

31991R2568

5.9.1991.

SLUŽBENI LIST EUROPSKIH ZAJEDNICA

L 248/1

UREDBA KOMISIJE (EEZ) br. 2568/91**od 11. srpnja 1991.****o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize**

KOMISIJA EUROPSKIH ZAJEDNICA,

uzimajući u obzir Ugovor o osnivanju Europske ekonomske zajednice,

uzimajući u obzir Uredbu Vijeća br. 136/66/EEZ od 22. rujna 1966. o osnivanju zajedničke organizacije tržišta ulja i masti ⁽¹⁾, kako je zadnje izmijenjena Uredbom (EEZ) br. 3577/90 ⁽²⁾, a posebno njezin članak 35.a,

budući da Prilog Uredbi br. 136/66/EEZ sadrži opise i definicije maslinovog ulja i ulja komine maslina koje se stavlja na tržište unutar svake države članice, kojima se trguje unutar Zajednice i kojima se trguje s trećim zemljama;

budući da, u smislu međusobnog razlikovanja različitih vrsta ulja, fizikalna i kemijska svojstva svakog od njih kao i organoleptičke karakteristike djevičanskih ulja trebaju biti definirane kako bi se osigurala čistoća i kvaliteta određenog proizvoda, ne dovodeći u pitanje ostale postojeće odredbe;

budući da prisutnost karakteristika različitih vrsta ulja treba odrediti ujednačeno u cijeloj Zajednici; budući da, u tu svrhu, treba ustanoviti metode kemijske analize i organoleptičkog ocjenjivanja Zajednice; budući da, u tranzicijskom razdoblju, trebaju biti dopuštene druge metode analiza koje se primjenjuju u državama članicama, pod uvjetom da u slučaju kad postoji razlika u rezultatima, odlučujućima će se smatrati oni dobiveni korištenjem zajedničke metode;

budući da definiranje fizikalnih i kemijskih karakteristika maslinovog ulja i metoda analize imaju za nužnu posljedicu izradu izmjena dodatnih bilješki uz Poglavlje 15. kombinirane nomenklature;

budući da metode ocjenjivanja organoleptičkih karakteristika djevičanskog ulja uključuju osnivanje komisije odabranih i obučanih organoleptičkih ocjenjivača; budući da razdoblje potrebno za ustanovljavanje takve strukture treba stoga biti fiksno; budući da, s obzirom na poteškoće na koje će neke

od država članica naići prilikom uvođenja komisije organoleptičkih ocjenjivača, korištenje tih komisija u drugim državama članicama treba dopustiti;

budući da, radi osiguranja ispravnog funkcioniranja sustava oporezivanja koji se primjenjuje pri uvozu komine maslina, treba postaviti jedinstvenu metodu za određivanje sadržaja ulja u tim proizvodima;

budući da, s ciljem da se ne naškodi trgovini, treba sastaviti odredbe za uklanjanje onih ulja koja su bila zapakirana prije stupanja ove Uredbe na snagu, unutar ograničenog vremenskog razdoblja;

budući da je potrebno staviti izvan snage Uredbu Komisije (EEZ) br. 1058/77 ⁽³⁾, kako je zadnje izmijenjena Uredbom (EEZ) br. 1858/88 ⁽⁴⁾;

budući da Upravljački odbor za ulja i masti nije dao svoje mišljenje unutar postavljenog vremenskog roka kojeg je odredio njihov predsjedavajući,

DONIJELA JE OVU UREDBU:

Članak 1.

1. Ulja, čije su karakteristike u skladu s onima postavljenima u točkama 1., 2. i 3. Priloga I. ovoj Uredbi, treba smatrati djevičanskim maslinovim uljem u smislu točke 1. podtočaka (a), (b) i (c) Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ.

2. Ulje, čije su karakteristike u skladu s onima postavljenima u točki 4. Priloga I. ovoj Uredbi, treba smatrati djevičanskim maslinovim uljem lampante u smislu točke 1. podtočke (d) Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ.

3. Ulje, čije su karakteristike u skladu s onima postavljenima u točki 5. Priloga I. ovoj Uredbi, treba smatrati rafiniranim maslinovim uljem u smislu točke 2. Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ.

⁽¹⁾ SL L 172, 30.9.1966., str. 3025/66.

⁽²⁾ SL L 353, 17.12.1990., str. 23.

⁽³⁾ SL L 128, 24.5.1977., str. 6.

⁽⁴⁾ SL L 166, 1.7.1988., str. 10.

4. Ulje, čije su karakteristike u skladu s onima postavljenima u točki 6. Priloga I. ovoj Uredbi, treba smatrati čistim maslinovim uljem u smislu točke 3. Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ.

5. Ulje, čije su karakteristike u skladu s onima postavljenima u točki 7. Priloga I. ovoj Uredbi, treba smatrati uljem komine maslina u smislu točke 4. Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ.

6. Ulje, čije su karakteristike u skladu s onima postavljenima u točki 8. Priloga I. ovoj Uredbi, treba smatrati rafiniranim uljem komine maslina u smislu točke 5. Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ.

7. Ulje, čije su karakteristike u skladu s onima postavljenima u točki 9. Priloga I. ovoj Uredbi, treba smatrati uljem komine maslina u smislu točke 6. Priloga Uredbi br. 136/66/EEZ.

Članak 2.

1. Karakteristike ulja postavljene u Prilogu I. treba odrediti u skladu sa sljedećim metodama analize:

- za određivanje slobodnih masnih kiselina, iskazanih kao postotak oleinske kiseline, metoda postavljena u Prilogu II.,
- za određivanje peroksidnog broja, metoda postavljena u Prilogu III.,
- za određivanje alifatskih alkohola, metoda postavljena u Prilogu IV.,
- za određivanje sadržaja sterola, metoda postavljena u Prilogu V.,
- za određivanje eritrodiole i uvaole, metoda postavljena u Prilogu VI.,
- za određivanje zasićenih masnih kiselina u položaju 2. na trigliceridima, metoda postavljena u Prilogu VII.,
- za određivanje sadržaja trilinoleina, metoda postavljena u Prilogu VIII.,
- za spektrofotometrijsko ispitivanje, metoda postavljena u Prilogu IX.,
- za određivanje sastava masnih kiselina, metoda postavljena u prilogima X.A i X.B,
- za određivanje hlapivih halogeniranih otapala, metoda postavljena u Prilogu XI.,
- za ocjenjivanje organoleptičkih karakteristika djevičanskog maslinovog ulja, metoda postavljena u Prilogu XII.,
- za dokazivanje da je proveden postupak rafiniranja, metoda postavljena u Prilogu XIII.

2. Ocjenjivanje organoleptičkih karakteristika provodi analitičar i, kad je to prikladno, uz pomoć specijalista, u skladu s postupkom opisanim u bilješkama o organoleptičkom ocjenjivanju koje se navode u Prilogu XII. U slučaju kad analiza ukaže

na karakteristike koje se razlikuju od onih koje proizlaze iz opisa proizvoda, uzorak treba ispitati komisija organoleptičkih ocjenjivača u skladu s odredbama Priloga XII.

Svaku drugu analizu treba provesti komisija u skladu s navedenim odredbama.

S ciljem potvrđivanja organoleptičkih karakteristika u vezi s djelatnostima koje se odnose na sustav intervencija, komisija organoleptičkih ocjenjivača provest će ovo ocjenjivanje u skladu s odredbama Priloga XII.

Članak 3.

Do 31. listopada 1992. uvođenje analitičkih metoda koje su predviđene u članku 2. neće spriječiti države članice da primjenjuju ostale iskušane i znanstveno valjane metode pod uvjetom da onim proizvodima za koje se utvrdi da su sukladni s pravilima na snazi koja uređuju metode Zajednice bude dopuštena slobodna trgovina. Prije korištenja ostalih metoda države članice koje su posrijedi obavijestit će o njima Komisiju.

U slučaju kad se jednom od ostalih metoda dobije rezultat koji se razlikuje od onih dobivenih metodom Zajednice, odlučujućima će se smatrati rezultati dobiveni metodom Zajednice.

Članak 4.

1. Za potrebe procjene organoleptičkih karakteristika, države članice osnivaju komisije koje se sastoje od obučanih i odabranih organoleptičkih ocjenjivača u skladu s pravilima utvrđenima metodom navedenom u Prilogu XII.

2. U slučaju kad neka država članica naiđe na poteškoće vezane uz osnivanje komisije na svojem državnom području, može se koristiti uslugama komisije koja djeluje u nekoj drugoj državi članici.

Članak 5.

Dodatne bilješke 2., 3. i 4. uz poglavlje 15. kombinirane nomenklature zamjenjuju se onima sadržanima u Prilogu XIV.

Članak 6.

1. Sadržaj ulja u uljnoj pogači i drugim ostacima maslina koje nastaju ekstrakcijom maslinovog ulja (oznake KN 2306 90 11 i 2306 90 19) utvrđuju se primjenom metoda navedenih u Prilogu XV.

2. Sadržaj ulja na koje se odnosi stavak 1. iskazuje se kao postotak težine ulja u odnosu na težinu suhe tvari.

Članak 7.

Primjenjuju se odredbe Zajednice koje se odnose na prisutnost neželjenih tvari, osim onih na koje upućuje Prilog XI.

Članak 8.

1. Države članice obavještavaju Komisiju o mjerama poduzetima s ciljem provedbe ove Uredbe.

2. Države članice trebaju na početku svakog polugodišta poslati Komisiji izjavu o analitičkim podacima koji se odnose na ispitivanja provedena tijekom prethodnog polugodišnjeg razdoblja.

Rezultate razmatra Upravni odbor za ulja i masti u skladu s postupkom utvrđenim u članku 39. Uredbe br. 136/66/EEZ.

Članak 9.

Uredba (EEZ) br. 1058/77 stavlja se izvan snage.

Članak 10.

1. Ova Uredba stupa na snagu trećeg dana od dana objave u *Službenom listu Europskih zajednica*.

Bez obzira na to, metoda navedena u Prilogu XII. Primjenjuje se od 1. siječnja 1992., osim kad su u pitanju djelatnosti vezane uz sustav intervencija.

2. Ova Uredba ne primjenjuje se na maslinova ulja i ulja komine maslina zapakirana prije stupanja ove Uredbe na snagu i stavljena na tržište do 31. listopada 1992.

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

Sastavljeno u Bruxellesu 11. srpnja 1991.

Za Komisiju
Ray MAC SHARRY
Član Komisije

PRILOZI

Sadržaj

	stranica
Prilog I.: Karakteristike maslinovog ulja	60
Prilog II.: Određivanje slobodnih masnih kiselina	62
Prilog III.: Određivanje peroksidnog broja	64
Prilog IV.: Određivanje sadržaja alifatskih alkohola kapilarnom plinskom kromatografijom	66
Prilog V.: Određivanje sastava i sadržaja sterola kapilarnom plinskom kromatografijom	71
Prilog VI.: Određivanje eritrodiola i uvaola	79
Prilog VII.: Određivanje zasićenih masnih kiselina u položaju 2. na trigliceridima	81
Prilog VIII.: Određivanje sastava trilinoleina	85
Prilog IX.: Spektrofotometrijsko ispitivanje u ultraljubičastom području	89
Prilog X.A: Analiza metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom	92
Prilog X.B: Pripremanje metilnih estera masnih kiselina	100
Prilog XI.: Određivanje hlapivih halogeniranih otapala u maslinovom ulju	104
Prilog XII.: Organoleptička procjena djevičanskog maslinovog ulja	105
Prilog XIII.: Dokazivanje da je proveden postupak rafiniranja	131
Prilog XIV.: Dodatne bilješke 2., 3. i 4. uz poglavlje 15. kombinirane nomenklature	133
Prilog XV.: Sadržaj ulja u komini maslina	136
Prilog XVI.: Određivanje jednog broja	138

PRILOG I.

KARAKTERISTIKE MASLINOVOG ULJA

Vrsta	Kiselost %	Peroksidni broj meq/O ₂ /kg	Halogenirana otapala mg/kg ⁽¹⁾	Alifatski alkoholi mg/kg	Zasićene masne kiseline u položaju 2. na trigliceridima %	Eritrodiool + uvaol %	Trilinolein %	Kolesterol %	Brasikasterol %	Kampesterol %	Stigmasterol %	Beta-sitosterol % ⁽²⁾	Delta-7-stigmasterol %	Ukupno sterola mg/kg
1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje	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	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1000
2. Djevičansko maslinovo ulje	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	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1000
3. Obično djevičansko maslinovo ulje	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	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1000
4. Djevičansko maslinovo ulje 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 1000
5. Rafinirano maslinovo ulje	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	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1000
6. Maslinovo ulje	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	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1000
7. Sirovo ulje komine maslina	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 2500
8. Rafinirano ulje komine maslina	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	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1800
9. Ulje komine maslina	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	< Kamp.	m 93,0	M 0,5	m 1800

M = maksimum, m = minimum

⁽¹⁾ Ukupna gornja granica za sastojke otkrivene detektorom zahvata elektrona. Gornja granica za pojedinačno otkrivene sastojke iznosi 0,10 mg/kg.

⁽²⁾ Delta-5,23-stigmastadiernol + klerosterol + sitosterol + sitostanol + delta-5-avenosterol + delta-5,24-stigmastadienol.

Bilješka:

Ako je ijedna karakteristika nekog ulja izvan određenih granica, to se ulje ne smije prihvatiti.

Vrsta	Sastav kiselina						K ₂₃₂	K ₂₇₀	K ₂₇₀ s aluminijevim oksidom ⁽¹⁾	Delta K	Senzorska ocjena
	Miristinska %	Linolenska %	Arahinska %	Eikozenska %	Behenska %	Lignocerin %					
1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje	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. Djevičansko maslinovo ulje	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. Obično djevičansko maslinovo ulje	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. Djevičansko maslinovo ulje 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 maslinovo ulje	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. Maslinovo ulje	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. Sirovo ulje komine maslina	M 0,1	M 0,9	M 0,7	M 0,5	M 0,3	M 0,5	—	—	—	—	—
8. Rafinirano ulje komine maslina	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. Ulje komine maslina	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	—

Bilješka:

(¹)U slučaju ulja čija je kiselost (sadržaj slobodnih masnih kiselina) veća od 3,3 %, ako je K₂₇₀ više od 0,11 nakon prelaska preko aluminijevog oksida, potrebno je provesti ispitivanje rafiniranja na koje upućuje Prilog XIII. Za potrebe utvrđivanja čistoće, u slučaju kad K₂₇₀ prelazi granicu za kategoriju koja je u pitanju, treba ga ponovno odrediti nakon prelaska preko aluminijevog oksida.

PRILOG II.

ODREĐIVANJE SLOBODNIH MASNIH KISELINA

1. ODREĐIVANJE KISELOSTI

Određivanje slobodnih masnih kiselina u maslinovim uljima. Sadržaj slobodnih masnih kiselina iskazuje se kao kiselost izračunata na uobičajeni način.

1.1. **Princip**

Uzorak se otopi u mješavini otapala i postojeće se slobodne masne kiseline odrede titracijom s otopinom kalijevog hidroksida u etanolu.

1.2. **Reagensi**

Svi reagensi trebaju biti priznate analitičke kvalitete, a voda koja se koristi treba biti bilo destilirana ili odgovarajuće čistoće.

1.2.1. Dietil eter; 95 % etanol (V/V), mješavina dijelova jednakih po volumenu.

Bilješka: Dietil eter je visoko zapaljiv i može stvoriti eksplozivne peroksidge. Prilikom njegova korištenja treba biti posebno pažljiv.

Neutralizirati točno u trenutku korištenja otopinom kalijevog hidroksida (1.2.2.) uz dodatak 0,3 ml otopine fenolfaleina (1.2.3.) na 100 ml mješavine.

Bilješka: Ako nije moguće koristiti dietil eter, može se koristiti mješavina otapala koja sadrži etanol i toluen. Ako je potrebno, etanol se može zamijeniti 2-propanolom.

1.2.2. Kalijev hidroksid, titrirana etanolna otopina, c(KOH) približno 0,1 mol/l ili, ako je potrebno, c(KOH) približno 0,5 mol/l.

Neposredno prije korištenja treba biti poznata i provjerena točna koncentracija otopine kalijevog hidroksida u etanolu. Treba koristiti otopinu koja je pripremljena najmanje pet dana prije korištenja i dekantirana u smeđe staklene boce s gumenim čepom. Otopina treba biti bezbojna ili boje slame.

Bilješka: Stabilna bezbojna otopina kalijevog hidroksida može se pripremiti na sljedeći način: zavrite 1 000 ml etanola s 8 g kalijevog hidroksida i 0,5 g aluminijskih strugotina i pustite da vrije pod povratnim hladilom sat vremena. Odmah destilirajte. Otopite potrebnu količinu kalijevog hidroksida u destilatu. Pustite da odstoji nekoliko dana i zatim dekantirajte kako biste odvojili bistru, supernatantnu tekućinu od nataloženog kalijevog karbonata.

Otopina se, također, može pripremiti bez destiliranja, na sljedeći način: na 1 000 ml etanola dodajte 4 ml aluminijevog butilata i pustite mješavinu da odstoji nekoliko dana. Dekantiranjem odvojite supernatantnu tekućinu i u njoj otopite potrebnu količinu kalijevog hidroksida. Otopina je spremna za korištenje.

1.2.3. Otopina 10 g/l fenolfaleina u 95 do 96 % etanolu (v/v) ili otopina 20 g/l alkalnog modrila (u slučaju snažno obojenih masnoća) u 95 do 96 % etanolu (volumenski).

1.3. **Oprema**

Uobičajena laboratorijska oprema, koja uključuje:

1.3.1. analitičku vagu;

1.3.2. Erlenmeyerovu tikvicu volumena 250 ml;

1.3.3. graduiranu biretu volumena 10 ml, s podjelom po 0,05 ml.

1.4. **Postupak**

1.4.1. Pripremanje uzoraka za ispitivanje

(Ispitivanje treba provoditi na filtriranom uzorku. U slučaju kad vlaga i nečistoća zajedno ne prelaze 1 %, treba koristiti uzorak bez dodatnog obrađivanja; u slučaju kad su veći od 1 %, treba ga filtrirati.)

1.4.2. Uzimanje uzorka

Uzorak treba odabrati ovisno o pretpostavljenom kiselinskom broju u skladu sa sljedećom tablicom:

Očekivani kiselinski broj	Masa uzorka (g)	Preciznost vaganja (g)
< 1	20	0,05
1 do 4	10	0,02
4 do 15	2,5	0,01
15 do 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Uzorak treba odvagati u Erlenmeyerovoj tikvici (1.3.2.).

1.4.3. Određivanje

Uzorak (1.4.2.) treba otopiti u 50 do 150 ml prethodno neutralizirane mješavine dietil etera i etanola (1.2.1.).

Titirati uz miješanje 0,1 mol/l otopinom kalijevog hidroksida (1.2.2.) (vidjeti bilješku 2.) dok se ne promijeni boja indikatora (ružičasta boja fenolftaleina treba biti postojana najmanje 10 sekundi).

Bilješka 1. Titrirana otopina kalijevog hidroksida u etanolu (1.2.2.) može se zamijeniti vodenom otopinom kalijevog ili natrijevog hidroksida pod uvjetom da volumen dodane vode ne prouzroči fazno razdvajanje.

Bilješka 2. Ako potrebna količina otopine kalijevog hidroksida od 0,1 mol/l bude veća od 10 ml, treba koristiti otopinu od 0,5 mol/l.

Bilješka 3. Ako otopina tijekom titriranja postane mutna, treba dodati dovoljno otapala (1.2.1.) da bi se dobila bistra otopina.

1.5. Kiselost: iskazana kao postotak oleinske kiseline

Kiselost izražena u težinskim postocima jednaka je:

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

pri čemu je:

V = volumen otopine kalijevog hidroksida utrošen za titriranje, u mililitrima;

c = točna koncentracija u mol po litri korištene otopine kalijevog hidroksida za titriranje;

M = molarna masa u gramima po molu kiseline korištene za iskazivanje rezultata (= 282);

m = masa uzorka u gramima.

Kao rezultat treba uzeti aritmetički prosjek dvaju provedenih izračuna.

PRILOG III.

ODREĐIVANJE PEROKSIDNOG BROJA

1. OPSEG

Ova norma opisuje metodu za određivanje peroksidnog broja ulja i masti.
2. PODRUČJE PRIMJENE

Ova norma primjenjuje se na ulja i masti životinjskog i biljnog podrijetla.
3. DEFINICIJA

Peroksidni broj je količina onih tvari u uzorku, iskazanih u obliku miliekvivalenata aktivnog kisika na kilogram, koji pod opisanim radnim uvjetima oksidiraju kalijev jodid.
4. PRINCIP

Reakcija ispitivanog dijela uzorka u otopini octene kiseline i kloroforma s otopinom kalijevog jodida. Titriranje oslobođenog joda standardiziranom otopinom natrijevog tiosulfata.
5. OPREMA

Sva oprema koja se koristi ne smije sadržavati tvari koje uzrokuju redukciju ili oksidaciju.

Bilješka: Površinu podloge ne zamastiti.
- 5.1. Staklena odmjerna posudica volumena 3 ml.
- 5.2. Tikvice s užim grlom i čepom, volumena približno 250 ml, prethodno osušene i ispunjene čistim, suhim, inertnim plinom (dušikom ili, još bolje, ugljičnim dioksidom).
- 5.3. Graduirana bireta volumena 25 ili 50 ml, s podjelom po 0,1 ml.
6. REAGENSI
- 6.1. Kloroform, kvalitete analitičkog reagensa, očišćen od kisika propuhivanjem strujom čistog, suhog inertnog plina.
- 6.2. Ledena octena kiselina, kvalitete analitičkog reagensa, očišćena od kisika propuhivanjem strujom čistog, suhog inertnog plina.
- 6.3. Kalijev jodid, zasićena vodena otopina, svježe pripremljena, bez joda i jodata.
- 6.4. Precizno standardizirana vodena otopina natrijevog tiosulfata 0,01 ili 0,002 mol/l, standardizirana neposredno prije korištenja.
- 6.5. Škrobna otopina, vodena otopina 10 g/l, svježe pripremljena korištenjem prirodnog topivog škroba.
7. UZORAK

Trba paziti da uzorak bude pohranjen na tamnom i hladnom mjestu u potpuno ispunjenim staklenim posudama, hermetički zatvorenima staklenim ili plutenim čepovima.
8. POSTUPAK

Ispitivanje treba provesti pri difuznom dnevnom svjetlu ili pod umjetnim svjetlom. U staklenoj odmjernoj posudici (5.1.), ili, ako to ne uspije, u tikvici (5.2.), treba izvagati masu uzorka s preciznošću od 0,001 g, u skladu sa sljedećom tablicom, u skladu s očekivanim peroksidnim brojem:

Očekivani peroksidni broj (meq)	Težina ispitivanog dijela uzorka (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

Tikvicu (5.2.) treba odčepiti i u nju staviti staklenu odmjernu posudicu koja sadrži ispitivani dio uzorka. Dodati 10 ml kloroforma (6.1.). Miješanjem brzo otopiti uzorak. Dodati 15 ml octene kiseline (6.2.), zatim 1 ml otopine kalijeveg jodida (6.3.). Brzo začepiti, protresti jednu minutu i odložiti da odleži točno pet minuta na tamnom mjestu i na temperaturi između 15 i 25 °C.

Dodati približno 75 ml destilirane vode. Titrirati oslobođeni jod otopinom natrijevog tiosulfata (6.4.) (otopina 0,002 mol/l za očekivane vrijednosti niže od 12 i otopina 0,01 mol/l za očekivane vrijednosti više od 12), snažnim protresanjem uz korištenje škrobne otopine (6.5.) kao indikatora.

Treba provesti dva određivanja na istom uzorku.

Istodobno treba provesti slijepu probu. Ako rezultat slijepa probe prelazi 0,05 ml 0,01 mol/l otopine natrijevog tiosulfata (6.4.), treba zamijeniti onečišćeni reagens.

9. ISKAZIVANJE REZULTATA

Peroksidni broj (PB) iskazan u miliekvivalentima aktivnog kisika na kilogram dan je sljedećom formulom:

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

pri čemu je:

V = volumen standardizirane otopine natrijevog tiosulfata (6.4.) utrošen za ispitivanje, iskazan u mililitrima, ispravljen rezultatom za slijepu probu;

T = točna molarnost korištene otopine natrijevog tiosulfata (6.4.);

m = masa ispitivanog dijela uzorka u gramima.

Kao rezultat treba uzeti aritmetički prosjek dvaju provedenih određivanja.

PRILOG IV.

ODREĐIVANJE SADRŽAJA ALIFATSKIH ALKOHOLA KAPILARNOM PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. PREDMET
Ovaj postupak opisuje metodu za određivanje sadržaja alifatskih alkohola u uljima i mastima.
2. PRINCIP METODE
Masna tvar s dodatkom 1-eikozanola koji služi kao interni standard, saponificira se otopinom kalijevog hidroksida u etanolu i zatim se neosapunjiva tvar ekstrahira dietilnim eterom.

Alkoholna frakcija odjeljuje se od neosapunjive tvari kromatografijom na podlozi od silikagela impregniranog kalijevim hidroksidom; alkoholi koji se dobiju sa silikagela transformiraju se u trimetilsilil etere i analiziraju kapilarnom plinskom kromatografijom.
3. OPREMA
 - 3.1. Tikvica okruglog dna volumena 250 ml s povratnim hladilom i brušenim staklenim nastavcima.
 - 3.2. Lijeveci za odjeljivanje volumena 500 ml.
 - 3.3. Tikvice volumena 250 ml.
 - 3.4. Kromatografska komora za tankoslojnu kromatografsku analizu, za staklene ploče veličine 20 x 20 cm.
 - 3.5. Ultraljubičasta svjetlost valne duljine 366 ili 254 nm, za ispitivanje TLC ploča.
 - 3.6. Mikroštrcaljka za unos 100 μ l i 500 μ l.
 - 3.7. Stakleni lijeveci za filtriranje od sinter-stakla s poroznom pločom G 3 (poroznost između 15 i 40 μ m) približnog promjera 2 cm i približne visine 5 cm, primjereni za filtriranje pod vakuumom i 12/21 brušeni muški spoj.
 - 3.8. Vakuumska tikvica volumena 50 ml s 12/21 ženskim spojem od brušenog stakla za korištenje s lievkom za filtriranje (3.7.).
 - 3.9. Epruveta volumena 10 ml s konusnim dnom i ručicom.
 - 3.10. Plinski kromatograf za korištenje s kapilarnom kolonom i opremljen sustavom za razdvajanje koji se sastoji od:
 - 3.10.1. termostatske komore za kolone (peć) koja može održavati željene temperature uz točnost od ± 1 °C;
 - 3.10.2. termostatski sklop za uparavanje (injektor) od silaniziranog stakla;
 - 3.10.3. plameno-ionizacijski detektor i pretvarač s pojačalom;
 - 3.10.4. snimač-integrator za aktivnosti s pretvaračem s pojačalom (3.10.3.), s vremenom reakcije koje nije dulje od jedne sekunde i s varijabilnom brzinom papira.
 - 3.11. Staklena ili kvarcna kapilarna kolona duljine između 20 i 30 m, unutarnjeg promjera između 0,25 i 0,32 mm, s SE-52 ili SE-54 ili odgovarajućom tekućom fazom, s debljinom filma između 0,10 i 0,30 μ m.
 - 3.12. Mikroštrcaljka za plinsku kromatografiju, volumena 10 μ l s tvrdom iglom (od kaljenog stakla).
4. REAGENSI
 - 4.1. Kalijev hidroksid, približno 2 mol/l otopina u etanolu: 130 g kalijevog hidroksida (minimalne koncentracije 85 %) otopi se, uz hlađenje, u 200 ml destilirane vode, a zatim se nadopuni etanolom do jedne litre. Otopinu treba čuvati u dobro začepljenoj boci od tamnog stakla.
 - 4.2. Dietilni eter, analitičke čistoće.
 - 4.3. Bezvodni natrijev sulfat, analitičke čistoće.

