raztopine porabljen v štirih do petih minutah. Običajno je potrebnih 1 do 5 mg prahu.

Lipazna enota je opredeljena kot količina encima, ki bo sprostil 10 mikro-ekvivalentov kisline na minuto. Potem je aktivnost A uporabljenega prahu, izmerjenega v enotah lipaze na mg, podana s formulo:

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

kjer je V volumen raztopine natrijevega hidroksida (5.19), porabljene na minuto, izračunano iz grafa, m je masa testnega deleža prahu v mg.

*Opomba 2:* Priprava lipaze

Lipaze, ki imajo zadostno aktivnost lipaze, so na voljo v prodaji. Vendar jih lahko pripravimo v laboratoriju kot sledi:

Ohladite 5 kg sveže prašičje trebušne slinavke na 0 °C; odstranite okoliško trdno maščobo in vezno tkivo in zmeljite v mešalcu, tako da dobite kašasto tekočino. Mešajte to kašo z mešalcem (4.25) štiri do šest ur z 2,5 l brezvodnega acetona in centrifugirajte. Naredite izvleček iz ostanka še trikrat z enakim volumnom acetona, potem dvakrat z 1/1(V/V) mešanico acetona in dietilnega etra, in dvakrat z dietilnim etrom.

Sušite ostanek v vakuumu 48 ur, da dobite stabilen prah, ki ga je treba hraniti v hladilniku.

*Opomba 3 :* V vsakem primeru je priporočljivo določiti tudi sestavo maščobnih kislin istega vzorca, saj bo primerjava obeh določitev pomagala pri interpretaciji dobljenih rezultatov.*Opomba 4:* Temperatura hidrolize poteka pri 37 °C, ker se uporablja tekoče olje. Vendar se za preskusni vzorec nastavi na 40 °C, da se omogoči pregled maščob, ki imajo tališče do 45 °C.

## PRILOGA VIII

## DOLOČANJE VSEBNOSTI TRILINOLEINA

## 1. NAMEN

Določanje sestave triglicerida v oljčnih oljih v smislu njihovega ekvivalentnega ogljikovega števila s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.

Ta metoda opisuje postopek za ločevanje in količinsko določanje sestave triglicerida v rastlinskih oljih v smislu njihove molske mase in stopnje nenasičenosti kot funkcije ekvivalentnega ogljikovega števila (glej Opombo 1).

## 2. PODROČJE UPORABE

Ta metoda se uporablja za vsa rastlinska olja, ki vsebujejo trigliceride dolgih maščobnih kislin. Ta metoda se posebej uporablja za detekcijo pristnosti majhnih količin polsušilnih olj (bogatih z linolno kislino) v rastlinskih oljih, ki vsebujejo oleinsko kislino kot prevladujočo nenasičeno maščobno kislino, tako kot oljčno olje.

## 3. POSTOPEK

Ločevanje trigliceridov glede na njihovo ekvivalentno ogljikovo število s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (reverzna faza) in interpretacija kromatogramov.

## 4. OPREMA

4.1 Kromatograf za visoko ločljivo tekočinsko kromatografijo, ki omogoča termostatski nadzor temperature kolone.

4.2 Injektor za vnos 10 µl.

4.3 Detektor: diferencialni refraktometer. Občutljivost celotne skale mora biti najmanj  $10^{-4}$  enote lomnega količnika.

4.4 Kolona: jeklena cev, dolga 250 mm in notranjega premera 4,5 mm, polnjena z delci silicijivega dioksida premera 5 µm, z 22 do 23 % ogljika v obliki oktadecilsilana (Opomba 2).

4.5 Rekorder in/ali integrator.

## 5. REAGENTI

Reagenti morajo biti čistoče za analizo. Topila za elucijo morajo biti razplinjena in se jih lahko večkrat reciklira brez vpliva naločevanje.

5.1 Kloroform.

5.2 Aceton.

5.3 Acetonitril.

5.4 Razvijalno topilo: acetonitril + aceton (treba je prilagoditi razmerja, da se doseže željeno ločevanje; začnite z mešanico 50:50).

5.5 Topilo: aceton ali mešanica acetona-kloroforma 1:1.

5.6 Referenčni trigliceridi: lahko se uporabi komercialne trigliceride (tripalmitin, triolein itd.) in se potem retencijske čase beleži glede na ekvivalentno ogljikovo število; ali alternativno, referenčni kromatogram, dobljen s sojinim oljem (glej Opombi 3 in 4 ter Sliki 1 in 2).

## 6. PRIPRAVA VZORCEV

5-% raztopina vzorcev, ki naj bi se jih analiziralo, se pripravi s tehtanjem  $0,5 \pm 0,001$  g vzorca v graduirano steklenico in se do 10 ml dolije topilo (5.5).

## 7. POSTOPEK

- 7.1 Pripravite kromatografski sistem. Črpajte elucijsko topilo (5.4) s hitrostjo 1,5 ml/mm, da očistite celoten sistem. Počakajte, da dobite stabilno bazno linijo.

Injicirajte 10 µl vzorca, kot je opisano v 6.

## 8. IZRAČUN IN IZRAŽANJE REZULTATOV

Uporabite interni standardizacijski posopek, t.j., predpostavite, da je vsota površin vrhov, ki ustreza različnim trigliceridom, enaka 100 %. Izračunajte relativni odstotni delež vsakega triglicerida z uporabo formule:

$$\% \text{ triglicerid} = \frac{\text{območje vrha}}{\text{vsota območij vrhov}} \times 100$$

Rezultat se izrazi na eno decimalno mesto.

*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  $n_0$ ,  $n_1$  in  $n_{1n}$  števila dvojnih vezi, ki se jih pripisuje oleinski, linolni oziroma linolenski kislini, je ekvivalentno ogljikovo število mogoče izračunati s pomočjo relacije v enačbi:

$$ECN = CN - d_0 n_0 - d_1 n_1 - d_{1n} n_{1n}$$

kjer se koeficiente  $d_0$ ,  $d_1$  in  $d_{1n}$  lahko izračuna s pomočjo referenčnih trigliceridov. Pod pogoji, določenimi v tem postopku, bo dobljena relacija približno:

$$ECN = CN - [2,60 n_0] - [2,35 n_1] - [2,17 n_{1n}]$$

*Opomba 2.* Primeri: Lichrosorb (Merck) RP18 Art 50333;

Lichrosphere ali equivalent (Merck) 100 CH18 Art 50377.

*Opomba 3.* Z več referenčnimi trigliceridi je možno izračunati tudi *resolucijo* glede na triolein,

$$\alpha = RT'/RT' \text{ olein}$$

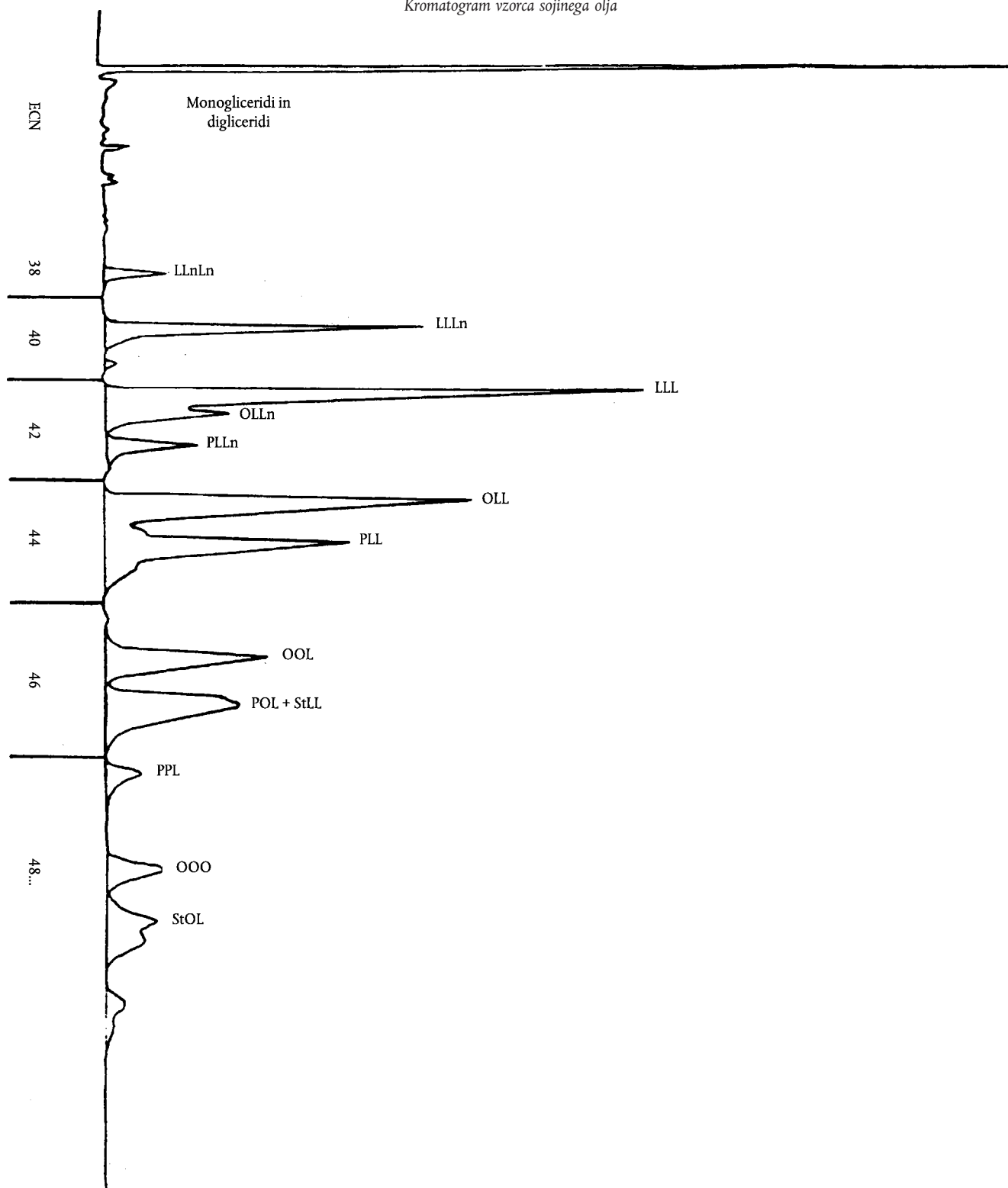
z uporabo reduciranega retenzijskega časa  $RT' = RT - RT_{\text{topilo}}$ .

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 2

*Opomba 4.* Učinkovitost kolone mora omogočati jasno ločevanje vrha trilinoleina od vrhov trigliceridov s sosednjim RT.

Slika 1

Kromatogram vzorca sojinega olja



P = palmitinska kislina

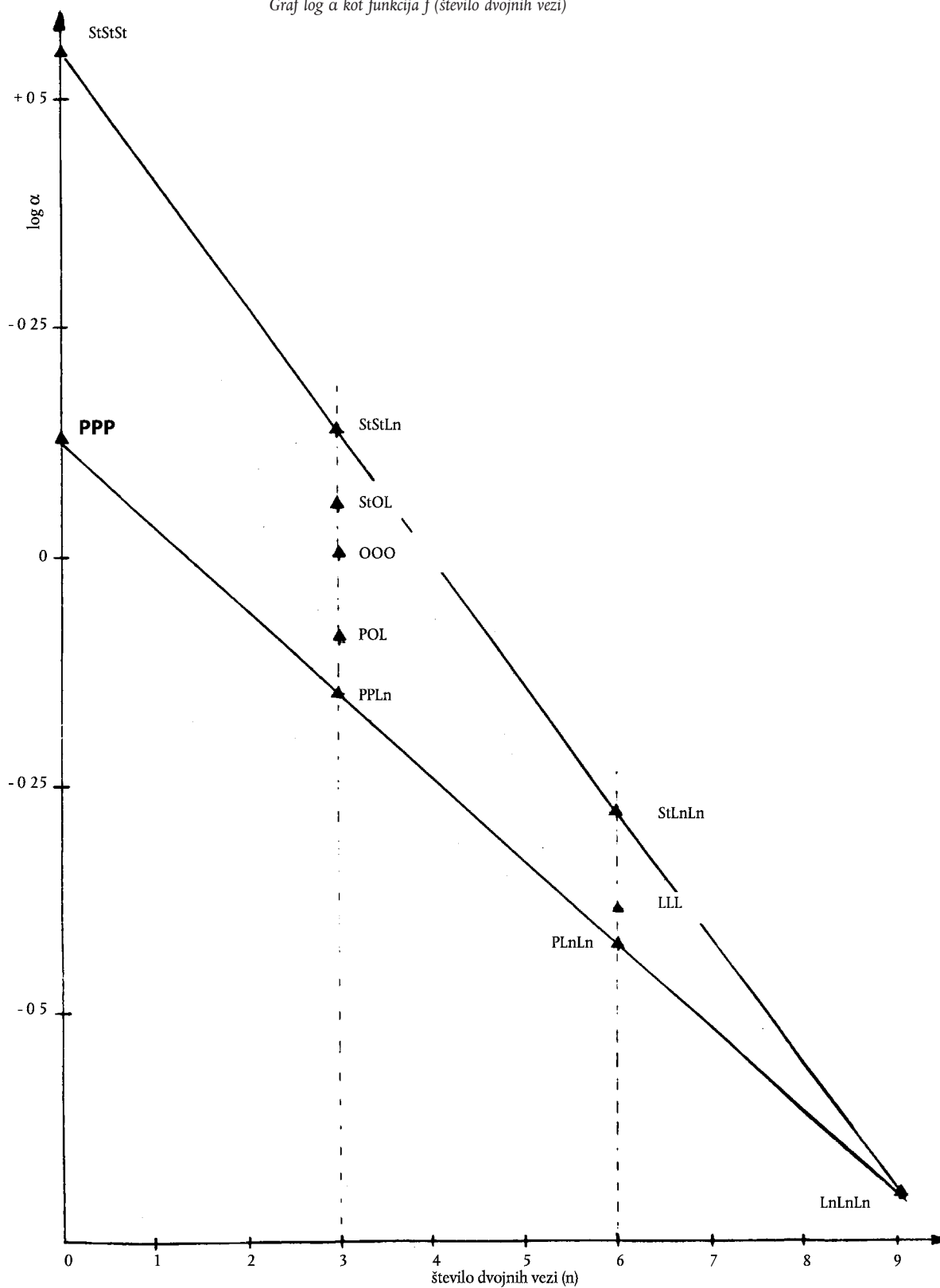
St = stearinska kislina

O = oleinska kislina

L = linolna kislina

Ln = linolenska kislina

Slika 2

Graf  $\log \alpha$  kot funkcija  $f$  (število dvojnih vezi)

La = laurinska kislina  
 St = stearinska kislina  
 Ln = Linolenska kislina

My = miristinska kislina  
 O = oleinska kislina

P = palmitinska kislina  
 L = linolna kislina

## PRILOGA IX

## SPEKTROFOTOMETRIČNO MERJENJE V UV PODROČJU

## PREDGOVOR

Spektrofotometrično merjenje v UV področju lahko nudi podatke o kakovosti maščobe, njenem stanju ohranitve in spremembah, ki so jih v njej povzročili tehnološki procesi.

Do absorpcije valovnih dolžin, določenih v postopku, pride zaradi prisotnosti konjugiranih dienov in trienov. Te absorpcije so izražene kot specifične ekstinkcije  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  (ekstinkcija 1 % raztopine maščobe v specificiranem topilu, v debelini 1 cm), konvencionalno označena s K (imenovana tudi „ekstinkcijski koeficient“).

## 1. NAMEN

Ta metoda opisuje postopek za izvajanje spektrofotometrične preiskave oljčnega olja v UV področju.

## 2. PRINCIP METODE

Zadefinirana maščoba se raztopi v zahtevanem topilu in ekstinkcija raztopine se potem določi pri specifični valovni dolžini glede na čisto topilo. Specifične ekstinkcije se izračunajo iz spektrofotometričnih odčitkov.

## 3. OPREMA

- 3.1 Spektrofotometer za merjenje ekstinkcije v UV področju med 220 in 360 nm z možnostjo odčitavanja posameznih nanometrskih enot.
- 3.2 Pravokotne kvarčne kivete, s pokrovčki, z optično dolžino 1 cm. Če jo napolnimo z vodo ali drugim primeranim topilom, ne sme kazati razlik med njimi za več kot 0,01 ekstinkcijske enote.
- 3.3 25-ml graduirane steklenice.
- 3.4 Kromatografska kolona dolžine 450 mm in premera 35 mm z izstopno cevjo premera približno 10 mm.

## 4. REAGENTI

- 4.1 Spektrofotometrično čisti izo-oktan (2,2,4-trimetilpentan). Glede na referenco z destilirano vodo naj bi imel transmisijo, ki ni manjša od 60 % pri 220 nm in ne manjša od 95 % pri 250 nm, ali
  - spektrofotometrično čisti cikloheksan: glede na referenco z destilirano vodo naj bi to imelo transmisijo, ki ni manjša od 40 % pri 220 nm in ne manjša od 95 % pri 250 nm, ali
  - drugo primerno topilo, ki lahko popolnoma raztopi maščobo) npr. etilni alkohol za ricinusovo olje).
- 4.2 Bazični aluminijev oksid za kolonsko kromatografijo, pripravljen in preverjen kot je opisano v Prilogi I
- 4.3 n-heksan, kromatografske čistoče.

## 5. POSTOPEK

- 5.1 Obravnavani vzorec mora biti popolnoma homogen in brez dvomljivih nečistoč. Olja, ki so pri temperaturi okolja tekoča, je treba prefiltrirati skozi papir pri temperaturi približno 30 °C, trde maščobe je treba homogenizirati in prefiltrirati pri temperaturi, ki ni več kot 10 °C nad tališčem.

5.2 Točno natehtajte približno 0,25 g tako pripravljenega vzorca v 25-ml graduirano bučko, dopolnite do oznambe specificirano topilo in homogenizirajte. Tako pripravljena raztopina mora biti popolnoma čista. Če je raztopina opalescentna ali motna, hitro prefiltrirajte skozi papir.

5.3 Napolnite kiveto s pripravljeno raztopino in izmerite ekstinkcijo pri ustrezni valovni dolžini med 232 in 276 nm, s tem da topilo uporabite kot referenco.

Izmerjene ekstinkcijske vrednosti morajo biti v rangu od 0,1 do 0,8. Če ne, je treba meritve ponoviti z uporabo ustreznih bolj koncentriranih ali bolj razredčenih raztopin.

5.4 Kadar je pri prehodu preko aluminijevega oksida zahtevana opredelitev specifične ekstinkcije, nadaljujte kot sledi: Uvedite 30 g bazičnega aluminijevega oksida v heksansko suspenzijo v kromatografski koloni. Potem, ko se je adsorbent usedel, odstranite presežni heksan navzdol do približno 1 cm nad vrhom aluminijevega oksida.

Raztopite 10 g maščobe, homogenizirane in filtrirane, kot je opisano v 5.1, v 100 ml heksana in vlijte raztopino v kolono. Zberite eluent in v vakuumu pri temperaturi pod 25 °C odparite stran vse topilo.

Z uporabo tako dobljene maščobe takoj nadaljujte, kot je določeno v 5.2.

## 6. IZRAŽANJE REZULTATOV

6.1 Zabeležite specifične ekstinkcije (ekstinkcijski koeficienti) pri različnih valovnih dolžinah, izračunane kot sledi:

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

kjer je:

$K_{\lambda}$  = specifična ekstinkcija pri valovni dolžini  $\lambda$ ;

$E_{\lambda}$  = ekstinkcija izmerjena pri valovni dolžini  $\lambda$ ;

$c$  = koncentracija raztopine v g/100 ml;

$s$  = debelina kivete v cm.

Rezultate se izrazi na dve decimalni mesti.

6.2 Spektrofotometrična analiza oljčnega olja v skladu z uradnim posotpkom, v EGS predpisih specificira določanje specifične ekstinkcije v raztopini izo-oktana pri valovni dolžini 232 in 270 nm in določanje  $K$ , ki je podana s:

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

kjer je  $K_m$  specifična ekstinkcija pri valovni dolžini  $m$ , valovni dolžini za maksimalno absorpcijo okrog 270 nm.

## DODATEK I

*Priprava aluminijevega oksida in preskus njegove aktivnosti*

## A.1.1 Priprava aluminijevega oksida

Uvedite aluminijev oksid, ki je bil prej posušen v peči pri 380 do 400 °C za tri ure v hermetično zatesnjeno posodo, dodajte destilirano vodo v razmerju 5 ml na 100 g aluminijevega oksida, posodo takoj zaprite, večkrat pretresite in potem pred uporabo pustite počivati najmanj 12 ur.

## A.1.2 Preverjanje aktivnosti aluminijevega oksida

Pripravite kromatografsko kolono s 30 g aluminijevega oksida. Ravnajte kot je opisano v odstavku 5.4, uvedite mešanico sestavljeno iz:

- 95 % deviškega oljčnega olja s specifično ekstinkcijo manjšo od 0,18 pri 268 nm,
- 5 % arašidovega olja, v procesu rafinacije tretiranega z aktivnimi zemljami, s specifično ekstinkcijo, ki ni manjša od 4 pri 268 nm

skozi kolono.

Če ima po prehodu skozi kolono mešanica specifično ekstinkcijo večjo od 0,11 pri 268 nm je aluminijev oksid sprejemljiv, če pa je nima, je treba nivo dehidracije dvigniti.

---

## DODATEK II

*Kalibracija spektrofotometra*

- A.2 Opremo je treba preverjati v intervalih (najmanj vsakih šest mesecev) na odziv valovne dolžine in točnosti odziva.
- A.2.1 Valovno dolžino se lahko preveri z živosrebrovo žarnico ali s pomočjo ustreznih filtrov.
- A.2.2 Da preverite odzivnost fotocelice in fotopomnoževalke ravnajte kot sledi: natehtajte 0,2000 g čistega kalijevega kromata za spektrofotometrijo in raztopite 0,05 raztopine N kalijevega hidroksida v 1 000-ml graduirano bučko in dolijte do oznake. Vzemite natančno 25 ml dobljene raztopine, prenesite jo v 500-ml graduirano bučko in razredčite do oznake z isto raztopino kalijevega hidroksida.

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

---

## PRILOGA X A

## PLINSKOKROMATOGRAFSKA ANALIZA METILNIH ESTROV MAŠČOBNIH KISLIN

## 1. NAMEN

Ta metoda daje splošne smernice za uporabo plinske kromatografije, z uporabo polnjenih ali kapilarnih kolon, za določanje kvalitativne in kvantitativne sestave mešanice metilnih estrov maščobnih kislin, dobjenih po postopku, določenem v Prilogi X B.

Metoda se ne uporablja za polimerizirane maščobne kisline.

## 2. REAGENTI

## 2.1 Nosilni plin

Inertni plin (dušik, helij, argon, vodik itd.) popolnoma posušen in z vsebnostjo kisika, manjšo od 10 mg/kg.

*Opomba 1.* Vodik, ki se kot inertni plin uporablja samo pri kapilarnih kolonah, lahko hitrost analize podvoji, vendar je nevaren. Varnostne naprave so na voljo.

## 2.2 Pomožni plini:

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

2.2.2 Zrak ali kisik, brez organskih nečistoč.

## 2.3 Referenčni standard

Mešanica metilnih estrov čistih maščobnih kislin, ali metilnih estrov maščobe poznane sestave, najraje podobne maščobi, ki jo je treba analizirati.

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

## 3. OPREMA

Dana navodila se nanašajo na običajno opremo, ki se uporablja za plinsko kromatografijo, z uporabo polnjene in/ali kapilarne kolone in plamensko ionizacijskega detektorja. Primerne so vse aparature, ki dajo učinkovitost in resolucijo, specificirano v 4.1.2.

## 3.1 Plinski kromatograf

Plinski kromatograf vključuje naslednje elemente:

## 3.1.1 Injicirni sistem

Uporabite injicirni sistem:

(a) s polnjenimi kolonami, z najmanjšim možnim mrtvim volumnom (v tem primeru je injicirni sistem možno segreti na temperaturo, ki je 20 do 50 °C višja od temperature kolone); ali

(b) s kapilarnimi kolonami, v tem primeru je injicirni sistem posebej izdelan za uporabo s takšnimi kolonami. Lahko je tip injektorja z deljenjem vzorca ali tip injektorja brez deljenja vzorca v koloni.

*Opomba 2.* V odsotnosti maščobnih kislin z manj kot 16 ogljikovimi atomi, se lahko uporabi injektor s pomično iglo.

## 3.1.2 Peč

Peč je takšna, da lahko segreje kolono na temperaturo najmanj 260 °C in vzdržuje željeno temperaturo znotraj 1 °C v poljnjeni koloni in znotraj 0,1 °C v kapilarni koloni. Zadnja zahteva je zlasti pomembna kadar se uporablja kapilarna kolona.

Uporabo programiranega temperaturnega gretja priporočamo v vseh primerih in zlasti za maščobne kisline z manj kot 16 ogljikovimi atomi.

### 3.1.3 Polnjena kolona

3.1.3.1 Kolona, iz materiala, inertnega na snovi, ki naj bi jih analizirali (t.j. steklo ali jeklo), naslednjih dimenzij:

- (a) dolžina: 1 do 3 m. Kadar so prisotne dolgoveržne maščobne kisline (nad  $C_{20}$ ) je treba uporabiti relativno kratko kolono. Kadar analizirate kisline s 4 ali 6 ogljikovimi atomi, je priporočljivo, da uporabite kolono dolžine 2 m;
- (b) notranji premer: 2 do 4 mm.

*Opomba 3.* Če so prisotne polinenasičene komponente z več kot tremi dvojnimi vezmi, se v jekleni koloni lahko razgradijo.

*Opomba 4.* Lahko se uporabi sistem z dvema identičnima polnjenima kolonama

3.1.3.2 Polnilo, ki vključuje naslednje elemente:

- (a) *nosilec*: kislinsko obdelana in silanizirana diatomejska zemlja, ali drugi primeren inertni nosilec z ozkim območjem velikosti delcev (25  $\mu\text{m}$  območje med 125 do 200  $\mu\text{m}$ ), tako da je povprečna velikost delcev povezana z notranjim premerom in dolžino kolone;
- (b) stacionarna faza: polarna topila poliestrskega tipa (npr. dietilenglikol polisukcinat, butandiol polisukcinat, etilenglikol poliadiopat, itd.) cianosilikoni ali katera koli druga tekočina, ki omogoča zahtevano kromatografsko ločevanje (glej klavzulo 4). Vsebnost stacionarne faze mora biti 5 do 20 % (m/m) polnila. Za nekatere analize se lahko uporabi nepolarna stacionarna faza.

3.1.3.3 Kondicioniranje kolone

Ob odklopljeni koloni, če je mogoče, od detektorja, postopoma segrejte peč na 185 °C in uvajajte tok inertnega plina skozi sveže pripravljeno kolono s hitrostjo 20 do 60 ml/min najmanj 16 ur pri tej temperaturi in nadaljni 2 uri pri 195 °C.

3.1.4 Kapilarna kolona

3.1.4.1 Kolona, iz materiala, inertnega na snovi, ki naj bi jih analizirali (običajno steklo ali kvarčno steklo). Notranji premer mora biti med 0,2 in 0,8 mm. Notranja površina mora biti ustrezno obdelana (npr. površinska obdelava, pasiviranje) pred nanosom stacionarne faze. V večini primerov zadošča dolžina 25 mm.

3.1.4.2 Stacionarna faza, običajno poliglikolnega tipa (polietilenglikol 20 000), poliester (butandiol polisukcinat) ali polarni polisiloksan (cianosilikoni). Primerne so kolone, kjer je stacionarna faza kemijsko vezana (zamrežena) na nosilni material.

*Opomba 5.* Obstaja nevarnost, da polarni polisiloksani povzročijo težave pri identifikaciji in ločevanju linolenske kisline ali pri kislinah  $C_{20}$ .

Nanosi stacionarne faze so tanki, t.j. 0,1 do 0,2  $\mu\text{m}$ .

3.1.4.3 Namestitev in kondicioniranje kolone

Upošteвайте običajne varnostne ukrepe za montažo kapilarnih kolon, t.j. namestitev kolone v peči (nosilec), izbira in montaža priključkov (tesnenje), pozicioniranje končnih mest kolone v injektorju in na detektorju (zmanjšanje mrtvih volumnov). Pretok nosilnega plina za kolono dolžine 25 mm in notranjega premera 0,3 mm naj bo 0,3 bar (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 pri izotermičnih pogojih.

*Opomba 6.* Ustrezno predhodno kondicionirane kolone se dobijo v prodaji.

3.1.5 Detektor, po možnosti tak, ki ga je mogoče segreti na temperaturo, višjo od temperature kolone.

## 3.2 Brizgalka

Brizgalka je maksimalne kapacitete 10  $\mu\text{l}$  z razdelki na 0,1  $\mu\text{l}$ .

## 3.3 Rekorder

Če se bo krivuljo rekorderja uporabilo za izračun sestave analizirane mešanice, je potreben elektronski rekorder visoke natančnosti, kompatibilen z uporabljenimi aparaturami. Rekorder ima naslednje karakteristike:

- (a) odzivna hitrost pod 1,5 s, če je mogoče 1 s (odzivna hitrost je čas, ki ga potrebuje pisalo rekorderja, da naredi prehod od 0 do 90 % po nenadnem vstopu 100 % signala);

- (b) širina papirja najmanj 20 cm;
- (c) hitrost papirja, ki jo je mogoče prilagoditi na vrednosti med 0,4 in 2,5 cm/min.

### 3.4 Integrator

Hitri in točni izračuni se lahko opravijo z elektronskim integratorjem. Ta daje linearni odziv z ustrezno občutljivostjo, in korekcija deviacij bazne linije mora biti zadovoljiva.

## 4. POSTOPEK

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

Kot alternativa se lahko uporabi plinski kromatograf s katarometrijskim detektorjem (ki deluje na principu spremembe toplotne prevodnosti). Delovni pogoji se potem prilagodijo, kot je opisano v klavzuli 6.

### 4.1 Preskusni pogoji

#### 4.1.1 Izbor optimalnih delovnih pogojev

##### 4.1.1.1 Polnjena kolona

Pri izbiri preskusnih pogojev je treba upoštevati naslednje spremenljivke:

- (a) dolžina in premer kolone;
- (b) narava in količina stacionarne faze;
- (c) temperatura kolone;
- (d) tok nosilnega plina;
- (e) zahtevana resolucija;
- (f) količina vbržganega vzorca, izbrana tako, da sklop detektorja in elektrometra daje linearni odziv;
- (g) trajanje analize.

Vrednosti, podane v tabelah št. 1 in 2, zagotavljajo najmanj 2 000 teoretskih prekatov na meter kolone za metilni stearat in njegovo elucijo v teku približno 15 min.

Če aparaturna to omogoča, mora biti injektor na temperaturi približno 200 °C in detektor na temperaturi, ki je enaka ali višja od temperature kolone.

Praviloma je razmerje med pretokom vodika, dovajanega k plamensko ionizacijskemu detektorju ter med pretokom nosilnega plina, od 1:2 do 1:1, odvisno od premera kolone. Pretok kisika je približno 5 do 10 krat večji od pretoka dušika.

Tabela 1

Notranji premer kolone Mm	Pretok nosilnega plina ml/min
1	15 do 15
3	20 do 40
4	40 do 60

Tabela 2

Koncentracija stacionarne faze % (m/m)	Temperatura kolone °C
5	175
10	180
15	185
20	185

## 4.1.1.2 Kapilarna kolona

Lastnosti učinkovitosti in prepustnosti kapilarne kolone pomeni, da sta ločevanje med sestavinami in trajanje analize v veliki meri odvisna od pretoka nosilnega plina v koloni. Treba bo torej optimizirati obratovalne pogoje z delovanjem na ta parameter (ali bolj enostavno, na glavno izgubljanje kolone), glede na to, ali želite izboljšati ločbo ali hitrost analize.

## 4.1.2 Določanje števila teoretskih prekatov (učinkovitost) in resolucija (glej Sliko 1)

Naredite analizo mešanice metilnega stearata in metilnega oleata v približno ekvivalentnih razmerjih (na primer, metilni estri iz kakavovega masla).

Izberite temperaturo kolone in pretok nosilnega plina, tako da je maksimalni vrh metilnega stearata zabeležen približno 15 minut po vrhu topila. Uporabite tako količino mešanice metilnih estrov, da bo vrh metilnega stearata dosegel približno tri-četrtine celotne skale.

Izračunajte število teoretskih prekatov,  $n$  (učinkovitost), z uporabo formule:

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

in resolucijo,  $R$ , z uporabo enačbe:

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

kjer je:

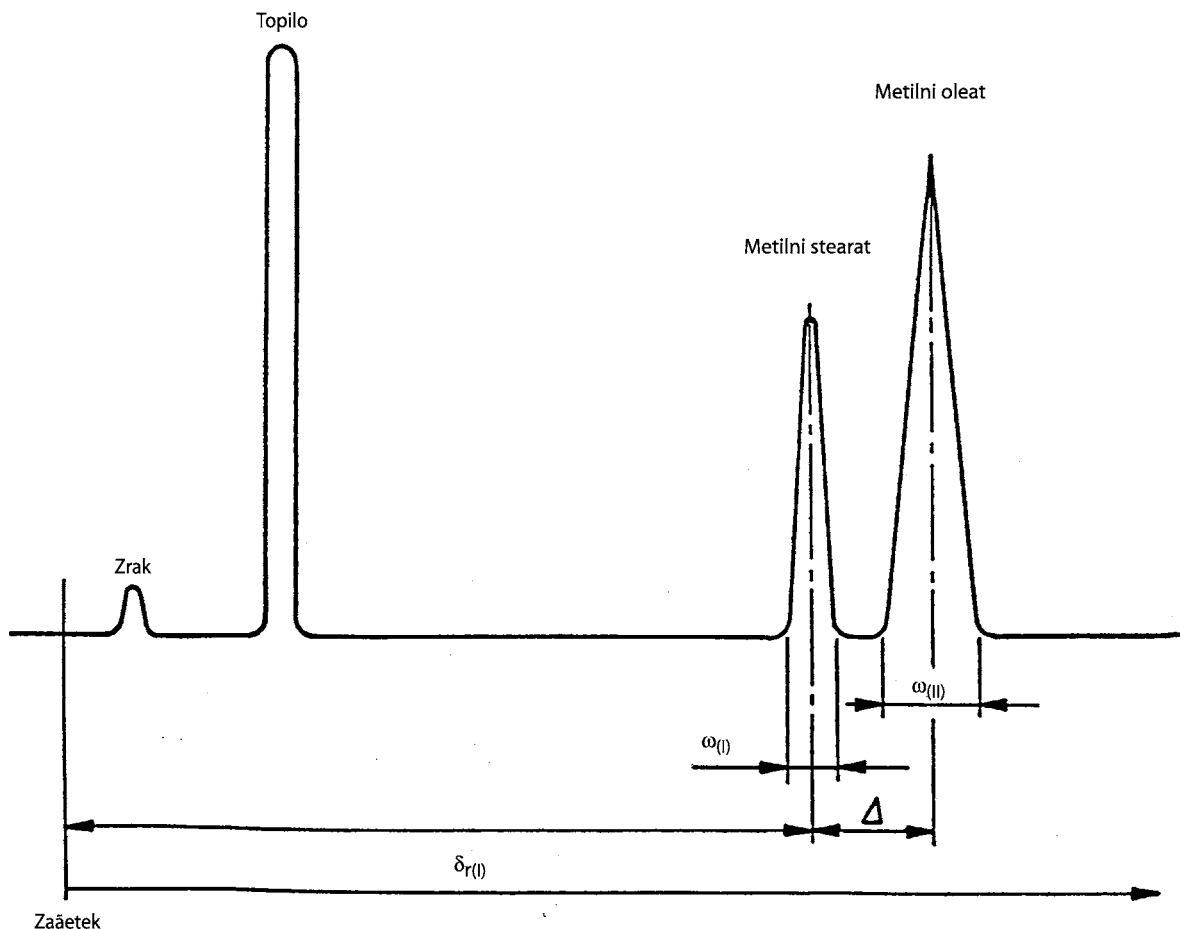
$dr_1$  je retenzijska razdalja, v milimetrih, od začetka kromatograma do vrha pika za metilni stearat;

$\omega_1$  in  $\omega_2$  sta širini, v milimetrih, vrhov za metilni stearat oziroma metilni oleat, izmerjeni med sečišči tangent na prevojnih točkah krivulje z bazno linijo;

$\Delta$  je razdalja, v milimetrih, med vrhoma metilnega stearata in metilnega oleata.

Slika 1

Kromatogram za določanje števila teoretskih prekatov (učinkovitosti) in resolucije



Izbrati moramo take delovne pogoje, ki dajo najmanj 2 000 teoretskih prekatov na meter kolone stearat in resolucijo najmanj 1,25 za metilni stearat.

#### 4.2 Količina vzorca

S pomočjo brizgalke (3.2) vzemite 0,1 do 2  $\mu$ l raztopine metilnih estrov, pripravljenih v skladu s Prilogo X B in jih vbrizgajte v kolono.

Če nimate že pripravljene raztopine estrov, si jih pripravite v koncentraciji 100 mg/ml heptana kromatografske čistoče in vbrizgajte 0,1 do 1 ml te raztopine.

Če se analizira sestavine, prisotne samo v sledovih, se količina vbrizganega vzorca lahko poveča (do 10-krat).

#### 4.3 Analiza

Splošni delovni pogoji so določeni v 4.1.1.

Vendar je možno delati pri nižji temperaturi kolone, kadar se zahteva določanje maščobnih kislin z manj kot 12 ogljikovimi atomi, ali pri višji temperaturi, za določanje maščobnih kislin z več kot 20 ogljikovimi atomi. Včasih je možno v obeh primerih uporabiti temperaturno programiranje. Na primer, če vzorec vsebuje metilne estre maščobnih kislin, z manj kot 12 ogljikovimi atomi, injicirajte vzorec pri 100 °C (ali pri 50 do 60 °C, če je prisotna butirična kislina) in takoj, s hitrostjo 4 do 8 °C/min, dvignite temperaturo na optimalno. V določenih primerih se lahko oba postopka kombinirata.

Po programiranem segrevanju nadaljujte z eluiranjem pri konstantni temperaturi dokler niso vse sestavine eluirane. Če instrument nima programiranega gretja, ga uporabite na dveh nespremenljivih temperaturah med 100 in 195 °C.