- 4.4. Silikagel TLC staklene ploče, bez indikatora fluorescencije, debljine 0,25 mm (mogu se nabaviti u slobodnoj trgovini).
- 4.5. Kalijev hidroksid, približno 0,2 mol/l otopina u etanolu; 13 g kalijevog hidroksida otopi se u 20 ml destilirane vode i nadopuni se etanolom do jedne litre.
- 4.6. Benzen, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
- 4.7. Aceton, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
- 4.8. Heksan, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
- 4.9. Dietilni eter, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
- 4.10. Kloroform, za kromatografiju.
- 4.11. Referentna otopina za tankoslojnu kromatografiju: mješavina 5 % C₂₀ do C₂₈ alkohola u kloroformu.
- 4.12. 0,2 %-tna otopina 2,7-diklorofluoresceina u etanolu. Ovo se može učiniti blago lužnatim dodavanjem nekoliko kapi otopine 2 mol/l kalijevog hidroksida.
- 4.13. Bezvodni piridin, za kromatografiju.
- 4.14. Heksametildisilazan.
- 4.15. Trimetilklorosilan.
- 4.16. Standardne otopine trimetilsilil etera alifatskih alkohola od C₂₀ do C₂₈. Može ih se pripremiti od mješavina čistih alkohola u trenutku kad su potrebni za korištenje.
- 4.17. 0,1 %-tna (m/v) otopina 1-eikozanola u CHCl₃ (interni standard).
- 4.18. Plinovi nosači: vodik i helij, kromatografske čistoće.
- 4.19. Pomoćni plinovi:
 - vodik, kromatografske čistoće,
 - zrak, kromatografske čistoće.
5. POSTUPAK
- 5.1. Pripremanje neosapunjive tvari.
 - 5.1.1. Pomoću mikroštrcaljke od 500 µl treba u tikvicu s okruglim dnom volumena 250 ml ubrizgati volumen 0,1 %-tne otopine 1-heneikozanola (4.17.) (može se također koristiti 1-eneikozanol) koja sadrži količinu 1-eikozanola koja je približno jednaka 10 % sadržaja alifatskih alkohola u onom dijelu uzorka koji će se uzeti za analizu. Primjerice, na 5 g uzorka dodati 250 µl 0,1 %-tne otopine 1-eikozanola ako se radi o maslinovom ulju ili sjemenskom ulju i 1 500 µl ako se radi o ulju komine maslina. Interni standard treba osušiti isparivanjem u atmosferi dušika.

U tikvicu treba odmjeriti približno 5 g suhog, filtriranog uzorka.
 - 5.1.2. Dodaje se 50 ml 2 mol/l otopine kalijevog hidroksida u etanolu, namješta se povratno hladilo i uređaj zagrijava do točke slabog vrenja na parnoj kupelji uz neprekidno miješanje tijekom cijelog zagrijavanja, dok se ne završi saponificiranje (otopina postane bistra). Zagrijavanje se nastavlja još 20 minuta, a zatim se kroz hladilo dodaje 50 ml destilirane vode, nakon čega se hladilo odvaja, a tikvica se ohladi na približno 30 °C.
 - 5.1.3. Sadržaj tikvice se kvantitativno prenese u lijevak za odjeljivanje volumena 500 ml i opere s 2 x 25 ml destilirane vode. Dodaje se približno 80 ml dietilnog etera, sve se žestoko protrese 30 sekundi i zatim odloži da se rasloji u dvije faze (bilješka 1.).

Donja vodena faza prenosi se u drugi lijevak za odjeljivanje. U vodenoj fazi obavljaju se još dvije ekstrakcije, na jednak način, uz korištenje između 60 i 70 ml dietilnog etera za svaku.

Bilješka 1. Emulzije se mogu odstraniti dodavanjem (postupkom prskanja) malih količina etilnog alkohola ili metilnog alkohola.
 - 5.1.4. Ekstrakti dietilnog etera miješaju se u lijevku za odjeljivanje i ispiru destiliranom vodom (u obrocima od 50 ml) dok voda kojom se ispiralo ne pokaže neutralnu reakciju.

Odbacite vodenu fazu a eter-fazu osušite bezvodnim natrijevim sulfatom i profiltrirajte u tikvicu volumena 250 ml koja je prethodno izvagana, a lijevak i filtre operite malim količinama dietilnog etera koje se dodaju na ukupnu količinu.

5.1.5. Eter se isparuje nježnim zagrijavanjem na nekoliko ml, a zatim se suši pod blagim vakuumom ili pod strujom dušika; sušenje se završava u sušioniku na 100 °C na približno 15 minuta, a nakon hlađenja u eksikatoru mjeri se ostatak.

5.2. Odjeljivanje alkoholnih frakcija

5.2.1. Pripremanje osnovnih ploča: TLC ploče (4.4.) potpuno se urone u otopinu 0,2 mol/l kalijevog hidroksida (4.5.) na 10 sekundi, zatim ih se ostavi da se dva sata suše u digestoru, a na kraju ih se stavlja u sušionik na 100 °C na sat vremena.

Ploče se zatim vade iz sušionika i pohranjuju u eksikator napunjen kalcijevim kloridom dok ne budu potrebne za uporabu. Ploče obrađene na ovaj način moraju se iskoristiti unutar dva tjedna.

Bilješka 2. Kad se za odjeljivanje alkoholnih frakcija koriste osnovne silikagel ploče, nema potrebe da se neosapunjive tvari obrađuju s Al_2O_3 . Slijedi da se svi kiseli sastojci (masne kiseline i drugi) zadržavaju na početku čime se dobiva i vrpca alifatskog alkohola i vrpca terpenskog alkohola, a oba se značajno razlikuju od vrpce sterola.

5.2.2. Otopina benzena i acetona u volumnom omjeru 95:5 % unosi se u komoru za razvijanje do visine od približno 1 cm. Umjesto toga, može se koristiti mješavina heksana i dietilnog etera u volumnom omjeru 65:35 %. Komora se zatvara i ostavlja na najmanje pola sata da bi se uspostavila ravnoteža pare i tekućine. Trake filter-papira namočene u eluens (tekućinu za razvijanje) mogu se pričvrstiti na unutarnju površinu komore kako bi se skratilo vrijeme razvijanja za otprilike jednu trećinu i dobila jednoličnija, pravilna elucija komponenata.

Bilješka 3. Otopina za razvijanje mora se zamijeniti prilikom svake analize da bi se postigli reproducibilni uvjeti razvijanja.

5.2.3. Pripremi se otprilike 5 %-tna otopina neosapunjive tvari (5.1.5.) u kloroformu, a 300 μ l otopine nanese se u jednoličnom sloju minimalne debljine pomoću mikroštrcaljke zapremnine 100 μ l na TLC ploču približno 2 cm od donjeg ruba TLC ploče. Poravnano sa slojem, nasumce se nanese između 2 i 3 μ l referentne otopine alifatskog alkohola (4.11.) radi identificiranja vrpce alifatskog alkohola nakon završetka razvijanja.

5.2.4. Ploča se smješta unutar komore za razvijanje kako je navedeno u 5.2.2. Temperaturu treba održavati između 15 i 20 °C. Komora se odmah zatvara, a uzorak se ostavlja da eluira dok prednji dio otapala ne dođe do udaljenosti od 1 cm od gornjeg ruba ploče. Ploča se zatim vadi iz komore za razvijanje, a otapalo isparuje pod strujom vrućeg zraka ili se ploča ostavlja još neko vrijeme u digestoru.

5.2.5. Ploča se blago i jednoliko pošprica otopinom 2,7-diklorofluoresceina; kad se ploča promatra pod ultraljubičastom svjetlošću, vrpca alifatskog alkohola identificira se uspoređivanjem s alifatskim alkoholima u vrpci koja se nalazi neposredno iznad, vrpce triterpenskog alkohola i zajedno se zaokružuje.

Bilješka 4. Razlog zahtjeva za uklanjanje vrpce alifatskog alkohola i triterpenskog alkohola jest moguća migracija nekih alifatskih alkohola u vrpcu triterpenskih alkohola.

5.2.6. Silikagel koji se nalazi u označenom području sastruže se pomoću metalne spatule. Sastrugani materijal razbija se na fine čestice i unosi u lijevak za filtriranje (3.7.), dodaje se 10 ml vrućeg kloroforma. Sadržaj se temeljito miješa pomoću metalne spatule i filtrira pod vakuumom; filtrat se skuplja u tikvici (3.8.) koja je spojena s lijevkom za filtriranje.

Ostatak unutar lijevka ispire se tri puta s po 10 ml etilnog etera, a filtrat se skuplja u istu tikvicu spojenu na lijevak. Filtrat se isparuje na volumen od približno 4 do 5 ml, a preostala otopina se ulijeva u testnu epruvetu volumena 10 ml (3.9.) koja je prije tog izvagana; epruveta se suši laganim zagrijavanjem pod blagom strujom dušika. Ostatak se ponovno otapa s nekoliko kapi acetona, ponovno se suši, a zatim smješta u sušionik na 105 °C na 10 minuta, vadi se i hladi u eksikatoru i važe.

Ostatak unutar epruvete sastoji se od alkoholne frakcije.

5.3. Pripremanje trimetilsilil etera.

5.3.1. Reagens za sililaciju, koji se sastoji od mješavine piridina, heksametildisilazana i trimetilklorosilana u volumnom omjeru 9:3:1 (v/v/v) (bilješka 5.), u omjeru od po 50 μ l na svaki miligram alkohola, dodaje se u epruvetu koja sadrži alkoholnu frakciju, tako da se izbjegne bilo kakva apsorpcija vlage (bilješka 6.).

Bilješka 5. Otopine spremne za uporabu dostupne su u slobodnoj trgovini; reagens za silaniziranje kao što su N, 0-bis (trimetilsilil)trifluoroacetamid + 1 % trimetilklorosilan za miješanje s jednakim volumenom bezvodnog piridina.

- 5.3.2. Epruvetu treba začepiti i pažljivo protresti bez preokretanja, sve dok se alkoholi ne rastope. Zatim ju treba odložiti na sobnoj temperaturi na vrijeme ne kraće od 15 minuta, nakon čega ju se na nekoliko minuta stavlja na centrifugiranje; bistra otopina spremna je za analizu plinskim kromatografom.
- Bilješka 6.* Normalno je da dođe do blage opalescencije koja neće utjecati na rezultat. Stvaranje bijelog flokulata i pojava ružičastog obojenja znakovi su prisutnosti vlage ili propadanja reagensa. U tom slučaju treba ponoviti ispitivanje.
- 5.4. Analiza plinskim kromatografom.
- 5.4.1. Pripremne djelatnosti i kondicioniranje kapilarne kolone.
- 5.4.1.1. Kapilarna kolona namješta se unutar plinskog kromatografa tako da se početak kolone spoji s isparivačem koji je spojen na sustav za razdvajanje, a kraj kolone na detektor.
- Treba provesti opću provjeru stanja sklopa plinskog kromatografa (čvrstoću spoja (brtvljenja) plinskih priključaka, učinkovitost detektora, učinkovitost sustava za razdvajanje i sustava za bilježenje, i tako dalje).
- 5.4.1.2. Kapilarna kolona koja se koristi prvi put treba proći postupak kondicioniranja. Kroz kapilarnu kolonu pusti se da proteče malo plina nositelja, a zatim se sklop plinskog kromatografa uključi i postupno ga se zagrijava dok se ne postigne temperatura koja je najmanje 20 °C iznad radne temperature (vidjeti Bilješku 7.). Ta se temperatura treba održavati ne kraće od dva sata, zatim se sklop dovede na radne uvjete (reguliranje protoka plina, paljenje plamena dijeljenja, spoj na elektronički uređaj za bilježenje, prilagođavanje temperature komore (peći) kapilarne kolone, detektor i injektor, i tako dalje), a signal se prilagođava na osjetljivost koja je najmanje dvostruko viša od najviše razine predviđene za provođenje analize. Bazna linija za praćenje treba biti linearna, bez ikakvih pikova ikakve vrste i ne smije pokazivati nikakve znakove otklona.
- Negativan pravocrtni otklon ukazuje na to da spojevi kolone nisu savršeno čvrsti (zabrtvljeni), dok pozitivan otklon ukazuje na to da kolona nije dostatno kondicionirana.
- Bilješka 7.* Temperatura kondicioniranja mora biti najmanje 20 °C niža od maksimalne temperature predviđene za primijenjenu tekuću fazu.
- 5.4.2. Odabir radnih uvjeta
- 5.4.2.1. Opći radni uvjeti su kako slijedi:
- temperatura kolone: inicijalni izoterma postavlja se na 180 °C na osam minuta, a zatim se programira na 5 °C po minuti dok ne dosegne 260 °C i daljnjih 15 minuta na 260 °C,
 - temperatura isparivača: 280 °C,
 - temperatura detektora: 290 °C,
 - linearna brzina plina nosača: helij između 20 i 35 cm/s, vodik između 30 i 50 cm/s,
 - omjer razdvajanja: 1:50 do 1:100,
 - osjetljivost instrumenta: između 4 i 16 puta viša od minimalne atenuacije,
 - osjetljivost bilježenja: između 1 i 2 mV pune skale,
 - brzina papira: između 30 i 60 cm/h,
 - količina injektirane tvari: između 0,5 i 1 µl TMSE otopine.
- Gore navedeni uvjeti mogu se modificirati u skladu s karakteristikama kolone i karakteristikama plinskog kromatografa ne bi li se dobili kromatogrami koji udovoljavaju sljedećim uvjetima:
- retenciono vrijeme alkohola C₂₆ treba biti 18 ± 5 minuta,
 - pik alkohola C₂₂ treba biti 80 ± 20 % vrijednosti pune skale za maslinovo ulje i 40 ± 20 % vrijednosti pune skale za sjemensko ulje.
- 5.4.2.2. Prethodno navedeni zahtjevi provjeravaju se opetovanim injektiranjem standardne TMSE mješavine alkohola i radni uvjeti se prilagođavaju tako da bi se postigli najbolji mogući rezultati.
- 5.4.2.3. Parametri za integriranje pikova postavljaju se na takav način da se postigne ispravna procjena površine pikova koje se analizira.
- 5.4.3. Provođenje analize
- 5.4.3.1. Korištenjem mikroštrcaljke volumena 10 µl unosi se 1 µl heksana, za kojim slijedi 0,5 µl zraka, a nakon tog i između 0,5 i 1 µl otopine uzorka; klip mikroštrcaljke treba dignuti da bi se igla ispraznila.
- Igla se uvodi kroz septum sklopa za injektiranje; nakon jedne do dvije sekunde otopina se brzo injektira, a nakon približno pet sekundi igla se polako izvlači.
- 5.4.3.2. Bilježenje treba provoditi sve dok se TMSE prisutnih alkohola u potpunosti ne eluira. Bazna linija treba u svakom trenutku odgovarati zahtjevima točke 5.4.1.2.
- 5.4.4. Identificiranje pikova
- Identificiranje pojedinačnih pikova provodi se u skladu s retencijskim vremenima i uspoređivanjem sa standardnom TMSE mješavinom koja se analizira pri jednakim uvjetima.
- Kromatogram alkoholne frakcije djevičanskog maslinovog ulja prikazan je na Slici 1.
- 5.4.5. Kvantitativna procjena
- 5.4.5.1. Površine pikova 1-eikozanola i alifatskih alkohola C₂₂ i C₂₈ izračunavaju se elektroničkom integracijom.

5.4.5.2. Sadržaj svakog alkohola, iskazan u mg/100 g masne tvari izračunava se kako slijedi:

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

pri čemu je:

A_x = površina pika alkohola x, u kvadratnim milimetrima;

A_s = površina 1-eikozanola u kvadratnim milimetrima;

m_s = masa 1-eikozanola u miligramima;

m = masa uzorka uzetog za određivanje, u gramima.

6. ISKAZIVANJE REZULTATA

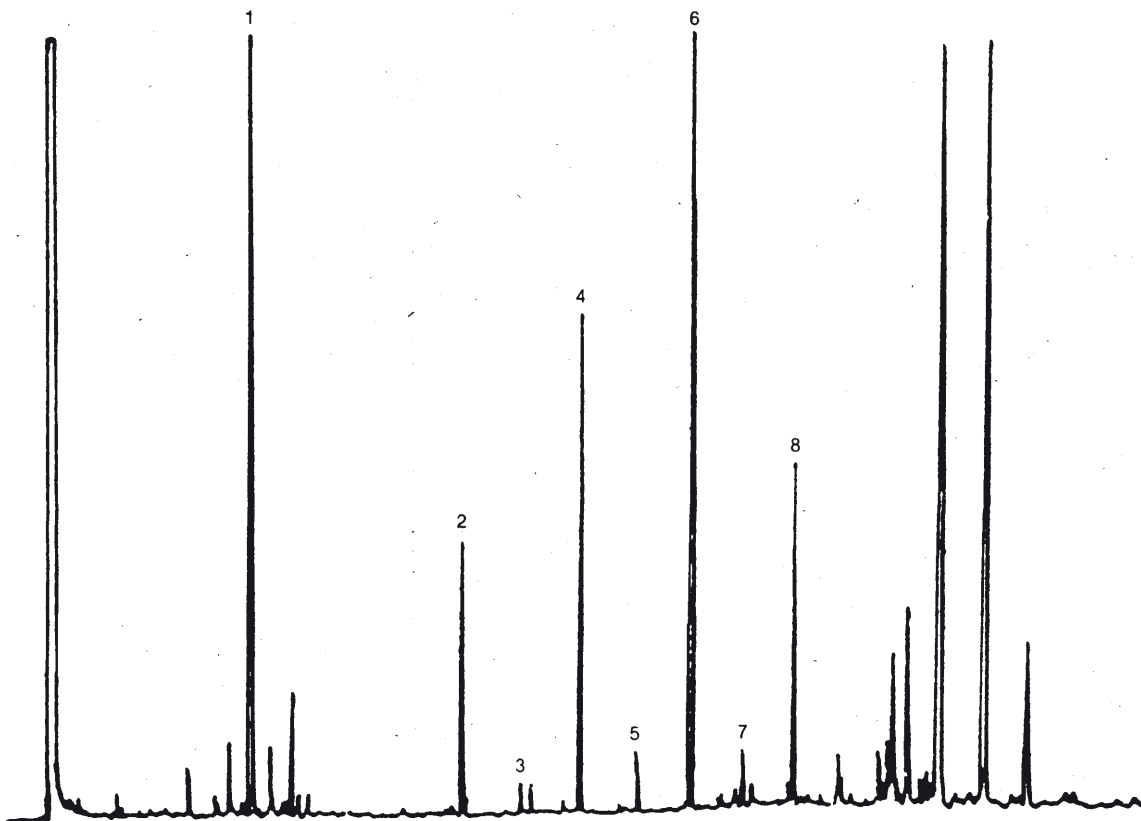
Iskazuje se sadržaj pojedinačnih alifatskih alkohola u mg/100 g masne tvari i zbroj „ukupnih alifatskih alkohola“.

DODATAK

Određivanje linearne brzine plina

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

Linearna brzina u cm/s zadana je $s = L/t_M$, pri čemu je L duljina kolone u centrima, a t_M vrijeme, u sekundama, koje je izmjereno zapornom urom.



Slika 1. Kromatogram alkoholne frakcije jednog djevičanskog maslinovog ulja.

1 = Eikozanol (SI),

2 = Dokožanol,

3 = Trikožanol,

4 = Tetraškožanol,

5 = Pentakožanol,

6 = Heksakožanol,

7 = Heptakožanol,

8 = Oktaškožanol.

PRILOG V.

ODREĐIVANJE SASTAVA I SADRŽAJA STEROLA KAPILARNOM PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. OPSEG

Ova metoda opisuje postupak određivanja sadržaja pojedinačnih i ukupnih sterola u masnim tvarima.

2. PRINCIP METODE

Masna tvar s dodatkom β -kolestanola koji služi kao interni standard, saponificira se otopinom kalijevog hidroksida u etanolu i zatim se neosapunjiva tvar ekstrahira dietilnim eterom.

Sterolna frakcija odjeljuje se od neosapunjivog ekstrakta kromatografijom na osnovnoj silikagel ploči. Steroli koji se dobiju sa silikagela transformiraju se u trimetil-silil etera i analiziraju kapilarnom plinskom kromatografijom.

3. OPREMA

- 3.1. Tikvica volumena 250 ml s povratnim hladilom i nastavcima od brušenog stakla.
- 3.2. Lijeveći za odjeljivanje volumena 500 ml.
- 3.3. Tikvice volumena 250 ml.
- 3.4. Cjeloviti instrument za analizu tankoslojnom kromatografijom, korištenjem staklenih ploča veličine 20 x 20 cm.
- 3.5. Ultraljubičasta svjetiljka valne duljine 366 ili 254 nm.
- 3.6. Mikroštrcaljke od 100 μ l i 500 μ l.
- 3.7. Cilindrični lijevak za filtriranje s poroznom pločom G 3 (poroznost između 15 i 40 μ m) približnog promjera 2 cm i visine od oko 5 cm, s dodatkom primjerenim za filtriranje pod vakuumom i 12/21 brušeni muški spoj.
- 3.8. Erlenmeyerova vakuumska tikvica volumena 50 ml s 12/21 ženskim spojem od brušenog stakla koja se može pričvrstiti na lijevak za filtriranje (3.7.).
- 3.9. Epruveta volumena 10 ml s konusnim dnom i brtvenim čepom.
- 3.10. Plinski kromatograf prikladan za korištenje s kapilarnom kolonom i opremljen sustavom za razdvajanje koji se sastoji od:
 - 3.10.1. termostatske komore za kolone koje mogu održavati željene temperature uz točnost od ± 1 °C;
 - 3.10.2. jedinice za uparavanje s mogućnošću prilagođavanja temperature, s elementom za uparavanje od persilaniziranog stakla;
 - 3.10.3. plameno-ionizacijskog detektora i pretvarača s pojačalom;
 - 3.10.4. snimač-integratora prikladnog za korištenje s pretvaračem s pojačalom (3.10.3.), s vremenom reakcije koje nije dulje od jedne sekunde i s varijabilnom brzinom papira.
- 3.11. Staklena ili kvarcna kapilarna kolona duljine između 20 i 30 m, unutarnjeg promjera između 0,25 i 0,32 mm, potpuno prekrivena sa SE-52 ili SE-54 ili odgovarajućom tekućinom jednolikom debljinom između 0,10 i 0,30 μ m.
- 3.12. Mikroštrcaljka za plinsku kromatografiju volumena 10 μ l s tvrdom iglom (od kaljenog stakla).

4. REAGENSI

- 4.1. Kalijev hidroksid, približno 2 mol/l otopina u etanolu. Treba otopiti 130 g kalijevog hidroksida (minimalne koncentracije 85 %), uz hlađenje, u 200 ml destilirane vode, a zatim nadopuniti etanolom do jedne litre. Otopinu treba čuvati u dobro začepljenim bocama od tamnog stakla.

- 4.2. Dietilni eter, analitičke čistoće.
 - 4.3. Bezvodni natrijev sulfat, analitičke čistoće.
 - 4.4. Staklene ploče presvučene silikagelom, bez indikatora fluorescencije, debljine 0,25 mm (mogu se nabaviti u slobodnoj trgovini).
 - 4.5. Kalijev hidroksid, 0,2 mol/l otopina u etanolu. Treba otopiti 13 g kalijevog hidroksida u 20 ml destilirane vode i nadopuniti etanolom do jedne litre.
 - 4.6. Benzen, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
 - 4.7. Aceton, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
 - 4.8. Heksan, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
 - 4.9. Dietilni eter, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
 - 4.10. Kloroform, analitičke čistoće (Vidjeti 5.2.2.).
 - 4.11. Referentna otopina za tankoslojnu kromatografiju: 5 %-tna otopina kolesterola ili fitosterola u kloroformu.
 - 4.12. 2,7-diklorofluorescein, 0,2 %-tna otopina u etanolu. Ovo se može učiniti blago lužnatim dodavanjem nekoliko kapi otopine 2 mol/l kalijevog hidroksida.
 - 4.13. Bezvodni piridin, za kromatografiju.
 - 4.14. Heksametil disilazan.
 - 4.15. Trimetilklorosilan.
 - 4.16. Standardne otopine sterolnih trimetilsilil etera. Treba ih se pripremiti neposredno prije korištenja od čistih sterola ili mješavine sterola dobivenih iz ulja koja ih sadrže.
 - 4.17. β -kolestanol, 0,2 %-tna otopina (m/V) u kloroformu (interni standard).
 - 4.18. Plinovi nosači: vodik ili helij, čistoće za plinsku kromatografiju.
 - 4.19. Pomoćni plinovi:
 - vodik, čistoće za plinsku kromatografiju,
 - zrak, čistoće za plinsku kromatografiju.
5. POSTUPAK
- 5.1. Pripremanje neosapunjive tvari
 - 5.1.1. Pomoću mikroštrcaljke od 500 μ l treba u tikvicu volumena 250 ml ubrizgati onu količinu 0,2 %-tne otopine β -kolestanola u kloroformu (4.17.) koja sadrži količinu kolestanola koja je približno jednaka 10 % sadržaja sterola alikvota uzorka koji će se uzeti za određivanje. Primjerice, na 5 g uzorka treba dodati 500 μ l 0,2 %-tne otopine β -kolestanola u slučaju kad se radi o maslinovom ulju i 1 500 μ l ako se radi o sjemenskom ulju ili ulju komine maslina.

Osušiti isparivanjem u atmosferi dušika i zatim izvagati točno 5 g suhog filtriranog uzorka u istu tikvici.

Ulja i masti životinjskog ili biljnog podrijetla koja sadrže znatne količine kolesterola mogu dati pik s retencijskim vremenom koje je identično onome kolestanola. U tom slučaju frakcija sterola treba se analizirati dvostruko - s i bez internog standarda.
 - 5.1.2. Dodaje se 50 ml 2 mol/l otopine kalijevog hidroksida u etanolu, namješta se povratno hladilo i zagrijava do točke slabog vrenja na parnoj kupelji uz neprekidno energično miješanje, dok se ne završi saponificiranje (otopina postane bistra). Zagrijavanje se nastavlja još 20 minuta, a zatim se dodaje 50 ml destilirane vode u vrh hladila, nakon čega se hladilo odvaja, a tikvica se ohladi na približno 30 °C.
 - 5.1.3. Sadržaj tikvice se kvantitativno prenese u lijevak za odjeljivanje volumena 500 ml uz nekoliko ispiranja destiliranom vodom u ukupnoj količini od približno 50 ml. Dodaje se približno 80 ml dietilnog etera, sve se žestoko protrese približno 30 sekundi i zatim odloži da se slegne (bilješka 1.).

Donja vodena faza treba se odvojiti sakupljanjem u drugi lijevak za odjeljivanje. Treba provesti još dvije ekstrakcije na vodenoj fazi na jednak način, uz korištenje između 60 i 70 ml etilnog etera za svaku.

Bilješka 1. Svaka se emulzija može uništiti prskanjem malih količina etilnog ili metilnog alkohola.

- 5.1.4. Ekstrakte etera treba pomiješati u lijevku za odjeljivanje i ispirati destiliranom vodom (u obrocima od 50 ml) dok voda kojom se ispiralo ne pokaže neutralnu reakciju.