Če je potrebno, je priporočljivo, da se analiza izvaja na dveh nespremenljivih fazah z različnima polaritetama, da se preveri odsotnost skritih vrhov, na primer v primeru hkratne prisotnosti konjugiranih  $C_{18:3}$  in  $C_{20:0}$  ali  $C_{18:3}$  in  $C_{18:2}$ .

#### 4.4 Priprava referenčnega kromatograma in referenčnih grafov

Analizirajte referenčno standardno mešanico (2.3) z uporabo istih delovnih pogojev kot so bili tisti, uporabljeni za vzorec ter izmerite retenzijske čase ali retenzijske razdalje za osnovne maščobne kisline. Na semi logaritemski papir za vsako stopnjo nenasičenosti naredite grafe, ki prikazujejo logaritem retenzijskega časa ali razdalje kot enačbo števila ogljikovih atomov. V izotermnih pogojih bi morali biti grafi za nerazvejane kisline iste stopnje nenasičenosti ravne črte. Te črte bi morale biti približno vzporedne.

Treba se je izogibati pogojev pri katerih lahko pride do skritih vrhov t.j., takrat, ko je resolucija nezadostna za ločevanje dveh sestavin.

### 5. IZRAŽANJE REZULTATOV

#### 5.1 Kvalitativna analiza

Identificirajte vrhove metilnih estrov v vzorcu iz grafov, pripravljenih v 4.4, z interpolacijo, če je potrebno.

#### 5.2 Kvantitativna analiza

##### 5.2.1 Določanje sestave

Razen izjemnih primerov, uporabite interni normalizacijski postopek, t.j., predpostavite, da so vse sestavine vzorca zastopane na kromatogramu, tako da celotno področje, ki ga pokrivajo vrhovi, predstavlja 100 % sestavin (celokupno ločevanje).

Če oprema vključuje integrator, uporabite tam dobljene podatke. Če ne, določite površino vrha tako, da pomnožite višino vrha z njegovo širino na sredini višine in morebitne različne stopnje atenuacije, uporabljene med beleženjem.

##### 5.2.2 IZRAČUN

###### 5.2.2.1 Splošni primer

Izračunajte vsebnost dane komponente  $i$ , izražene kot masni odstotni delež metilnih estrov tako da določite površinski delež danega vrha glede na površino vseh vrhov, z uporabo naslednje enačbe:

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

kjer je:

$A_i$  je površina vrha, ki ustreza komponenti  $i$ ;

$\sum A$  je vsota površin vseh vrhov.

Izračunajte rezultat na eno decimalko

*Opomba 7:* V tem splošnem primeru se šteje, da rezultat izračunan na podlagi relativnih površin predstavlja masni odstotek. Za primere, pri katerih 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, če se uporabljajo detektorji toplotne prevodnosti ali kadar je izrecno zahtevana najvišja stopnja točnosti, je treba uporabiti korekcijske faktorje za pretvorbo površin vrhov v masne odstotne deleže sestavin.

Določite korekcijske faktorje s pomočjo kromatograma iz referenčne mešanice metilnih estrov znane sestave, analizirane v delovnih pogojih, identičnih tistim, ki so bili uporabljeni za vzorec.

Za to referenčno mešanico je masni odstotni delež sestavine  $i$  podan z enačbo:

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

kjer je:

$m_i$  je masa sestavine  $i$  v referenčni mešanici;

$\sum m$  je vsota mas vseh sestavin v referenčni mešanici.

Iz kromatograma referenčne mešanice (4.4) izračunajte delež (površina/površina) sestavine i tako:

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

kjer je:

$A_i$  je površina vrha, ki ustreza sestavini i;

$\sum A$  je vsota površin vseh vrhov.

Korekcijski faktor se potem izračuna kot:

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

Običajno so korekcijski faktorji izraženi v odnosu na  $K_{C_{16}}$ , tako da relativni faktorji postanejo:

$$K'_i = \frac{K_i}{K_{C_{16}}}$$

Za vzorec je vsebina vsake sestavine i, izražena v masnem odstotnem deležu metilnih estrov:

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

Izračunajte rezultat na eno decimalko.

#### 5.2.2.3 Uporaba internega standarda

Pri nekaterih analizah (na primer, kjer vse maščobne kisline niso kvantificirane, kot na primer, 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 petimi, 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 z enačbo:

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

kjer je:

$A_i$  je površina vrha sestavine i;

$A_s$  je površina vrha, ki ustreza internemu standardu;

$K'_i$  je korekcijski faktor za komponento i (v odnosu na  $K_{C_{16}}$ );

$K'_s$  je korekcijski faktor za interni standard (v odnosu na  $K_{C_{16}}$ );

$m$  je masa vzorca, v miligramih;

$m_s$  je masa internega standarda, v miligramih.

Izračunajte rezultate na eno decimalko.

#### 6. POSEBEN PRIMER – UPORABA KATAROMETRSKEGA DETEKTORJA (KI DELUJE NA PRINCIPU SPREMEMB TOPLOTNE PREVODNOSTI)

Plinski kromatograf z uporabo detektorja, ki deluje na osnovi sprememb toplotne prevodnosti (katarometer), se lahko uporabi za določanje kvantitativne in kvalitativne sestave mešanice metilnih estrov maščobnih kislin. Če se ga uporabi, je treba pogoje, določene v klavzuli 3 in klavzuli 4, prilagoditi tako, kot je to prikazano v Tabeli 3.

Za kvantitativno analizo uporabite korekcijske faktorje, določene v 5.2.2.2.

Tabela 3

Spremenljivka	Stanje vrednosti
Kolona	Dolžina: 2 do 4 m Notranji premer: 4 mm
Nosilec	Velikost delcev med 160 in 200 $\mu\text{m}$
Koncentracija stacionarne faze	15 do 25 % (m/m)
Nosilni plin	Helij ali, če tega ni, vodik, z najmanjšo možno vsebnostjo kisika
Pomožni plini	Noben
Temperatura injektorja	Od 40 do 60 °C nad temperaturo kolone
Temperature kolone	180 do 200 °C
Tok nosilnega plina	Običajno med 60 in 80 ml/min
Velikost injiciranega vzorca	Običajno med 0.5 in 2 $\mu\text{l}$

## 7. POROČILO O PRESKUSU

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

Poročilo o preskusu vključuje vse potrebne podatke za popolno identificiranje vzorca.

## PRILOGA X B

**PRIPRAVA METILNIH ESTROV MAŠČOBNIH KISLIN SKLADNO Z NASLOVOMA I IN II PRILOGE VI  
K UREDBI (EGS) št. 72/77 ALI SPODAJ OPISANO METODO**

## PREDGOVOR

Izbira postopka določa kislinska sestava in kislost maščobe, ki jo je treba v analizi s plinsko kromatografijo preiskati.

Bolj natančno:

- za maščobe, ki vsebujejo maščobne kisline z manj kot 12 ogljikovimi atomi se lahko uporabljajo samo procesi v zatesnjeni fioli ali postopki, kjer se uporablja dimetil sulfat,
- za maščobe s kislostjo prek 3 % se lahko uporabljajo samo postopki z metanol-solno kislino ali metil sulfatom,
- samo postopki, pri katerih se uporabljata natrijev metilat ali dimetil sulfat, se lahko uporabijo za analizo trans-izomerov s plinsko kromatografijo,
- za pripravo metilnih estrov iz majhnih količin maščob po ločevanju s tankoplastno kromatografijo je treba uporabiti postopek z metanol-heksan-žveplovo kislino.

Prisotnost neumiljivih snovi se lahko zanemari, pod pogojem, da ne presegajo 3 %, sicer je treba metilne estre pripraviti iz maščobnih kislin.

## 1. NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Opisano je pet postopkov za pripravo metilnih estrov iz maščob.

- (a) z natrijevim metilatom;
- (b) z natrijevim metilatom v zataljeni fioli;
- (c) z metanol-klorovodikovo kislino v zataljeni fioli;
- (d) z dimetil sulfatom;
- (e) z metanol-heksan-žveplovo kislino.

**Postopek A**

## 2. PRINCIP

Maščoba, ki se analizira, se segreje pod povratnim hladilnikom z metilnim alkoholom in natrijevim metilatom. Dobljeni metilni estri se ekstrahirajo z dietilnim etrom.

## 3. OPREMA

- 3.1 100-ml bučka s povratnim hladilnikom, s kiveto iz natrijevega karbonata, priključeno na vrhu, s priključki s steklenimi obrusi.
- 3.2 50-ml steklena merilna posoda.
- 3.3 5-ml merilna pipeta z 0,1 ml razdelki.
- 3.4 250-ml liji ločniki.
- 3.5 200-ml bučka.

## 4. REAGENTI

- 4.1 Brezvodni metanol.

- 4.2 Približno 1-% raztopina natrijevega metilata v metanolu; to se pripravi z raztopitvijo 0,34 g elementarnega natrija v 100 ml brezvodnega metanola.
- 4.3 Dietilni eter.
- 4.4 10-% raztopina natrijevega klorida.
- 4.5 40 do 60 °C petrol eter.

## 5. POSTOPEK

- 5.1 V 100-ml bučko natehtajte 2 g maščobe, ki je bila predhodno posušena na natrijevem sulfatu in filtrirana. Dodajte 35 ml metanola, namestite hladilnik in pustite vreti pod povratnim hladilnikom nekaj minut.
- 5.2 Prekinite postopek gretja, odstranite hladilnik in hitro dodajte 3,5 ml raztopine natrijevega metilata; ponovno namestite hladilnik in pustite vreti pod povratnim hladilnikom najmanj 3 ure. Metiliranje je končano, ko so vse maščobe utekočinjene in je reakcijska mešanica pri sobni temperaturi popolnoma bistra.
- 5.3 Ohladite in izlijte reakcijsko mešanico v 250-ml lij ločnik, dodajte 35 do 40 ml dietilnega etra, 100 ml vode in 5 do 6 ml 10 % raztopine natrijevega klorida. Pretresite in pustite, da se plasti ločijo. Vodno fazo prenesite v drugi lij ločnik in še enkrat ekstrahirajte s 25 ml dietilnega etra.

Dodajte 50 ml 40 do 60 °C petrol etra k združenim etrskim ekstraktom. Voda se bo ločila in se jo lahko odstrani.

Etra fazo trikrat izperite z 10 do 15 ml vode, osušite na natrijevem sulfatu in filtrirajte skozi papir, s tem da zberete filtrat v 200-ml steklenici.

Topilo odparite do 20 ml, tako da postopek zaključite nad vodno kopeljo v toku čistega dušika.

## Postopek B

### 2. PRINCIP

Maščoba, ki se analizira, se tretira z natrijevim metilatom v raztopini metanola, v zataljeni fioli pri 85 do 90 °C.

### 3. OPREMA

- 3.1 Trda steklena fiola, kapacitete približno 5 ml (višine 40 do 45 mm, premera 14 do 16 mm).
- 3.2 1-ml merilna pipeta z 0,1 ml razdelki.

### 4. REAGENTI

- 4.1 Približno 1,5 % raztopina natrijevega metilata v metanolu. To se pripravi z raztopitvijo 0,50 g elementarnega natrija v 100 ml brezvodnega metanola.

### 5. POSTOPEK

- 5.1 V stekleno fiolo uvedite 2 g maščobe, ki je bila predhodno posušena na natrijevem sulfatu in filtrirana. Dodajte 0,3 g (približno 0,4 ml) raztopine natrijevega metilata in zatalite fiolo.
- 5.2 Potopite fiolo za dve uri na 85 °C do 90 °C, s tem da jo od časa do časa pretresete. Postopek esterifikacije je končan, ko je vsebina fiole prozorna po sedimentaciji glicerina in ostanku reagentov.
- 5.3 Ohladite pri sobni temperaturi. Fiolo odprite pred uporabo. Pred vbrizgom v plinski kromatograf metilni estri ne zahtevajo nobene nadaljnje obdelave.

## Postopek C

### 2. PRINCIP

Maščoba, ki se analizira, se tretira z metanol-klorovodikovo kislino, v zataljeni fioli, pri 100 °C.

3. OPREMA
  - 3.1 Trda steklena fiola, kapacitete približno 5 ml (višine 40 do 45 mm, premera 14 do 16 mm).
  - 3.2 1- in 2-ml kalibrirani pipeti.
4. REAGENTI
  - 4.1 Raztopina klorovodikove kisline v 2 % metanolu. To pripravimo iz plinaste klorovodikove kisline in brezvodnega metanola (Opomba 1).
  - 4.2 Heksan, plinsko-kromatografske čistoče.
5. POSTOPEK
  - 5.1 V stekleno fiolo natehtajte 0,2 g maščobe, ki je bila predhodno posušena na natrijevem sulfatu in filtrirana ter 2 ml raztopine klorovodikova kislina-metanol. Zatalite filolo.
  - 5.2 Potopite fiolo na 100 °C za 40 minut.
  - 5.3 Fiolo ohladite pod tekočo vodo, odprite, dodajte 2 ml destilirane vode in 1 ml heksana. Centrifugirajte in odstranite heksansko fazo, ki je pripravljena za uporabo.

#### Postopek D

2. PRINCIP

Maščoba, ki se analizira, se umili z raztopino kalijevega hidroklorida v metilnem alkoholu in potem tretira z dimetil sulfatom. Ko se doda klorovodikova kislina, se metilni estri, ki so se tvorili, avtomatsko ločijo. Zelo čiste metilne estre se dobi z zaporednim tretiranjem z aluminijevim oksidom.
3. OPREMA
  - 3.1 Trda epruveta, kapacitete približno 20 ml, z zamaškom 10/19 z obrušom in varnostnimi sponkami.
  - 3.2 Povratni hladilniki, z nastavkom 10/19 z obrušom.
  - 3.3 Stekleni filtri s sintranim diskom, velikosti G-2, premera 20 mm.
  - 3.4 Steklene epruvete, s kapaciteto približno 10 ml in konusnim dnom.
  - 3.5 1- in 5-ml brizgalke.
4. REAGENTI
  - 4.1 Kalijev hidroksid, 10-% raztopina v metilnem alkoholu, za plinsko-kromatografske čistoče.
  - 4.2 Bromkrezol zeleno indikator: 0,05-% raztopina v metilnem alkoholu.
  - 4.3 Dimetil sulfat ( $\rho = 1,335$  pri 15 °C).
  - 4.4 Koncentrirana klorovodikova kislina ( $\rho=1,19$ ) razredčena z enakim delom metilnega alkohola plinsko-kromatografske čistoče.
  - 4.5 Aluminijev oksid po Brockmanu, za adsorpcijsko kromatografijo.
5. POSTOPEK
  - 5.1 V 20-ml epruveto uvedite 2,2 ml maščobe, ki je bila predhodno posušena na natrijevem sulfatu in filtrirana. Dodajte 5 ml raztopine kalijevega hidroksida in nekaj kremenčevih zrn za nadzor vrenja. Priključite povratni hladilnik in ob pretresanju segrevajte nad majhnim plamenom pet minut. Umiljevanje je končano, ko je raztopina prozorna. Nazadnje ohladite pod tekočo vodo in odstranite hladilnik.

- 5.2 Dodajte dve kaplji indikatorja in z brizgalko počasi dodajte 1 ml dimetil sulfata. Zatalite epruveto in jo stresajte dve do tri minute, s tem da dno preskusne cevi pogosto potapljate v kotel vrele vode. Reakcija je končana, ko se barva indikatorja spremeni iz modre v rumeno. Na koncu ohladite epruveto pod tekočo vodo, jo potem odprite in dodajte 5 ml raztopine klorovodikova kislina – metanol.
- 5.3 Potem ko ste jo nekaj sekund stresali, epruveto namestite poševno in po njej narahlo potrkajte. To bo omogočilo, da se metilni estri dvignejo na površino v obliki oljne mase (Opomba A).

Metilne estre odstranite z brizgalko uvedite jih v epruveto s konusnim dnom, dodajte količino aluminijevaga oksida, ki je enaka 1/4 količine metilnih estrov, pretresite in filtrirajte skozi filtrirni papir.

*Opomba A.* Če se metilni estri ne ločujejo spontano, v epruveto dodajte 5 ml vode in pretresite.

### Postopek E

#### 2. PRINCIP

Maščoba, ki se analizira, se segreje pod povratnim hladilnikom z metanol-heksan-žveplovo kislino. Dobljene metilne estre se ekstrahira s petrol etrom.

#### 3. OPREMA

- 3.1 Epruveta kapacitete približno 20 ml, na katero je priključen zračni povratni hladilnik, dolžine približno 1 m, s steklenimi priključki z obrusom.
- 3.2 5-ml merilna pipeta.
- 3.3 50-ml lij ločnik.
- 3.4 10- in 25-ml stekleni merilni posodi.
- 3.5 15-ml epruveta s konusnim dnom.

#### 4. REAGENTI

- 4.1 Reagent za metiliranje: brezvodna metanol-heksan-koncentrirana žveplova kislina ( $\rho = 1.84$ ) v razmerju 75:25:1 (V/V/V).
- 4.2 40 do 60 °C petrol eter.
- 4.3 Brezvodni natrijev sulfat.

#### 5. POSTOPEK

- 5.1 Snov, vzeto s plošče, uvedite v 20-ml epruveto in dodajte 5 ml reagenta za metiliranje.
- 5.2 Priključite povratni hladilnik in segrevajte 20 minut na vreli vodni kopeli (Opomba 2).
- 5.3 Kvantitativno prenesite mešanico v 50-ml ločevalni lij ločnik, z dodatkom 10 ml destilirane vode in 10 ml petrol etra. Močno pretresite in pustite da se faze ločijo, odstranite vodno fazo in izplaknite plast etra dvakrat z 20 ml destilirane vode. V lij ločnik dodajte majhno količino brezvodnega natrijevega sulfata, pretresite, pustite nekaj minut, da se usede in filtrirajte, filtrat zberite v 15-ml epruveti s konusnim dnom.

Odparite topilo nad vodno kopeljo v toku dušika.

*Opomba 1.* Majhne količine plinasti klorovodikove kisline je mogoče zlahka pripraviti v laboratoriju z enostavnim izločanjem iz komercialne raztopine ( $\rho = 1,18$ ) s kapljanjem koncentrirane žveplove kisline. Sproščeni plin je zlahka osušen s prepihanjem skozi konc. žveplovo kislino. Ker klorovodikova kislina metanol zelo hitro absorbira, je priporočljivo, da se jo raztaplja ob običajnih varnostnih ukrepih, t.j. uvedite plin skozi majhen preobrtnjen lij ločnik, ki se z robom ravno dotika površine tekočine. Velike količine raztopine metanol-klorovodikove kisline se lahko pripravi vnaprej, ker se odlično ohrani v s steklenimi zamaški zaprtih steklenicah, ki so skladiščene v temnem prostoru.

*Opomba 2.* Za kontroliranje vrelišča vstavite stekleno palčko v epruveto in omejite temperaturo vodne kopeli na 90 °C.

## 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 Steklena 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 diatomske 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 Steklena 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.

## PRILOGA XII

## SENZORIČNO OCENJEVANJE DEVIŠKEGA OLJČNEGA OLJA

## 1. NAMEN

Namen te metode je določiti merila, potrebna za ocenjevanje značilne arome deviškega oljčnega olja in razviti metodologijo, ki je za to potrebna.

## 2. PODROČJE UPORABE

Opisana metoda se uporablja samo za senzorično ocenjevanje in klasifikacijo oljčnega olja, ki se ga lahko uporablja neposredno za prehrano ljudi. Ta metoda se omejuje na razvrščanje deviškega oljčnega olja po numerični lestvici, glede na zaznavanje dražljajev njegove arome, kot jih oceni skupina izbranih poskuševalcev.

## 3. SPLOŠNI OSNOVNI SLOVAR ZA SENZORIČNO ANALIZO

Glej poglavje z naslovom „Senzorična analiza: splošni osnovni slovar“.

## 4. SPECIFIČNI SLOVAR ZA OLJČNO OLJE

*Mandelj*: ta aroma se lahko pojavi v dveh oblikah: kot značilna aroma po svežih mandljih ali kot posebna aroma po suhih zdravih mandljih, ki jo je mogoče zamenjati z začetno žarkostjo. Značilen okus se zazna kot pokuš, ko olje ostane v stiku z jezikom in nebom. Podobno kot sladka olja s prazno oziroma blago aromo.

Jabolko: aroma oljčnega olja, ki spominja na to sadje.

Pregreto-plesnivo: značilna aroma olja, pridobljenega iz plodov, skladiščenih v kupih, ki so bili že v fazi fermentacije.

Grenko: značilen okus olj, pridobljenih iz zelenih ali rahlo obarvanih oljk. Lahko je bolj ali manj prijeten, odvisno od intenzivnosti.

Slanica: aroma olja, pridobljenega iz oljk, hranjenih v slanici..

Kumara: aroma, ki nastane, kadar je olje predolgo neprepustno zaprto, zlasti v pločevinkah, in jo pripisujejo nastanku 2,6 nonadienala.

Zemlja: značilna aroma olja, pridobljenega iz plodov, ki so bili pobrani umazani z zemljo ali blatom in niso bili oprani; To aromo lahko včasih spremlja aroma po plesnivem-vlažnem.

Športa (slojnica): značilna aroma olja, pridobljenega iz oljk, stiskanih v novih športah (slojnicah). Aroma se lahko razlikuje glede na to, ali so slojnice izdelane iz zelenega ali posušenega materiala.

Blago-prazno: aroma oljčnega olja z zelo šibkimi senzoričnimi značilnostmi zaradi izgube aromatičnih sestavin.

Sadežno: aroma, ki po vonju in okusu spominja na zdrav in svež, optimalno zrel ali zelen sadež (oljko).

Trava: značilna aroma določenih olj, ki spominja na pokošeno travo.

Strojno olje: vonj oljčnega olja, predelanega v oljarni, ki ni bila dovolj očiščena ostankov nafte, maščob in mineralnih olj.

Zeleno listje (grenko): aroma olja, pridobljenega iz preveč zelenih oljk ali oljk, ki so bile obrane skupaj z listjem in vejicami.

Črivo: značilna aroma olja, pridobljenega iz oljk, ki so jih napadle ličinke oljčne muhe (*Bactrocera oleae*).

Trpko: značilna zaznava določenih olj, ki pri pokušanju vlečejo usta skupaj.

Seno: značilna aroma določenih olj, ki spominja na bolj ali manj posušeno seno.

Segreto ali zažgano: značilna aroma olj, ki so jih med predelavo preveč in/ali predolgo segrevali, posebno takturat, ko se oljke mesijo pod neustreznimi temperaturnimi pogoji.

Kovinsko: aroma, ki spominja na kovino. Značilna za olja, ki so bila med mletjem, mešanjem, stiskanjem ali skladiščenjem predolgo v stiku s kovinskimi površinami.

Morklja: značilna aroma olj, pridobljenih iz usedline(blata) v velikih sodih ali v podzemnih rezervoarjih.

Plesnivo-vlažno: značilna aroma olj, pridobljenih iz sadežev (oljk), na katerih so se zaradi večdnevnega skladiščenja v kupih pod vlažnimi pogoji razvile glive in kvasovke.

Staro: značilna aroma olja, ki so ga predolgo shranjevali v posodah za skladiščenje. Lahko se pojavi tudi pri predolgo pakiranih oljih.

Tropine: značilna aroma, ki spominja na aromo oljčnih tropin.

Športa (slojnica): značilna aroma olja, pridobljenega iz oljk, ki so jih stiskali v nečistih, s fermentiranimi ostanki zamazanih slojnicah.

Žarko: značilna aroma vseh masti in olj, pri katerih je zaradi dolgotrajnega stika s kisikom prišlo do avtooksidacije. Ta aroma je neprijetna in je ni mogoče popraviti.

Zreli sadeži: aroma oljčnega olja, pridobljenega iz zrelih sadežev, ki ja na splošno blagega vonja in sladkega okusa.

Grobo (gosto): značilna zaznava pri določenih oljih, ki ob pokušanju obložijo ustno votlino.

Milo: aroma, ki po vonju in okusu spominja na zeleno milo.

Sladko: prijeten okus, ne ravno po sladkorju, prisoten v oljih, v katerih ne prevladujejo grenkoba, trpkost in pikantnost.

Rastlinska voda: značilna aroma, ki se oblikuje v oljih, ki so bila zaradi neakovostnega odlivanja pri predelavi dalj časa v stiku z rastlinsko vodo plodov.

Zakisano: značilna aroma določenih olj, ki spominja na skisano vino ali kis, predvsem zaradi nastanka očetne kisline, etilacetata in etanola v večjih količinah, kot je to običajno pri aromi oljčnega olja.

#### 5. KOZARCI, KI SE UPORABLJAJO PRI POKUŠNJI OLJ

Glej Poglavje „Kozarci, ki se uporabljajo pri pokušnji olj“.

#### 6. DEGUSTACIJSKA SOBA

Glej Poglavje „Navodilo za opremo prostora za senzorično ocenjevanje“.

#### 7. OPREMA

Da ocenjevalec svojo nalogo pravilno opravi, mora imeti vsako ocenjevalno mesto naslednjo opremo:

- standardizirani kozarci z vzorci, označenimi z dvema naključnima številčkama in črkama; za označevanje je treba uporabiti pisalo, ki je brez vonja in neizbrisljivo,
- urna stekla, označena enako kot kozarci, s katerimi pokrijemo kozarce,
- ocenjevalni list z navodili za njegovo uporabo,
- svinčnik ali pero,
- majhne pladnje z narezanimi jabolki,
- kozarec vode sobne temperature.

## 8. METODOLOGIJA

To poglavje določa najpomembnejše znanje, potrebno za izvedbo senzorične analize deviških oljčnih olj, in skuša standardizirati ravnanje in postopek pokuševalcev, ki sodelujejo pri teh pokušnjah in se morajo zavedati tako splošnih kot tudi posebnih priporočil v zvezi s pokušnje oljčnega olja.

### 8.1 Dolžnosti vodje ocenjevalne komisije (skupine)

Vodja, ki sestavi ocenjevalno komisijo (skupino), mora biti primerno usposobljen, izšolan za tovrstno področje. Ta oseba je ključna v ocenjevalni komisiji in je odgovorna za organizacijo in potek dela. Pravčasno mora obvestiti pokuševalce o ocenjevanju in razjasniti vse dvome glede poteka ocenjevanja, pri tem pa ne sme vplivati na njihovo mnenje glede vzorcev.

Odgovoren je za seznam opreme, njeno popolno čistočo, poskrbeti mora, da so vzorci pripravljene in pravilno označeni ter pokuševalcem predstavljeni v skladu z načinom okušanja. Poskrbeti mora, da so podatki ocenjevanja zbrani in statistično obdelani.

Delo vodje ocenjevalne komisije (skupine) zahteva osebo s senzoričnimi izkušnjami, natančnostjo pri pripravi ocenjevanj in strogostjo pri njihovem izvajanju, hkrati pa mora znati te pokušnje potrpežljivo načrtovati in izvesti. Vodja ocenjevalne komisije (skupine) mora med člani ocenjevalne komisije (skupine) spodbujati zanimanje, radovednost in tekmovalni duh. Ob tem ne sme pokazati svojega mnenja in dovoliti posameznikom, da bi drugim članom vsilili svoja merila. Odgovarja za usposabljanje, izbiro in preverjanje pokuševalcev, saj s tem zagotavlja, da so njihove sposobnosti na zadovoljivi ravni.

### 8.2 Pogoji za ocenjevanje

#### 8.2.1 Količina vzorca

Vsak kozarec mora vsebovati 15 ml olja.

#### 8.2.2 Temperatura pokušanja

Vzorci olja, pripravljene za ocenjevanje, so shranjeni v kozarcih s temperaturo  $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . Pri tej temperaturi se najlažje ugotavljajo senzorične razlike. Pri temperaturah, ki so višje ali nižje od predpisane, aromatične sestavine komajda izhlapevajo ali pa nastajajo hlapne sestavine, značilne za segreta olja.

#### 8.2.3 Čas za pokušnjo

Najboljši čas za ocenjevanje olj je zjutraj/dopoldan. Dokazano je, da je zaznavanje vonja in okusa najboljše tekom dneva.

Pred obroki je občutljivost za vonje in okuse povečana, potem pa se ta zaznava zmanjša.

Če je pokuševalec lačen, je njegova sposobnost razlikovanja zmanjšana, še posebno njegova merila glede ugajanja in sprejemljivosti.

## 9. POKUŠEVALCI

Osebe, ki delajo kot pokuševalci pri senzoričnih ocenjevanjih oljčnih olj, morajo biti usposobljeni in izbrani na podlagi svojih sposobnosti za razlikovanje med podobnimi vzorci. Zelo pomembno je, da vemo, da se njihova natančnost s šolanjem še izboljša. (glej ustrezno poglavje).

Pri ocenjevanju sodeluje osem do dvanajst pokuševalcev, hkrati pa je treba imeti še nekaj nadomestnih pokuševalcev.

### 9.1 Splošna priporočila za kandidate in pokuševalce

Ta priporočila se nanašajo na postopek izbiranja kandidatov in na postopek dela pokuševalcev.

Kadar jih vodja ocenjevalne komisije (skupine) povabi na senzorično ocenjevanje ob času, ki je vnaprej določen, morajo biti pokuševalci pripravljene izpolniti spodaj naštetete pogoje.

- 9.1.1 Pokuševalec ne sme kaditi najmanj pol ure pred napovedanim časom za pokušnjo.
- 9.1.2 Pokuševalec ne sme uporabljati parfum, kozmetičnih preparatov ali mila, katerega vonj bi lahko zaznali tudi še med pokušnjo. Za umivanje rok lahko uporabi le neodišavljeno ali rahlo odišavljeno milo, ki si ga mora spirati z rok toliko časa, da vonja ni več mogoče zaznati.
- 9.1.3 Pokuševalec ne sme jesti najmanj eno uro pred ocenjevanjem.
- 9.1.4 Pokuševalec, ki se fizično ne počuti dobro, še posebej, kadar je prizadet njegov vonj ali okus, ali če je zaradi kakšnega psihološkega razloga njegova zbranost pri opravljanju dela motena, mora o tem obvestiti vodjo ocenjevalne komisije (skupine) z namenom, da ga črta s seznama sodelujočih na ocenjevanju ali predlaga nadomestnega pokuševalca, ob tem pa ne sme pozabiti na možna odstopanja srednjih vrednosti preostanka ocenjevalne komisije (skupine).
- 9.1.5 Ko izpolni priporočila iz prejšnjih alinej, mirno in tiho zasede mesto, ki mu je dodeljeno.
- 9.1.6 Preveri, ali ima na voljo pravilno in ustrezno pripravljeno opremo in ali se ujemajo oznake na kozarcu z oznakami na urnem steklu.
- 9.1.7 Pazljivo mora prebrati navodila na ocenjevalnem listu, vzorca pa ne sme začeti ocenjevati dokler se ne preprča o nalogi, ki jo mora izpolniti. Če se mu porodijo dvomi, lahko o tem na samem spregovori z vodjo ocenjevalne komisije (skupine).

- 9.1.8 Pokuševalec dvigne kozarec, pokrit z urnim steklom, tako da se to ne odkrije, in ga počasi nagne. Potem ga zavrti, tako da se notranja površina kozarca čim bolj omoči. Ko to naredi, sname urno steklo in z enakomernimi, počasnimi in globokimi vdihni voha vzorec, vse dokler si ne ustvari mnenja o olju, ki ga ocenjuje. Voha lahko največ trideset sekund. Če v tem času nič ne ugotovi, po kratkem počitku začne znova. Ko je vohanje vzorca končano, pokuševalec oceni aromo v vonjalno-okuševalno-tipnem pomenu. Da to lahko naredi, da v usta majhen požirek olja (približno 3 ml). Zelo pomembno je, da olje razporedi po vsej ustni votlini, od sprednjega dela ust in jezika, ob strani proti zadnjemu delu in nebu, saj je zaznavanje štirih osnovnih okusov (sladkega, slanega, kislega in grenkega) odvisno od območja na jeziku in nebu.

Poudariti je treba, da je izredno pomembno, da pokuševalec ustrezno količino olja počasi razporedi od zadnjega dela jezika proti grlu, in se medtem koncentrira na vrstni red zaznave (grenkega in ostrine). Če ne naredi tako, pomeni, da se oba okusa v okušanjem olju ne moreta zaznati ali pa reze dražljaj prekrije grenkega.

Kratki, zaporedni vdihni pokuševalcu dajejo možnost, da razporedi vzorec po vsej ustni votlini in tudi zazna hlapne aromatične sestavine.

Morajo se upoštevati tudi tipne zaznave. Če pokuševalec zazna tekočnost, lepljivost in ostrost (pekočnost), mora to zapisati ali, če se tako zahteva, tudi izmeriti njihovo intenziteto.

- 9.1.9 Pri senzoričnem ocenjevanju deviškega oljčnega olja se ocenjuje le po en vzorec, s čimer se izogne kontrastu, do katerega bi prišlo, če bi se različni vzorci ocenjevali neposredno drug za drugim.

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

Priporoča se žvečenje majhnega koščka jabolka (okoli 15 g), ki se lahko potem, ko se prežveči, izpljune v pljuvalnik. Potem se usta splaknejo z vodo sobne temperature. Med koncem pokušnje enega vzorca in začetkom pokušanja naslednjega vzorca mora preteči najmanj petnajst minut.

## 9.2 Izbira kandidatov

Izbiro opravi vodja ocenjevalne komisije (skupine), ki se mora s kandidati osebno pogovoriti in se tako približati njim in njihovem okolju. Psiho-fizični pogoji, ki jih je treba izpolnjevati, niso zelo strogi, saj teoretično lahko sodeluje vsakdo. Vplivne dejavnike kot so spol, starost, specifične navade (kajenje) itd. dandanes izpodrivajo zdravje, osebni interes in dovolj časa za delo (ocenjevanje).

V pogovoru mora vodja ocenjevalne komisije (skupine) kandidatu razložiti značilnosti njegove naloge in približen čas trajanja naloge. Na podlagi kandidatovega odgovora vodja oceni interes in motivacijo kandidata kakor tudi, koliko časa lahko nameni nalogi. Kot referenca lahko pomaga naslednji vprašalnik.

## VPRAŠALNIK

Prosim odgovorite na naslednja vprašanja

- |   |                          |                          |
|---|--------------------------|--------------------------|
|   | Da                       | Ne                       |
| 1. Ali se želite vključiti v delo pokuševalca?  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Ali mislite, da bo vaše delo prispevalo k dvigu kakovosti živil doma in na tujem?  | Da                       | Ne                       |
|   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. Če da, zakaj? <sup>(1)</sup> .....   |                          |                          |
| .....   |                          |                          |
| .....   |                          |                          |
| 4. Zavedati se morate, da boste morali pokušati olja takoj, ko boste poklicani. Ali ste pripravljeni na to?                         | Da                       | Ne                       |
|   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. Ali bi želeli primerjati svoje vohalno-okuševalne sposobnosti s sposobnostmi sodelavcev?   | Da                       | Ne                       |
|   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. Ali ste kadar koli na razpolago? Ali ste dovolj samostojni, da svoje dnevno delo organizirate po svojih željah?                  | Da                       | Ne                       |
|   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 7. Ali mislite, da bi vam vaš nadrejeni dovolil večkratne odsotnosti z dela do pol ure in v posebnih primerih tudi več dni zapored? | Da                       | Ne                       |
|   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 8. Ali bi lahko nadomestili odsotnost s svojega delovnega mesta, zaradi sodelovanja pri senzoričnih analizah?                       | Da                       | Ne                       |
|   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 9. Ali mislite, da bi morali za to delo dobiti plačilo?   | Da                       | Ne                       |
|   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 10. Na kakšen način?  | Da                       | Ne                       |
|   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Vodja ocenjevalne komisije mora te podatke uporabiti pri izbiri kandidatov in odkloniti vse tiste, ki za tovrstno delo nimajo dovolj interesa, ki niso takoj dosegljivi, ali tiste, ki se ne znajo jasno izražati.

### 9.3 Določitev „srednjega praga“ skupine za „značilne lastnosti“

Pazljivo se izbere štiri olja, od katerih vsako predstavlja eno od naslednjih lastnosti: pregreto, zakisano, žarko in grenko, izražene, kolikor je mogoče čisto in intenzivno.

Od vsakega olja se vzame ustrezen del in pripravi vzorce, katerih koncentracije se med seboj razlikujejo za faktor 2. Potem se redči z ustreznim nevtralnoljem toliko časa, da ni mogoče ugotoviti nobene razlike med kozarcem, ki vsebuje samo nevtralno olje in zadnjima dvema ali tremi razredčenji. Zadnji par kozarcev naj vsebuje samo nevtralno olje.

Niz se konča s kozarci, ki vsebujejo višje koncentracije, dokler se ne dobi skupaj osem kozarcev.

Pripravi se ustrezna količina vzorcev z različnimi koncentracijami, da bo vsak kandidat dobil celoten niz olj vsake lastnosti.

Da se ugotovi „srednjo vrednost praga“ za vsako lastnost, se da vsakemu kandidatu en kozarec, ki vsebuje 15 ml katere koli od pripravljenih koncentracij, in en kozarec, ki vsebuje izključno 15 ml ustreznega nevtralnega sredstva. Po opravljenem poskusu bo kandidat povedal, ali sta vsebini enaki ali ne.

Isti poskus se ponovi s preostalimi koncentracijami ocenjevalne lastnosti.

Zapiše se število pravih odgovorov, ki se jih za vsako koncentracijo dobi od vseh pokuševalcev in to število izrazi kot odstotni delež števila opravljenih poskusov.

<sup>(1)</sup> Opišite, kako bi izboljšali senzorične ocene katerega koli živila, če želite, oljnega olja.

Potem se na absciso nanese v naraščajočem vrstnem redu koncentracije, ki se jih pokuša, na ordinato pa odstotek pravih odgovorov za vsako koncentracijo.

Slika 1 je praktičen primer teh navodil. Prag zaznavanja je določen z ekstrapolacijo točke na ordinati, ki pomeni 75 % pravih odgovorov s krivulje na absciso.