Nakon uklanjanja vode kojom se ispiralo, osušite bezvodnim natrijevim sulfatom i profiltrirajte kroz bezvodni natrijev sulfat u tikvici volumena 250 ml koja je prethodno izvagana, perući lijevak i filter malim količinama dietilnog etera.

- 5.1.5. Eter se destilira na nekoliko ml, a zatim se suši pod blagim vakuumom ili pod strujom dušika; sušenje se završava u sušioniku na 100 °C na približno četvrtinu sata, a nakon hlađenja u eksikatoru se važe.

- 5.2. Odjeljivanje frakcije sterola.

- 5.2.1. Pripremanje osnovnih ploča. Silikagel ploče (4.4.) se potpuno urone u otopinu 0,2 mol/l kalijevog hidroksida u etanolu (4.5.) na 10 sekundi, zatim ih se ostavi da se dva sata suše u digestoru i na kraju ih se stavlja u sušionik na 100 °C na sat vremena.

Ploče se zatim vade iz sušionika i pohranjuju u eksikator napunjen kalcijevim kloridom dok ne budu potrebne za uporabu (ploče obrađene na ovaj način mogu se koristiti unutar razdoblja od 15 dana).

Bilješka 2. Kad se za odjeljivanje frakcije sterola koriste osnovne silikagel ploče, nema potrebe da se neosapunjive tvari obrađuju aluminijevim oksidom. Na taj način, svi sastojci koji su po prirodi kiseli (masne kiseline i drugi) zadržavaju se na liniji raspršivanja, a vrpca sterola jasno se odvađa od vrpce alifatskih i triterpenskih alkohola.

- 5.2.2. Mješavina benzena i acetona u volumnom omjeru 95:5 % i unosi se u komoru za razvijanje do visine od približno 1 cm. Umjesto toga, može se koristiti mješavina heksana i etilnog etera u volumnom omjeru 65:35 %. Komora se zatvara odgovarajućim poklopcem i ostavlja tako na približno pola sata kako bi se uspostavila ravnoteža tekućine-para. Trake filter-papira namočene u eluens mogu se postaviti na unutarnje površine komore. Time se skraćuje vrijeme razvijanja za otprilike jednu trećinu i dobiva jednoličnija, pravilna elucija komponenata.

Bilješka 3. Mješavina za razvijanje mora se zamijeniti za svako ispitivanje da bi se postigli reproducibilni uvjeti elucije.

- 5.2.3. Pripremi se otprilike 5 %-tna otopina neosapunjive tvari (5.1.5.) u kloroformu, a 300 µl otopine se nanese u što tanjem i jednoličnijem sloju pomoću mikroštrcaljke od 100 µl na kromatografsku ploču približno (5.2.1.) 2 cm od jednog ruba. Poravnano s nanosom, nanosi se između 2 i 3 µl referentne otopine sterola (4.11.) na jednom kraju ploče, tako da se vrpca sterola nakon razvijanja može identificirati.

- 5.2.4. Ploča se smješta unutar komore za razvijanje pripremljene kako je navedeno u 5.2.2. Temperaturu treba održavati između 15 i 20 °C. Komoru treba odmah zatvoriti i ostaviti da eluira dok prednji dio otapala ne dođe do udaljenosti od približno 1 cm od gornjeg ruba ploče. Ploča se zatim vadi iz komore za razvijanje, a otapalo isparuje pod strujom vrućeg zraka ili se ploča ostavlja još neko kraće vrijeme u digestoru.

- 5.2.5. Ploča se blago i jednoliko pošprica otopinom 2,7-diklorofluoresceina. Kad se ploča promatra pod ultraljubičastom svjetlošću, vrpca sterola identificira tako što je poravnata s mrljom dobivenom od referentne otopine. Granice vrpce označavaju se uz rub fluorescencije crnom pisaljkom.

- 5.2.6. Silikagel koji se nalazi u označenom području sastruže se pomoću metalne spatule. Sastrugani materijal razbija se u fini prah i unosi u lijevak za filtriranje (3.7.). Treba dodati 10 ml vrućeg kloroforma i pažljivo miješati pomoću metalne spatule i filtrirati pod vakuumom; filtrat treba skupiti u Erlenmeyerovu tikvicu (3.8.) koja je spojena na lijevak za filtriranje.

Ostatak unutar lijevka ispire se tri puta dietilnim eterom (približno 10 ml za svako ispiranje) uz skupljanje filtrata u istu tikvicu spojenu na lijevak. Filtrat se isparuje na volumen između 4 i 5 ml, a preostala otopina se prenosi u epruvetu volumena 10 ml (3.9.) koja je prije tog izvagana, isparuje se sušenjem laganim zagrijavanjem pod blagom strujom dušika, ponovno se otapa u nekoliko kapljica acetona, ponovno se isparuje sušenjem, a zatim smješta u sušionik na 105 °C na približno 10 minuta, ostavlja se da se ohladi u eksikatoru i važe.

Ostatak unutar epruvete sastoji se od frakcije sterola.

- 5.3. Pripremanje trimetilsilil etera.

- 5.3.1. Reagens za sililaciju, koji se sastoji od mješavine piridina, heksametilidisilazana i trimetilklorosilana u volumnom omjeru 9:3:1 (bilješka 4.), dodaje se u omjeru od po 50 µl na svaki miligram sterola, u epruvetu koja sadrži frakciju sterola, tako da se izbjegne bilo kakva apsorpcija vlage (bilješka 5.).

Bilješka 4. Otopine spremne za uporabu dostupne su u slobodnoj trgovini. Ostali reagensi za silaniziranje kao što su, primjerice, bis-trimetilsilil, trifluoroacetamid + 1 % trimetil klorosilan, koji se treba razrijediti jednakom zapreminom bezvodnog piridina, također su dostupni.

- 5.3.2. Epruvetu treba začepiti i pažljivo protresti (bez preokretanja), sve dok se steroli u potpunosti ne rastope. Zatim ju treba odložiti na sobnoj temperaturi na vrijeme ne kraće od 15 minuta, nakon čega ju se na nekoliko minuta stavlja na centrifugiranje. Bistra otopina spremna je za analizu plinskim kromatografom.
- Bilješka 5.* Normalno je da dođe do blage opalescencije koja neće utjecati na rezultat. Stvaranje bijelog flokulata i pojava ružičastog obojenja znakovi su prisutnosti vlage ili propadanja reagensa. U tom slučaju treba ponoviti ispitivanje.
- 5.4. Analiza plinskim kromatografom
- 5.4.1. Pripremne djelatnosti, punjenje kolone
- 5.4.1.1. Kolonu treba namjestiti u plinski kromatograf tako da se početak kolone spoji na isparivač koji je spojen sa sustavom za razdvajanje, a izlazni kraj kolone na detektor.
- Treba provesti opću provjeru stanja jedinice plinskog kromatografa (curenje iz plinskih tokova, učinkovitost detektora, učinkovitost sustava za razdvajanje i sustava za bilježenje, i tako dalje).
- 5.4.1.2. U slučaju kad se kolona koristi prvi put, preporuča se da ju se podvrgne postupku kondicioniranja. Kroz kolonu se pusti da proteče malo plina, a zatim se jedinica plinskog kromatografa uključi i postupno zagrijava dok se ne postigne temperatura koja je najmanje 20 °C iznad radne temperature (bilješka 6.). Ta se temperatura treba održavati ne kraće od dva sata, zatim se cijela jedinica stavlja u radne uvjete (prilagođavanje protoka plina i razdvajanja, paljenja plamena, provjera spoja s elektroničkim uređajem za bilježenje, prilagođavanje komore za kolonu, temperature detektora i injektora, i tako dalje), a zatim se bilježi signal uz osjetljivost koja je najmanje dvostruko viša od razine predviđene za analizu. Tijek bazne linije treba biti linearan, bez pikova ikakve vrste i ne smije pokazivati nikakve znakove otklona.
- Negativan pravocrtni otklon ukazuje na to da je došlo do curenja iz spojeva kolone, a pozitivan otklon ukazuje na to da kolona nije kondicionirana na odgovarajući način.
- Bilješka 6.* Temperatura kondicioniranja mora uvijek biti najmanje 20 °C niža od maksimalne temperature utvrđene za primijenjenu stacionarnu fazu.
- 5.4.2. Odabir radnih uvjeta.
- 5.4.2.1. Opći radni uvjeti su kako slijedi:
- temperatura kolone: 260 ± 5 °C,
 - temperatura isparivača: 280 °C,
 - temperatura detektora: 290 °C,
 - linearna brzina plina nosača: helij između 20 i 35 cm/s, vodik između 30 i 50 cm/s,
 - omjer razdvajanja: između 1:50 i 1:100,
 - osjetljivost instrumenta: između 4 i 16 puta viša od minimalne atenuacije,
 - osjetljivost bilježenja: između 1 i 2 mV pune skale,
 - brzina papira: između 30 i 60 cm/sat,
 - količina injektirane tvari: između 0,5 i 1 µl TMSE otopine.
- Gore navedeni uvjeti mogu se modificirati u skladu s karakteristikama kolone i karakteristikama plinskog kromatografa ne bi li se dobili kromatogrami koji udovoljavaju sljedećim zahtjevima:
- retencijsko vrijeme β-sitosterola treba biti 20 ± 5 minuta,
 - pik kampesterola treba biti: za maslinovo ulje (prosječni sadržaj 3 %) 15 ± 5 % vrijednosti pune skale; a za sojino ulje (prosječni sadržaj 20 %) 80 ± 10 % vrijednosti pune skale,
 - svi prisutni steroli moraju biti odijeljeni. Osim odjeljivanja, pikovi također moraju biti u potpunosti razdvojeni, drugim riječima, trag pika mora se vratiti na baznu liniju prije no što krene stvarati novi pik. Međutim, nepotpuno razdvajanje tolerira se u slučaju da se pik pri TRR 1,02 može kvantificirati korištenjem okomice.
- 5.4.3. Analitički postupak.
- 5.4.3.1. Korištenjem mikroštrcaljke volumena 10 µl unosi se 1 µl heksana, za kojim slijedi 0,5 µl zraka, a nakon tog i između 0,5 i 1 µl otopine uzorka. Klip štrcaljke treba dignuti toliko da se igla isprazni. Iglu treba gurnuti kroz membranu jedinice za injektiranje i, nakon jedne do dvije sekunde, treba brzo injektirati, a nakon otprilike pet sekundi iglu treba polako izvući.
- 5.4.3.2. Bilježenje treba provoditi sve dok se TMSE prisutnih sterola u potpunosti ne eluiraju
- Bazna linija treba u svakom trenutku odgovarati zahtjevima (5.4.1.2.).
- 5.4.4. Identificiranje pikova.
- Identificiranje pojedinačnih pikova provodi se na temelju retencijskog vremena i uspoređivanjem sa mješavinama sterolnih TMSE koje se analiziraju pri jednakim uvjetima.
- Steroli se eluiraju sljedećim redoslijedom: kolesterol, brasikasterol, 24-metilen kolesterol, kampesterol, kampa-stanol, stigmasterol, Δ 7-kampesterol, Δ 5,23-stigmastadienol, klerosterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ 5-avenasterol, Δ 5,24-stigmastadienol, Δ 7-stigmasterol, Δ 7-avenasterol.

Retencijska vremena sitosterola za kolone SE-52 i SE-54 prikazana su u Tablici 1.

Slike 1. i 2. prikazuju tipične kromatograme za neka ulja.

5.4.5. Kvantitativna procjena

5.4.5.1. Površine pikova β -kolestanola i sterola izračunavaju se korištenjem integratora. Pikove bilo kojega od spojeva koji nisu uključeni među one koji su popisani u Tablici 1. ne treba uzimati u obzir. Koeficijent odziva za α -kolestanol treba biti jednak 1.

5.4.5.2. Treba izračunati koncentraciju svakog pojedinačnog sterola u mg/100 g masnog materijala kako slijedi:

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

pri čemu je:

A_x = površina pika sterola x , u kvadratnim milimetrima;

A_s = površina pika β -kolestanola, u kvadratnim milimetrima;

m_s = masadodanog β -kolestanola, u miligramima;

m = masa uzorka korištenog za određivanje, u gramima.

6. ISKAZIVANJE REZULTATA

6.1. Koncentracije pojedinačnih sterola bilježe se kao mg/100 g masnog materijala, a njihov zbroj kao „ukupni steroli”.

6.2. Postotak svakog pojedinačnog sterola izračunava se iz omjera površine relevantnog pika prema ukupnoj površini pikova za sterole.

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

pri čemu je:

A_x = površina pika za x ;

ΣA = ukupna površina pikova za sterole.

DODATAK

Određivanje linearne brzine plina

U plinski kromatograf postavljen na normalne radne uvjete injektira se između 1 i 3 μ l metana (ili propana) i zatim se mjeri vrijeme koje je plinu potrebno da proteče kroz kolonu od trenutka injektiranja do trenutka pojavljivanja pika (t_M).

Linearna brzina u cm/s zadana je s L/t_M , pri čemu je L duljina kolone u centimetrima, a t_M izmjereno vrijeme u sekundama.

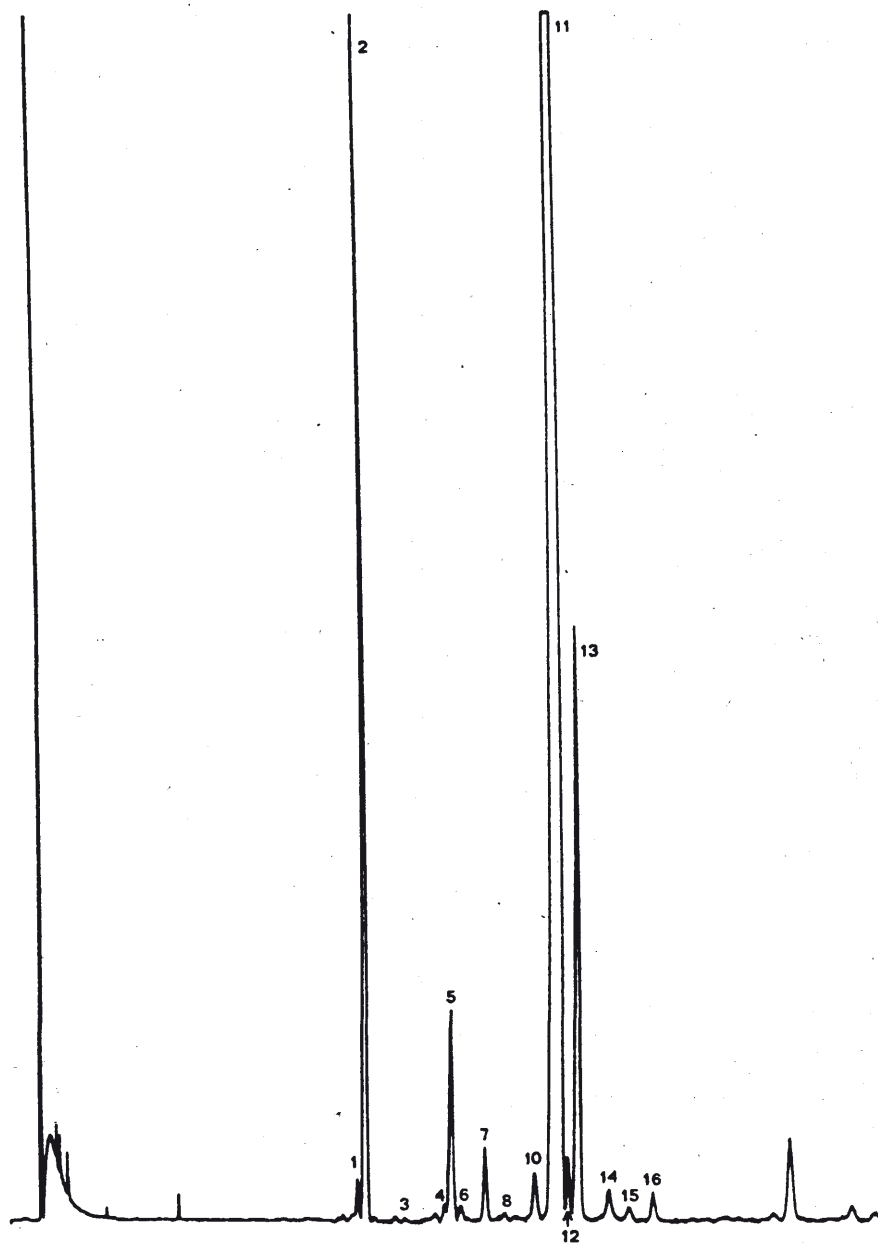
Tablica I.

Relativna retencijska vremena za sterole

Pik	Identifikacija		Relativno retencijskovrijeme	
			kolona SE 54	kolona SE 52
1.	kolesterol	Δ -5-kolesten-3 β -ol	0,67	0,63
2.	kolestanol	5 α -kolestan-3 β -ol	0,68	0,64
3.	brasikasterol	[24S]-24-metil- Δ -5,22-kolestadien-3 β -ol	0,73	0,71
4.	24-metilen-kolesterol	24-metilen- Δ -5,24-kolesten-3 β -ol	0,82	0,80
5.	kampesterol	[24R]-24-metil- Δ -5-kolesten-3 β -ol	0,83	0,81
6.	kampestanol	[24R]-24-metil-kolestan-3 β -ol	0,85	0,82
7.	stigmasterol	[24R]-24-etil- Δ -5,22-kolestadien-3 β -ol	0,88	0,87
8.	Δ -7-kampesterol	[24R]-24-metil- Δ -7-kolesten-3 β -ol	0,93	0,92
9.	Δ -5,23-stigmastadienol	[24R,S]-24-etil- Δ -5,23-kolestadien-3 β -ol	0,95	0,95
10.	klerosterol	[24S]-24-etil- Δ -5,25-kolestadien-3 β -ol	0,96	0,96
11.	β -sitosterol	[24R]-24-etil- Δ -5-kolestan-3 β -ol	1,00	1,00
12.	sitostanol	24-etil-kolestan-3 β -ol	1,02	1,02
13.	Δ -5-avenasterol	[24Z]-24-etiliden-5-kolesten-3 β -ol	1,03	1,03
14.	Δ -5,24-stigmastadienol	[24R,S]-24-etil- Δ -5,24-kolestadien-3 β -ol	1,08	1,08
15.	Δ -7-stigmastenol	[24R,S]-24-etil- Δ -7,24-kolestadien-3 β -ol	1,12	1,12
16.	Δ -7-avenasterol	[24Z]-24-etiliden- Δ -7-kolesten-3 β -ol	1,16	1,16

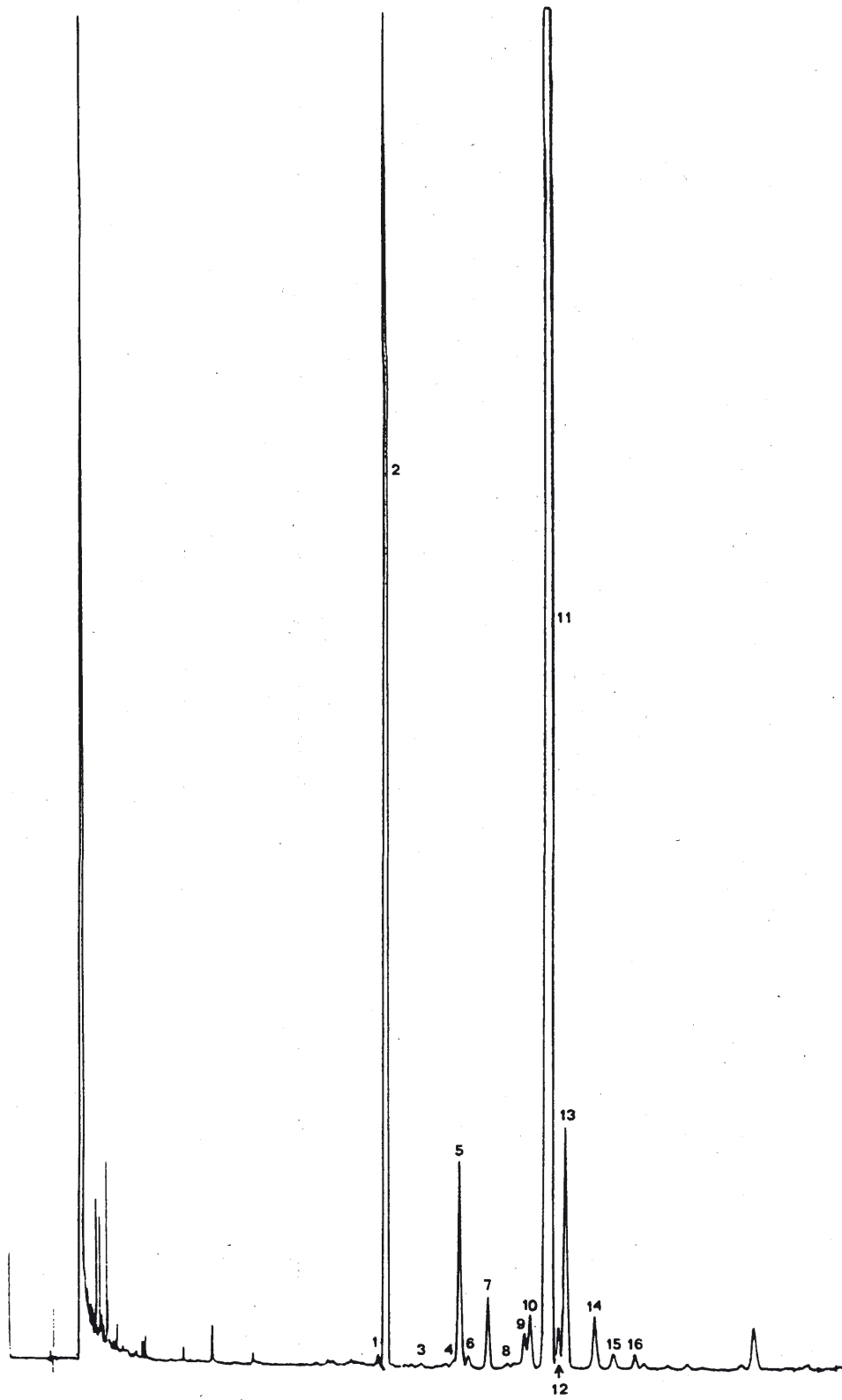
Slika 1.

Plinski kromatogram frakcije sterola jednog nerafiniranog maslinovog ulja



Slika 2.

Plinski kromatogram frakcije sterola jednog rafiniranog maslinovog ulja



PRILOG VI.

ODREĐIVANJE ERITRODIOLA I UVAOLA

UVOD

Eritrodiol (uobičajeni zajednički naziv za glikole eritrodiola i uvaola) sastojak je neosapunjive frakcije koja je karakteristična za neke vrste masnih tvari. U maslinovom ulju koje je dobiveno ekstrakcijom otapalom nalazi se u značajno višim koncentracijama nego u drugim uljima, kao što su prešano maslinovo ulje i ulje koštica grožđa koja ga također sadrže, pa stoga njegova prisutnost može ukazati na prisutnost maslinovog ulja dobivenog ekstrakcijom otapalom.

1. OPSEG

Ova metoda opisuje postupak otkrivanja eritrodiola u masnim tvarima.

2. PRINCIP METODE

Masna tvar saponificira se otopinom kalijevog hidroksida u etanolu. Neosapunjiva frakcija se zatim ekstrahira dietilnim eterom i pročišćava prelaskom preko kolone s aluminijskim oksidom.

Neosapunjive tvari podvrgavaju se tankoslojnoj kromatografiji na silikagel ploči dok se ne odijele vrpce koje odgovaraju frakcijama sterola i eritrodiola. Steroli i eritrodioli koji se dobiju s ploče transformiraju se u trimetilsilil eteri i smjesa se analizira plinskom kromatografijom.

Rezultat se iskazuje kao postotak eritrodiola u smjesi eritrodiola i sterola.

3. OPREMA

3.1. Oprema opisana u Prilogu V. (određivanje sadržaja sterola).

4. REAGENSI

4.1. Reagensi opisani u Prilogu V. (određivanje sadržaja sterola).

4.2. Referentna otopina eritrodiola, 0,5 %-tna otopina u kloroformu.

5. POSTUPAK

5.1. **Pripremanje neosapunjive tvari.**

Kao što je opisano u stavku 5.1.2. Priloga V.

5.2. **Odjeljivanje eritrodiola i sterola.**

5.2.1. Vidjeti stavak 5.2.1. Priloga V.

5.2.2. Vidjeti stavak 5.2.2. Priloga V.

5.2.3. Pripremi se 5 %-tna otopina neosapunjive tvari u kloroformu.

0,3 ml otopine nanese se u što tanjem i jednoličnijem sloju pomoću mikroštrcaljke od 0,1 ml na kromatografsku ploču, približno 1,5 cm od donjeg ruba.

Na jedan kraj ploče treba nanijeti nekoliko mikrolitara otopine kolesterola i eritrodiola koji će poslužiti kao reference.

5.2.4. Ploča se smješta unutar komore za razvijanje pripremljene kako je navedeno u 5.2.1. Temperatura treba biti oko 20 °C. Komoru treba odmah zatvoriti poklopcem i ostaviti da eluira dok prednji dio otapala ne dođe do udaljenosti od približno 1 cm od gornjeg ruba ploče. Ploča se zatim vadi iz komore za razvijanje, a otapalo isparuje pod strujom vrućeg zraka.

5.2.5. Ploča se blago i jednoliko pošprica otopinom 2,7-diklorofluoresceina u alkoholu. Kad se ploču promatra pod ultraljubičastom svjetlošću, vrpce sterola i eritrodiola identificiraju se tako što su poravnate s referentnima. Treba ih označiti točkom neposredno izvan rubova fluorescencije.

5.2.6. Silikagel koji se nalazi u označenom području sastruže se pomoću metalne spatule. Materijal sastrugan s ploče treba staviti u tikvicu volumena 50 ml. Treba dodati 15 ml vrućeg kloroforma, dobro protresti i filtrirati kroz lijevak s diskom od sinter-stakla tako da se silikagel prenese na filtar. Isprati tri puta vrućim kloroformom (po 10 ml za svako ispiranje), a filtrat skupiti u tikvicu volumena 100 ml. Filtrat se isparuje na volumen između 4 i 5 ml, prenosi u kalibriranu epruvetu za centrifugiranje s konusnim dnom volumena 10 ml, suši laganim zagrijavanjem pod blagom strujom dušika i važe.

5.3. **Pripremanje trimetilsilil estera.**

Kao što je opisano u stavku 5.3. Priloga V.

5.4. **Analiza plinskim kromatografom.**

Kao što je opisano u stavku 5.4. gornje metode. Radni uvjeti plinskog kromatografa tijekom provođenja analize moraju biti takvi da se može provesti analiza sterola i odijeliti TMSE od eritrodiole i uvaole.

Nakon što je uzorak injektiran, treba nastaviti provoditi bilježenje sve dok se prisutni steroli, eritrodiole i uvaole, u potpunosti ne eluiraju. Zatim treba identificirati pikove (retencijska vremena za eritrodiole i uvaole u odnosu na β -sitosterol iznose 1,45, odnosno, 1,55) i izračunati površine kao za sterole.

6. ISKAZIVANJE REZULTATA

$$\text{Eritrodiole \%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \Sigma A_{\text{sterolai}}} \times 100$$

pri čemu je:

A_1 = površina pika eritrodiole, u kvadratnim milimetrima;

A_2 = površina pika uvaole, u kvadratnim milimetrima;

$\Sigma A_{\text{sterolai}}$ = ukupna površina pikova za sterole, u kvadratnim milimetrima.

Rezultat se iskazuje jednim decimalnim mjestom.

PRILOG VII.