Ta „prag koncentracije“, ki se lahko razlikuje pri vsakem novem olju, ker je odvisen od intenzivnosti prisotne lastnosti, mora biti podoben za različne skupine kandidatov raznih ocenjevalnih komisij; ni povezan z nobeno navado ali posebno nagnjenostjo. Torej je to referenčna točka, lastna kateri koli običajni skupini ljudi, in se lahko uporabi le za poenotenje raznih ocenjevalnih komisij glede na njihovo vohalno-okuševalno občutljivost.

Na podlagi „praga koncentracije“ se za skupino nadaljuje postopek tako,

da se pripravi niz naraščajočih in padajočih koncentracij tako, da bo „prag koncentracije“ na desetem mestu lestvice. To pomeni, da sta enajsta in dvanajsta koncentracija bolj razredčeni, zaradi česar bo težje določiti prisotnost olj z izbrano lastnostjo.

Kot osnovo se vzame koncentracijo  $C_{10}$ , druge vzorce pa se pripravi v skladu s formulo:

$C_{10} \times a^n$ , kjer je „a“ konstanta, faktor razredčitve, enak 1,5, in „n“ eksponent, ki se spreminja od 9 do -2.

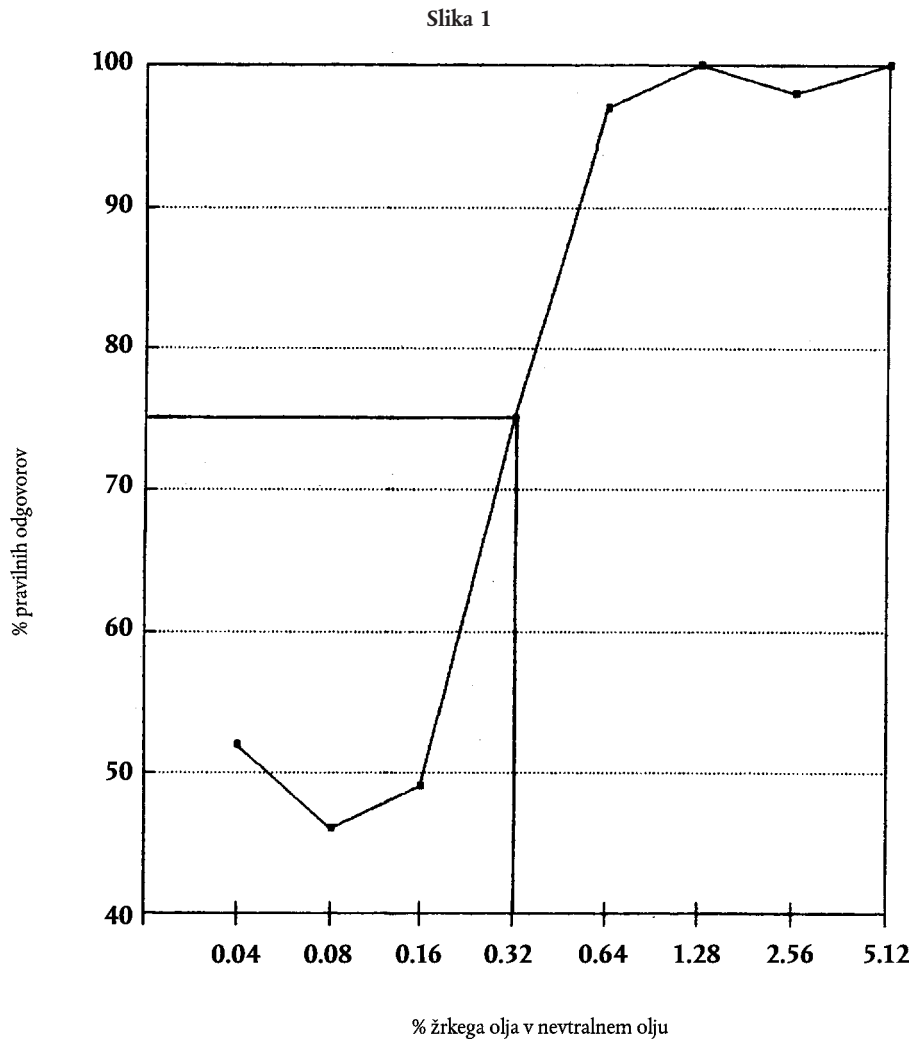
Primer: Če je prag za žarko olje 0,32;  $C_{10} = 0,32$  in „a“ = 1,5, na tej podlagi ima torej niz vzorcev naslednje koncentracije:

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

Če se ta postopek ponovi za druge tri lastnosti, se na podlagi njihovih pragov dobi za vse laboratorije za vsak dražljaj lestvico s podobnimi intenzivnostmi arome, čeprav so napake posameznih olj zaznavne pri različnih koncentracijah.

#### 9.4 Izbira pokuševalcev z metodo ocenjevanja intenzivnosti

V izbirnem postopku mora sodelovati dva- do trikrat več kandidatov, kot jih zahteva razpis, tako da so lahko izbrani ljudje z najboljšo občutljivostjo ali sposobnostmi razlikovanja. Vedno se priporoča uporaba tistega proizvoda, ki se pozneje analizira (torej se bo vedno uporabljalo oljčno olje).



Pri izbiri metode se ne sme spregledati, da mora biti sprejeti postopek učinkovit in čim bolj ekonomičen glede na količino olja, število poslanih vzorcev in čas, potreben za izbiro. Učinkovitost izbirnega postopka je v izbiri optimalnih ravni naslednjih treh odvisnih spremenljivk: (a) „stroškov“ glede na število preskusov; (b) „deleža“ možnih ustreznih kandidatov, ki so bili med izbiranjem po naključju odklonjeni; in (c) „deleža“ kandidatov, ki so bili pri postopku izbire izbrani, pa ne ustrezajo.

Štiri točke izbranega izbirnega postopka poskusa ocenjevanja intenzivnosti, opisanega v ASTM (American Society for Testing and Materials), STP (Special Technical Publication) št. 440, stran 53, so bile spremenjene zaradi:

1. zmanjšanja števila vzorcev v nizu;
2. širjenja obsega dražljajev, da bi se povečalo število vohalno-okuševalnih ocen, na katerih sloni izbira; s tem bi jih prilagodili najpogostejšim napakam zaznamim v oljčnem olju;
3. spreminjanja razmerja koncentracij v nizih; in
4. statistične obdelave rezultatov.

*Predpisana oprema:*

- 1 500 -ml steklenice;
- kozarci za pokušanje iz temno obarvanega stekla;
- merilni valji s prostornino 10, 15, 1 000 in 1 500 ml.

*Predpisani referenčni materiali:*

- Parafinsko olje (Merck 7 160, DAB8, USP XX) ali nevtralno olje brez vonja in okusa (pred kratkim rafinirano oljčno olje ali kakšno drugo podobno olje);
- olja: pregreto-plesnivo, zakisano, žarko in grenko.

## 9.4.1 Postopek

Po pripravi razredčitev se preide na izbiranje. Začne se s 25 kandidati, po spodaj opisani metodologiji za vsako lastnost:

1. Razvrsti se niz dvanajstih kozarcev, označenih s šiframi (en niz za vsakega kandidata). Vlije se po 15 ml vsake od različno koncentriranih raztopin, pripravljenih v skladu s formulo  $C_{10} \times a^n$ , v posamezne preskusne kozarce.
2. Potem, ko se napolni kozarce, se jih pusti pokrite z urnim steklom v prostoru za pokušanje najmanj eno uro pred začetkom pokušanja pri temperaturi od 20 do 22 °C, da se temperatura vzorcev izenači s temperaturo prostora.
3. Vodja mora razvrstiti dvanajst kozarcev iz vsakega niza v vrsto tako, da koncentracija pada.

Nato morajo vsi kandidati sami opraviti pokušanje v skladu s spodaj opisanimi navodili:

## 9.4.2 Navodila za kandidate

Dvanajst kozarcev, postavljenih v vrsto pred kandidati, vsebuje raztopine ene od naslednjih lastnosti: pregreto-plesnivo, zakisano, žarko in grenko. Vsebina kozarcev se razlikuje v intenziteti vonja. Kozarec z najmočnejšim vonjem je na skrajni levi, ostali kozarci pa so razvrščeni proti desni v padajočem vrstnem redu. Vsebina zadnjega kozarca na desni strani ima lahko tako šibko intenziteto vonja, da ga sploh ni možno zaznati.

Pokuševalec spozna vsak vonj v vsakem od testnih kozarcev v nizu. Začne na skrajni desni strani (št. 12) in si poskuša zapomniti intenziteto vseh vonjev, ne da bi se ob tem preveč utrudil.

Ko se začuti, da se navadi na lestvico koncentracij vonjev, zapusti sobo.

Medtem vodja vzame enega od kozarcev iz niza in ga položi poleg zadnjega kozarca na skrajni desni strani, vse druge kozarce pa premakne tako, da se zapolni prazno mesto. Zdaj se vrne v prostor in nadaljuje s pokušanjem.

Pokušnja zajema sledeče naloge:

Kozarec, vzeti iz niza, je potrebno vrniti na njegovo pravo mesto. Da se bi to naredilo, se ga povoha in njegov vonj primerja z drugimi, kolikor krat se to želi. Pravilno uvrščen kozarec ima močnejši vonj od vzorca, ki stoji ob njem na desni strani ter šibkejši vonj od vzorca, ki stoji ob njem na levi strani. Ta pokušnja se ponovi s tremi ostalimi kozarci.

Da bi bila pokušnja in zbiranje odgovorov enostavnejša, mora vsak kandidat izpolniti formular, ki je dopolnilo k pravkar opisanim navodilom.

## IZBIRA KANDIDATOV

Pokušnja št. .... Lastnost .....

Premaknjen kozarec spada na mesto št. ....

Datum ..... Ime .....

## 9.4.3 Zbiranje rezultatov

Vodja ocenjevalne komisije mora zapisati podatke vsakega kandidata na ta način:

Ime kandidata	Proučevana lastnost	Mesto vzorca (K')	Pravo mesto vzorca (K)	Razvrščanje $(K' - K)^2$
.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....

## 9.4.4 Postopek za statistično ocenjevanje

V tem posebnem primeru izbiranja morajo biti kozarci, ki jih je treba vrniti na svoja prava mesta, enaki za vse kandidate. V skladu s statističnimi izračuni, opravljenimi v ta namen, morajo kozarci za posamezno lastnost ustrezati naslednjim položajem v nizu:

Lastnost - pregreto- plesnivo	zakisano	žarko	grenko
kozarec št 10, 5, 7, 2	kozarec št. 11, 3, 8, 6	kozarec št 7, 4, 10, 2	kozarec št 6, 3, 11, 9

Številka, ki ustreza položaju kozarca v vrstnem redu niza, se ne sme spremeniti, ker so bili statistični izračuni za to pokušnje opravljene z upoštevanjem verjetnosti, da kozarce po naključju vrnejo na njihovo mesto.

Da kandidati drug drugemu ne bi mogli posredovati informacij, mora vodja ocenjevanja zagotoviti, da:

1. med kandidati ni možen stik. Vsak kandidat dobi drugače označene kozarce;
2. kandidat ne sme na noben način ugotoviti, s katerega mesta je bil premaknjen kozarec;
3. ne glede na to, da bodo vsi kandidati dobili iste, prej omenjene kozarce, bo vrstni red pri vsakem kandidatu drugačen.

Vsak kandidat dobi glede na svoje delo oceno, izraženo na sledeči način:

$e_1^i, e_2^i, \dots, e_{12}^i$  je dvanajst kozarcev, ki ustrezajo dvanajstim koncentracijam lastnosti „i“ katere koli od štirih lastnosti: pregreto-plesnivo, zakisano, žarko, grenko, postavljenim v padajočem redu koncentracij.

$e_k^i$  je eden od prestavljenih kozarcev,  $K'$  pa mesto, na katero ga je postavil kandidat pri uvrščanju v niz. Zaradi tega sta  $K$  in  $K'$  celi števili med 1 in vključno 12 in ustrezata pravi številki mesta izbranega kozarca in številki, ki mu jo je določil kandidat.

$T$  predstavlja najvišje dovoljeno odstopanje in je vnaprej določena vrednost. V našem primeru je  $T = 3$ . Če je  $K' - K > T$ , je kandidat zavržen (!).

Če je  $K' - K \leq T$ , je kandidat teoretično sprejet in lahko nadaljuje pokušnje, dokler ni sposoben vrniti kozarca na njegovo pravo mesto ali v neposredno bližino pravega mesta.

V tem primeru je ocena, ki jo dobi kandidat, ki je ocenil določeno lastnost, na primer pri nizu „pregreto-plesnivo“ ( $Pr$ ), enaka kvadratu razlike med točnim mestom kozarca v nizu in mestom, na katero ga je kandidat uvrstil, npr.:

$$P(1,2,3,4)^{(Pr)} = (K'-K)^2.$$

Glede na to, da bo ta postopek izvajal vsak kandidat s štirimi koncentracijami vsake lastnosti, je delna ocena za lastnost (na primer  $Pr$ ) naslednja:

$$Z^{Pr} = P1^{Pr} + P2^{Pr} + P3^{Pr} + P4^{Pr}$$

V nadaljevanju je opisano nekaj primerov.

Primer 1:

Če je kandidat A v zvezi s štirimi koncentracijami, vzetimi iz niza za lastnost „i“, odgovoril takole:

Pravo mesto kozarca v nizu (K)	Mesto, na katero ga je postavil kandidat (K')	Odmik od pravega mesta (K'-K)
7	7	7 - 7 = 0
4	5	4 - 5 = -1
10	6	10 - 6 = 4 (!)
2	4	2 - 4 = -2

(!) Ta kandidat se zavrne, ker je  $T > 3$ ; ali povedano drugače: pri uvrščanju kozarcev na njihova prava mesta se je kandidat zmotil za več kot tri mesta.

(!) Vodja ocenjevalne skupine mora tako voditi kandidata, da le-ta ne izgubi občutljivosti zaradi vohalnega naprežanja.

Primer 2:

Če je kandidat premeščal kozarce za določeno lastnost na naslednji način:

Pravo mesto kozarca v nizu (K)	Mesto, na katero ga je postavil kandidat (K)	Odmik od pravega mesta (K'-K)
7	7	$7 - 7 = 0$
4	4	$4 - 4 = 0$
10	7	$10 - 7 = 3$
2	3	$2 - 3 = -1$

Kandidat ni zavrjen. Dosegel je oceno:

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

Kandidatova končna ocena, s katero se potrdi, ali je sprejet ali zavrjen kot pokuševalec, je odvisna od njegovih odgovorov v zvezi z štirimi ocenjevanimi lastnostmi:

$$\begin{aligned} P1^{Pr} + P2^{Pr} + P3^{Pr} + P4^{Pr} &= Z^{Pr} \\ P1^{Za} + P2^{Za} + P3^{Za} + P4^{Za} &= Z^{Za} \\ P1^{Ža} + P2^{Ža} + P3^{Ža} + P4^{Ža} &= Z^{Ža} \\ P1^{Gr} + P2^{Gr} + P3^{Gr} + P4^{Gr} &= Z^{Gr} \end{aligned}$$


---


$$Z_{\text{končni}} = Z^{Pr} \dots Z^{Gr}$$

pri čemer je: Pr = Pregreto-plesnivo

Za = Zakisano

Ža = Žarko

Gr = Grenko

Postavlja se vprašanje določitve najvišje vrednosti za Z, pri kateri se lahko šteje, da ima kandidat dobro raven zaznavanja, dober olfaktorni spomin in je na takšni intelektualni ravni, da lahko pravilno odgovarja v zvezi s štirimi dražljaji. Očitno ima Z vedno pozitivno vrednost in  $Z = 0$  pomeni, da je kandidat prepoznal in pravilno ocenil vseh šestnajst predstavljenih koncentracij (štiri za vsako lastnost). Vrednost Z, ki ni 0, kaže da je kandidat prepoznal območja lestvice, iz katerih so bile izbrane intenzitete, vendar pa jim ni mogel določiti natančnega položaja, ker njegova sposobnost razlikovanja intenzitet v nizu, ki mu je bil predstavljen za eno ali več lastnosti, ni zadovoljiva.

Če kandidat po naključju vrne vse kozarce, mora biti kritična vrednost ( $Z_k$ ) določena tako, da je verjetnost, da bo  $Z < Z_k$ , dovolj majhna, vnaprej določena vrednost ( $\alpha$ ). Z drugimi besedami, zagotoviti se mora, da pri tem postopku obstaja možnost, da se v ocenjevalno komisijo izbere pokuševalca, ki nima dovolj velike sposobnosti razlikovanja intenzitete dražljajev, manjša od  $\alpha$ .

Kadar je vrednost  $\alpha$  določena (v našem primeru je 0,05), se dobi  $Z_k$  z verjetnostno porazdelitvijo spremenljivke Z, ta pa je odvisna od verjetnostne porazdelitve P spremenljivk ( $K^i$ ).

Če se sledi ustreznemu statističnemu izračunu, kritična vrednost  $Z_k$  doseže vrednost 34.

Ko dobimo oceno Z za vse kandidate, izločimo vse kandidate z oceno, višjo od 34.

Primer ocene kandidatov A in B:

Lastnost	Kandidat A	Kandidat B
Pregreto – plesnivo (Pr)	$Z^{Pr} = 10$	$Z^{Pr} = 12$
Zakisano (Za)	$Z^{Za} = 10$	$Z^{Za} = 11$
Žarko (Ža)	$Z^{Ža} = 10$	$Z^{Ža} = 15$
Grenko (Gr)	$Z^{Gr} = 4$	$Z^{Gr} = 0$
	$\Sigma = 34$	$\Sigma = 38$

Glede na to, da imata kandidata vrednosti  $Z = 34$  in  $Z = 38$ , bo kandidat A sprejet, medtem ko bo kandidat B zavrjen. Potem ko se izloči vse kandidate z oceno nad 34, se preostale razvrsti glede na njihovo oceno, dokler se ne dobi dvanajst najboljših kandidatov.

### 9.5 Usposabljanje

Glavni namen usposabljanja pokuševalcev je:

- (a) približati mnogovrstne vohalno-okuševalno-tipne različice, ki se jih najde v deviških oljčnih oljih;
- (b) približati pokuševalcem specifično senzorično metodologijo;
- (c) povečati individualne sposobnosti zaznavanja, prepoznavanja in vrednotenja senzoričnih lastnosti; in
- (d) izboljšati občutljivost in spomin glede na različne obravnavane lastnosti, tako da je končni rezultat natančna in dosledna ocena.

Usposabljanje zahteva številna delovna srečanja ocenjevalne komisije in skrbno analizo mnenj in pripomb posameznih pokuševalcev. Potem ko so pokuševalci vsak zase analizirali olja, se pogovorijo z vodjem ocenjevalne komisije o posameznih nejasnostih, da bi poenotili merila in mnenja.

Napredek, dosežen pri usposabljanju po določenem številu učnih ur, je ocenjen s povečevanjem odstotka pravih odgovorov (če so uporabljeni testi razlikovanja pri pokušnjah) ali z analizo variance povprečnih ocen, če se uporablja lestvica.

O praktični uporabi tega usposabljanja so mnenja različna, za zdaj pa velja, da je zelo uspešno in bistveno, če se želi doseči, da bodo senzorični rezultati točni in natančni.

### 9.6 Pregledi izvajanja

Ocenjevalna komisija običajno izvaja pokušanje na običajni in kontinuirani podlagi, kar vključuje senzorične teste, ki od nje zahtevajo veliko naporov. Od presoje ocenjevalne komisije so v veliki meri odvisne tehnološke in komercialne odločitve. Zaradi tega je potrebno preveriti znanje izbranih pokuševalcev, ko se jih izbere in usposobi.

Ko je ocenjevalna komisija sestavljena in je opravila nekaj rutinskih pokušenj, je treba njeno delo redno preverjati v določenih časovnih presledkih.

## 10. POSTOPKI ZA SENZORIČNO OCENJEVANJE DEVIŠKEGA OLJČNEGA OLJA

Ko so izpolnjeni prej naštetih pogoji in so na razpolago potrebni pripomočki ter zbrana ocenjevalna komisija, naj vsak pokuševalec povoha in pokusi vzorec olja za analizo, ki je v testnem kozarcu (zapečateni vzorci je treba do analize hraniti v hladilniku, kamor se vrnejo tudi po vsaki pokušnji, dokler ni opravljen test v triplicatu). Pokuševalec analizira vohalne, okuševalne, tipne in kinestetične zaznave in jih vpiše v obrazec št. 1 iz slike 2 te priloge. Vpiše prisotnost posameznih lastnosti in stopnjo njihove intenzitete. Naslednja stopnja je ocena kakovosti olja, ki se vpiše v obrazec št. 2 iz slike 2 te priloge

### 10.1 Uporaba obrazcev (obrazec senzoričnih lastnosti in ocenjevalna tabela kakovosti)

Na levi strani obrazca so naštetih najbolj pogoste senzorične zaznave v oljčnih oljih. Če pokuševalec naleti na kakšen drug dražljaj, ki ne ustreza opisom, ga mora čim podrobneje opisati v rubriki „druge lastnosti“.

Pokuševalec mora zaznavne lastnosti oceniti v sorazmerju z njihovo intenziteto, kar v ustrezni rubriki označi s križcem (x) v skladu z naslednjimi merili:

- 1: komaj zaznavno,
- 2: šibko,
- 3: povprečno,
- 4: močno,
- 5: zelo močno (ekstremno).

Na desni strani obrazca je ocenjevalna tabela kakovosti s točkami od 1 do 9 (9 za izjemno kakovost, 1 za najslabšo kakovost) s katero pokuševalci ocenijo kakovost. Ta ocena mora upoštevati tako dobre kot tudi slabe lastnosti olja, ki so že zabeležene na levi strani obrazca.

Prvi stolpec ocenjevalne tabele je razdeljen na pet delov. Kakovostno razvrščanje olj mora temeljiti na odsotnosti oziroma prisotnosti napak in intenzivnosti arom. Glede na to, da ocenjevalna tabela obsega devet točk, so opisani kriteriji v drugem stolpcu ocenjevalne tabele pod oznako „značilnosti“ pokuševalcu v pomoč in jih mora upoštevati pri končni odločitvi o oceni kakovosti.

## 10.2 Končna ocena

Vodja skupine mora zbrati ocenjevalne liste, ki so jih izpolnili vsi pokuševalci in preveriti, ali se senzorične značilnosti in intenzitete, s katerimi so bile te lastnosti zaznane in zapisane na obrazcu senzoričnih lastnosti, ujemajo z oceno olja na ocenjevalni tabeli kakovosti. Če pride do opazne razlike, mora vodja prositi pokuševalca, naj preveri ocenjevalni list.

Če je to potrebno, mora pokuševalec pokušnjo ponoviti.

Na koncu mora vodja skupine sestaviti tabelo z ocenami celotne skupine in izračunati aritmetično sredino in standardni odmik od aritmetične sredine.

V primeru revizijske analize mora skupina ocenjevati v trojniku. Končna ocena, decimalno število, je srednja vrednost treh ocen.

Če je srednja vrednost intenzitete za grenkost oziroma pikantnost večja od 2,5, je treba olje primerno označiti in zapisati, da je olje grenko oziroma pikantno.

*Prikaz rezultatov:* Na podlagi povprečne ocene mora vodja skupine določiti kategorijo v skladu z mejnimi vrednostmi iz Priloge 1 tega normativa. V poročilu o analizi je senzorična ocena podana le z razvrstitvijo olja v kategorijo.

*Opomba:* Do senzorične analize morajo biti vzorci zapečateni in hranjeni v hladilniku, kamor jih je potrebno vrniti po vsaki pokušnji, dokler ni opravljen test v triplikatu.

**Slika 2**  
**Deviško oljčno olje**

ocenjevalni list  
Vohalno-okušalno-tipni zaznamki <sup>(2)</sup>

	0	1	2	3	4	5
Oljčno sadežno (zreli in zeleni) <sup>(1)</sup>						
Jabolko.....						
Drugo zeleno sadje .....						
Zeleno (listje, trava).....						
Grenko.....						
Pikantno (pekoče) .....						
Sladko .....						
Druge dovoljene značilnosti .....						
(opiši.....						
.....)						
Zakisano <sup>(1)</sup> .....						
Grobo.....						
Kovina.....						
Plesnivo/vlažno <sup>(1)</sup> .....						
Morklja.....						
Pregreto/plesnivo .....						
Žarko .....						
Druge nedovoljene značilnosti.....						
(opiši.....						
.....)						

Ocenjevalna tabela

Napake	Značilnosti	Skupna ocena
Jih ni	Oljčno sadno	9
	Oljčno sadno in po drugem	8
	svežem sadju	7
Šibki in komaj zaznavni	Šibka aroma po katerem koli sadju	6
Zaznavne	Dokaj nečista aroma po sadju, nenavadni vonji in okusi	5
Znatne, na meji sprejemljivosti	Jasni nečisti, neprijetni vonji in okusi	4
Močne in/ali resne, jasno zaznavne	Za uživanje popolnoma nedopustni vonji in okusi	3
		2
		1

Pripombe: .....

Ime pokuševalca: .....

Oznaka vzorca: .....

Datum: .....

<sup>(1)</sup> Črtaj v kolikor ni v uporabi.

<sup>(2)</sup> Zaznavanje:

0: (?),

1: komaj zaznavno,

2: rahlo (šibko),

3: povprečno,

4: močno,

5: ekstremno (zelo močno).

**ENZORIČNA ANALIZA: SPLOŠNI OSNOVNI SLOVAR**

## 1. NAMEN

Namen tega slovarja je zbrati in opredeliti splošne izraze, ki se uporabljajo pri senzorični analizi.

## 2. SLOVAR

2.1 **Splošna terminologija**

Senzorična analiza (samostalnik):

Pregled organoleptičnih lastnosti proizvoda s pomočjo čutil.

Zaznavanje (samostalnik):

Senzorično zavedanje zunanjih predmetov ali dogodkov

Organoleptična lastnost (pridevnik) (prilastek):

Lastnost izdelka, ki je zaznavna s čutili.

Strokovni ocenjevalec (samostalnik):

(z vidika preiskave organoleptičnih lastnosti)

Izbran strokovnjak z visoko razvito stopnjo senzorične občutljivosti in z izkušnjami pri senzorični metodologiji, ki je sposoben dosledno in ponovljivo senzorično ocenjevati različne proizvode.

Pokuševalec (samostalnik):

Usposobljena, občutljiva oseba, izbrana za vrednotenje organoleptičnih lastnosti živil s pomočjo čutil.

*Ocenjevalna skupina:*

Skupina posebej izbranih in usposobljenih ocenjevalcev, ki izvajajo senzorične analize proizvodov pod predpisanimi in nadzorovanimi pogoji.

Občutek (samostalnik):

Subjektivni odziv (zaznava) organizma na čutilni dražljaj. Ta pojav se lahko subjektivno razlikuje ali objektivno opredeli s čutilom glede na naravo ali vrsto dražljaja in njegove intenzitete.

Občutljivost (samostalnik):

Sposobnost kvalitativnega in kvantitativnega zaznavanja dražljajev majhne intenzitete ali majhnih razlik med dražljaji s pomočjo čutil.

Ocenjevanje (samostalnik):

Postopek, ki vključuje zaznavanje, analiziranje in presojanje organoleptičnih lastnosti proizvoda, predvsem njegovih vohalnih, okuševalnih, tipnih in kinestetičnih lastnosti.

Sprejetje (samostalnik):

Dejanje določenega posameznika ali skupine, ko ugotovi, da proizvod zadovoljuje njegova pričakovanja.

Harmoničnost (samostalnik):

Lastnost izdelka, ki daje prijeten občutek. občutek nastane pri zaznavi sestavin izdelka kot vohalnih, okuševalnih, tipnih in kinestetičnih dražljajev, ker so ti prisotni v ustreznih razmerjih.

Sprejemljivost (samostalnik):

Stanje izdelka, ki ga je posameznik ali skupina sprejela glede na njegove organoleptične lastnosti.

Razlikovanje (samostalnik):

Dejanje kvalitativnega in/ali kvantitativnega razlikovanja med dvema ali več dražljaji.

Kompenzacija (samostalnik):

Rezultat medsebojnega vplivanja kombinacije dražljajev tako, da se vsak dražljaj zazna manj intenzivno, kot če bi nastopal samostojno.

Videz (samostalnik):

Kombinacija organoleptičnih lastnosti, ki se jih zazna z vidom: velikost, oblika, barva, struktura, motnost, jasnost, tekočnost, penjenje in vrenje. Ta izraz je treba uporabljati namesto izraza videz.

Lastnost (samostalnik):

Zaznavna značilnost.

## 2.2 Fiziološka terminologija

Dražljaj (samostalnik):

Fizikalni ali kemijski povzročitelj odgovora zunanjih ali notranjih senzoričnih receptorjev.

Okus (samostalnik):

(Čut okusa)

Čut, katerega receptorji so v ustih, predvsem na jeziku, in jih aktivirajo različne snovi v raztopini.

Okušalen/gustatoren (pridevnik):

Opis lastnosti izdelka, ki vzdraži okušalni aparat tako, da vzbudi zaznave, ki se nanašajo na enega ali več osnovnih okusov: sladko, slano, kislo, grenko.

Receptor (samostalnik):

Specifičen del čutila, ki se odziva na določen dražljaj.

*Opomba:* receptorji so razvrščeni glede na vrsto energije, ki povzroča dražljaj (svetloba, toplota, zvok itd.)

Voh (samostalnik):

Je funkcija vohalnega aparata, da sprejme in razlikuje med molekulami hlapnih snovi, ki ga dosežejo skozi nos, neposredno ali posredno.

Intenzivnost (samostalnik):

Stopnja energije lastnosti, ki se lahko meri po kvantitativni lestvici vrednosti nad pragom.

Prilagoditev (samostalnik):

Začasno spremenjena občutljivost v zaznavanju senzoričnih dražljajev zaradi neprekinjene ponavljajoče izpostavljenosti določenemu dražljaju ali dražljaju, ki mu je podoben.

Oviranje (inhibicija) (samostalnik):

Zmanjšan odziv čutilnega organa ali njegovega dela na dražljaj, čeprav intenzivnost presega prag zaznave.

Odziv (samostalnik):

Dejanje, pri katerem se senzorične celice odzivajo na delovanje enega ali več, za določen receptor ustreznih dražljajev.

Telo (samostalnik):

Tipni občutek v ustih, s katerim ugotovimo stopnjo gostote, viskoznosti, konsistence ali trdnosti izdelka.

Dišava (samostalnik):

Svež, prijeten vonj.

Vohati (glagol):

(Aktivni čut za vonj)

Opis dejanja, pri katerem zaznamo vonj.

Objektivno (pridevnik):

(a) Način resničnega in dokazljivega opisovanja, pri katerem je vpliv človeka čim manjši (npr. navade, nagnjenost, priljubljenost);

(b) Opisuje tehniko, ki s pomočjo senzoričnih ali instrumentalnih metod zmanjšuje lastne napake.

*Opomba:* uporaba izraza „instrumentalen“ se, kot sinonim za objektivno, ne priporoča.

*Subjektivno (pridevnik):*

Opis zaznave, na katero poleg dražljaja vpliva tudi naš način razmišljanja in čutenja.

*Kinesteza:*

Občutek, ki je rezultat pritiska na vzorec in ga ustvari gibanje v ustni votlini ali pa ga ustvarimo s prsti (na primer stiskanje sira s prsti).

*Prag (samostalnik):**Absolutni prag:*

minimalna vrednost senzoričnega dražljaja, ki povzroči:

- pojav občutka (prag dražljajev, prag zaznave) ali
- prepoznavo občutka (prag prepoznave).

*Prag razlike:*

Najmanjša vrednost senzoričnega dražljaja, ki povzroči zaznavno razliko v intenzivnosti dražljaja.

*Končni prag:*

Največja vrednost dražljaja, nad katero povečanje intenzivnosti dražljaja ni več zaznavno.

*Preferenčni prag:*

Najnižja kvantitativna vrednost dražljaja nad absolutnim pragom, pri kateri se pojavi privlačnost ali zavračanje glede na nevtralni dražljaj, na primer pri izbiri med sladkano tekočino in vodo.

*Opomba:* Razlika mora biti prikazana med absolutnim preferenčnim pragom in pragom razlike.

*Pod pragom (pridevnik):*

Pod absolutnim pragom.

*Nad pragom (pridevnik):*

Nad absolutnim pragom (pridevnik)

*Senzorična utrujenost:*

Posebna oblika senzorične prilagoditve, ko pade raven občutljivosti.

*Kompenzacija (samostalnik):*

Rezultat medsebojnega delovanja kombinacije dražljajev, ko vsakega od dražljajev zaznamo manj intenzivno, kot če bi učinkoval posamezno.

*Sinergistično (pridevnik):*

Skupen učinek ali delovanje snovi, ko intenziteta organoleptičnih lastnosti, kot posledica kombinacije, presega vsoto intenzitet posameznih lastnosti.

*Kontrastni učinek:*

Je povečanje odziva kot odgovor na razlike med dvema sočasima ali zaporednima dražljajema.

Nasprotno od konvergentnega učinka.

*Konvergentni učinek:*

Je zmanjšanje odziva kot odgovor na razlike med dvema sočasima ali zaporednima dražljajema. Nasprotno od kontrastnega učinka.

## 2.3 TERMINOLOGIJA, KI SE NANAŠA NA SENZORIČNE LASTNOSTI

*Kislo (pridevnik):*

(a) opisuje osnovni okus, ki ga povzročajo razredčene vodne raztopine večine kislih snovi (na primer citronske kisline, mlečne kisline, vinske kisline);

(b) opisuje lastnosti čistih snovi ali mešanic, ki povzročajo kislo zaznavo.

Ustrezen samostalnik je kislost.

*Kiselkasto (pridevnik):*

Opisuje vohalno-okušalno zaznavo, pri kateri prevladujejo kisline, ki so večinoma nastale s fermentacijo, ali živila, ki povzročajo kislo zaznavo.

Nekateri dejavniki, ki prispevajo k tej zaznavi, se nanašajo na fermentacijo živil, na primer mlečno-kislinsko ali očetno-kislinsko fermentacijo.

Grenko (pridevnik):

- (a) opisuje osnovni okus, ki ga povzroči razredčena vodna raztopina različnih snovi, kot so na primer kinin, kofein ali določeni alkaloidi;
- (b) opisuje lastnost čistih snovi ali mešanice, ki povzročijo grenko zaznavo.

Ustrezen samostalnik je grenkost.

Slano (pridevnik):

- (a) opisuje osnovni okus, ki ga povzročajo raztopine natrijevega klorida;
- (b) opisuje lastnost čistih snovi ali mešanic, ki povzročajo ta okus.

Ustrezen samostalnik je slanost.

Sladko (pridevnik):

- (a) opisuje osnovni okus, ki ga povzročajo vodne raztopine različnih snovi, na primer saharoze;
- (b) opisuje lastnost istih snovi ali mešanic, ki povzročajo ta okus.

Ustrezen samostalnik je sladkost.

Trpko (pridevnik):

- (a) opisuje celovito zaznavo v ustih, ki jo povzročajo razredčene vodne raztopine nekaterih taninov, kot so npr. tanini kakija in trnulje;
- (b) opisuje lastnost čistih snovi ali mešanic, ki povzročajo to zaznavo.

Ustrezen samostalnik je trpkost.

Aroma (samostalnik):

Celovita kombinacija vohalno-okušalno-tipnih in kinestetičnih zaznav, ki omogoča pokuševalcu, da razpozna in vzpostavi večstopenjski kriterij o prijetnih in neprijetnih aromah.

Okus (samostalnik):

- (a) občutek, ki se ga zazna, ko nekatere topne snovi vzdražijo okušalne brbončice;
- (b) lastnosti značilnih občutkov, ki jih take snovi povzročajo.

Osnovni okus (samostalnik):

Kateri koli od štirih značilnih okusov: sladko, slano, kislo, grenko.

Vonj (samostalnik):

- (a) kombinacija občutkov, zaznanih z vohalnim organom med vohanjem določenih hlapnih snovi;
- (b) lastnost posebnega občutka, ki ga povzroči ena od zgoraj omenjenih sestavin.

Aroma (samostalnik):

- (a) prijeten občutek, ki ga zaznamo posredno s čutilom za voh, ko pokušamo hrano;
- (b) v industriji dišav in navadnem jeziku se lahko ta beseda nanaša na iste občutke, ki jih zaznamo neposredno skozi nos.

Pookus; ostanek okusa (samostalnik):

Kombinacija občutkov, zaznanih potem, ko je dražljaj izginil iz ust in se razlikuje od občutkov, zaznanih pred tem.

Aromatičnost (pridevnik):

- (a) opisuje lastnost istih snovi ali mešanic, ki pri okušanju povzročijo zaznavo, poznano kot aroma;
- (b) z njim opišemo izdelke, ki v trenutku, ko jih preučujemo neposredno skozi nos, povzročijo občutek prijetnega vonja in svežine.

Tekstura (samostalnik):

Mehanske, geometrijske in površinske lastnosti proizvoda, ki se zaznajo z mehničnimi, tipnimi receptorji v ustih in, kjer je primerno, tudi z vidnimi in slušnimi receptorji.

*Opomba:* ta izraz se nanaša samo na objektivne lastnosti in ne na občutke, ki so poimenovani s splošno terminologijo, na primer konsistenca, vlaknatost, mastnost ipd.

*Razporejanje vzorca v ustih:*

Postopek, ko živilo pride v stik z vsemi občutljivimi površinami v ustih, tako da se zazna občutek, ki ga živilo vzbudi.

*Opomba:* ta slovar se lahko razširi v skladu s standardom SIST ISO 5492, deli I do V in druge publikacije kot npr. J. L. Magnen *Les cahiers techniques du Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation*, itd.

## KOZARCI, KI SE UPORABLJAJO PRI OCENJEVANJU OLJ

### 1. NAMEN

Namen tega standarda je opisati značilnosti kozarcev, ki se uporabljajo pri senzoričnih analizah jedilnih olj (vonj, okus, aroma).

Poleg tega predpisuje prilagojen grelnik, ki je potreben za doseganje in obdržanje prave temperature.

### 2. OPIS KOZARCA

Namen risbe na sliki 1 je uvesti optimalne značilnosti primernega kozarca, ki so:

- (a) maksimalna stabilnost, ki preprečuje nagibanje kozarca in polivanje olja;
- (b) dno, ki se prilega odprtini grelnika, tako da se dno kozarca enakomerno segreva;
- (c) oblika, ki je najširša pri dnu, tako da se hlapne snovi olja z lahkoto sproščajo, in pri vrhu zožena, da se hlapne snovi lahko koncentrirajo, s čimer zagotovimo, da se jih z nosom bolje zazna in razpozna;
- (d) barva stekla mora biti temna, da barva olja ne more vplivati na oceno.