ODREĐIVANJE ZASIĆENIH MASNIH KISELINA U POLOŽAJU 2. NA TRIGLICERIDIMA ULJA I MASTI

1. OPSEG

Ova norma opisuje metodu određivanja sastava one frakcije masnih kiselina nekog ulja ili masti koja se esterificira na položaju 2. (ili unutarnjem položaju) glicerola.

2. PODRUČJE PRIMJENE

Ova norma primjenjuje se na ulja i masti čije je talište niže od 45 °C, zahvaljujući posebnim karakteristikama djelovanja lipaze iz gušterače.

Ne primjenjuje se bezrezervno na ulja i masti koje sadrže znatne količine: masnih kiselina s 12 ili manje atoma ugljika (kokosovo ulje, ulje od palmine jezgre (koštica) i mliječna mast) ili visoko nezasićenih masnih kiselina (s više od četiri dvostruke veze) koje sadrže 20 ili više atoma ugljika (riblje ulje i ulje od morskih organizama), ili pak masnih kiselina koje sadrže oksigenirane grupe, osim karboksilne grupe.

3. PRINCIP

Moguća neutralizacija kiselih ulja i masti u otapalu. Pročišćavanje prelaskom preko kolone s aluminijevim oksidom. Djelomična hidroliza triglicerida lipazom iz gušterače tijekom određenog vremena. Odjeljivanje stvorenih monoglicerida tankoslojnom kromatografijom i metanoliza tih monoglicerida. Analiza tih metilnih estera plinsko-tekućinskom kromatografijom.

4. OPREMA

- 4.1. Tikvica s okruglim dnom volumena 100 ml.
- 4.2. Tikvica s okruglim dnom volumena 25 ml sa spojevima od brušenog stakla.
- 4.3. Zračno hladilo duljine 1 m, koje se može pričvrstiti na tikvicu navedenu u stavku 4.2.
- 4.4. Erlenmeyerova tikvica volumena 250 ml.
- 4.5. Čaša volumena 50 ml.
- 4.6. Lijevak za odjeljivanje volumena 500 ml.
- 4.7. Staklena kromatografska kolona unutarnjeg promjera 13 mm i duljine 400 mm, sa zataljenim staklenim diskom i ventilom.
- 4.8. Epruveta za centrifugiranje volumena 10 ml, sa čepom od brušenog stakla.
- 4.9. Graduirana bireta volumena 5 ml, s podjelom po 0,05 ml.
- 4.10. Štrcaljka volumena 1 ml, s tankom iglom.
- 4.11. Mikroštrcaljka kojim se mogu dobiti kapljice veličine između 3 i 4 μ l.
- 4.12. Pribor za nanošenje tankog sloja za tankoslojnu kromatografiju.
- 4.13. Staklene ploče za tankoslojnu kromatografiju, veličine 20 × 20 cm.
- 4.14. Staklena komora za razvijanje za tankoslojnu kromatografiju, s poklopcem od brušenog stakla, koja odgovara pločama veličine 20 × 20 cm.
- 4.15. Sprej za tankoslojnu kromatografiju.
- 4.16. Sušionik podešen na 103 ± 2 °C.
- 4.17. Termostat kojega se može regulirati između 30 i 45 °C s točnošću od 0,5 °C.
- 4.18. Rotirajući isparivač.
- 4.19. Vibrirajuća električna tresilica koja omogućava snažno protresanje epruvete za centrifugiranje.
- 4.20. Ultraljubičasta svjetiljka za ispitivanje tankoslojnih ploča.

Za kontroliranje aktivnosti lipaze:

- 4.21. pH-metar.
- 4.22. Spiralna miješalica.
- 4.23. Bireta volumena 5 ml.
- 4.24. Zaporna ura.

Za moguće pripremanje lipaze:

- 4.25. Laboratorijska miješalica, odgovarajuća za dispergiranje i miješanje heterogenih materijala.
5. REAGENSI
- 5.1. *n*-heksan ili, ako nije dostupan, lagani petrolej (čija je točka vrelišta između 30 i 50 °C), kromatografske kvalitete.
 - 5.2. 2-propanol, ili etanol, 95 % (v/v), kvalitete analitičkog reagensa.
 - 5.3. 2-propanol, ili etanol, 1/1 otopina u vodi.
 - 5.4. Dietil eter, bez peroksida.
 - 5.5. Aceton.
 - 5.6. Mravlja kiselina, ne manje od 98 % (m/m).
 - 5.7. Otopina za razvijanje: mješavina *n*-heksana (5.1.), dietil etera (5.4.) i mravlje kiseline 5.6.) u volumnom omjeru 70:30:1 (v/v/v).
 - 5.8. Aktivirani aluminijski oksid za kromatografiju, neutralan, stupnja kvalitete I. po Brockmannu.
 - 5.9. Kvarcni prah s vezivom, kvalitete odgovarajuće za tankoslojnu kromatografiju.
 - 5.10. Lipaza iz gušterače, odgovarajuće kvalitete (Bilješke 1. i 2.).
 - 5.11. Natrijev hidroksid, 120 g/l otopina u vodi.
 - 5.12. Solna kiselina, otopina u vodi 6 mol/l.
 - 5.13. Kalcijev klorid (CaCl₂), 220 g/l otopina u vodi.
 - 5.14. Natrijev kolat (enzimatske kvalitete), 1 g/l otopina u vodi.
 - 5.15. Pufer otopina: 1 M otopinu u vodi tris-hidroksimetilaminometana podesiti na pH 8 dodavanjem solne kiseline (5.12.) (provjerite pomoću pH-metra).
 - 5.16. Fenolftalein, 10 g/l otopina u 95 %-tnom (v/v) etanolu.
 - 5.17. 2',7' -diklorofluorescein, 2 g/l otopina u 95 %-tnom (v/v) etanolu, učinjena blago lužnatim dodavanjem jedne kapljice 1 mol/l otopine natrijevog hidroksida na 100 ml.

Za kontroliranje aktivnosti lipaze:

- 5.18. Neutralizirano ulje.
- 5.19. Natrijev hidroksid, 0,1 mol/l otopina u vodi.
- 5.20. Natrijev kolat (enzimatske kvalitete), 200 g/l otopina u vodi.
- 5.21. Guma arabika, 100 g/l otopina u vodi.

6. PRIPREMANJE UZORKA

Ako je kiselost uzorka (sadržaj slobodnih masnih kiselina) niža od 3 %, određena u skladu s Prilogom II., pročistite ga direktno preko aluminijskog oksida u skladu s uputama u stavku 6.2.

Ako je kiselost uzorka viša od 3 %, određena u skladu s Prilogom II., neutralizirajte ga lužinom uz prisutnost otapala u skladu sa stavkom 6.1., a zatim pročistite aluminijskim oksidom u skladu s uputama u stavku 6.2.

- 6.1. Neutralizacija lužinom uz prisutnost otapala

U lijevak za odjeljivanje (4.6.) stavite oko 10 g sirovog ulja i dodajte 100 ml heksana (5.1.), 50 ml 2-propanola (5.2.), nekoliko kapljica otopine fenolftaleina (5.16.) i otopinu natrijevog hidroksida (5.11) u količini koja odgovara slobodnoj kiselosti ulja (sadržaju slobodnih masnih kiselina) plus 0,3 % viška. Snažno protresajte jednu minutu, dodajte 50 ml destilirane vode, ponovno protresite i odložite da se slegne.

Nakon odjeljivanja odstranite sapunasti sloj s dna. Također odstranite sve međuslojeve (sluz, netopljiva tvar). Operite otopinu neutraliziranog ulja u heksanu uzastopnim obrocima (25 do 30 ml) otopine 2-propanola (5.3.), sve dok ne nestane ružičasta boja fenolftaleina.

Većinu heksana odstranite destiliranjem pod vakuumom u rotirajućem isparivaču (4.18.), osušite ulje na temperaturi između 30 i 40 °C pod vakuumom strujom čistog dušika, dok se heksan u cijelosti ne odstrani.

6.2. Pročišćavanje kroz aluminijev oksid

Pripremite suspenziju od 15 g aktiviranog aluminijevog oksida (5.8.) i 50 ml heksana (5.1.) i ulijte ju, uz miješanje, u kromatografsku kolonu (4.7.). Pustite da se aluminijev oksid jednoliko slegne i pustite da razina otapala padne na između 1 i 2 mm iznad apsorbenta. Pažljivo u kolonu ulijte otopinu 5 g ulja i 25 ml heksana (5.1.), a svu tekućinu prikupljenu iz kolone prebacite u tikvicu s okruglim dnom (4.1.).

7. Pripremanje kromatografskih ploča

Temeljito očistite staklene ploče (4.13.) etanolom, laganim petrolejem i acetonom da biste odstranili i najmanji trag masne tvari.

U Erlenmeyerovu tikvicu (4.4.) stavite 30 g kvarcnog praha (5.9.) Dodajte 60 ml destilirane vode. Začepite i snažno tresite jednu minutu. Premjestite emulziju direktno u pribor za nanošenje tankog sloja (4.12.) i premažite čiste ploče slojem debljine 0,25 mm.

Pustite da se ploče suše 15 minuta na zraku, a zatim sat vremena u sušioniku (4.16.) na 103 ± 2 °C. Prije korištenja ploča ohladite ih na sobnu temperaturu u eksikatoru.

Pripremljene ploče dostupne su u slobodnoj trgovini.

8. POSTUPAK

8.1. Hidroliza lipazom iz gušterače.

U epruveti za centrifugiranje (4.8.) izvažite približno 0,1 g pripremljenog uzorka, a ako je uzorak tekuće ulje, direktno nastavite kako je opisano dolje.

Dodajte 20 mg lipaze (5.10.) i 2 ml pufer otopine (5.15.). Protresite dobro ali pažljivo, a zatim dodajte 0,5 ml otopine natrijevog kolata (5.14.) i 0,2 ml otopine kalcijevog klorida (5.13.). Epruvetu začepite čepom od brušenog stakla, pažljivo protresite (tako da se čep ne smoci) i epruvetu odmah stavite u termostat (4.17.) koji održava temperaturu od $40 \pm 0,5$ °C i tresite rukom točno jednu minutu.

Izvadite epruvetu iz termostata i snažno protresajte pomoću električne tresilice (4.19.) točno dvije minute.

Odmah ohladite u tekućoj vodi; dodajte 1 ml solne kiseline (5.12.) i 1 ml dietil etera (5.4.). Začepite i snažno miješajte pomoću električne tresilice. Pustite da se slegne i odstranite organski sloj pomoću štrcaljke (4.10.) ako je potrebno nakon centrifugiranja.

8.2. Odjeljivanje monoglicerida tankoslojnom kromatografijom

Nanesite ekstrakt na kromatografsku ploču pomoću mikroštrcaljke (4.11.), približno 1,5 cm od donjeg ruba, u tankoj, jednolikej liniji koja treba biti čim je moguće uža. Postavite ploču u dobro zasićenu komoru za razvijanje (4.14.) i razvijajte otapalom za razvijanje (5.7.) na približno 20 °C do približno 1 cm od gornjeg ruba ploče.

Ploču osušite na zraku, na temperaturi komore, i pošpricajte ju otopinom 2',7' -diklorofluoresceina (5.17.). Identificirajte vrpce monoglicerida (R_f oko 0,035) pod ultraljubičastom svjetlošću (4.20.).

8.3. Analiza monoglicerida plinsko-tekućinskom kromatografijom.

Sastružite vrpce dobivenu u stavku 8.2. pomoću spatule (nemojte sastrugati komponente koje su preostale na baznoj liniji) i premjestite u tikvicu za metiliranje (4.2.).

Sastruganu masu kvarcnog praha tretirajte direktno, metodom opisanom u Prilogu X.B tako da monogliceride pretvorite u metilne estere, a zatim ispitajte estere plinskom kromatografijom kao što je opisano u Prilogu X.A.

9. ISKAZIVANJE REZULTATA

Izračunajte sastav masnih kiselina u položaju 2., s jednim decimalnim mjestom (bilješka 3.).

10. BILJEŠKE

Bilješka 1.: Provjeravanje aktivnosti lipaze

Pripremite uljnu emulziju protresanjem mješavine 165 ml otopine gumi arabike (5.12.), 15 g mrvljenog leda i 20 ml neutraliziranog ulja (5.18.) u odgovarajućoj tresilici.

U čašu (4.5.) stavite 10 ml ove emulzije, zatim dodajte 0,3 ml otopine natrijevog kolata (5.20.) i na kraju 20 ml destilirane vode.

Čašu stavite u termostat koji održava temperaturu od $37 \pm 0,5$ °C (bilješka 4.); umetnite elektrode pH-metra (4.21.) i spiralnu miješalicu (4.22.).

Pomoću birete (4.23.) dodavajte kap po kap otopine natrijevog hidroksida (5.19.) dok pH vrijednost ne dosegne 8,5.

Dodajte dovoljnu količinu vodene suspenzije lipaze (vidjeti dolje). Čim pH-metar pokaže pH vrijednost 8,3, uključite zapornu uru (4.24.) i ukapajte otopinu natrijevog hidroksida (5.19.) brzinom koja će osigurati održavanje pH vrijednosti 8,3. Svaku minutu očitajte volumen utrošene otopine lužine.

Zabilježite očitavanja u obliku grafa, tako da očitavanje vremena bude na apscisi, a ml otopine lužine potrebni za održavanje konstantnog pH bude na ordinati. Trebali biste dobiti linearni graf.

Suspenzija lipaze spomenuta gore je 1:1 000 (m/m) suspenzija u vodi. Za svako ispitivanje treba koristiti toliko suspenzije da bi se utrošio približno 1 ml otopine lužine tijekom četiri do pet minuta. Obično je potrebno između 1 i 5 mg praha.

Jedinica lipaze definirana je kao količina enzima koji će osloboditi 10 μ -ekvivalenata kiseline u minuti. U tom je slučaju aktivnost A utrošenog praha, mjereno u jedinici lipaze na mg, zadan formulom:

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

pri čemu je V volumen otopine natrijevog hidroksida (5.19.) utrošene u minuti, izračunan iz grafa, a m je masa u mg ispitivanog dijela praha.

Bilješka 2.: Pripremanje lipaze

Lipaze koje imaju zadovoljavajuću aktivnost lipaze dostupne su u slobodnoj trgovini. No, moguće je također pripremiti ih u laboratoriju na sljedeći način:

Ohladite 5 kg svježe svinjske gušterače na 0 °C; odstranite okolnu krutu mast i vezivno tkivo i sameljite u mikseru da biste dobili gustu tekućinu. Ovu pastu miješajte miješalicom (4.25.) između četiri i šest sati s 2,5 l bezvodnog acetona i centrifugirajte ju. Ekstrahirajte ostatak još tri puta s jednakim volumenom acetona, a zatim dva puta s 1/1 (V/V) mješavinom acetona i dietil etera i dva puta dietil eterom.

Ostatak sušite u vakuumu 48 sati da biste dobili stabilan prah, kojeg treba pohraniti u hladnjaku.

Bilješka 3.: U svakom se slučaju preporučuje odrediti sastav ukupnih masnih kiselina istog uzorka, budući da će njegovo uspoređivanje s onima kiselina na položaju 2. pomoći u tumačenju dobivenih vrijednosti.

Bilješka 4.: Temperatura hidrolize zadana je na 37 °C, budući da se koristi tekuće ulje. Međutim, za ispitivani uzorak zadana je na 40 °C kako bi se omogućilo ispitivanje masti čija je točka vrelišta do 45 °C.

PRILOG VIII.

ODREĐIVANJE SASTAVA TRILINOLEINA

1. OPSEG

Određivanje sastava triglicerida u maslinovim uljima u smislu njihovog ekvivalentnog ugljikovog broja visoko djelotvornom tekućinskom kromatografijom.

Ova norma opisuje metodu odjeljivanja i kvantitativnog određivanja sastava triglicerida biljnih ulja u smislu njihove molekularne mase i stupnja nezasićenosti kao funkcije njihovog ekvivalentnog ugljikovog broja (vidjeti bilješku 1.).
2. PODRUČJE PRIMJENE

Ova se norma primjenjuje na sva biljna ulja koja sadrže trigliceride masnih kiselina dugog lanca. Ta se metoda posebno može primjenjivati na otkrivanje prisutnosti malih količina polusušivih ulja (bogatih linolnom kiselinom) u biljnim uljima koja sadrže oleinsku kiselinu kao najdominantniju nezasićenu masnu kiselinu, kao što je maslinovo ulje.
3. PRINCIP

Odjeljivanje triglicerida u skladu s njihovim ekvivalentnim ugljikovim brojem visoko djelotvornom tekućinskom kromatografijom (reverzno-fazna) i interpretacija kromatograma.
4. OPREMA
 - 4.1. Visoko djelotvorni tekućinski kromatograf, koji omogućava termostatsku kontrolu temperature kolone.
 - 4.2. Jedinica za injektiranje 10 µl.
 - 4.3. Detektor: diferencijalni refraktometar. Osjetljivost pune skale treba biti najmanje 10^{-4} jedinica indeksa refrakcije.
 - 4.4. Kolona: cijev od nehrđajućeg čelika duljine 250 mm i unutarnjeg promjera 4,5 mm, napunjena česticama kvarca promjera 5 µm s između 22 i 23 % ugljika u obliku oktadecilsilana (bilješka 2.).
 - 4.5. Pisač i/ili integrator.
5. REAGENSI

Reagensi moraju biti analitičke čistoće. Otapala za eluciju moraju biti takva da se mogu nekoliko puta reciklirati bez da to utječe na odjeljivanja, a iz njih moraju biti odstranjeni svi plinovi.

 - 5.1. Kloroform.
 - 5.2. Aceton.
 - 5.3. Acetonitril.
 - 5.4. Otapalo za eluciju: acetonitril + aceton (omjer treba prilagoditi postizanju željenog odjeljivanja; započnite s mješavinom 50:50).
 - 5.5. Otapalo za rastapanje: aceton ili mješavina acetona i kloroforma u omjeru 1:1.
 - 5.6. Referentni trigliceridi: možete koristiti trigliceride dostupne u slobodnoj trgovini (tripalmitin, triolein i tako dalje), u kojem se slučaju retencijska vremena bilježe u skladu s ekvivalentnim ugljikovim brojem, ili pak možete koristiti referentni kromatogram dobiven od sojinog ulja (vidjeti bilješke 3. i 4. i slike 1. i 2.).
6. PRIPREMANJE UZORAKA

5 %-tnu otopinu uzoraka koje ćete analizirati pripremite tako da odvagnete $0,5 \pm 0,001$ g uzorka u graduiranoj tikvici volumena 10 ml i nadopunite do 10 ml otapalom za rastapanje (5.5.).

7. POSTUPAK

- 7.1. Postavite sustav za kromatografiju. Upumpajte otapalo za eluciju (5.4.) brzinom od 1,5 ml/mm da biste pročistili cijeli sustav. Pričekajte dok ne dobijete stabilnu baznu liniju.

Injektirajte 10 µl uzorka pripremljenog kao u točki 6.

8. IZRAČUNAVANJE I ISKAZIVANJE REZULTATA

Koristite metodu interne standardizacije, odnosno, pretpostavite da zbroj površina pikova koji odgovaraju različitim trigliceridima iznosi 100 %. Izračunajte relativni postotak svakog triglicerida koristeći sljedeću formulu:

$$\% \text{ triglicerida} = \frac{\text{površina pika}}{\text{zbroj površina pikova}} \times 100$$

Rezultat treba iskazati jednim decimalnim mjestom.

Bilješka 1. Redoslijed elucije može se odrediti izračunavanjem ekvivalentnih ugljikovih brojeva, što se najčešće definira odnosom $ECN = CN - 2n$, pri čemu je CN ugljikov broj, a n broj dvostrukih veza; preciznije se može izračunati tako da se u obzir uzme izvor dvostruke veze. Ako su n_0 , n_1 i n_{1n} brojevi dvostrukih veza koje se pripisuju oleinskoj, linolnoj i linolenskoj kiselini, ekvivalentni ugljikov broj može se izračunati pomoću odnosa u formuli:

$$NCE = NC - d_0n_0 - d_1n_1 - d_{1n}n_{1n}$$

pri čemu se koeficijenti d_0 , d_1 i d_{1n} mogu izračunati pomoću referentnih triglicerida. Pod uvjetima utvrđenima ovom metodom, dobiveni odnos bit će blizak sljedećemu:

$$NCE = NC - (2,60n_0) - (2,35n_1) - (2,17n_{1n}).$$

Bilješka 2. Primjeri: Lichrosorb (Merck) RP18 Art 50333;

Licrosphere ili ekvivalent (Merck) 100 CH18 Art 50377.

Bilješka 3. S nekoliko je referentnih triglicerida također moguće izračunati rezoluciju u odnosu na triolein,

$$\alpha = TR'/TR'_{olein\dot{a}}$$

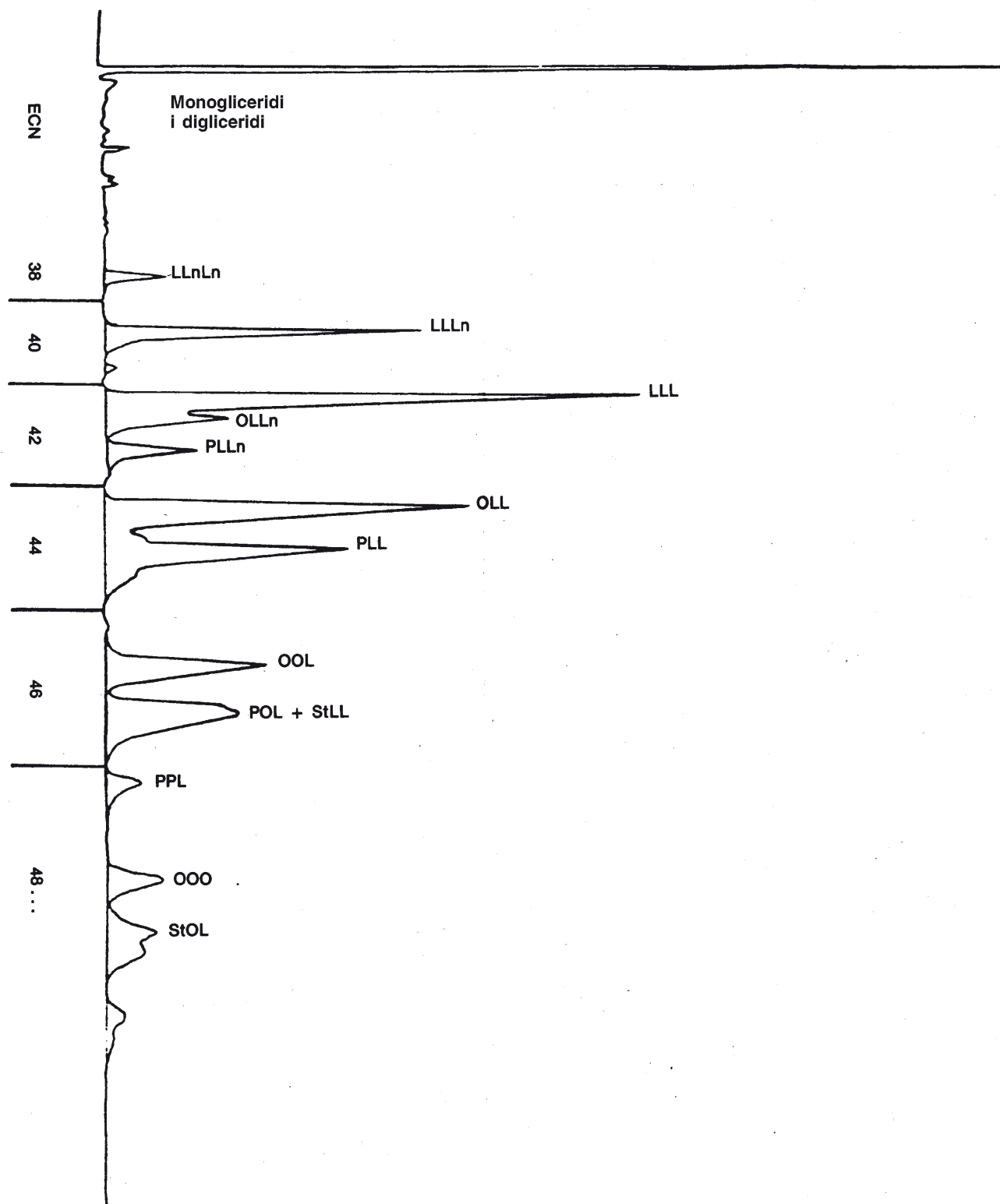
korištenjem reduciranog retencijskog vremena $RT' = RT - RT_{otapalo}$.

Graf „log α ” u odnosu na „ f^* ” (broj dvostrukih veza) omogućava određivanje retencijskih vrijednosti za sve trigliceride masnih kiselina sadržanih u referentnim trigliceridima - vidjeti sliku 2.

Bilješka 4. Učinkovitost kolone mora omogućiti jasno odjeljivanje pika trilinoleina od pikova triglicerida sa susjednim RT.

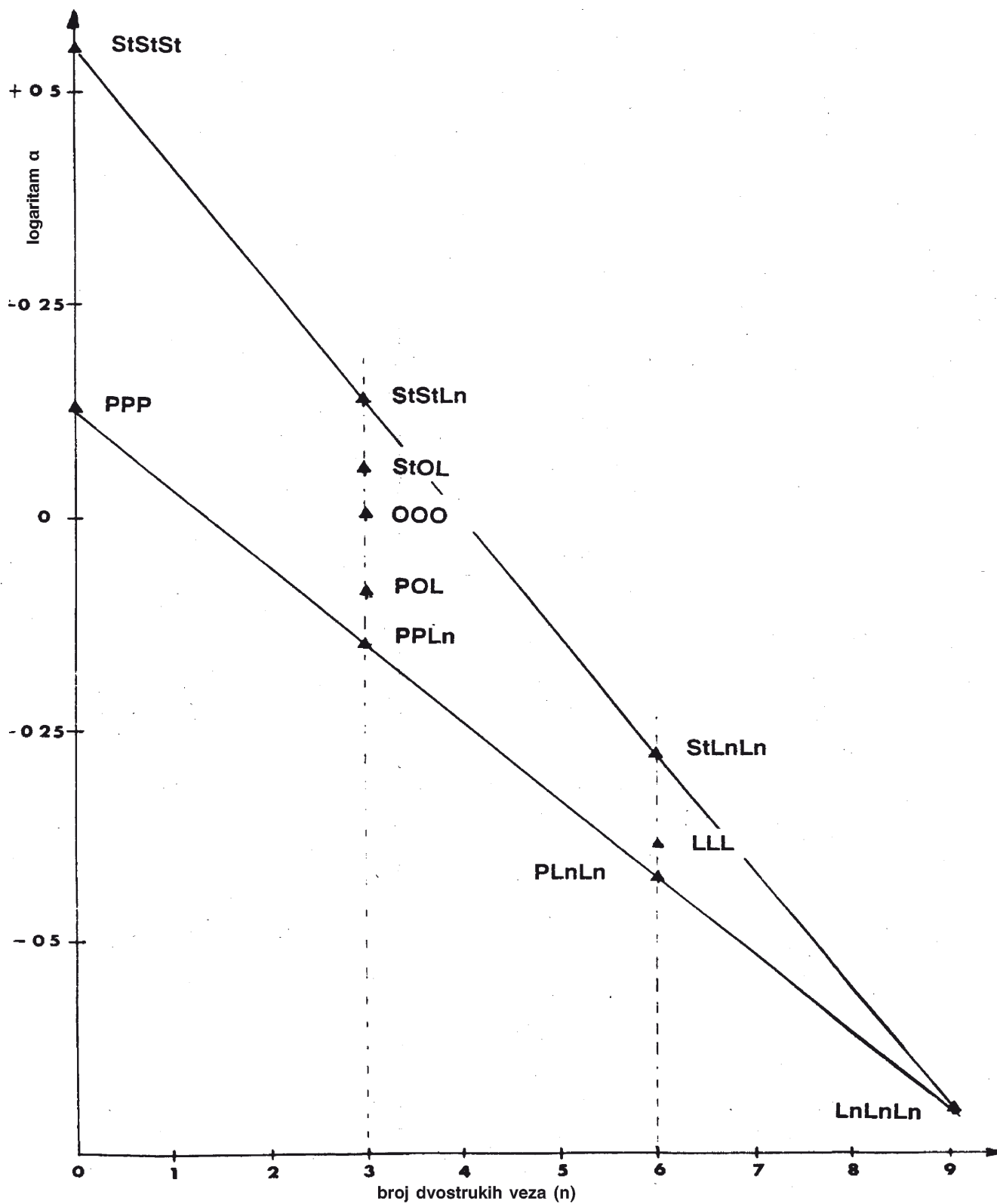
Slika 1.