#### 2.1 Mere

Kozarec je prikazan na sliki 1, njegove mere pa so:

prostornina .....	130 ml ± 10 ml,
višina .....	60 mm ± 1 mm,
premer ustja .....	50 mm ± 1 mm,
premer kozarca pri vrhu .....	70 mm ± 1 mm,
premer dna .....	35 mm ± 1 mm,
debelina kozarca ob straneh.....	1,5 mm ± 0,2 mm,
debelina dna .....	5 mm ± 1 mm.

Vsak kozarec mora biti opremljen z urnim steklom, katerega premer je za 10 mm večji od premera kozarca. To urno steklo se uporabi kot pokrov, ki preprečuje izgubo arome in vstop prahu.

#### 2.2 Značilnost izdelave

Kozarec je narejen iz toplotno odpornega stekla. Biti mora temno obarvan, da se ne more razločiti barve njegove vsebine. Ne sme imeti prask oziroma zračnih mehurčkov.

Rob mora biti pravilen, gladek in prirobljen.

Kozarec mora biti kaljen tako, da prenese temperaturne spremembe, ki jih mora prenesti v poskusu.

### 2.3 Navodila za uporabo

Kozarce se pere z nevtralnimi sredstvi in se jih splakuje tako dolgo, da se popolnoma odstrani čistilo. Nato se jih splakne še z destilirano vodo, odcedi in posuši v sušilniku.

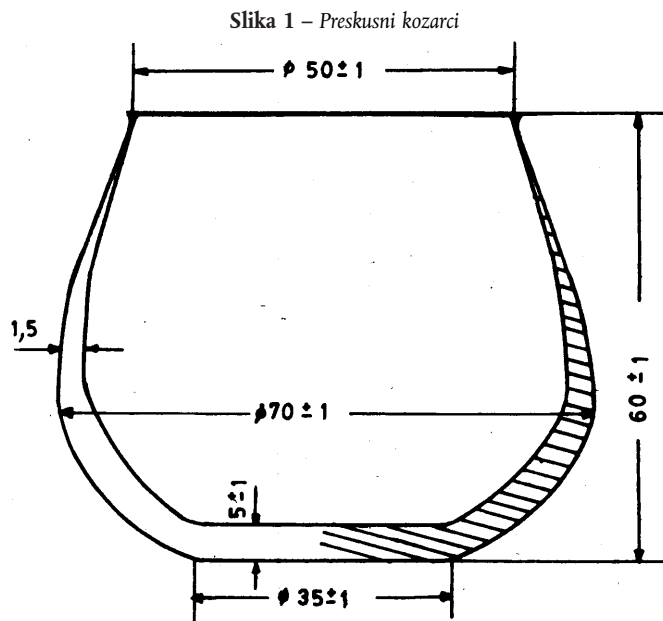
Ne smejo se uporabljati koncentrirane kisline in ne mešanice kromovih kislin.

Kozarci morajo ostati do uporabe v sušilniku ali pa v omarici, kjer so zaščiteni pred onesnaženjem s tujimi vonji.

Pred uporabo se vsak kozarec povoha in se tako prepriča, da nima tujega vonja. Pri pripravi pokušnje se pazi na to, da se označi vsak kozarec in vzorec olja, ki ga vsebuje. Vodja pokušnje je edina oseba, ki je seznanjena z razporedom vzorcev.

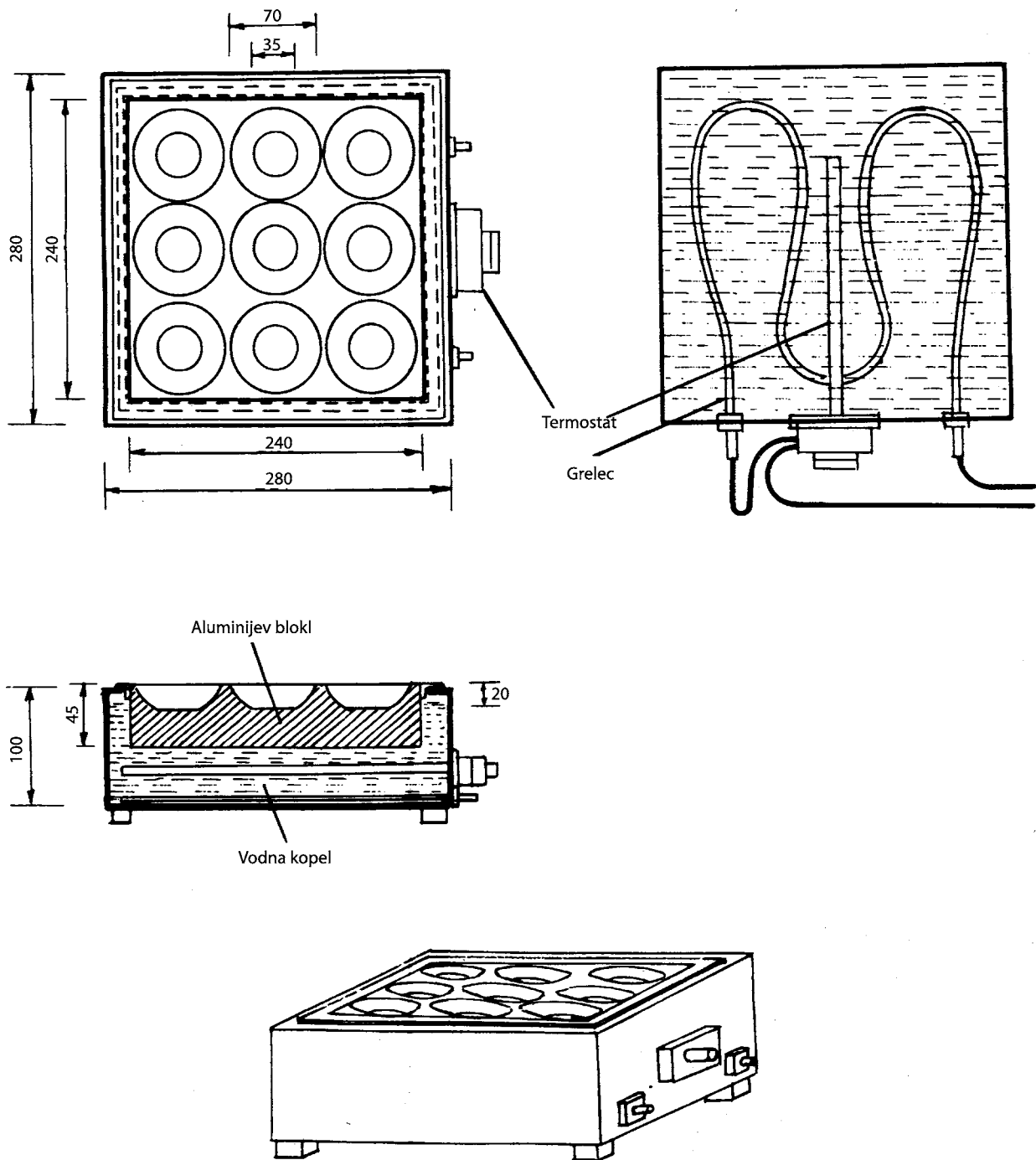
### 3. NAPRAVA ZA SEGREVANJE VZORCEV

Vzorci se senzorično ocenjujejo pri predpisani temperaturi, ki je za olja  $28 \pm 2$  °C. Zato se v vsako ocenjevalno komoro namesti grelnik (slika 4). Grelnik je sestavljen iz aluminijevega bloka, ki je potopljen v termostatisirano vodno kopel. Blok ima odprtine, ki se prilegajo dnu kozarcev. Temperaturna razlika med grelnikom in oljem v kozarcih ne sme biti večja od  $\pm 2$  °C.



(mere v mm)

Slika 2: Grelnik (mere v mm)



## NAVODILO ZA OPREMO PROSTORA ZA SENZORIČNO OCENJEVANJE

### 1. UVOD

Prostor za senzorično ocenjevanje je zasnovan tako, da zagotavlja skupini delo v primernem, udobnem in standardiziranem okolju, ki zagotavlja ponovljivost in primerljivost rezultatov.

### 2. NAMEN

Namen navodila je določiti osnovne pogoje, ki morajo biti izpolnjeni pri opremljanju degustacijske sobe.

### 3. SPLOŠNE ZAHTEVE ZA OPREMO

Prostori morajo biti, ne glede na velikost (glej 3.1), v skladu z naslednjimi zahtevami:

prijetni in ustrezno osvetljeni (glej 3.2), oprema pa nevtralna. Zaradi tega naj bodo stene svetlih barv, ki ustvarjajo sproščeno razpoloženje <sup>(1)</sup>.

Prostori morajo biti takšni, da se lahko enostavno očistijo in zvočno izolirajo. V njih ne sme biti tujih vonjev, zato naj bodo opremljeni z dobrimi prezračevalnimi napravami. V prostoru je treba vzdrževati stalno temperaturo od 20 do 22 °C.

#### 3.1 Velikost

Velikost prostorov je navadno odvisna od možnosti, ki jih imajo laboratoriji ali podjetja. Na splošno pa morajo biti prostori dovolj prostorni, da je v njih mogoče namestiti deset enakovrednih ocenjevalnih mest in prostor za pripravo vzorcev.

Zaželeno je, da je prostor čim večji, da se lahko loči prostor za čiščenje pribora od prostora za kulinarčno pripravo in prostora za odprto skupinsko pokušanje.

#### 3.2 Osvetlitev

Osvetlitev, naravna ali umetna, naj bo izenačena, difuzna in z možnostjo nastavitve.

#### 3.3 Temperatura in vlažnost

V prostorih mora biti stalna in prijetna temperatura in sprejemljiva vlažnost. Priporoča se, razen v posebnih okoliščinah, temperatura od 20 do 22 °C in 60 do 70-% relativna vlažnost.

### 4. OPIS OCENJEVALNE KABINE

#### 4.1 Splošne značilnosti

Kabine za senzorično analizo naj bodo v prostoru nameščene druga ob drugi, biti morajo enake in ločene s pregradami, ki naj bodo dovolj visoke in široke, da pokuševalce med seboj ločijo.

Kabine naj bodo izdelane iz materiala, ki se lahko enostavno čisti in vzdržuje (na primer les ipd). Če je kabina prebarvana, mora biti barva po sušenju popolnoma brez vonja.

Sedeži naj bodo udobni in nastavljive višine.

Vsaka kabina mora imeti svojo lastno osvetlitev z možnostjo nastavitve.

Zelo priporočljivo je, da so kabine opremljene s stikalom, povezanim z zunanjo lučjo. Ta omogoča pokuševalcu, da osebi, ki spremlja pokušnjo, sporoči, da je pokušnjo končal, ali da zahteva nove vzorce, da manjka del opreme, da je opazil kakšne nepravilnosti, da želi kakšne podatke in podobno, ne da bi motil druge pokuševalce.

<sup>(1)</sup> Barva sobe in njena osvetlitev lahko vplivata na rezultate senzorične analize.

#### 4.2 Velikost

Kabine morajo biti ustrezno velike in udobne, priporočene mere pa so:

- širina:
  - 0,75 m (brez korita)
  - 0,85 m (s koritom);
- dolžina:
  - 0,50 m (miza)
  - 0,20 m dodatno za pregrado;
- višina pregrade:
  - najmanj 0,60 m od mize;
- višina mize:
  - 0,75 m.

#### 4.3 Ureditev

Površina mize mora biti taka, da jo je možno enostavno čistiti.

Del površine se uporablja kot izplakovalnik s tekočo pitno vodo. Če to ni izvedljivo, je na tem prostoru lahko plitva posoda, pljuvalnik ali podobna posoda.

Kadar morajo imeti med pokušnjo vzorci stalno temperaturo, ki je nad ali pod sobno temperaturo, se uporabi vodno kopel, grelnik ipd.

Na višini 1,10 m se lahko namesti polica, namenjena različnim potrebščinam (kozarcem, drobnemu priboru ipd.).

Če ureditev kabin v degustacijskih sobah to dovoljuje, je priporočljivo namestiti naprave za lažje podajanje vzorcev. To so lahko drsna vratca (slika 1), vrtljiva navpična vratca (slika 2), primerna za kozarce ali skodelice (visoke posode), v primeru majhnih vzorcev pa vratca, ki se odpirajo vodoravno (slika 3). Odprtina naj bo dovolj velika, da se lahko skozi njo poda pladenj in kozarce z vzorci.

Glej sliko 4 za vzorec degustacijske sobe in dodatnih prostorov.

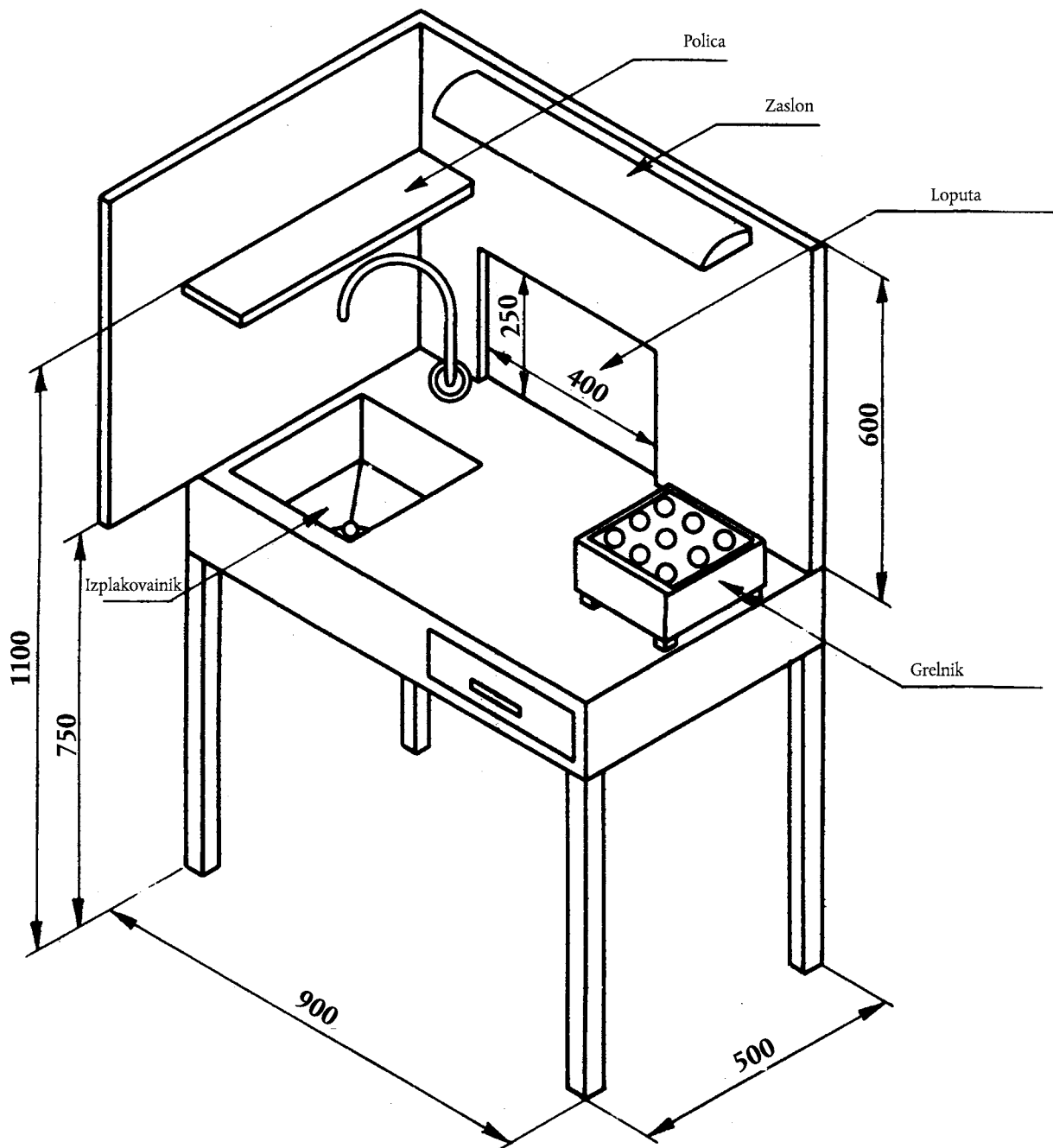
#### 5. DODATNI PROSTORI

Če je dovolj prostora, je priporočljivo zagotoviti ločene prostore za pripravo vzorcev, pripravo kozarcev ali naprave ter za razgovor pred pokušnjo in po njej. Ti prostori naj bodo čisti. Vonji, hrup ali pogovori ne smejo motiti dela ocenjevalcev v degustacijski sobi.

*Opomba:* opisani pogoji so idealni. Če ni možna takšna ureditev, se lahko opravlja senzorične analize v prostorih, ki ustrezajo minimalnim predpisanim pogojem (osvetlitev, temperatura, hrup, vonji) z namestitvijo mobilnih kabin iz sestavljenih elementov tako, da so lahko pokuševalci ločeni med seboj.