Kromatogram uzorka sojinog ulja



P = palmitinska kiselina St = stearinska kiselina O = oleinska kiselina
L = linolna kiselina Ln = linolenska kiselina

Slika 2.

Graf od „log α ” u odnosu na „f” (broj dvostrukih veza)

La = laurinska kiselina My = miristinska kiselina P = palmitinska kiselina
 St = stearinska kiselina O = oleinska kiselina L = linolna kiselina
 Ln = linolenska kiselina

PRILOG IX.

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ISPITIVANJE U ULTRALJUBIČASTOM PODRUČJU

UVOD

Spektrofotometrijsko ispitivanje u ultraljubičastom području može dati informacije o kvaliteti masti, njezinoj očuvanosti i promjenama koje su u njoj uzrokovane tehnološkim procesima.

Do apsorpcija na valnim duljinama utvrđenima u ovoj metodi dolazi zbog prisustva konjugiranih diena i triena. Te se apsorpcije iskazuju kao specifične ekstinkcije $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (ekstinkcija 1 %-tne otopine masti u određenom otapalu, na debljini od 1 cm), što se uobičajeno označava s K (i također se naziva „koeficijentom ekstinkcije“).

1. OPSEG

Ova metoda opisuje postupak provođenja spektrofotometrijskog ispitivanja maslinovog ulja u ultra-ljubičastom području.

2. PRINCIP METODE

Predmetna mast otapa se u propisanom otapalu, a zatim se određuje ekstinkcija otopine na utvrđenim valnim duljinama u odnosu na čisto otapalo. Specifične ekstinkcije izračunavaju se iz spektrofotometrijskih očitavanja.

3. OPREMA

3.1. Spektrofotometar za mjerenje ekstinkcije u ultraljubičastom području između 220 i 360 nm, s mogućnošću očitavanja pojedinačnih nanometrijskih jedinica.

3.2. Pravokutne kvarcne kivete, s poklopcima, optičke duljine 1 cm. Kad su napunjene vodom ili nekim drugim odgovarajućim otapalom, kivete se međusobno ne smiju razlikovati za više od 0,01 ekstinkcijskih jedinica.

3.3. Graduirana tikvica volumena 25 ml.

3.4. Kromatografska kolona duljine 450 mm i promjera 35 mm s ispusnom cijevi čiji je promjer približno 10 mm.

4. REAGENSI

4.1. Spektrofotometrijski čist izo-oktan (2,2,4-trimetilpentan). U odnosu na destiliranu vodu, treba imati transmisiju koja nije manja od 60 % kod 220 nm niti je manja od 95 % kod 250 nm, ili

— spektrofotometrijski čist cikloheksan: u odnosu na destiliranu vodu, treba imati transmisiju koja nije manja od 40 % kod 220 nm niti je manja od 95 % kod 250 nm, ili

— neko drugo odgovarajuće otapalo sposobno u potpunosti otopiti mast (primjerice, etilni alkohol za ricinusovo ulje).

4.2. Bazični aluminijski oksid za kromatografiju na koloni pripremljen i provjeren kako je opisano u Dodatku I.

4.3. n-heksan, za kromatografiju.

5. POSTUPAK

5.1. Predmetni uzorak mora biti savršeno homogen i bez sumnjivih onečišćenja. Ulja koja su tekuća na temperaturi okoline treba profiltrirati kroz papir na temperaturi od približno 30 °C, tvrde masti treba homogenizirati i profiltrirati na temperaturi koja nije više od 10 °C viša od točke tališta.

5.2. Odvagajte precizno približno 0,25 g tako pripremljenog uzorka u graduiranoj tikvici volumena 25 ml, nadopunite propisanim otapalom do oznake i homogenizirajte. Dobivena otopina mora biti savršeno bistra. Ako je došlo do opalescencije ili zamućenosti, brzo ju profilirajte kroz papir.

5.3. Napunite kivetu dobivenom otopinom i izmjerite ekstinkcije na odgovarajućoj valnoj duljini između 232 i 276 nm, koristeći upotrijebljeno otapalo kao referentno.

Zabilježene vrijednosti ekstinkcije moraju se nalaziti unutar raspona od 0,1 do 0,8. Ako nije tako, mjerenja se moraju ponoviti, s time da se upotrijebe otopine veće ili manje koncentracije, ovisno o slučaju.

5.4. Kad se zahtijeva određivanje specifične ekstinkcije nakon prelaska preko aluminijskog oksida, postupite kako slijedi. U kolonu za kromatografiju stavite 30 g bazičnog aluminijskog oksida u otopini u heksanu. Nakon što se adsorbent slegao, uklonite suvišak heksana do približno 1 cm iznad vrha aluminijskog oksida.

Otopite 10 g masti, homogenizirane i filtrirane kako je opisano u točki 5.1., u 100 ml heksana i ulijte otopinu u kolonu. Sakupite eluat (tekućinu iz kolone) i isparite svo otapalo pod vakuumom na temperaturi nižoj od 25 °C.

Odmah nastavite kako je opisano u točki 5.2., koristeći ovako dobivenu mast.

6. ISKAZIVANJE REZULTATA

6.1. Zabilježite specifične ekstinkcije (koeficijente ekstinkcije) na različitim valnim duljinama, izračunate kako slijedi:

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

pri čemu je:

K_{λ} = specifična ekstinkcija na valnoj duljini λ ;

E_{λ} = ekstinkcija mjerena na valnoj duljini λ ;

c = koncentracija otopine u g/100 ml;

s = debljina kivete u cm.

Rezultate treba iskazati s dva decimalna mjesta.

6.2. Spektrofotometrijska analiza maslinovog ulja u skladu sa službenom metodom u propisima EEZ-a utvrđuje određivanje specifične ekstinkcije u otopini izo-okšana na valnim duljinama između 232 i 270 nm i određivanje K , što je zadano kao:

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

pri čemu je K_m specifična ekstinkcija na valnoj duljini m , valnoj duljini za maksimalnu apsorpciju oko 270 nm.

DODATAK I.

Pripremanje aluminijskog oksida i ispitivanje njegove aktivnosti

A.1.1. Pripremanje aluminijskog oksida

Aluminijski oksid koji ste prethodno osušili držeći ga u peći tri sata na temperaturi između 380 i 400 °C, stavite u posudu koja se može hermetički zatvoriti, dodajte destiliranu vodu u omjeru od 5 ml na 100 g aluminijskog oksida, odmah zatvorite posudu, opetovano protresajte i zatim pustite da se sliježe najmanje 12 sati prije uporabe.

A.1.2. Provjeravanje aktivnosti aluminijskog oksida

Pripremite kromatografsku kolonu s 30 g aluminijskog oksida. Postupajući kako je opisano u stavku 5.4., kroz kolonu treba propustiti mješavinu koja se sastoji od:

— 95 % djevičanskog maslinovog ulja čija je specifična ekstinkcija manja od 0,18 kod 268 nm,

— 5 % ulja od kikirikija, koje je u procesu rafiniranja tretirano zemljom, čija je specifična ekstinkcija niža od 4 kod 268 nm.

Ako mješavina, nakon prolaska kroz kolonu, ima specifičnu ekstinkciju višu od 0,11 kod 248 nm, aluminijev oksid je prihvatljiv, a u suprotnom se slučaju mora povećati razina dehidracije.

DODATAK II.

Umjeravanje spektrofotometra

- A.2. Oprema se mora periodički provjeravati (najmanje jedanput svakih šest mjeseci) obzirom na odziv valne duljine i preciznost odziva.
- A.2.1. Valna duljina može se provjeriti korištenjem svjetiljke sa živinom parom ili pomoću odgovarajućih filtara.
- A.2.2. S ciljem provjeravanja odziva fotoćelije i fotomultiplikatora postupite kako slijedi: odvagajte 0,2000 g čistog kalijevog kromata za spektrofotometriju i otopite ga u 0,05 mol/l otopini kalijevog hidroksida u graduiranoj tikvici volumena 1 000 ml i nadopunite do oznake. Uzmite točno 25 ml dobivene otopine, stavite ju u graduiranu tikvicu volumena 500 ml i razrijedite do oznake koristeći istu otopinu kalijevog hidroksida.

Izmjerite ekstinkciju tako dobivene otopine kod 275 nm, koristeći otopinu kalijevog hidroksida kao referentnu. Ekstinkcija izmjerena korištenjem kivete od 1 cm treba biti $0,200 \pm 0,005$.

PRILOG X.A

ANALIZA METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. OPSEG

Ova metoda daje opće upute za primjenu plinske kromatografije, korištenjem punjenih ili kapilarnih kolona, radi utvrđivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava mješavine metilnih estera masnih kiselina dobivenih u skladu s metodom utvrđenom u Prilogu X.B.

Ova metoda ne primjenjuje se na polimerizirane masne kiseline.

2. REAGENSI

2.1. Plin nosač

Inertni plin (dušik, helij, argon, vodik, i tako dalje), temeljito osušen, sa sadržajem kisika manjim od 10 mg/kg.

Bilješka 1. Vodik, koji se kao plin nosač koristi samo u kapilarnim kolonama, može udvostručiti brzinu analize, ali je opasan. Dostupni su sigurnosni uređaji.

2.2. Pomoćni plinovi

2.2.1. Vodik (čistoće $\geq 99,9\%$), bez organskih nečistoća.

2.2.2. Zrak ili kisik, bez organskih nečistoća.

2.3. Referentni standard

Mješavina metilnih estera čistih masnih kiselina, ili metilnih estera masti poznatog sastava, po mogućnosti nalik onoj masne tvari koja se analizira.

Posebnu pažnju treba posvetiti sprečavanju oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina.

3. OPREMA

Navedene upute odnose se na uobičajenu opremu koja se koristi za plinsku kromatografiju, uključujući punjene i/ili kapilarne kolone i plameno-ionizacijski detektor. Sva oprema koja osigurava učinkovitost i rezoluciju utvrđenu u stavku 4.1.2. smatra se odgovarajućom.

3.1. Plinski kromatograf

Plinski kromatograf treba sadržavati sljedeće elemente.

3.1.1. Sustav za injektiranje

Koristite sustav za injektiranje bilo s:

(a) punjenim kolonama, s najmanjim mogućim slobodnim (neiskorištenim) volumenom (u ovom slučaju sustav za injektiranje treba biti u stanju zagrijati se na temperaturu koja je između 20 i 50 °C viša od temperature kolone); ili s

(b) kapilarnim kolonama, u kojem slučaju sustav za injektiranje treba biti izrađen posebno za korištenje s takvim kolonama. Po vrsti, injektor može biti s dijeljenjem uzorka ili bez dijeljenja uzorka u koloni.

Bilješka 2. Ako nema masnih kiselina s manje od 16 atoma ugljika, može se koristiti injektor s pomičnom iglom.

3.1.2. Peć

Peć za termostatanje kolone mora biti u stanju zagrijati kolonu na temperaturu od najmanje 260 °C i održavati željenu temperaturu unutar 1 °C u slučaju punjene kolone i unutar 0,1 °C u slučaju kapilarne kolone. Ovaj posljednji zahtjev posebno je važan kad se koristi kvarcna cijev.

U svim se slučajevima preporučuje korištenje zagrijavanja programiranom temperaturom, a posebno za masne kiseline koje imaju manje od 16 atoma ugljika.

3.1.3. Punjena kolona

3.1.3.1. Kolona izrađena od materijala koji je inertan u odnosu prema tvari koja će se analizirati (primjerice, staklo ili nehrđajući čelik) čije su dimenzije kako slijedi:

(a) duljina: 1 do 3 m. Relativno kratka kolona treba se koristiti kad su prisutne masne kiseline dugog lanca (iznad C₂₀). Prilikom analiziranja kiselina s 4 ili 6 atoma ugljika, preporuča se korištenje kolone duljine 2 m;

(b) unutarnji promjer: 2 do 4 mm.

Bilješka 3. Ako su prisutne višestruko nezasićene komponente s više od tri dvostruke veze, mogu se razgraditi u koloni od nehrđajućeg čelika.

Bilješka 4. Može se koristiti sustav s dvije jednake punjene kolone.

3.1.3.2. Punjenje, koje uključuje sljedeće elemente:

(a) *nositelj*: diatomejska zemlja oprana kiselinom i silanizirana, ili neki drugi odgovarajući inertni nositelj s malim rasponom veličine zrna (raspon od 25 µm unutar granica između 125 i 200 µm), s time da je prosječna veličina zrna u određenom odnosu na unutarnji promjer i duljinu kolone;

(b) *stacionarna faza*: polarna tekućina poliesterskog tipa (primjerice, dietilenglikol polisukcinat, butandiol polisukcinat, etilenglikol poliadipat, i tako dalje) cijanosilikoni ili druge tekućine koje omogućuju zahtijevano kromatografsko odjeljivanje (vidjeti klauzulu 4.). Punjenje treba sadržavati između 5 i 20 % (m/m) stacionarne faze. Za određena odjeljivanja može se koristiti nepolarna stacionarna faza.

3.1.3.3. Kondicioniranje kolone

Kad je kolona odspojena, ako je to moguće, od detektora, postupno zagrijte peć na 185 °C i kroz svježe pripremljenu kolonu puštajte struju inertnog plina brzinom od između 20 i 60 ml/min, ne kraće od 16 sati na toj temperaturi te još sljedeća 2 sata na 195 °C.

3.1.4. Kapilarna kolona

3.1.4.1. Cijev, izrađena od materijala koji je inertan u odnosu prema tvari koja će se analizirati (uobičajeno, staklo ili kvarc). Unutarnji promjer treba biti između 0,2 i 0,8 mm. Unutarnja površina treba se obraditi na odgovarajući način (primjerice, pripremanje površine, deaktiviranje) prije nanošenja premaza stacionarne faze. U većini je slučajeva dovoljna duljina od 25 mm.

3.1.4.2. Stacionarna faza, obično po vrsti poliglikol (poli(etilen glikol) 20 000), poliester (butandiol polisukcinat) ili polarni polisiloksan (cijanosilikon). Odgovarajuće su i kolone gdje je stacionarna faza kemijski vezana (umrežena) na materijal nosač (tzv. *bonded/crosslinked columns*).

Bilješka 5. Postoji opasnost da polarni polisiloksani prouzroče poteškoće prilikom identificiranja i odjeljivanja linolenske kiseline i C₂₀ kiselina.

Premazi trebaju biti tanki, odnosno, od 0,1 do 0,2 µm.

3.1.4.3. Sastavljanje i kondicioniranje kolone

Uvažavajte normalne mjere predostrožnosti prilikom sastavljanja kapilarnih kolona, odnosno, namještanje kolone u peći (nositelj), odabir i sastavljanje priključaka (čvrsto spojeni (zabrtvljeni) da ne bi došlo do curenja), pozicioniranje krajeva kolone u injektoru i na detektoru (smanjivanje slobodnog (neiskorištenog) volumena). Kolonu stavite pod struju plina nosača (primjerice, 0,3 bar (30 kPa) za kolonu duljine 25 mm i unutarnjeg promjera 0,3 mm).

Kolonu kondicionirajte temperaturnim programiranjem peći po 3 °C/min od temperature okoline na temperaturu koja je 10 °C niža od granice razgrađivanja stacionarne faze. Održavajte ovu temperaturu peći jedan sat, dok se bazna linija ne stabilizira. Vratite ju na 180 °C da biste radili u izotermnim uvjetima.

Bilješka 6. Odgovarajuće unaprijed kondicionirane kolone dostupne su u slobodnoj trgovini.

3.1.5. Detektor, po mogućnosti takav da ga se može zagrijati na temperaturu višu od one kolone.

3.2. Štrcaljka

Štrcaljka treba imati maksimalni volumen 10 µl i biti graduirana s podjelom po 0,1 µl.

3.3. Pisač

Ako će se krivulja koristiti za izračunavanje sastava analizirane mješavine, zahtijeva se elektronički pisač visoke preciznosti, kompatibilan s korištenom opremom. Pisač treba imati sljedeće karakteristike:

(a) brzina odziva ispod 1,5 s, po mogućnosti 1 s (brzina odziva je vrijeme potrebno za pisaljku da, nakon iznenadnog dobivanja 100 %-tnog signala, prijeđe od 0 do 90 %);

(b) širina papira minimalno 20 cm;

(c) brzina papira, takva da se može prilagoditi vrijednostima između 0,4 i 2,5 cm/min.

3.4. Integrator

Brz i precizan izračun može se postići pomoću elektroničkog integratora. Time se dobiva linearni odziv odgovarajuće osjetljivosti, a isprava za devijaciju bazne linije bit će zadovoljavajući.

4. POSTUPAK

Aktivnosti opisane u stavcima od 4.1. do 4.3. odnose se na korištenje plameno-ionizacijskog detektora.

Umjesto toga, može se koristiti plinski kromatograf s katarometarskim detektorom (koji radi na principu promjena toplinske vodljivosti). Radni uvjeti se u tom slučaju prilagođavaju kako je opisano u klauzuli 6.

4.1. Uvjeti ispitivanja

4.1.1. Odabir optimalnih radnih uvjeta

4.1.1.1. Punjena kolona

Prilikom odabira uvjeta ispitivanja u obzir treba uzeti sljedeće varijable:

- (a) duljina i promjer kolone;
- (b) priroda i količina stacionarne faze;
- (c) temperatura kolone;
- (d) protok plina nosača;
- (e) zahtijevana rezolucija;
- (f) veličina ispitivanog dijela, odabrana na takav način da sklop detektora i elektrometra daje linearni odziv;
- (g) trajanje analize.

Općenito, vrijednosti dane u tablici 1. i tablici 2. dovest će do željenih rezultata, odnosno najmanje 2 000 teoretskih odsječaka po metru duljine kolone za metilni stearat i njegovo eluiranje unutar otprilike 15 minuta.

U slučaju kad to oprema dopušta, injektor treba biti na temperaturi od otprilike 200 °C, a detektor na temperaturi jednakoj ili višoj od temperature kolone.

U pravilu, odnos brzine protoka vodika unesenog u plameno-ionizacijski detektor i brzine plina nosača varira od 1:2 do 1:1, ovisno o promjeru kolone. Protok kisika je otprilike između 5 i 10 puta veći od protoka vodika.

Tablica 1.

Unutarnji promjer kolone mm	Protok plina nosača ml/min
2	15 do 25
3	20 do 40
4	40 do 60

Tablica 2.

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

4.1.1.2. Kapilarna kolona

Svojstva učinkovitosti i propusnosti kapilarne kolone pokazuju da odjeljivanje između sastojaka i trajanje analize uvelike ovise o brzini protoka plina nosača kroz kolonu. Stoga je potrebno optimirati radne uvjete djelovanjem na ovaj parametar (ili, jednostavnije, na glavni gubitak kolone), ovisno o tome želite li poboljšati odjeljivanje ili ubrzati analizu.

4.1.2. Određivanje broja teoretskih odsječaka/tavana (učinkovitost) i rezolucije (vidjeti sliku 1.)

Analizu mješavine metilnog stearata i metilnog oleata provedite u približno jednakim omjerima (primjerice, metilni esteri iz kakao maslaca).

Odaberite temperaturu kolone i protok plina nosača tako da se maksimum pika metilnog stearata zabilježi približno 15 minuta nakon pika otapala. Upotrijebite onoliku količinu mješavine metilnih estera koja je dovoljna da pik metilnog stearata zauzme oko tri četvrtine pune skale.

Broj teoretskih odsječaka, n (učinkovitost), izračunajte koristeći formulu:

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

a rezoluciju, R , koristeći formulu:

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

pri čemu je:

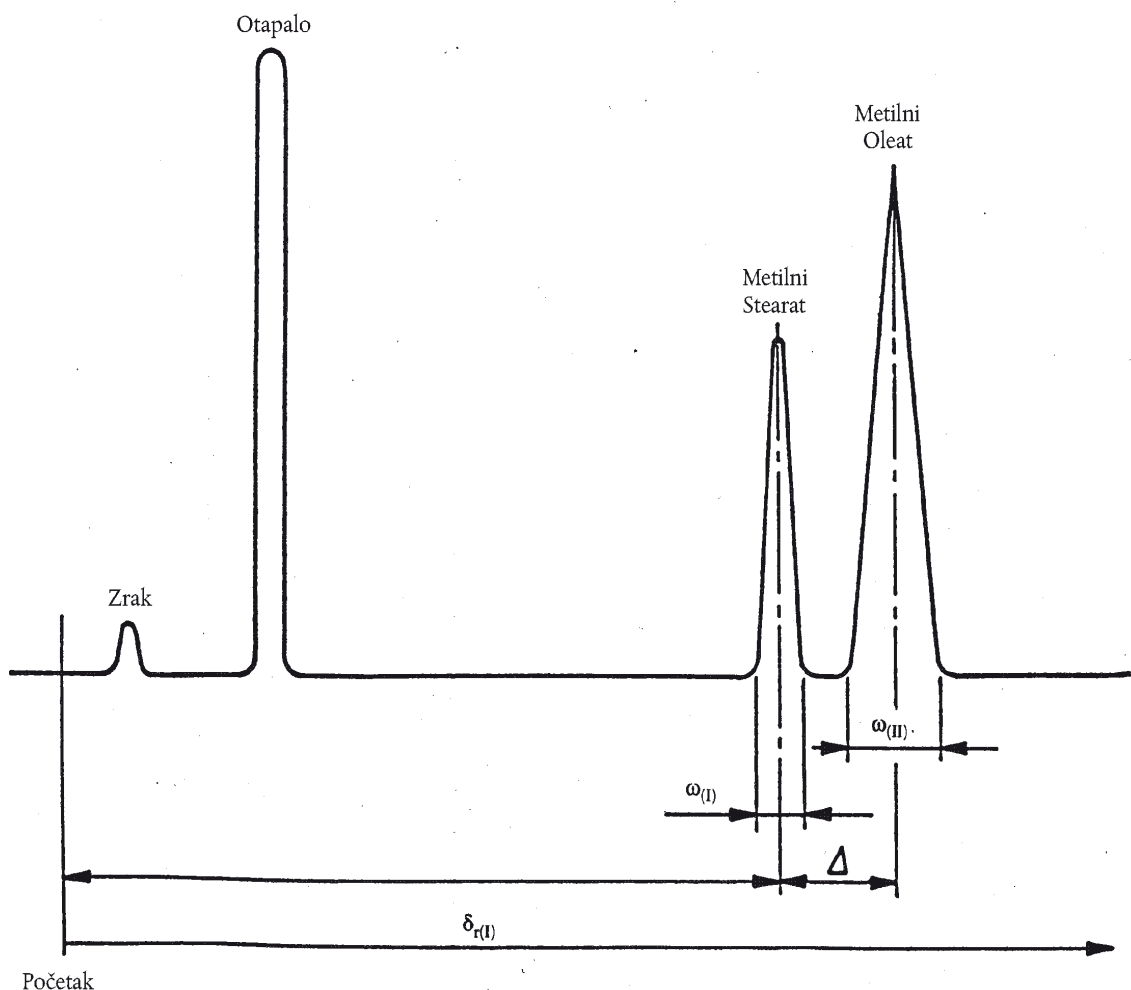
dr_1 retencijska udaljenost, u milimetrima, od početka kromatograma do maksimuma pika metilnog stearata;

ω_1 i ω_2 širine, u milimetrima, pikova metilnog stearata odnosno metilnog oleata, mjerene između sjecišta tangenti na točkama infleksije krivulje s baznom linijom;

Δ udaljenost, u milimetrima, između maksimalnog pika metilnog stearata i metilnog oleata.

Slika 1.

Kromatogram za određivanje broja teoretskih odsječaka (učinkovitost) i rezolucije



Radni uvjeti koje treba odabrati jesu oni koji će omogućiti najmanje 2 000 teoretskih odsječaka po metru duljine kolone za metilni stearat i rezoluciju od najmanje 1,25.

4.2. Ispitivani dio uzorka

Pomoću štrcaljke (3.2.) uzmite između 0,1 i 2 μl otopine metilnog estera pripremljene u skladu s Prilogom X.B i injektirajte u kolonu.

U slučaju da esteri nisu u otopini, pripremite otopinu od približno 100 mg/ml u heptanu kromatografske čistoće i injektirajte između 0,1 i 1 μl ove otopine.

Ako analizirate sastojke prisutne samo u tragovima, veličina ispitivanog dijela uzorka može se povećati (i do deseterostruko).

4.3. Analiza

Općenito, radni uvjeti trebaju biti kao oni utvrđeni u točki 4.1.1.

Međutim, moguće je raditi s nižom temperaturom kolone kad se zahtijeva određivanje masnih kiselina koje imaju manje od 12 atoma ugljika, ili s višom temperaturom kad se zahtijeva određivanje masnih kiselina koje imaju više od 20 atoma ugljika. Povremeno je moguće u oba slučaja koristiti temperaturno programiranje. Primjerice, ako uzorak sadrži metilne estere masnih kiselina s manje od 12 atoma ugljika, injektirajte uzorak na 100 °C (ili na između 50 i 60 °C ako je prisutna maslačna kiselina) i odmah povišite temperaturu brzinom od 4 do 8 °C/min do optimalne. U nekim slučajevima mogu se kombinirati ova dva postupka.

Nakon programiranog zagrijavanja nastavite eluciju na stalnoj temperaturi sve dok sve komponente ne eluiraju. Ako instrument nema programirano zagrijavanje, koristite ga na dvije fiksne temperature između 100 i 195 °C.

Ako je potrebno, preporučuje se provođenje analize na dvije nepromjenjive faze s različitim polarnostima da bi se potvrdilo da nema maskiranih pikova, primjerice u slučaju istovremene prisutnosti konjugiranih $C_{18:3}$ i $C_{20:0}$, ili $C_{18:3}$ i $C_{18:2}$.

4.4. Pripremanje referentnog kromatograma i referentnih grafova

Analizirajte referentnu standardnu mješavinu (2.3.) koristeći iste radne uvjete kao što su oni primijenjeni za uzorak, pa izmjerite retencijska vremena ili retencijske udaljenosti za prisutne masne kiseline. Na semi-logaritamskom papiru, za svaki stupanj nezasićenosti, kreirajte grafove koji pokazuju logaritamsku vrijednost retencijskog vremena ili udaljenosti kao funkciju broja atoma ugljika. U izotermnim uvjetima, grafovi za kiseline ravnog lanca jednakog stupnja nezasićenosti trebali bi biti ravne linije. Te linije trebale bi biti približno paralelne.

Potrebno je izbjegavati uvjete u kojima postoje „maskirani pikovi”, odnosno u kojima rezolucija nije dovoljna da bi se odijelila dva sastojka.