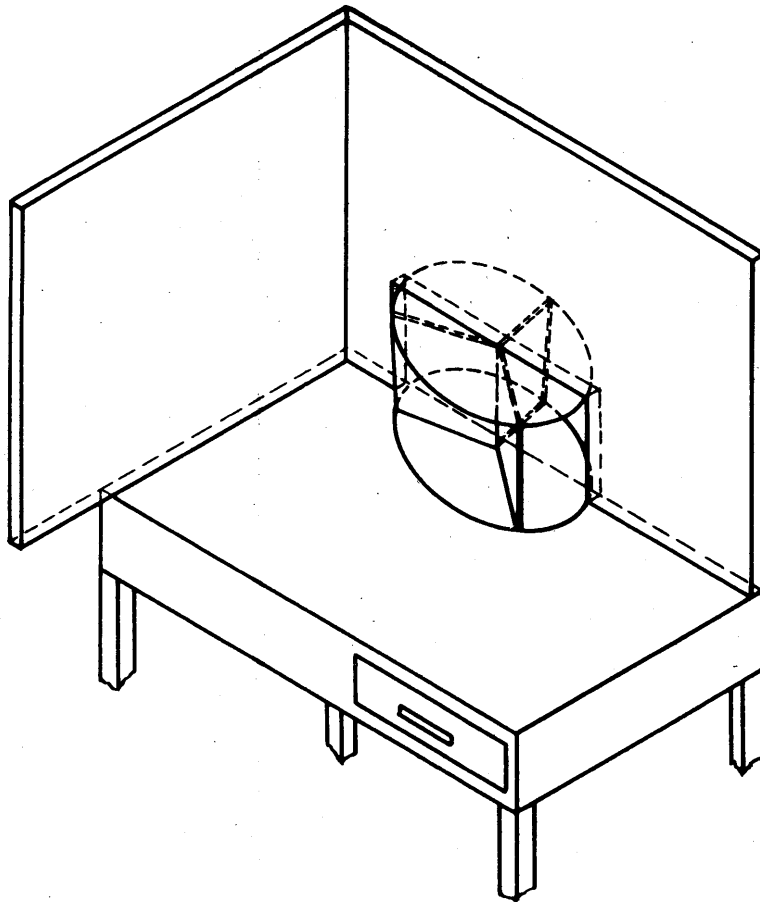
## UREDITEV OCENJEVALNE KABINE

Slika 1



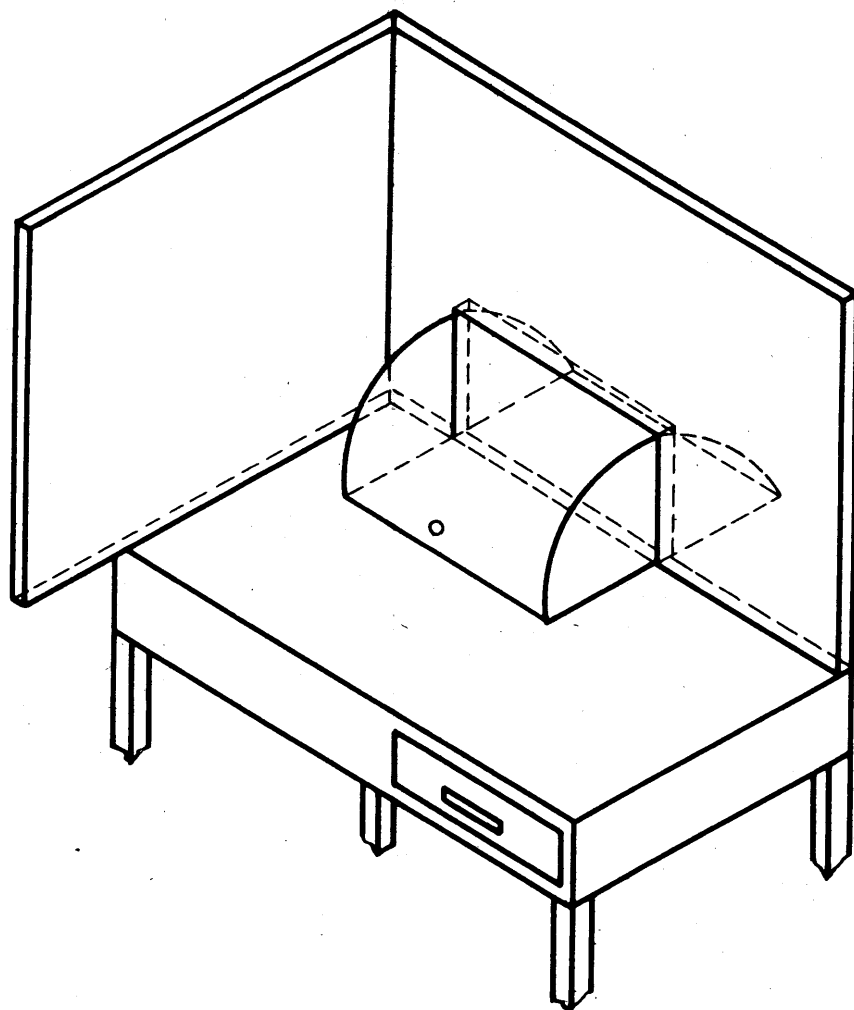
## VRTLJIVA NAVPIČNA VRATCA ZA PODAJANJE VZORCEV

Slika 2



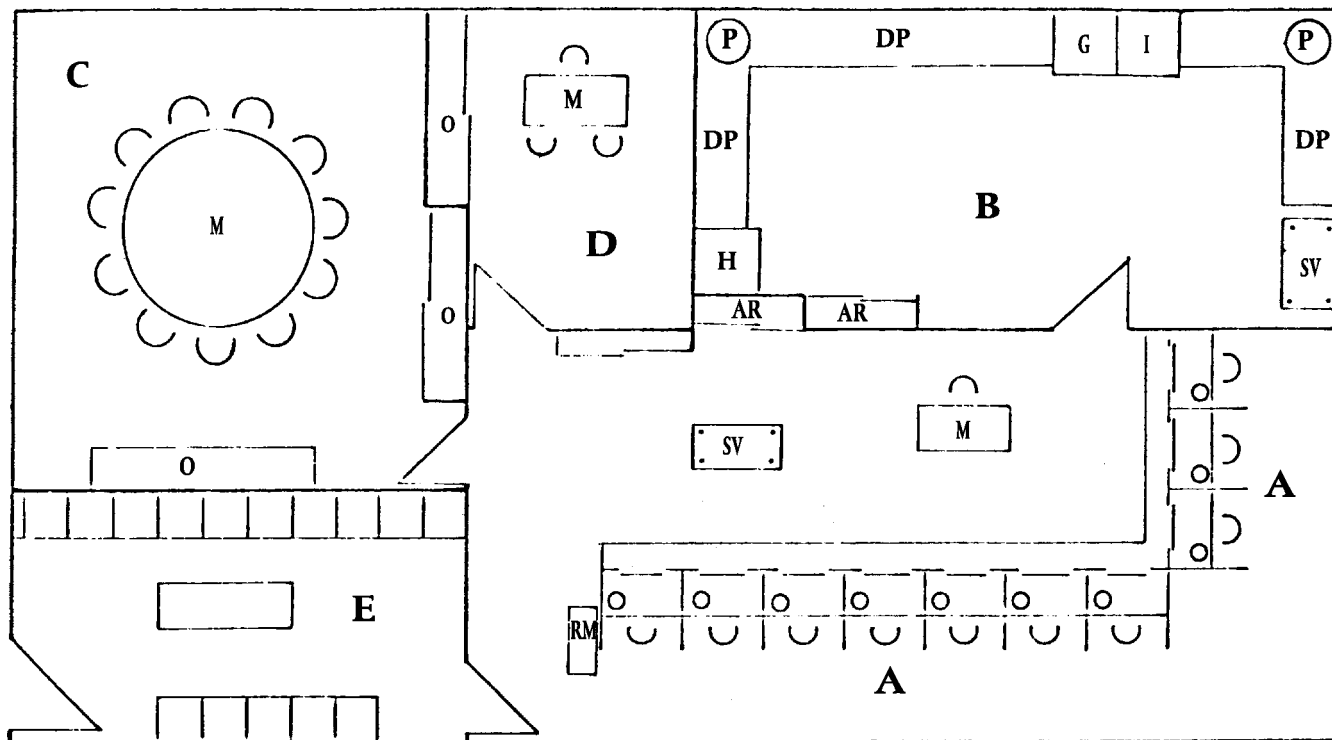
## VODORAVNA VRATCA ZA PODAJANJE VZORCEV

Slika 3



## LABORATORIJ ZA SENZORIČNO ANALIZO (Primer)

Slika 4 - Primer sobe za senzorično ocenjevanje



- A: ocenjevalne kabine,
- B: prostor za čiščenje pribora in pripravo vzorcev,
- C: prostor za skupinsko delo,
- D: pisarna,
- E: čakalnica,
- H: hladilnik,
- G: grelnik,
- I: izplakovalnik,
- P: pomivalni stroj,
- O: omara,
- SV: servirni voziček,
- RM: razdeljevalno mesto,
- OM: okrogla miza,
- DP: delovna površina.

## PRILOGA XIII

## DOKAZ RAFINACIJE

## 1. NEVTRALIZACIJA IN RAZBARVANJE OLJČNEGA OLJA V LABORATORIJU

## 1.1 Nevtralizacija olja

## 1.1.1 Oprema

- visoka 300-ml čaša,
- laboratorijska centrifuga s 100-ml epruvetami
- 250-ml čaša,
- 100-ml bučke z okroglim dnom,
- litrski lij ločnik.

## 1.1.2 Reagenti

- 12-% vodna raztopina natrijevega hidroksida,
- 1-% etanolna raztopina fenolfaleina,
- čisti heksan,
- čisti propan-2-ol.

## 1.1.3 Postopek

- (a) *Olja z vsebnostjo prostih maščobnih kislin, izraženih kot oleinska kislina, manj kot 30 %*

50 g surovega olja natehemo v 300-ml čašo in ga na vodni kopeli segrejemo do 65 °C. Med stalnim in previdnim mešanje dodamo teoretsko množino 12 % raztopine natrijevega hidroksida, ki je potrebna za nevtralizacijo prostih kislin v olju, povečano za 5 %. Pri temperaturi 65 °C mešamo še 5 minut.

Mešanico prenesemo v 100-ml epruvete za centrifugiranje in med centrifugiranjem odločimo milnato pasto. Dekantirano olje prelijemo v 250-ml čašo in ga speremo s 50-60 ml vrele destilirane vode, ki jo odstranimo z natega. Olje spiramo dokler ne odstranimo vsega preostalega mila (razbarvanje fenolfaleina).

Po tem olje centrifugiramo, da odstranimo morebitno preostalo vodo.

- (b) *Olja z vsebnostjo prostih maščobnih kislin, izraženih kot oleinska kislina, več kot 30 %*

V 1-l lij ločnik natehemo 50 g surovega olja, dodamo 200 ml heksana, 100 ml propan-2-ola in teoretsko množino 12-% raztopine natrijevega hidroksida, ki je potrebna za nevtralizacijo prostih kislin v olju, povečano za 0,3 %.

Močno stresamo 1 minuto. Dodamo 100 ml destilirane vode in ponovno pretresemo ter počakamo, da se plasti ločijo.

Spodnjo plast, ki vsebuje mila, iztočimo; prav tako srednjo plast (iz sluzi in netopnih snovi), ki se včasih pojavi med plastema.

## 1.2 Razbarvanje nevtraliziranega olja

## 1.2.1 Oprema

- trogrla 250-ml bučka z okroglim dnom in brušenimi grli za nastavek:
  - (a) termometer s stopinjskimi razdelki, ki omogoča odčitavanje temperature pri 90 °C;
  - (b) mehansko mešalo, ki obratuje pri 200 do 300 obratih na minuto, delujoče v vakuumu;
  - (c) nastavek za priklop na vakuumsko črpalko,
- vakuumska črpalka z manometrom, ki daje podtlak, 15 do 30 mbar.

### 1.2.2 Postopek

V trogrlo bučko natehtamo približno 100 g nevtraliziranega olja. Vanjo namestimo termometer, povežemo z vakuumom in med nenehnim mešanjem segrejemo na 90 °C. Doseženo temperaturo med mešanjem vzdržujemo vse dokler ne odstranimo vse vode iz olja (približno 30 minut). Potem prekinemo vakuum in dodamo 2 do 3 g diatomejske zemlje.

Bučko ponovno povežemo z vakuumom in pri vakuumu 15 do 30 mbar pri temperaturi 90 °C in z 250 obrati na minuto mešamo še 30 minut.

Še vroče olje filtriramo v termostatorani peči pri 50 do 60 °C.

---

## PRILOGA XIV

## DODATNE OPOMBE 2, 3 IN 4 K POGlavJU 15 KOMBINIRANE NOMENKLATURE

1. „Opomba 2A: Za namene oznak KN1509 in 1510, je oljčno olje samo olje, dobljeno iz oljk in ne vključuje reesterificiranih olj in mešanic oljčnega olja z drugimi olji.

Prisotnost reesterificiranih olj in drugih olj dokažemo z metodami iz Prilog V, VII, IX, X in XII. Analizne značilnosti sterolne in kislinske sestave vseh oljčnih olj oznak KN 1509 in 1510 so v spodnji tabeli.

Tabela I – Kislinska sestava kot delež skupnih kislin		Tabela II – Sterolna sestava kot delež skupnih sterolov	
Miristinska kislina	M 0,1	Holesterol	M 0,5
Linolenska kislina	M 0,9	Brasikasterol	M 0,2
Arašidova kislina	M 0,7	Kampesterol	M 4,0
Eikozanojska kislina	M 0,5	Stigmasterol	< kampesterol
Behenska kislina	M 0,3	Betasitosterol <sup>(1)</sup>	m 93,0
Lignocerinska kislina	M 0,5	Δ 7– stigmasterol	M 0,5

M = maksimalno

m = minimalno

<sup>(1)</sup> Delta-5-23

stigmasterol + holesterol + betasitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5-24-stigmastadienol.

- Opomba 2B: „Deviško oljčno olje“ je samo olje, pridobljeno iz oljk z mehanskimi ali drugimi fizikalnimi postopki pri pogojih, posebej termičnih, ki ne vodijo do kvara olja in ki niso bila podvržena drugim postopkom kot le pranju, dekantiranju, centrifugiranju ali filtriranju, z izjemo olj, ekstrahiranih iz oljk s topli (1510), omenjenih v spodnjih Sekcijah I in II.

- I. Za primere iz podpoglavja 1509 10 10 je „deviško oljčno olje neprimerno za prehrano“, ne glede na kislost, olje z:

- (a) vsebnostjo alifatskih alkoholov, ki ne presega 400 mg/kg;
- (b) vsebnostjo eritrodiole in uvaole, ki ne presega 4,5 %;
- (c) vsebnostjo nasičenih maščobnih kislin na položaju 2 v trigliceridih, ki ne presega 1,3 % in/ali
- (d) eno od naslednjih značilnosti:
- (d1) peroksidnim številom, ki presega 20 meq O<sub>2</sub>/kg;
- (d2) skupno vsebnostjo hlapnih halogeniranih topil, ki presega 0,2 mg/kg in posameznega halogeniranega topila, ki presega 0,1 mg/kg;
- (d3) K<sub>270</sub> (100) ekstinkcijskim koeficientom, višjim od 0,250 ali po obdelavi olja z aktiviranim aluminijevim oksidom, ne višjim od 0,11. Nekatera olja z vsebnostjo prostih maščobnih kislin več kot 3,3 g na 100 g imajo lahko v skladu z metodo iz Priloge XV K<sub>270</sub> ekstinkcijski koeficient višji od 0,11. V takem primeru morajo po laboratorijski nevtralizaciji in razbarvanju imeti naslednje značilnosti:

- $K_{270}$  ekstinkcijski koeficient ne večji kot 1,20;
- razliko ekstinkcijskih koeficientov ( $\Delta K$ ) <sup>(1)</sup> v območju 270 nm večjo od 0,01, vendar ne večjo od 0,16;
- (d4) senzorične značilnosti z vključenimi zaznavnimi napakami, ki presegajo meje sprejemljivosti in s senzorično oceno manjšo od 3,5.

II. Za primere iz podpoglavja 1509 10 90 je ‚deviško olje‘ olje z naslednjimi značilnostmi:

- (a) vsebnostjo kislin, izraženih kot oleinska kislina, ki ne presega 3,3 g na 100 g;
- (b) s peroksidnim številom, ki ne presega 20 mekv  $O_2$ /kg;
- (c) z vsebnostjo alifatskih alkoholov, ki ne presega 300 mg/kg;
- (d) s skupno vsebnostjo hlapnih halogeniranih topil, ki ne presega 0,2 mg/kg in posameznega halogeniranega topila, ki ne presega 0,1 mg/kg;
- (e) s  $K_{270}$  ekstinkcijskim koeficientom, ki ni višji od 0,250 in ki ni višji od 0,10 po obdelavi olja z aktiviranim aluminijevim oksidom <sup>(2)</sup>;
- (f) z razliko ekstinkcijskih koeficientov ( $\Delta K$ ) v 270 nm območju, ki ni večja od 0,010;
- (g) s senzoričnimi značilnostmi, ki lahko vsebujejo zaznavne napake znotraj meja sprejemljivosti in senzorično oceno večjo od 3,5;
- (h) z vsebnostjo eritrodiole in uvaola, ki ne presega 4,5 %;
- (i) z vsebnostjo nasičenih maščobnih kislin na položaju 2 v trigliceridih, ki ne presega 1,3 %.

**Opomba 2C:** Podpoglavje 1509 90 00 zajema oljna olja, ki ustrezajo podpoglavju 1509 10 10 ali 1509 10 90, ne glede na dejstvo, da so lahko mešana z deviškim oljčnim oljem in z naslednjimi značilnostmi:

- (a) vsebnostjo kislin, izraženih kot oleinska kislina, ki ne presega 3,3 g na 100 g;
- (b) vsebnostjo alifatskih alkoholov, ki ne presega 350 mg/kg;
- (c)  $K_{270}$  ekstinkcijskim koeficientom (100), višjim od 0,250 a ne večjim od 1,20 in ki ni višji od 0,10 po obdelavi olja z aktiviranim aluminijevim oksidom;
- (d) z razliko ekstinkcijskih koeficientov ( $\Delta K$ ) v 270 nm območju, večjo od 0,010 a ne večjo od 0,160;
- (e) vsebnostjo eritrodiole in uvaola, ki ne presega 4,5 %;
- (f) vsebnostjo nasičenih maščobnih kislin na položaju 2, ki ne presega 1,5 %.

**Opomba 2D:** Za primere iz podpoglavja 1510 00 10 je ‚surovo olje‘, predvsem olje oljčnih tropin, olje z naslednjimi značilnostmi:

- (a) z vsebnostjo kislin, izraženih kot oleinska kislina, več kot 2 g na 100 g;
- (b) z vsebnostjo eritrodiole in uvaola, ki presega 12 %;
- (c) z vsebnostjo nasičenih maščobnih kislin na položaju 2 v trigliceridih, ki ne presega 1,8 %.

**Opomba 2E:** Olja iz podpoglavja 1510 00 90 vključujejo olja, pridobljena iz olj, umeščenih v podpoglavje 1510 00 10, ne glede na dejstvo, da so lahko mešana z deviškim oljčnim oljem in ki nimajo značilnosti iz sekcij I in II, a z vsebnostjo nasičenih maščobnih kislin na položaju 2 v trigliceridih, ki ne presega 2 %.

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

$K_m$  je ekstinkcijski koeficient pri valovni dolžini vrha absorpcijske krivulje v 270 nm območju.

$K_{m-4}$  in  $K_{m+4}$  sta ekstinkcijska koeficienta pri valovnih dolžinah, zmanjšanih za 4 nm in zvišanih za 4 nm glede na valovno dolžino  $K_m$ .

<sup>(2)</sup> Če  $K_{270}$  presega 0,25, moramo opraviti nov test, ki sledi čiščenju na aluminijevem oksidu.  $K_{270}$  ne sme preseči 0,10.“

2. „Opomba 3: Podpoglavja 1522 00 31 in 1522 00 39 ne zajemajo:
    - (a) tropin po obdelavi olje vsebujočih snovi z jednim številom, določenim v skladu z metodo iz Priloge XVI, ki je nižje od 70 ali višje od 100;
    - (b) tropin po obdelavi olje vsebujočih snovi z jednim številom, ki je nižje od 70 ali višje od 100, pri katerih je površina vrha za ( $\beta$ )-sitosterol, določena v skladu s Prilogo Uredbe, ki je omenjena v dodatni Opombi 4, manj kot 93 % površin vrhov preostalih sterolov.“
  3. „Opomba 4: Analizne metode za določitev omenjenih značilnosti so v prilogah Uredbe (EGS) št. 2568/91.“
-

## 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  $103 \pm 2$  °C, z možnostjo prepihanja 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 %.

## 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  $103 \pm 2$  °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 nekolikokrat 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  $103 \pm 2$  °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:

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

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 določitvev, 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  $j\delta$  = 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 določitvev.

## 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.

Tabela 1

Pričakovano jodno 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 jodnim številom nižjim od 150 pustimo stati na temnem eno uro; vzorce z jodnim 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

Jodno 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;

$V_2$  = 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).