5. ISKAZIVANJE REZULTATA

5.1. Kvalitativna analiza

Identificirajte pikove metilnog estera za uzorak iz grafa pripremljenog prema točki 4.4., ako je potrebno interpolacijom.

5.2. Kvantitativna analiza

5.2.1. Određivanje sastava

Osim u iznimnim slučajevima, koristite metodu interne normalizacije, odnosno, pretpostavite da su svi sastojci uzorka predstavljeni na kromatogramu, tako da ukupna površina pod pikovima predstavlja 100 % sastojaka (ukupna elucija).

Ako oprema uključuje integrator, koristite brojke dobivene od njega. Ako ga ne uključuje, odredite površinu pod svakim pikom tako da pomnožite visinu pika s njegovom širinom na polovici visine, a, kad je potrebno, uzmite u obzir različite atenuacije koje su se koristile tijekom bilježenja.

5.2.2. Metoda izračunavanja

5.2.2.1. Općeniti slučaj

Izračunajte sadržaj danog sastojka i , iskazan kao postotak mase metilnih estera, određivanjem postotka kojega predstavlja površina odgovarajućeg pika u odnosu na zbroj površina svih pikova, koristeći sljedeću formulu:

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

pri čemu je:

A_i površina pod pikom koji odgovara sastojku i ;

ΣA zbroj površina pod svim pikovima.

Rezultat iskažite jednim decimalnim mjestom.

Bilješka 7: U ovom općenitom slučaju, smatra se da rezultat izračuna na temelju relativnih površina predstavlja postotak mase. U slučajevima u kojima ova pretpostavka nije dopuštena, vidjeti točku 5.2.2.2.

5.2.2.2. Korištenje korekcijskih faktora

U nekim slučajevima, primjerice kad su prisutne masne kiseline s manje od osam atoma ugljika ili kiselina sa sekundarnim grupama, kad se koriste detektori toplinske vodljivosti ili kad se posebno zahtijeva najviši stupanj preciznosti, treba koristiti korekcijske faktore da bi se postotke površine pikova pretvorilo u postotke mase sastojaka.

Korekcijske faktore odredite pomoću kromatograma dobivenog analizom referentne mješavine metilnih estera poznatog sastava, provedene pod radnim uvjetima jednakima onima koji su korišteni za uzorak.

Za ovu referentnu mješavinu postotak mase sastojaka i zadan je sljedećom formulom:

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

pri čemu je:

m_i masa sastojka i u referentnoj mješavini;

Σm zbroj masa svih sastojaka referentne mješavine.

Za kromatogram referentne mješavine (4.4.) izračunajte postotak (površina/površina) za sastojak i kako slijedi:

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

pri čemu je:

A_i površina pod pikom koji odgovara sastojku i ;

ΣA zbroj površina pod svim pikovima.

Korekcijski faktor se zatim izračunava kao:

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

Uobičajeno se korekcijski faktori iskazuju u odnosu na K_{C16} , tako da relativni faktori postaju:

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

Za uzorak, sadržaj svakog sastojka i , iskazan kao postotak mase metilnih estera, jest:

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

Rezultat iskažite jednim decimalnim mjestom.

5.2.2.3. Korištenje internog standarda

U nekim analizama (primjerice, gdje nisu sve masne kiseline kvantificirane, kao kad su prisutne kiseline sa četiri i šest ugljika zajedno s kiselinama sa 16 i 18 ugljika, ili kad je potrebno odrediti apsolutnu količinu masnih kiselina u nekom uzorku), potrebno je koristiti interni standard. Često se koriste masne kiseline s pet, 15 ili 17 ugljika. Treba odrediti korekcijski faktor (ako postoji) za interni standard.

Postotak mase sastojka i , iskazan kao metilni esteri, zadan je formulom:

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

pri čemu je:

A_i površina pod pikom koji odgovara sastojku i ;

A_s površina pod pikom koji odgovara Internom standardu;

K'_i korekcijski faktor za sastojak i (u odnosu na K_{CI});

K'_s korekcijski faktor za interni standard (u odnosu na K_{CI6});

m je masa, u miligramima, ispitivanog dijela uzorka;

m_s je masa, u miligramima, internog standarda.

Rezultate iskažite jednim decimalnim mjestom.

6. POSEBAN SLUČAJ - KORIŠTENJE KATAROMETARSKOG DETEKTORA (KOJI RADI NA PRINCIPU PROMJENA TOPLINSKE VODLJIVOSTI)

Plinski kromatograf koji koristi detektor koji radi na načelu promjena toplinske vodljivosti (katarometar) može se koristiti i za određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava mješavine metilnih estera masnih kiselina. Ako se koristi, uvjeti utvrđeni u klauzuli 3. i klauzuli 4. trebaju se modificirati kako je prikazano u tablici 3.

Za kvantitativnu analizu koristite korekcijske faktore definirane u točki 5.2.2.2.

Tablica 3.

Varijabla	Vrijednost/uvjet
Kolona	Duljina: 2 do 4 metra Unutarnji promjer: 4 mm
Nositelj	Veličina zrna između 160 i 200 μm
Koncentracija stacionarne faze	15 do 25 % (m/m)
Plin nosač	Helij ili, ako ga nema, vodik, s najmanjim mogućim sadržajem kisika
Pomoćni plinovi	Nema
Temperatura injektora	Od 40 do 60 °C viša od temperature kolone
Temperatura kolone	180 do 200 °C
Protok plina nosača	Obično između 60 i 80 ml/min
Veličina injektiranog dijela uzorka	Obično između 0,5 i 2 μl

7. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

Izješće o ispitivanju treba navesti metode korištene za pripremanje metilnih estera i za plinsku kromatografsku analizu te dobivene rezultate. Treba također sadržavati sve pojedinosti djelovanja koja nisu navedena u ovoj Međunarodnoj normi, ili se smatraju opcionalnima, zajedno s pojedinostima o bilo kojem događaju koji je mogao utjecati na rezultate.

Izješće o ispitivanju treba uključivati sve informacije potrebne za potpunu identifikaciju uzorka.

PRILOG X.B

**PRIPREMANJE METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA
U SKLADU S GLAVAMA I. I II. PRILOGA VI. UREDBI (EEZ) BR. 72/77 ILI S DOLJE OPISANOM METODOM**

UVOD

Izbor postupka uvjetovan je kiselinskim sastavom i kiselošću masne tvari koja se ispituje te metodom plinske kromatografije kojom će se analiza provesti.

Detaljnije:

- za masne tvari koje sadrže masne kiseline s manje od 12 atoma ugljika mogu se koristiti samo postupci sa zataljenom posudicom ili postupci u kojima se koristi dimetil sulfat,
- za masne tvari čija je kiselost iznad 3 % mogu se koristiti samo postupci sa metanol-solnom kiselinom ili s metilnim sulfatom,
- za mjerenja trans-izomera plinskom kromatografijom mogu se koristiti samo postupci u kojima se koristi natrijev metilat ili dimetil sulfat,
- za pripremanje metil estera iz malih količina masne tvari iz odjeljivanja tankoslojnom kromatografijom mora se koristiti postupak s metanol-heksan-šumpornom kiselinom.

Prisutnost neosapunjivih tvari može se zanemariti pod uvjetom da ne prelaze 3 %, inače se metilni esteri moraju pripremiti iz masnih kiselina.

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Opisano je pet postupaka za pripremanje metilnih estera iz masnih tvari:

- (a) s natrijevim metilatom;
- (b) s natrijevim metilatom u zataljenoj posudici;
- (c) sa solnom kiselinom u metanolu u zataljenoj posudici;
- (d) s dimetil sulfatom;
- (e) s metanol-heksan-šumpornom kiselinom.

Postupak A

2. PRINCIP

Masna tvar koja se analizira zagrijava se pod povratnim hladilom s metilnim alkoholom i natrijevim metilatom. Dobiveni metilni esteri ekstrahiraju se etilnim eterom.

3. OPREMA

- 3.1. Tikvica volumena 100 ml s povratnim hladilom, s kivetom od natrijevog karbonata pričvršćenom na vrh, s spojevima od brušenog stakla.
- 3.2. Odmjerne staklene posude, volumena 50 ml.
- 3.3. Odmjerna pipeta, volumena 5 ml, s podjelom po 0,1 ml.
- 3.4. Lijeveći za odjeljivanje, volumena 250 ml.
- 3.5. Tikvica volumena 200 ml.

4. REAGENSI

- 4.1. Bezvodni metanol.

- 4.2. Otopina natrijevog metilata u metanolu, približno 1 %-tna; pripremite ju tako da otopite 0,34 g metalnog elementarnog natrija u 100 ml bezvodnog metanola.
- 4.3. Etilni eter.
- 4.4. 10 %-tna otopina natrijevog klorida.
- 4.5. 40 do 60 °C petroleter.
5. POSTUPAK
 - 5.1. U tikvicu volumena 100 ml stavite 2 g masne tvari koja je prethodno osušena na natrijevom sulfatu i profiltrirana. Dodajte 35 ml metanola, namjestite hladilo i pustite da vrije pod povratnim hladilom nekoliko minuta.
 - 5.2. Zaustavite postupak zagrijavanja, maknite hladilo i brzo dodajte 3,5 ml otopine natrijevog metilata; ponovno namjestite hladilo i pustite da vrije pod povratnim hladilom ne kraće od 3 sata. Metiliranje je završeno kad su sve masne tvari postale tekuće i kad je mješavina reagensa savršeno bistra na sobnoj temperaturi.
 - 5.3. Ohladite i ulijte mješavinu reagensa u lijevak za odjeljivanje, volumena 250 ml, dodajte između 35 i 40 ml etilnog etera, 100 ml vode i 5 do 6 ml 10 %-tne otopine natrijevog klorida. Protresite i pustite da se slojevi odijele. Prebacite vodenu fazu u drugi lijevak za odjeljivanje i još jedanput ekstrahirajte sa 25 ml etilnog etera. Pomiješanim ekstraktima etera dodajte 50 ml 40 do 60 °C petroletera. Voda će se odijeliti i možete ju odstraniti.

Operite etersku fazu tri puta sa 10 do 15 ml vode, osušite na natrijevom sulfatu i profiltrirajte kroz papir, skupljajući filtrat u tikvicu volumena 200 ml.

Isparite otapalo do 20 ml, završavajući postupak iznad parne kupelji u struji čistog dušika.

Postupak B

2. PRINCIP

Masna tvar koja se analizira obrađuje se metanolskom otopinom natrijevog metilata, u dobro začepljenoj posudici, na temperaturi 85 do 90 °C.
3. OPREMA
 - 3.1. Čvrsta staklena posudica volumena približno 5 ml (visine između 40 i 45 mm, promjera između 14 i 16 mm).
 - 3.2. Odmjerna pipeta, volumena 1 ml, s podjelom po 0,1 ml.
4. REAGENSI
 - 4.1. Otopina natrijevog metilata u metanolu, približno 1,5 %-tna. Pripremite ju tako da otopite 0,50 g metalnog natrija u 100 ml bezvodnog metanola.
5. POSTUPAK
 - 5.1. U staklenu posudicu stavite 2 g masne tvari koja je prethodno osušena na natrijevom sulfatu i profiltrirana. Dodajte 0,3 g (približno 0,4 ml) otopine natrijevog metilata i zatalite posudicu.
 - 5.2. Uronite posudicu na 2 sata u vodu temperature 85 do 90 °C, uz povremeno protresanje. Postupak esterifikacije završen je kad sadržaj posudice bude bistar nakon sedimentacije glicerina i ostatka reagensa.
 - 5.3. Ohladite na sobnoj temperaturi. Posudicu otvorite neposredno prije korištenja metilnih estera. Oni ne zahtijevaju nikakvu daljnju obradu prije stavljanja u uređaj za plinsku kromatografiju.

Postupak C

2. PRINCIP

Masna tvar koja se analizira obrađuje se metanol-solnom kiselinom, u zataljenoj posudici, na 100 °C.

3. OPREMA
 - 3.1. Čvrsta staklena posudica volumena približno 5 ml (visine 40 do 45 mm, promjera 14 do 16 mm).
 - 3.2. Kalibrirane pipete volumena 1 i 2 ml.
4. REAGENSI
 - 4.1. 2 %-tna otopina solne kiseline u metanolu. Pripremite ju od plinovite solne kiseline i bezvodnog metanola (bilješka 1.).
 - 4.2. Heksan za plinsku kromatografiju.
5. POSTUPAK
 - 5.1. U staklenu posudicu stavite 0,2 g masne tvari koja je prethodno osušena na natrijevom sulfatu i profiltrirana, i 2 ml otopine solne kiseline u metanolu. Zatalite posudicu.
 - 5.2. Uronite posudicu u vodu temperature 100 °C na 40 minuta.
 - 5.3. Ohladite posudicu pod tekućom vodom, otvorite ju, dodajte 2 ml destilirane vode i 1 ml heksana. Centrifugirajte i odstranite heksansku fazu koja je spremna za uporabu.

Postupak D

2. PRINCIP

Masna tvar koja se analizira saponificira se otopinom kalijevog hidroksida u metilnom alkoholu, a zatim obrađuje dimetil sulfatom. Kad se doda solna kiselina, metilni esteri koji su se formirali automatski se odjeljuju. Daljnjom obradom aluminijskim oksidom dobivaju se iznimno čisti metilni esteri.
3. OPREMA
 - 3.1. Čvrsta epruveta volumena od približno 20 ml s 10/19 čepom od brušenog stakla i sigurnosnim kvačicama.
 - 3.2. Povratna hladila s 10/19 nastavcima od brušenog stakla.
 - 3.3. Stakleni filtri sa sinter diskom, veličine G 2, promjera 20 mm.
 - 3.4. Staklene epruvete volumena približno 10 ml, s koničnim dnom.
 - 3.5. Štrcaljke od 1 ml i 5 ml.
4. REAGENSI
 - 4.1. Kalijev hidroksid, 10 %-tna otopina u metilnom alkoholu, za plinsku kromatografiju.
 - 4.2. Indikator bromkrezol zeleno: 0,05 %-tna otopina u metilnom alkoholu.
 - 4.3. Dimetil sulfat ($\rho = 1,335$ pri 15 °C).
 - 4.4. Koncentrirana solna kiselina ($\rho = 1,19$), razrijeđena u jednakim dijelovima metilnim alkoholom za plinsku kromatografiju.
 - 4.5. Aluminijski oksid po Brockmannu, za adsorpcijsku kromatografiju.
5. POSTUPAK
 - 5.1. U epruvetu volumena 20 ml stavite 2,2 ml masne tvari koja je prethodno osušena na natrijevom sulfatu i profiltrirana. Dodajte 5 ml otopine kalijevog hidroksida i nekoliko kvarcnih zrnaca radi kontroliranja vrenja. Pričvrstite povratno hladilo i zagrijavajte nad slabim plamenom pet minuta, uz protresanje. Saponifikacija će biti završena kad je otopina bistra. Na kraju ohladite pod tekućom vodom i odstranite hladilo.

- 5.2. Dodajte dvije kapi indikatora i, koristeći štrcaljku, 1 ml dimetil sulfata, i to polako. Hermetički začepite posudicu i protresajte ju između dvije i tri minute, a donji dio posudice u učestalim intervalima uranjajte u kipuću vodenu kupelj. Reakcija je završena kad se boja indikatora promjeni iz plave u žutu. Na kraju, ohladite posudicu pod tekućom vodom, otvorite ju i dodajte 5 ml otopine solne kiseline u metanolu.
- 5.3. Nakon što ste ju nekoliko sekundi tresli, odložite posudicu pod određenim kutom i zatim ju lagano kuckajte. To će pomoći izdizanju metilnih estera na površinu, u obliku uljane mase (bilješka A).
- Metilne estere odstranite pomoću štrcaljke, stavite ih u epruvetu s koničnim dnom, dodajte aluminijev oksid u zapremini koja je jednaka približno $\frac{1}{4}$ volumena metilnih estera, protresite i profilirajte preko filter-papira.
- Bilješka A.* Ako se metilni esteri ne odijele spontano, dodajte 5 ml vode u epruvetu i zatim protresite.

Postupak E

2. PRINCIP

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

3. OPREMA

- 3.1. Epruveta volumena od približno 20 ml, sa zračnim povratnim hladilom duljine približno 1 m, sa spojevima od brušenog stakla.
- 3.2. Kalibrirana pipeta volumena 5 ml.
- 3.3. Lijevak za odjeljivanje volumena 50 ml.
- 3.4. Odmjerne posude volumena 10 ml i 25 ml.
- 3.5. Epruveta volumena 15 ml s koničnim dnom.

4. REAGENSI

- 4.1. Reagens za metiliranje: bezvodna metanol-heksan-koncentrirana sumporna kiselina ($\rho = 1,84$) u omjeru 75:25:1 (V/V/V).
- 4.2. 40 do 60 °C petroleter.
- 4.3. Bezvodni natrijev sulfat.

5. POSTUPAK

- 5.1. Tvar prikupljenu s kromatografske ploče stavite u epruvetu volumena 20 ml i dodajte 5 ml reagensa za metiliranje.
- 5.2. Namjestite povratno hladilo i zagrijavajte 30 minuta u kipućoj vodenoj kupelji (bilješka 2.).
- 5.3. Mješavinu kvantitativno prenesite u lijevak za odjeljivanje volumena 50 ml, pomoću 10 ml destilirane vode i 10 ml petroletera. Snažno protresite i pustite da se faze odijele, odstranite vodenu fazu i isperite sloj etera dva puta s 20 ml destilirane vode. U lijevak za odjeljivanje dodajte malu količinu bezvodnog natrijevog sulfata, protresite, pustite nekoliko minuta da se slegne i profilirajte, skupljajući filtrat u epruveti volumena 15 ml s koničnim dnom.

Isparite otapalo iznad vodene kupelji u struji dušika.

Bilješka 1. Male količine plinovite solne kiseline mogu se lako pripremiti u laboratoriju jednostavnim izlučivanjem iz otopine dostupne u slobodnoj trgovini ($\rho = 1,18$), kapanjem koncentrirane sumporne kiseline ($\rho = 1,84$). Oslobođeni plin lako se suši propuhivanjem kroz konc. sumpornu kiselinu. Budući da se solna kiselina vrlo brzo apsorbira u metanolu, preporučuje se poduzimanje uobičajenih mjera predostrožnosti prilikom njezina otapanja, primjerice, plin uvodite kroz mali okrenuti lijevak čiji rub jedva da dodiruje površinu tekućine. Velike količine otopine solne kiseline u metanolu mogu se pripremiti unaprijed, budući da se savršeno čuva u bocama sa staklenim čepom, pohranjenima na tamnom mjestu.

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

PRILOG XI.

ODREĐIVANJE SADRŽAJA HLAPIVIH HALOGENIRANIH OTAPALA U MASLINOVOM ULJU

1. METODA
Analiza plinskom kromatografijom uz korištenje „head space” tehnike.
2. OPREMA
 - 2.1. Uređaj za plinsku kromatografiju opremljen detektorom zahvata elektrona (ECD).
 - 2.2. Uređaj „head space”.
 - 2.3. Staklena kolona za plinsku kromatografiju, duljine 2 m i promjera 2 mm, stacionarna faza faza OV 10110 % ili ekvivalent, na nositelju od kalcinirane, diatomske zemlje, oprane kiselinom i silanizirane, veličine čestica 80 do 100 mesh.
 - 2.4. Nosač i pomoćni plin: dušik za plinsku kromatografiju, odgovarajući za detekciju zahvatom elektrona.
 - 2.5. Staklene tikvice od 10 do 15 ml, s teflonskim slojem i aluminijskim čepom kroz kojeg se može uvesti štrcaljka.
 - 2.6. Spojnice za hermetičko zatvaranje.
 - 2.7. Štrcaljka za plin između 0,5 i 2 ml.
3. REAGENSI
Standard: halogenirana otapala čiji stupanj čistoće odgovara za plinsku kromatografiju.
4. POSTUPAK
 - 4.1. Točno odvagajte oko 3 g ulja u staklenoj tikvici (koja se neće ponovno koristiti); hermetički ju začepite. Stavite ju u termostat na 70 °C na sat vremena. Koristeći štrcaljku pažljivo izuzmite između 0,2 i 0,5 ml „head space”-a (parne faze). Injektirajte ju u kolonu uređaja za plinsku kromatografiju namještenoj kako slijedi:
 - temperatura injektora: 150 °C,
 - temperatura kolone: 70 do 80 °C,
 - temperatura detektora: 200 do 250 °C.Mogu se koristiti i druge temperature pod uvjetom da rezultati ostanu ekvivalentni.
 - 4.2. Referentne otopine: pripremite standardne otopine koristeći rafinirano maslinovo ulje bez tragova otapala u koncentracijama u rasponu od 0,05 do 1 ppm (mg/kg) i koji odgovaraju pretpostavljenom sadržaju uzorka. Halogenirana otapala mogu se razrijediti korištenjem pentana.
 - 4.3. Kvantitativna prosudba: usporedite površine ili visine pikova uzorka i standardne otopine one koncentracije za koju pretpostavljate da je najpribližnija. Ako je odstupanje veće od 10 %, treba ponoviti analizu uz uspoređivanje s nekom drugom otopinom standarda dok odstupanje ne bude manje od 10 %. Sadržaj se određuje na temelju prosjeka elementarnih injiciranja.
 - 4.4. Iskazivanje rezultata: u ppm (mg/kg). Granica detekcije za ovu metodu je 0,01 mg/kg.

PRILOG XII.

ORGANOLEPTIČKA PROSUDBA DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

1. OPSEG

Svrha je ove metode određivanje kriterija koji su potrebni za prosuđivanje karakteristika arome djevičanskog maslinovog ulja i razvijanje za to potrebne metodologije.

2. PODRUČJE PRIMJENE

Opisana metoda primjenjiva je isključivo na organoleptičko prosuđivanje i klasifikaciju djevičanskog maslinovog ulja koje se direktno koristi u prehrambene svrhe. Ograničena je na razvrstavanje djevičanskog maslinovog ulja prema brojčanoj ljestvici s obzirom na percepciju njegove arome, a prema sudu grupe odabranih organoleptičkih ocjenjivača koji djeluju u organiziranoj komisiji.

3. OPĆENITI TEMELJNI RJEČNIK SENZORNE ANALIZE

Vidjeti poglavlje naslovljeno „Senzorna analiza: općeniti temeljni rječnik“.

4. SPECIFIČNI RJEČNIK ZA MASLINOVO ULJE

Badem: ova se aroma može pojaviti u dva oblika: onom tipičnome za svježe bademe, ili onom specifičnome za sušene zdrave bademe, a koji se zabunom može zamijeniti za početak kvarenja. Taj se specifični okus opažava kao naknadni okus („*aftertaste*“) kada se ulje zadržava na jeziku i nepcu, a povezuje se sa slatkim uljima blagog mirisa.

Biljna voda: karakteristična aroma kakvu ulje poprima zbog lošeg dekantiranja i dugotrajnog dodira s biljnom vodom.

Blago ili slabo: aroma maslinovog ulja čija su organoleptička svojstva vrlo slaba zbog gubitka aromatskih sastojaka.

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

Crvljivo: aroma karakteristična za ulje dobiveno iz maslina koje su napale ličinke maslinine muhe (*Dacus oleae*).

Filtar slojnica: aroma karakteristična za ulje koje je dobiveno iz maslina koje su prešane na prljavim filter slojnicama sa zaostalim fermentiranim ostacima.

Gorko: aroma karakteristična za ulja dobivena iz zelenih maslina ili maslina koje su tek počele mijenjati boju. Može biti više ili manje ugodna, ovisno o intenzitetu.

Grubo: karakterističan dojam kod nekih ulja koja prilikom kušanja u ustima ostavljaju osjećaj kao da su obložena gustom pastom.

Jabuka: aroma maslinovog ulja koje podsjeća na ovo voće.

Kiselo-octeno: karakteristična aroma nekih ulja koja podsjeća na vino ili ocat, uglavnom zbog stvaranja octene kiseline, etil acetata i etanola u količinama koje su veće od uobičajenih za okus maslinovog ulja.

Komina: karakteristična aroma koja podsjeća na okus komine maslina.

Krastavci: aroma koja nastaje kad je ulje predugo hermetički zatvoreno, posebno u limenim spremnicima, a pripisuje se stvaranju 2,6 nonadienala.

Metalno: aroma koja podsjeća na metal. Karakteristična je za ulja koja su dugotrajno i u neprikladnim uvjetima bila izložena dodiru s prehrambenim proizvodima ili metalnim površinama tijekom drobljenja, miješanja, prešanja ili skladištenja.

Oporo: aroma karakteristična za ulje dobiveno iz maslina koje su prešane između novih dijelova filter slojnica. Aroma se može razlikovati ovisno o tome jesu li filter slojnice napravljene od zelene trave esparto ili sušene trave esparto.

Pljesnivo: aroma karakteristična za ulje koje je dobiveno iz maslina koje su bile uskladištene u hrpama i koje su već zašle u odmaklu fazu fermentacije.

Pljesnivo-vlažno: aroma karakteristična za ulja koja su dobivena iz plodova na kojima su se, a zbog skladištenja u hrpama i vlažnim uvjetima tijekom razdoblja od nekoliko dana, razvile brojne gljivice i kvasci.

Sapunast: aroma koja mirisom i okusom podsjeća na zeleni sapun.

Sijeno: aroma karakteristična za neka ulja, a podsjeća na više ili manje posušenu travu.

Salamura: aroma ulja koje je dobiveno iz maslina koje su čuvane u slanoj otopini.

Slatko: ugodan okus koji nije sladak poput šećera, no može se osjetiti u uljima u kojima ne prevladavaju gorak, trpak i oštar okus.

Staro: aroma karakteristična za ulje koje je predugo stajalo u spremnicima. Također se može javiti kod ulja koja su pretjerano dugo bila zapakirana.

Strojno ulje: miris maslinovog ulje koje je dobiveno u prerađivačkom pogonu u kojem strojevi nisu dobro očišćeni od ostataka nafte, ulja za podmazivanje i mineralnih ulja.

Trava: karakteristična aroma nekih ulja koji podsjeća na svježe pokošenu travu.

Trpk: karakterističan okus nekih ulja koja, nakon kušanja, izazivaju osjećaj stezanja usta.

Užglo: karakteristična aroma koja je zajednička svim uljima i mastima koja su zbog dugotrajne izloženosti zraku pretrpjela proces autooksidacije. Ovaj je aroma neugodna i ne može se popraviti.

Voćno: aroma koja mirisom i okusom podsjeća na zdravo, svježe, idealno dozrelo voće.

Zagrijano ili zagoreno: aroma karakteristična za ulja koja su bila izložena pretjeranom i/ili dugotrajnom zagrijavanju tijekom prerade, posebno u slučaju kad se miješanje provodilo u neprikladnim temperaturnim uvjetima.

Zeleno lišće (gorko): aroma ulja koje je dobiveno od prezelenih maslina ili maslina koje su bile prešane zajedno s lišćem i grančicama.

Zemljasto: aroma karakteristična za ulje dobiveno iz maslina koje su sakupljene s ostacima zemlje ili blata i nisu oprane. Ova aroma katkad može biti popraćena ustajalo-vlažnom aromom.

Zrelo voće: aroma maslinovog ulja koje je dobiveno iz zrelih plodova, uglavnom je blagog mirisa i slatkog okusa.

5. ČAŠE ZA ORGANOLEPTIČKO OCJENJIVANJE ULJA

Vidjeti poglavlje naslovljeno „Čaša za organoleptičko ocjenjivanje ulja”.

6. PROSTOR ZA ORGANOLEPTIČKO OCJENJIVANJE

Vidjeti poglavlje naslovljeno „Vodič za uređivanje prostora za organoleptičko ocjenjivanje”.

7. OPREMA

Da bi organoleptički ocjenjivači mogli pravilno provesti svoj zadatak, u svakom odjeljku nadohvat ruke treba se nalaziti sljedeća oprema:

- čaše (standardizirane) koje sadrže uzorke označene oznakom koja se sastoji od dviju nasumično odabranih brojki ili od dviju brojki i slova. Oznake moraju biti napisane pisaljkom koja se ne može obrisati i koja nema mirisa.
- satna stakalca s identičnim oznakama kojima se čaša poklopi,
- ocjenjivački listić (vidjeti sliku 2.) koji sadrže i upute za ispunjavanje,
- obična ili kemijska olovka,
- maleni pladnjevi na kojima su poslužene kriške jabuke,
- čaša vode sobne temperature.

8. METODOLOGIJA

Ovim se odjeljkom propisuje predznanje koje je potrebno za senzorsku analizu djevičanskih maslinovih ulja te pokušava normirati ponašanje i postupanje ocjenjivača koji sudjeluju u takvom ocjenjivanju, a koji moraju biti upoznati kako s općim tako i s posebnim preporukama za organoleptičko ocjenjivanje maslinovog ulja.

8.1. Dužnosti organizatora ili predsjednika komisije (ili ocjenjivačke komisije)

Predsjednik ocjenjivačke komisije mora imati odgovarajuću obuku i obrazovanje te biti stručnjak za one vrste ulja s kojima će se susretati tijekom svojeg rada. On je ključna osoba u komisiji i odgovorna za njezino organiziranje i funkcioniranje. On treba dovoljno rano okupiti organoleptičke ocjenjivače i razjasniti sve nedoumice koje bi oni mogli imati, a koje se odnose na provođenje ocjenjivanja, međutim, treba se suzdržati od tog da im da ikakvo svoje mišljenje o danom uzorku.

Odgovoran je za inventuru opreme i za osiguravanje njezine odgovarajuće čistoće, za pripremanje i označavanje (kodiranje) uzoraka i njihovo predstavljanje organoleptičkim ocjenjivačima u skladu s odgovarajućim načinom ispitivanja, kao i za prikupljanje i statističku obradu dobivenih podataka, kako bi se uz minimalni trud postigli najbolji rezultati.

Rad predsjednika ocjenjivačke komisije traži senzorne vještine, pedantnost prilikom pripremanja ocjenjivanja i njihov strog raspored, kao i vještinu i strpljivost koji su potrebni za planiranje i provođenje ocjenjivanja. Dužnost predsjednika komisije je i podizanje morala među članovima komisije putem poticanja interesa, radoznalosti i natjecateljskog duha među njima. On mora osigurati da neće odati svoje mišljenje i mora spriječiti moguće vođe da svoje kriterije nametnu drugim organoleptičkim ocjenjivačima. Osim toga, odgovoran je za obuku, odabir i promatranje organoleptičkih ocjenjivača s ciljem potvrđivanja održavaju li svoje sposobnosti na odgovarajućoj razini.

8.2. Uvjeti za ocjenjivanje

8.2.1. Veličina uzorka

Svaka čaša treba sadržavati 15 ml ulja.

8.2.2. Temperatura ocjenjivanog uzorka

Uzroci ulja koji će se ocjenjivati moraju se čuvati u čašama na temperaturi od $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Ova je temperatura odabrana zbog toga što je najpogodnija za lako uočavanje organoleptičkih razlika, na normalnoj temperaturi, kad se ulja koriste kao začini. Drugi čimbenik koji govori u prilog odabiru ove temperature jest taj što na višim ili nižim temperaturama aromatski sastojci gotovo i ne hlape, ili se pak stvaraju hlapivi sastojci koji su svojstveni zagrijanim uljima.

8.2.3. Vrijeme ocjenjivanja

Jutro je najbolje vrijeme za ocjenjivanje ulja. Dokazano je da tijekom dana postoje optimalna razdoblja za osjetila okusa i mirisa.

Obrocima prethodi razdoblje u kojem se povećava osjetljivost na podražaje mirisa i okusa, dok se nakon njih ta percepcija smanjuje.

Međutim, s ovim kriterijem ne treba pretjerivati do te mjere da glad počne ometati organoleptičke ocjenjivače u smislu smanjivanja njihove sposobnosti razlikovanja i, posebno, kriterije sklonosti i prihvaćanja.

9. ORGANOLEPTIČKI OCJENJIVAČI

Osobe koje kao organoleptički ocjenjivači sudjeluju u organoleptičkim ocjenjivanjima jestivih maslinovih ulja trebaju biti obučavani i odabirani u skladu s njihovim sposobnostima razlikovanja sličnih uzoraka; treba imati na umu da će se njihova preciznost poboljšati daljnjom obukom (vidjeti odgovarajući odjeljak).

Organoleptičko ocjenjivanje zahtijeva između 8 i 12 ocjenjivača, iako je mudro imati nekoliko rezervnih organoleptičkih ocjenjivača u slučaju nečije moguće odsutnosti.

9.1. Općenite preporuke za kandidate i organoleptičke ocjenjivače

Ove se preporuke odnose na ponašanje kandidata i organoleptičkih ocjenjivača tijekom njihova rada.

Kad ih predsjednik komisije pozove da sudjeluju u organoleptičkom ocjenjivanju, organoleptički ocjenjivač treba biti u stanju prisustvovati u unaprijed određeno vrijeme i treba se pridržavati sljedećega:

- 9.1.1. Ne smije pušiti barem 30 minuta prije vremena određenog za ocjenjivanje.
- 9.1.2. Ne smije koristiti nikakav parfem, kozmetički preparat niti sapun čiji bi se miris mogao zadržati do vremena organoleptičkog ocjenjivanja. Treba koristiti neparfimirani ili blago parfimirani sapun za pranje ruku koji nakon tog treba isprati i osušiti onoliko puta koliko je potrebno da bi se eliminirali svi mirisi.
- 9.1.3. Mora postiti barem jedan sat prije početka organoleptičkog ocjenjivanja.
- 9.1.4. Ako osjeti da se fizički ne osjeća dobro, a posebno ako su mu pogođena osjetila mirisa ili okusa, ili ako se zbog nekog psihološkog čimbenika ne može koncentrirati na posao, organoleptički ocjenjivač o tome treba izvijestiti predsjednika komisije kako bi ga oslobodio od ocjenjivanja ili donio odgovarajuću odluku, imajući pritom na umu moguća odstupanja srednjih vrijednosti ostatka ocjenjivačke komisije.
- 9.1.5. Nakon što je udovoljio svim gore navedenim uvjetima, organoleptički će ocjenjivač mirno i u tišini zauzeti svoje mjesto u dodijeljenom mu odjeljku za ocjenjivanje.
- 9.1.6. Kad sjedne, provjerit će ima li ispravnu opremu i je li ona pravilno složena te će provjeriti odgovaraju li oznake na čašama oznakama na staklenim poklopcima.
- 9.1.7. Pažljivo će pročitati upute koje se nalaze na ocjenjivačkom listiću i neće početi s ocjenjivanjem uzoraka sve dok nije u potpunosti siguran u to kakav zadatak treba ispuniti. Pojavi li se ikakva nedoumica, o poteškoćama na koje je naišao treba razgovarati nasamo s predsjednikom ocjenjivačke komisije.

- 9.1.8. Organoleptički ocjenjivač treba uzeti čašu, koju pritom treba držati poklopljenom staklenim poklopcem, i lagano je nagnuti; zatim je u tom položaju treba potpuno zarotirati tako da tekućina obloži čim veću unutarnju površinu čaše. Nakon što je ovaj korak završen, treba otklopiti čašu i mirisati uzorak jednakomjernim, polaganim i dubokim udisajima sve dok ne stvori mišljenje o uzorku koji prosuđuje. Mirisanje ne smije trajati dulje od 30 sekundi. Ako u tom roku ne stvori zaključak, prije novog pokušaja treba se nakratko odmoriti. Nakon završetka ocjenjivanja mirisa organoleptički ocjenjivač treba ocijeniti aromu (cjelokupni dojam dobiven mirisom, okusom i dodirom). U tu svrhu treba uzeti mali gutljaj ulja (približno 3 ml). Iznimno je važno ulje rasporediti po cijeloj usnoj šupljini, od prednjeg dijela usta i jezika, sa strane i do stražnjeg dijela pa sve do nepca, budući da je poznato da intenzitet percepcije četiriju osnovnih okusa – slatkoga, slanoga, kiselog i gorkog – varira ovisno o dijelu jezika i nepca.

Treba istaknuti da je od ključne važnosti rasporediti dovoljnu količinu ulja vrlo polako preko stražnje strane jezika prema grlu i da se istodobno organoleptički ocjenjivač koncentrira na redosljed kojim se javljaju gorki i oštri podražaji, jer bi u protivnome oba ta podražaja kod nekih ulja mogla proći nezamijećeno ili bi pak podražaj oštine mogao prikriti gorčinu.

Uvlačenje kratkih uzastopnih udisaja kroz usta omogućava organoleptičkom ocjenjivaču ne samo da dobro rasporedi uzorak po cijeloj usnoj šupljini, već i da uoči hlapive aromatske sastojke u stražnjem dijelu nosa.

Treba razmotriti i osjetilni doživljaj. Prema tome, ako se mogu osjetiti, treba zabilježiti žitkost, ljepljivost i oštrinu, a ako se to traži u ocjenjivanju, treba brojačno odrediti njihov intenzitet.

- 9.1.9. Prilikom organoleptičke prosudbe djevičanskog maslinovog ulja ocjenjuje se po jedan uzorak s ciljem izbjegavanja učinka usporedbe do kojega može doći kad se uzroci ocjenjuju neposredno jedan za drugim.

Budući da uzastopno ocjenjivanje dovodi do zamora ili smanjuje osjetljivost, važno je koristiti neko sredstvo koje će iz usta odstraniti ostatke ulja iz prethodnog ocjenjivanja.

Preporučuje se kriška jabuke (oko 15 g), koju se nakon žvakanja može ispljunuti u pljuvačnicu. Nakon tog se usta isperu s malo vode sobne temperature. Između završetka jednog organoleptičkog ocjenjivanja i početka drugog mora proteći barem 15 minuta.

9.2. Odabir kandidata

Ovaj korak provodi predsjednik ocjenjivačke komisije koji treba osobno razgovarati s kandidatima kako bi se upoznao s njihovom osobnošću i okolinom. Psihofizički uvjeti koji moraju biti ispunjeni nisu vrlo strogi budući da, u teoriji, sudjelovati može svaka zdrava osoba. Danas su čimbenike poput spola, starosti, osobnih navika (pušenje), i tako dalje potisnuli drugi kao što su zdravlje, osobni interesi i dovoljno slobodnog vremena za obavljanje posla.

Tijekom razgovora predsjednik komisije treba kandidatu objasniti karakteristike njegova zadatka i reći mu koliko će približno to trajati. Od kandidata zatim treba dobiti takve informacije koje će mu pomoći u prosuđivanju njegovih interesa i motiviranosti te količine vremena koju uistinu ima na raspolaganju. Sljedeći upitnik može pomoći kao referenca.

UPITNIK

Molimo Vas da odgovorite na sljedeća pitanja:

- | | | |
|---|--------------------------|--------------------------|
| | da | ne |
| 1. Želite li sudjelovati u radu na ovu temu? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Mislite li da bi ovakav rad mogao doprinijeti poboljšanju kvalitete prehrambenih proizvoda na domaćem i međunarodnom tržištu? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. Ako da, zbog čega ⁽¹⁾ | | |
| | | |
| | | |
| 4. Trebate biti svjesni činjenice da ćete morati kušati ulja kad Vas se na to pozove. Jeste li spremni to učiniti? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | da | ne |
| 5. Biste li željeli usporediti svoje osjete njuha i okusa s onima Vaših kolega? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | da | ne |
| 6. Imate li vremena za to? Jeste li u dovoljnoj mjeri neovisni da svoj radni dan možete organizirati kako Vama odgovara? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | da | ne |
| 7. Ako ovisite o nadređenoj osobi, mislite li da biste mogli izostati s posla u razdoblju ne duljem od pola sata u nekoliko navrata tijekom nekoliko uzastopnih dana? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | da | ne |
| 8. Biste li na poslu mogli nadoknaditi vrijeme izgubljeno zbog sudjelovanja u senzorskoj analizi? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | da | ne |
| 9. Mislite li da biste za ovaj rad trebali dobiti naknadu? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | da | ne |
| 10. Kakvu? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Predsjednik komisije treba na osnovu prikupljenih informacija odabrati kandidate i odbiti one koji pokazuju slab interes za ovakav rad, koji nisu na raspolaganju, kao i one koji se nisu u stanju jasno izražavati.

9.3. Određivanje „srednjeg praga” grupe za „karakteristične značajke”

Pažljivo odaberite četiri ulja od kojih se svako smatra reprezentativnim za jednu od sljedećih značajki: pljesnivost, kiselost, užeglost i gorčinu, i čiji je intenzitet čim je moguće veći i jasniji.

Uzmite jednaki dio svakog ulja i pripremite uzroke čije se koncentracije razlikuju u omjeru naprama 2, razrjeđujući svaki sljedeći uzorak odgovarajućim neutralnim uljem sve dok se više ne može osjetiti nikakva razlika između čaše koja sadrži samo neutralno ulje i posljednja dva ili tri razrjeđenja. Posljednji par čaša sadrži samo neutralno ulje.

Završite niz čašama koje sadrže veće koncentracije, sve dok ne budete imali osam čaša.

Pripremite dovoljnu količinu uzoraka različitih koncentracija tako da svaki kandidat dobije kompletan niz za svaku značajku.

Da bi se utvrdio „srednji prag” kandidata za svaku pojedinu značajku, svakome dajte po jednu čašu koja sadrži 15 ml bilo koje od pripremljenih koncentracija, te drugu čašu koja sadrži 15 ml čistog neutralnog ulja. Nakon ocjenjivanja kandidat mora reći je li sadržaj u čašama isti ili različit.

Ponovite isto ocjenjivanje ostalih koncentracija one značajke koja se ocjenjuje.

Zabilježite broj točnih odgovora za svaku koncentraciju koje su dali svi organoleptički ocjenjivači, a taj broj iskažite kao postotak broja provedenih ocjenjivanja.

⁽¹⁾ Opišite što se može dobiti organoleptičkim ispitivanjem bilo kojeg prehrambenog proizvoda, ili, ako želite, maslinovog ulja.

Zatim na apscisu, s vrijednostima od najmanje prema višoj, upišite ocjenjivane koncentracije, a na ordinatu postotak točnih odgovora za svaku koncentraciju.

Slika 1. daje praktičan primjer ovih uputa. Prag detekcije određuje se ekstrapolacijom točke na ordinati koja na krivulji predstavlja 75 % točnih odgovora u odnosu na apscisu.

Taj bi „prag” koncentracije, koji se može razlikovati za svako novo ulje budući da ovisi o intenzitetu prisutne značajke, trebao biti sličan za različite grupe kandidata različitih ocjenjivačkih komisija; on nije povezan ni sa kojom navikom ili sklonostima. Dakle, radi se o referentnoj točki koja je zajednička svakoj normalnoj grupi ljudi i može se koristiti za ujednačavanje različitih ocjenjivačkih komisija samo prema osjetljivosti njihova njuha i okusa.

Na osnovi praga koncentracije dobivenog za pojedinu grupu, postupite na sljedeći način:

Pripremite niz koncentracija koje rastu i smanjuju se na takav način da „prag koncentracije” bude na 10. mjestu te ljestvice. Podrazumijeva se da će 11. i 12. koncentracija biti razrijeđenije, zbog čega će biti teže detektirati prisutnost ulja koje posjeduje odabranu značajku.

Uzimajući koncentraciju C_{10} kao temeljnu, ostali uzorci mogu se pripremiti u skladu sa sljedećom formulom:

$C_{10} \cdot a^n$, pri čemu je „a” konstanta, faktor razrjeđenja, koji iznosi 1,5, a „n” je eksponent koji se kreće između 9 i -2.

Primjer: uz pretpostavku da je prag dobiven za užeglo ulje 0,32; $C_{10} = 0,32$, na temelju čega će, a budući da je „a” = 1,5, niz uzoraka imati sljedeće koncentracije:

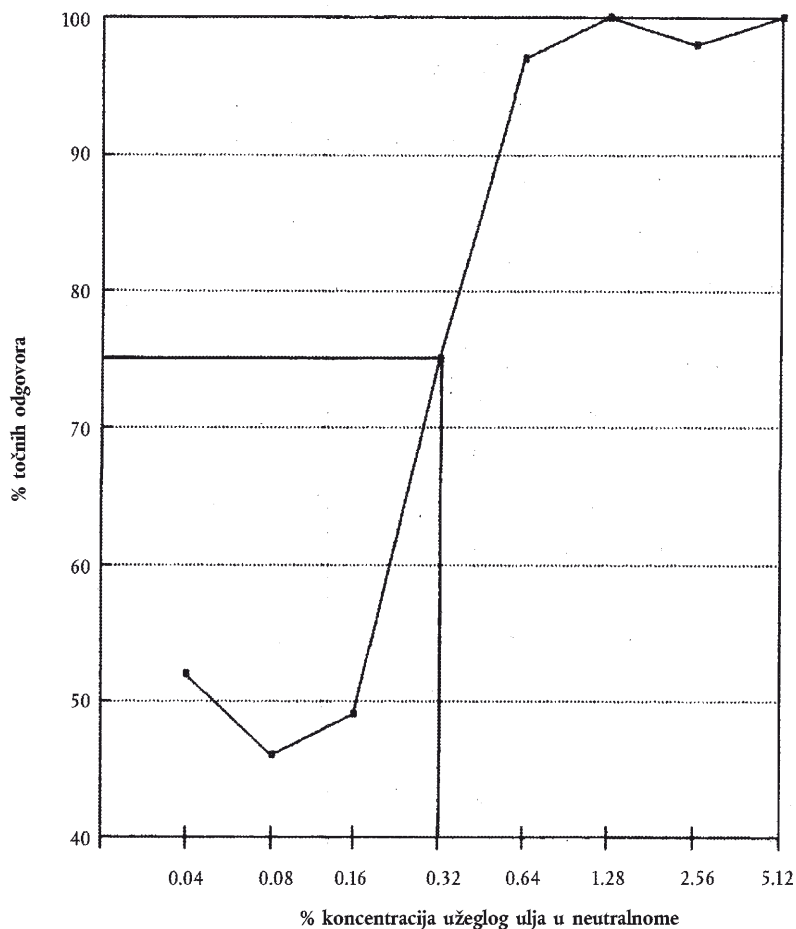
Uzorak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Koncentracija	12,30	8,20	5,47	3,65	2,43	1,62	1,08	0,72	0,48	0,32	0,21	0,14

Ako se gore navedeni postupak ponovi za preostale tri značajke na temelju njihovih individualnih pragova koji se također izračunavaju kako je navedeno gore, dobit će se ljestvice sa sličnim aromatskim intenzitetima za svaku značajku za sve laboratorije, iako bi se nedostaci kod prvih ulja mogli doživjeti u različitim intenzitetima.

9.4. Odabiranje organoleptičkih ocjenjivača metodom ocjenjivanja intenziteta

U postupku odabiranja treba sudjelovati dva do tri puta više kandidata od broja ocjenjivača potrebnog za komisiju tako da bi se mogli odabrati oni ljudi koji pokažu najveću osjetljivost ili sposobnost razlučivanja. Uvijek se preporučuje koristiti isti proizvod koji će se kasnije analizirati (prema tome, uvijek će se koristiti maslinovo ulje.).

Slika 1.



Prilikom odabiranja metode ne smije se previdjeti da, osim što treba biti učinkovit, postupak mora biti čim je više moguće ekonomičan u pogledu količine ulja, broja uzoraka i vremena koje je utrošeno za postupak odabiranja. Učinkovitost postupka odabiranja leži u odabiranju optimalnih razina ovih triju međusobno ovisnih varijabli: (a) „trošak” koji je određen brojem ocjenjivanja; (b) „udjel” potencijalno odgovarajućih kandidata koji su slučajem nažalost eliminirani tijekom postupka; i (c) „udjel” kandidata koji su slučajem prošli postupak odabiranja iako ne odgovaraju.

Nakon što su odabrane četiri točke postupka odabiranja, ocjenjivanje intenziteta, koje je opisano u ASTM-u (*American Society for Testing and Materials*), STP-u (*Special Technical Publication*) br. 440, stranica 53., prilagođene su putem:

1. smanjivanja broja uzoraka u nizu;
2. proširivanja lepeze podražaja s ciljem povećavanja broja bilješki o rezultatima njuha i okusa, a na osnovu kojih se provodi odabiranje, da bi ih se prilagodilo najčešćim nedostacima koji se prepoznaju u maslinovom ulju;
3. mijenjanja omjera koncentracija u nizu; i
4. statističke obrade podataka.

Zahtijevana oprema:

- boce ili staklene tikvice volumena 1 500 ml,
- čaše od tamnog stakla za organoleptičko ocjenjivanje,
- graduirane epruvete volumena 10, 15, 1 000 i 1 500 ml.

Zahtijevani dodatni materijali:

- parafinsko ulje (Merck 7 160, DAB 8, USP XX) ili neutralno ulje bez okusa i mirisa (nedavno rafinirano maslinovo ulje ili drugo slično ulje),
- ulja: pljesnivo, kiselo, užeglo i gorko.

9.4.1. Postupak

Nakon pripremanja razrijeđenih koncentracija počnite postupak odabiranja s 25 kandidata, u skladu s metodologijom opisanom u daljnjem tekstu za svaku pojedinu značajku:

1. Pripremite niz od 12 čaša za organoleptičko ocjenjivanje koje ste označili šifrom (po jedan niz za svakog kandidata). Ulijte po 15 ml svake od različitih koncentracija koje ste pripremili prema formuli $C_{10}x a^n$, u svaku čašu za organoleptičko ocjenjivanje.
2. Kad napunite čaše za organoleptičko ocjenjivanje, treba ih ostaviti poklopljenima satnim stakalcem u prostoru za ocjenjivanje na temperaturi između 20 i 22 °C ne kraće od sat vremena prije početka ocjenjivanja ne bi li se njihova temperatura izjednačila s temperaturom okoline.
3. Predsjednik komisije zatim treba poredati 12 čaša za organoleptičko ocjenjivanje svakog niza u red, od najveće koncentracije prema najmanjoj.

Sljedeći je korak da svaki kandidat samostalno provede ocjenjivanje, u skladu sa sljedećim uputama:

9.4.2. Upute za kandidate

12 čaša za organoleptičko ocjenjivanje koje su poredane ispred kandidata sadrže razrijeđene koncentracije bilo kojega od uzroka čija je značajka pljesnivo, kiselo, užeglo ili gorko. Čimbenik kojim se razlikuje sadržaj u čašama za ocjenjivanje je intenzitet mirisa. Čaša s najintenzivnijim mirisom nalazi se krajnje lijevo, a svaka sljedeća čaša prema desnoj strani sadrži sve manji intenzitet. Posljednja čaša za ocjenjivanje na desnoj strani može imati toliko slab miris da ga je možda nemoguće razabrati.

Prosljedite na sljedeći način: upoznajte se s mirisom svake od čaša za organoleptičko ocjenjivanje u nizu. Da biste to učinili, počnite s krajnje desnom čašom (br. 12) i pokušajte zapamtiti intenzitet svih mirisa, a da se pritom previše ne umorite.

Kad osjetite da ste se navikli na niz koncentracija mirisa, izađite iz prostora.

U međuvremenu će predsjednik komisije odstraniti jednu od čaša za organoleptičko ocjenjivanje iz niza i staviti će je na mjesto posljednje čaše s desne strane, a ostale će pomaknuti tako da se popuni prazno mjesto. Nakon tog se vratite u prostor i nastavite s ocjenjivanjem.

Ocjenjivanje uključuje sljedeće:

Čašu za organoleptičko ocjenjivanje koja je izvađena iz niza potrebno je vratiti na njezino pravo mjesto. Zato je pomirišite i usporedite s ostalima koliko puta želite, imajući na umu da je za njezino vraćanje na pravo mjesto potrebno da njezin miris bude jači od prve čaše s njezine desne strane i slabiji od prve čaše s njezine lijeve strane. Ovo će se ocjenjivanje ponoviti s još tri čaše.

Svaki kandidat, osim upravo opisanih uputa, treba dobiti i formular zahvaljujući kojem će se olakšati ocjenjivanje i prikupljanje podataka.

ODABIR KANDIDATA

Ocjenjivanje br. Značajka

Čaša izvađena iz niza treba stajati na položaju broj

Datum Ime

9.4.3. Dobivanje rezultata

Predsjednik komisije treba zabilježiti podatke za svakog kandidata na sljedeći način koji će omogućiti njihovo rangiranje:

Ime kandidata	Značajka koja se ispituje	Redni broj (položaj) uzorka (K)	Točan redni broj (položaj) uzorka (K)	Ocjena $(K - K)^2$
.....
.....

9.4.4. Postupak statističkog ocjenjivanja

U ovom postupku odabiranja, čaše za organoleptičko ocjenjivanje koje treba vratiti na njihov točan položaj moraju biti iste za sve kandidate. U skladu sa statističkim izračunom u tu svrhu, čaše moraju odgovarati sljedećim položajima u nizu za svaku pojedinu značajku:

Pljesnivo (Plj)	Kiselno (Ki)	Užeglo (Už)	Gorko (Go)
Čaša br.	Čaša br.	Čaša br.	Čaša br.
(10, 5, 7, 2)	(11, 3, 8, 6)	(7, 4, 10, 2)	(6, 3, 11, 9)

Broj koji odgovara položaju čaša u redosljedu jednog niza ne smije se mijenjati budući da je statistički izračun za ovo ocjenjivanje dobiven uzimajući u obzir mogućnost da čaše budu nasumično vraćene na njihovo točno mjesto.

U svrhu onemogućavanja prenošenja bilo kakvih informacija među kandidatima, predsjednik komisije treba osigurati da:

1. među kandidatima ne postoji nikakva mogućnost kontaktiranja. Za svakog od kandidata koristit će se drugačije oznake;
2. kandidati ni na koji način ne smiju biti u mogućnosti saznati položaj čaša koje su premještene;
3. iako će svim kandidatima biti podijeljene iste, prije spomenute čaše, njihov raspored za svakog kandidata mora biti drugačiji.

Ovisno o njegovom rezultatu, svaki se kandidat ocjenjuje na sljedeći način:

$e^i_1, e^i_2, \dots, e^i_{12}$ je 12 čaša s 12 pripadajućih koncentracija značajke „i” („i” može biti bilo koja od četiri značajke: pljesnivo, kiselno, užeglo ili gorko) poslagane prema sve slabijem intenzitetu.

e^i_k je jedna od premještenih čaša, a K' je položaj u nizu na kojega ju je kandidat vratio. Tako su vrijednosti K i K' cijeli brojevi između 1 i 12, uključujući i te brojeve, koji odgovaraju stvarnom broju položaja odabrane čaše i onom broju kojega im je dodijelio kandidat.

Vrijednost T (najveće dopušteno odstupanje) treba biti unaprijed određena, a u ovom slučaju ona iznosi 3, tako da ako je $K' - K > T$, kandidat će automatski biti odbijen ⁽¹⁾

Ako je, međutim, $K' - K \leq T$, teoretski, kandidat će biti prihvaćen i može nastaviti s ocjenjivanjem budući da je on ili ona u stanju vratiti čašu na pravi položaj, ili barem vrlo blizu pravog položaja.

U ovom je slučaju ocjena koju dobije kandidat koji je ocijenio zadanu značajku (koncentraciju), primjerice, u nizu „pljesnivo (Plj)”, jednaka kvadratu razlike između točnog položaja čaše u nizu i položaja na kojega ju je kandidat vratio. Drugim riječima:

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

Budući da svaki kandidat provodi ovaj postupak s četiri koncentracije svake značajke, djelomično ocjenjivanje značajke (primjerice, Plj) glasi:

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

Sljedi nekoliko primjera koji će omogućiti razumijevanje ovog postupka.

Primjer 1.:

Pretpostavimo da je kandidat A za četiri koncentracije koje su izvađene iz niza za određenu značajku (i) odgovorio na sljedeći način:

Točan položaj čaše u nizu (K)	Položaj na koji ju je kandidat vratio (K')	Odstupanje od točnog položaja (K' - K)
7	7	7 - 7 = 0
4	5	4 - 5 = - 1
10	6	10 - 6 = 4 ⁽¹⁾
2	4	2 - 4 = - 2

⁽¹⁾ Ovog kandidata treba odbiti budući da je na ocjenjivanju njegov rezultat $T > 3$.

⁽¹⁾ Organizator ispitivanja treba upozoriti kandidata da ocjenjuje razborito, odnosno na takav način da ne izgubi osjetljivost zbog zamora osjetila mirisa.

Primjer 2:

U slučaju da je kandidat premjestio čaše za određenu značajku na sljedeći način:

Točan položaj čaše u nizu (K)	Položaj na koji ju je kandidat vratio (K')	Odstupanje od točnog položaja (K' - K)
7	7	$7 - 7 = 0$
4	4	$4 - 4 = 0$
10	7	$10 - 7 = 3$
2	3	$2 - 3 = -1$

Ovaj kandidat neće biti odbijen. Dobio je ocjenu:

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

Konačna ocjena kandidata, koja odlučuje o njegovu primanju ili odbijanju ili odabiranju za mjesto organoleptičkog ocjenjivača, ovisi o kandidatovim odgovorima za četiri značajke koje se ocjenjuju, izgleda ovako:

$$\begin{aligned} P_h^{Plj} + P_j^{Plj} + P_l^{Plj} + P_m^{Plj} &= Z^{Plj} \\ P_h^{Ki} + P_j^{Ki} + P_l^{Ki} + P_m^{Ki} &= Z^{Ki} \\ P_h^{Už} + P_j^{Už} + P_l^{Už} + P_m^{Už} &= Z^{Už} \\ P_h^{Go} + P_j^{Go} + P_l^{Go} + P_m^{Go} &= Z^{Go} \\ \hline Z \text{ konačno} &= Z^{Plj} + \dots + Z^{Go} \end{aligned}$$

Pri čemu je: Plj = pljesnivo

Ki = kiselo

Už = užeglo

Go = gorko

Sad je potrebno odrediti do koje se maksimalne vrijednosti Z može smatrati da kandidat ima dobru razinu percepcije, pamćenje osjeta mirisa te da je intelektualno sposoban dati točan odgovor za četiri značajke koje se ocjenjuju. Očito je da Z nikad nema negativnu vrijednost, a $Z = 0$ znači da je kandidat prepoznao i točno ocijenio svih 16 intenziteta koncentracija (po četiri za svaku značajku). Z vrijednosti koje nisu 0 ukazuju na to da je kandidat prepoznao područje u nizu iz kojega su koncentracije odabrane, no nije bio u stanju odrediti njihov točan položaj unutar tih područja budući da njegova sposobnost razlučivanja stupnja intenziteta koncentracija za jednu ili više značajki nije zadovoljavajuća.

Zbog toga treba odrediti takvu kritičnu vrijednost (Z_k) da u slučaju da kandidat nasumično vrati sve čaše unutar područja koja je prethodno prepoznao, vjerojatnost dobivanja konačne ocjene Z koja je manja od Z_k , bude dovoljno niske vrijednosti (α), koja može biti i unaprijed određena. Drugim riječima, primjenom ovog postupka treba osigurati da vjerojatnost odabira organoleptičkog ocjenjivača za komisiju koji ne pokaže dovoljnu sposobnost razlučivanja intenziteta značajki korištenih u procesu odabira bude manja od α .

Ako je vrijednost α određena (u ovom slučaju 0,05), Z_k se izračunava na osnovu vjerojatnosti raspodjele varijable Z, koja pak ovisi o vjerojatnosti raspodjele P varijabli (K').

U skladu s odgovarajućim statističkim izračunima, vrijednost za Z_k iznosi 34.

Nakon što se dobije ocjena Z za sve kandidate, svi oni kandidati čija je ocjena viša od 34 bit će odbijeni.

Primjer ocjene kandidata A i B:

Značajka	Kandidat A	Kandidat B
Pljesnivo (Plj)	$Z^{Plj} = 10$	$Z^{Plj} = 12$
Kiselo (Ki)	$Z^{Ki} = 10$	$Z^{Ki} = 11$
Užeglo (Už)	$Z^{Už} = 10$	$Z^{Už} = 15$
Gorko (Go)	$Z^{Go} = 4$	$Z^{Go} = 0$
	$\Sigma = 34$	$\Sigma = 38$

S obzirom na to da vrijednost Z ovih kandidata iznosi 34, odnosno 38, kandidat A će biti prihvaćen, dok će kandidat B biti odbijen. Kad su eliminirani svi kandidati čija je ocjena viša od 34, ostali kandidati će se rangirati ovisno o njihovim Z ocjenama dok se ne odabere 12 najboljih.

9.5. **Obuka**

Glavni ciljevi obuke su:

- (a) upoznati organoleptičke ocjenjivače s raznovrsnim inačicama mirisa, okusa i dodira koje mogu biti prisutne kod djevičanskog maslinovog ulja;
- (b) upoznati organoleptičke ocjenjivače sa specifičnom senzorskom metodologijom;
- (c) izoštriti individualne sposobnosti prepoznavanja, određivanja i vrednovanja senzornih značajki;
i
- (d) poboljšati osjetljivost i pamćenje koje se odnosi na različite značajke koje se ocjenjuju tako da krajnji rezultat bude precizna i dosljedna prosudba.

Uobičajeno je da se obuka sastoji od nekoliko sastanaka, ovisno o mogućnostima ocjenjivačke komisije, na kojima, nakon individualne analize ulja, organoleptički ocjenjivači s predsjednikom komisije raspravljaju o poteškoćama na koje su naišli i komentiraju dobivene ocjene u svrhu ujednačavanja kriterija i mišljenja.

Standard koji se postiže obukom nakon određenog broja sastanaka prosuđuje se na temelju postotka povećanja točnih odgovora – u slučaju kad se provodi ocjenjivanje sposobnosti razlikovanja – ili analizom odstupanja prosječnih individualnih ocjena komisije u slučaju kad se primjenjuje ocjenjivanje prema ljestvici.

Nakon što se uvelike raspravljalo o praktičnoj primjeni ovog razdoblja obuke, danas ga se smatra vrlo učinkovitim, čak i neophodnim ako se žele dobiti točni, precizni senzorski podaci.

9.6. **Provjera učinka**

Ocjenjivačka komisija čiji su članovi iskusni organoleptički ocjenjivači uobičajeno provodi redovita i kontinuirana organoleptička ocjenjivanja koja uključuju senzorna ocjenjivanja koja od njih zahtijevaju veliki trud. U velikoj većini slučajeva važne tehnološke i komercijalne odluke ovise o njihovom sudu. Zbog toga se nakon njihova odabira i obuke uspješnost ocjenjivača provjerava kako bi se osigurala preciznost njihovih rezultata.

Nakon što su ocjenjivačke komisije oformljene i nakon što su prošle uobičajene provjere, bilo bi očito potrebno redovito provjeravati njihov rad u odgovarajućim vremenskim razmacima.

10. **POSTUPAK ZA ORGANOLEPTIČKO PROSUĐIVANJE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA**

Kad se ispune gore navedene norme, kad je na raspolaganju potreban prostor i kad su odabrani članovi ocjenjivačke komisije, svaki organoleptički ocjenjivač treba pomirisati i kušati ⁽¹⁾ uzorak ulja za analizu koje je u čaši za organoleptičko ocjenjivanje. On treba analizirati dojam mirisa, okusa, dodira i kinestetički dojam pomoću obrasca koji je prikazan na slici 2., a u koji treba zabilježiti prisutne „note” i stupanj njihova intenziteta. Sljedeći je korak ocjenjivanje kvalitete ulja.

10.1. **Korištenje obrasca prikazanog na slici 2. (opis arome i ocjena kvalitete)**

S lijeve strane obrasca nabrojani su neki od najkarakterističnijih senzornih dojmova koji se često nalaze u maslinovim uljima i koji opisuju njihovu aromu. Ako organoleptički ocjenjivač naiđe na neku karakteristiku koja ne odgovara niti jednom predloženom opisu, treba je zabilježiti u rubriku „ostalo”, koristeći onaj opis koji je najbolje opisuje.

Zamjetne karakteristike prosuđuju se prema intenzitetu koji se označava križićem (x) u odgovarajućoj kućici, u skladu sa sljedećim kriterijima:

- 1: jedva zamjetno,
- 2: blago,
- 3: prosječno,
- 4: jako,
- 5: ekstremno.

Na desnoj strani obrasca je ljestvica kvalitete označena bodovima od 1 do 9 (9 označava iznimnu kvalitetu, 1 najlošiju) u koju organoleptički ocjenjivači trebaju upisati opću ocjenu karakteristika ulja koje ocjenjuju. Ova ocjena mora biti dosljedna dobrim karakteristikama i nedostacima ulja koji su već zabilježeni na lijevoj strani obrasca.

⁽¹⁾ Organoleptički ocjenjivač može ostati suzdržan ako mu je miris iznimno neugodan, a to će zabilježiti na ocjenjivačkom listiću kao izvanrednu pojavu.

Prvi stupac (nedostaci) tablice za ocjenjivanje podijeljen je u pet odjeljaka. Slijedom toga, razvrstavanje ulja treba prvenstveno temeljiti na potpunom nepostojanju ili prisutnosti aroma koji se smatraju nedostatkom, kao i na tome u kojoj su mjeri takvi okusi ozbiljni ili intenzivni. Međutim, budući da ljestvica za ocjenjivanje ima 9 bodova, u obzir treba uzeti određene nijanse ili aspekte koji pomažu pri donošenju zaključne odluke o ukupnoj ocjeni kvalitete i koji su opisani u drugom stupcu nazvanom „karakteristike”.

10.2. **Konačna ocjena**

Predsjednik ocjenjivačke komisije sakuplja obrasce koje su ispunili pojedini ocjenjivači i provjerava podudaraju li se senzorne značajke i njihovi intenziteti koji su zamijećeni i zabilježeni u obrascu s prosudbom ulja u ocjenjivačkom listiću. Ako postoji zamjetna razlika, predsjednik će zamoliti ocjenjivača da provjeri svoj ocjenjivački listić.

Ako je potrebno, ocjenjivač treba ponoviti organoleptičko ocjenjivanje.

Naposljetku, predsjednik ocjenjivačke komisije treba sastaviti tablicu s ocjenama cijele komisije i izračunati aritmetičku sredinu te stupanj odstupanja (od aritmetičke sredine).

Komisija treba ponoviti ocjenjivanje samo u slučaju revizijske analize koja se provodi s ciljem dobivanja prosudbe na temelju trostrukog uzorka; konačna ocjena, zaokružena na jednu decimalu, predstavlja srednju vrijednost triju danih ocjena.

Ako je srednja vrijednost intenziteta gorčine i/ili oštine veća od 2,5, ulje treba sukladno tome označiti i treba zabilježiti da je ono gorko i/ili oštro.

Iskazivanje rezultata: na temelju prosječne ocjene predsjednik komisije određuje kategoriju kojoj uzorak pripada, u skladu s ograničenjima koja su propisana u Prilogu I. U izvještaju o analizi navodi se samo ova kategorija.

Bilješka: Sve do analize uzorke treba držati zapečaćenima, u hladnjaku, u koji ih se treba vraćati nakon svake analize, sve dok se ocjenjivanje ne provede tri puta.

Slika 2.

Djevičansko maslinovo ulje

Obrazac karakteristika
„note” mirisa, okusa i dodira ⁽²⁾

Tablica za ocjenjivanje

	0	1	2	3	4	5
Maslinasto voćno (zrelo i zeleno) ⁽¹⁾						
labuka						
Drugo zrelo voće						
Zeleno (trava, lišće)						
Gorko						
Oštro						
Slatko						
Druga dopustiva značajka/e						
(Navedite koja						
.....)						
Kiselost/po vinu/octu/kiselini ⁽¹⁾						
Grubo						
Metalno						
Ustajalo/vlažno ⁽¹⁾						
Blatnjavo						
Pljesnivo						
Užeglo						
Druga nedopustiva značajka/e						
(Navedite koja						
.....)						

Nedostaci	Karakteristike	Ukupna ocjena: bodovi
Nema	Maslinasto voćno	9
	Maslinasto voćno i voćno drugog zrelog voća	8
		7
Slabi i jedva zamjetni	Slaba voćna aroma bilo koje vrste voća	6
Zamjetni	Prilično nesavršena voćna aroma, nepravilni mirisi i okusi	5
Znatni, na granici prihvatljivosti	Očito nesavršeno, neugodni mirisi i okusi	4
Veliki i/ili ozbiljni, jasno zamjetni	Potpuno nedopustivi mirisi i okusi za prehrambenu namjenu	3
		2
		1

Opaske:

Ime ocjenjivača:

Šifra uzorka:

Datum:

⁽¹⁾ Prekrižiti nepotrebno.⁽²⁾ Dojam:

0: (3),

1: jedva zamjetno,

2: blago,

3: prosječno,

4: jako,

5: ekstremno.

SENZORSKA ANALIZA: OPĆENITI TEMELJNI RJEČNIK

1. OPSEG

Svrha je ove norme prikupljanje općenitih izraza koji se koriste prilikom senzorske analize te davanje njihovih definicija.

2. RJEČNIK

2.1. **Općenita terminologija**

Senzorska analiza (imenica):

ispitivanje organoleptičkih značajki nekog proizvoda osjetilima.

Dojam/percepcija (imenica):

senzorska svijest o vanjskim predmetima ili događajima.

Organoleptički (pridjev) (atribut):

opisuje značajku proizvoda koju je moguće raspoznati osjetilima.

Stručnjak (imenica):

(s obzirom na ispitivanje organoleptičkih značajki)

organoleptički ocjenjivač specijaliziran za senzorsku analizu određenog proizvoda koji je upoznat barem s osnovama pripremanja tog proizvoda i sklonostima tržišta.

Organoleptički ocjenjivač (imenica):

proncljiva osoba razvijenih osjetila, obučavana i odabrana za ocjenjivanje organoleptičkih značajki neke hrane vlastitim osjetilima.

Ocjenjivačka komisija:

grupa posebno odabranih i obučvanih prosuditelja koji se okupljaju u svrhu provođenja senzorske analize nekog proizvoda u kontroliranim uvjetima.

Osjećaj (imenica):

subjektivna pojava koja se javlja zbog podražaja osjetilnog sustava. Ova pojava može se subjektivno razlikovati ili biti objektivno definirana osjetilnim organom, ovisno o prirodi ili vrsti podražaja te o njegovom intenzitetu.

Osjetljivost (imenica):

spособnost kvalitativnog i kvantitativnog prepoznavanja podražaja slabog intenziteta ili malih razlika između podražaja osjetilnim organima.

Organoleptičko ocjenjivanje (imenica):

aktivnost koja uključuje razaznavanje, analiziranje i davanje suda o organoleptičkim značajkama nekog proizvoda, posebno svojstava mirisa, okusa, dodira i kinestetičkih svojstava nekog prehrambenog proizvoda.

Prihvaćanje (imenica):

čin kojim pojedinac ili grupa sa zadovoljstvom prihvaća proizvod.

Sklad (imenica):

svojstvo nekog proizvoda koje izaziva cjelokupan ugodan osjećaj. Ovaj osjećaj javlja se prilikom percepcije svojstava proizvoda kao što su podražaji mirisa, okusa, dodira i kinestetički podražaj zahvaljujući tome što su prisutni u odgovarajućim omjerima koncentracija.

Prihvatljivost (imenica):

stanje proizvoda koji su pojedinac ili grupa sa zadovoljstvom prihvatili s obzirom na njegova organoleptička svojstva.

Razlikovanje/spособnost razlikovanja (imenica):

čin kvalitativnog i/ili kvantitativnog razlikovanja dvaju ili više podražaja.

Kompenzacija (imenica):

rezultat takvog međusobnog djelovanja kombinacije podražaja pri kojem svaki od podražaja ostavlja dojam da je slabijeg intenziteta nego što bi bio da djeluje samostalno.

Aspekt (imenica):

kombinacija organoleptičkih svojstava koji se percipiraju vizualno: veličina, oblik, boja, struktura, zamućenost, čistoća, žitkost, pjenjenje i vrenje. Ovaj izraz treba imati prednost pred izrazom izgled.

Svojstvo (imenica):

karakteristika koju je moguće razabrati.

2.2. **Fiziološka terminologija**

Podražaj (imenica):

fizikalni ili kemijski agens koji podražava vanjske ili unutarnje senzorske receptore.

Okus (imenica):

(osjetilo okusa)

osjetilo čiji se receptori nalaze u ustima, posebno na jeziku, a koji se aktiviraju u dodiru s različitim sastojcima u otopini.

Okusni (pridjev):

opisuje značajku nekog proizvoda koja može stimulirati osjetilo okusa pobuđivanjem jednog ili više osnovnih okusa: slatkog, slanog, kiselog i gorkog.

Receptor (imenica):

specifičan dio osjetilnog organa koji reagira na podražaj, prima ga i pretvara u živčani podražaj.

Bilješka: receptori su razvrstani prema vrsti energije koja se povezuje s podražajem (svjetlost, toplina, zvuk itd.).

Njuh (imenica):

funkcija organa njuha da iz okoline prima i razlikuje molekule mirisa u obliku plina, izravno ili neizravno putem nosa.

Intenzitet (imenica):

stupanj jačine nekog svojstva koji se može izmjeriti na temelju kvantitativne ljestvice vrijednosti koje su iznad praga.

Prilagodba (imenica):

privremena promjena osjetljivosti na senzorske podražaje uzrokovana stalnim, opetovanim izlaganjem određenom ili njemu sličnom podražaju.

Zakočenost (inhibicija) (imenica):

nepostojanje reakcije osjetilnog organa ili nekog njegovog dijela, usprkos djelovanju prikladnog podražaja čiji je intenzitet iznad praga.

Odgovor/reakcija (imenica):

aktivnost kojom senzorske stanice odgovaraju na djelovanje jednog ili više podražaja vezanih uz određeni osjetilni organ.

Tijelo (imenica):

osjet dodira koji se doživljava u ustima, kojim se određuje stupanj gustoće, viskoznosti, konzistencije, ili kompaktnosti proizvoda.

Miris (imenica):

svjež, ugodan, ukusan miris.

Mirisati (glagol):

(aktivan osjet njuha)

opisuje čin mirisanja.

Objektivno (pridjev):

(a) način koji daje istinit i dokaziv opis nekog predmeta tako što na najmanju moguću mjeru smanjuje utjecaj ljudskog čimbenika (primjerice, preferencije, navike, sklonosti);

(b) opisuje tehniku koja primjenom bilo senzorskih ili instrumentalnih metoda na najmanju moguću mjeru smanjuje vlastite greške.

Bilješka: ne preporučuje se uporaba izraza „instrumentalno” kao sinonima za objektivno.

Subjektivno (pridjev):

opisuje ono što rezultira time da na dojam ne utječe samo podražaj, nego i način našeg razmišljanja i osjećaji.

Kinestezija:

osjećaj koji nastaje kao rezultat pritiska na uzorak koji proizvodi pomicanje u usnoj šupljini ili prstima (primjerice: pritiskanje sira prstima).

*Prag (imenica):**Apsolutni prag:*

minimalna vrijednost senzornog podražaja koja dovodi do:

- pojave osjećaja (prag podražaja ili prag razaznavanja), ili
- identifikacije osjećaja (prag prepoznavanja).

Prag razlike:

najmanja vrijednost senzorskog podražaja koja dovodi do zamjetne razlike u intenzitetu osjećaja.

Konačni prag:

najveća vrijednost podražaja iznad koje se povećanje intenziteta ne razabire.

Preferencijski prag:

najniža kvantitativna vrijednost podražaja ili kritična vrijednost tog podražaja koja prelazi prag kod koje se odgovor prihvatanja ili odbijanja javlja s obzirom na neutralni podražaj, primjerice, prilikom izbora između zašećerene otopine i vode.

Bilješka: Treba razlikovati apsolutni preferencijski prag i razlikovni preferencijski prag.

Ispod praga (pridjev):

ispod apsolutnog praga.

Iznad praga (pridjev):

iznad apsolutnog praga.

Senzorski zamor:

poseban oblik senzorske prilagodbe prilikom koje dolazi do pada senzorske osjetljivosti.

Kompenzacija (imenica):

rezultat takvog međusobnog djelovanja kombinacije podražaja pri kojem svaki od podražaja ostavlja dojam da je slabijeg intenziteta nego što bi bio da djeluje samostalno.

Sinergijski (pridjev):

zajednički učinak ili djelovanje određenih tvari u kojima je intenzitet organoleptičkih svojstava kao posljedica kombinacije veći od zbroja intenziteta svakog svojstva zasebno.

Kontrastni učinak:

je povećanje reakcije na razlike između dvaju istovremenih ili uzastopnih podražaja.

Suprotno od konvergentnog učinka.

Konvergentni učinak:

je smanjenje reakcije na razlike između dvaju istovremenih ili uzastopnih podražaja.

Suprotno od kontrastnog učinka.

2.3. Terminologija koja se odnosi na organoleptička svojstva

Kiselo (pridjev):

- (a) opisuje osnovni okus kakav izaziva razrijeđena vodena otopina većine kiselih tvari (primjerice, limunska kiselina, mliječna kiselina, vinska kiselina);
- (b) opisuje svojstvo čistih tvari ili mješavina koja izaziva takav okus.

Odgovarajuća imenica je kiselost.

Kiselkasto (pridjev):

Opisuje mirisno-okusni osjet kojim prevladavaju kiseline dobivene fermentacijom, kao i prehrambeni proizvodi koji izazivaju takav osjećaj.

Neki čimbenici koji doprinose ovom osjećaju povezani su s fermentacijom, primjerice fermentacija mliječne ili octene kiseline, u prehrambenom proizvodu.

Gorko (pridjev):

(a) opisuje osnovni okus kakav izazivaju razrijeđene vodene otopine različitih tvari poput kinina, kofeina ili nekih alkaloida;

(b) opisuje svojstvo čistih tvari ili mješavina koje izaziva ovaj okus.

Odgovarajuća imenica je gorčina.

Slano (pridjev):

(a) opisuje karakterističan osjećaj koji se percipira osjetilom okusa, a najtipičniji primjer je onaj koji izaziva otopina natrijeva klorida;

(b) opisuje svojstvo čistih tvari ili mješavina koje izaziva ovaj okus.

Odgovarajuća imenica je slanost.

Slatko (pridjev):

(a) opisuje osnovni okus kakav izaziva vodena otopina različitih tvari kao što je saharoza;

(b) opisuje svojstvo čistih tvari ili mješavina koje izaziva ovaj okus.

Odgovarajuća imenica je slatkoća.

Trpk (pridjev):

(a) opisuje složen osjećaj u ustima kakav izazivaju razrijeđene vodene otopine proizvoda koji sadrže tanin (primjerice, tanin iz kakija i trnjine);

(b) opisuje svojstvo čistih tvari ili mješavina koje izaziva takav osjećaj.

Odgovarajuća imenica je trpkost.

Aroma (imenica):

aroma označava kombinaciju osjeta mirisa, okusa, dodira i kinestetičkog osjeta koji ocjenjivaču omogućavaju da prepozna i utvrdi višestruki, povoljni ili nepovoljni kriterij.

Okus (imenica):

(a) osjećaj koji se javlja prilikom stimulacije okusnih pupoljaka nekom topivom tvari;

(b) svojstvo specifičnog osjećaja koje izazivaju takve tvari.

Osnovni okus (imenica):

bilo koji od razlikovnih okusa, za koje se vjeruje da ih je četiri: slatko, slano, kiselo, gorko.

Miris (imenica):

(a) kombinacija osjećaja koji se primaju putem nosa prilikom mirisanja hlapivih tvari;

(b) svojstvo specifičnog osjećaja koje izaziva bilo koja od gore navedenih tvari.

Aroma (imenica):

(a) ugodni osjećaji koji se primaju neizravno putem nosa tijekom kušanja hrane;

(b) u industriji parfema i svakodnevnom jeziku ovaj se pojam također koristi za osjećaj koji se prima izravno putem nosa.

Naknadni okus; okus koji se zadržava (imenica):

kombinacija osjećaja koji se javljaju nakon što je podražaj nestao iz usta, a koji se razlikuje od prethodnih osjećaja.

Aromatičan (pridjev):

(a) opisuje svojstvo čistih tvari ili mješavina koje prilikom kušanja izazivaju osjećaj koji je poznat pod imenom aroma;

(b) opisuje proizvode koji prilikom ocjenjivanja direktno kroz nos izazivaju osjećaj ugodna mirisa i svježine.

Tekstura (imenica):

karakteristike krutih ili reoloških stanja proizvoda, kombinacija onog što stimulira mehaničke receptore tijekom kušanja, posebno one koji se nalaze u ustima.

Bilješka: Taj se izraz odnosi samo na objektivna svojstva, a ne na osjećaje koji su opisani općenitim pojmovima kao što su konzistentnost, vlaknastost, masnoća itd.

Raspoređivanje uzorka u ustima:

postupak u kojemu se hrana koja se nalazi u ustima raspoređuje tako da dođe u kontakt sa svim osjetljivim dijelovima usne šupljine da bi se mogli prepoznati osjećaji koje izaziva.

Bilješka: ovaj se rječnik može proširiti prema dijelovima od I. do V. norme ISO 5492, kao i drugim publikacijama kao što je, primjerice, J. L. Magnen *Les cahiers techniques du Centre National de Coordination des Etudes et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation*, i tako dalje.

ČAŠA ZA ORGANOLEPTIČKO OCJENJIVANJE ULJA

1. OPSEG

Svrha ove norme je opisivanje karakteristika čaše namijenjene korištenju tijekom organoleptičke analize jestivih ulja (miris, okus, aroma).

Osim toga, opisuje prilagođeni uređaj za zagrijavanje koji je potreban da bi se postigla i održavala odgovarajuća temperatura za ovu analizu.

2. OPIS ČAŠE

Crtež na slici 1. namijenjen je prikazivanju optimalnih karakteristika koje su poželjne za ovu vrstu opreme, a koje se mogu odrediti na sljedeći način:

- (a) maksimalna stabilnost radi sprečavanja naginjanja čaše i prolijevanja ulja;
- (b) dno koje se lakoćom umeće u udubine u uređaju za zagrijavanje tako da se jednakomjerno zagrijava;
- (c) oblik koji je najširi pri dnu tako da se hlapivi sastojci u ulju s lakoćom oslobađaju, ali sužen pri vrhu tako da se navedene tvari lakše koncentriraju, čime se osigurava bolje razaznavanje i identificiranje mirisanjem;
- (d) staklo mora biti tamne boje čime se sprečava da organoleptički ocjenjivač vidjeti boju ulja, zahvaljujući čemu ne može doći do stvaranja mišljenja i sklonosti koje bi utjecale na ocjenu unaprijed.

2.1. Dimenzije

Čaša prikazana na slici 1. je sljedećih dimenzija:

— ukupna zapremnina	130 ml ± 10 ml,
— ukupna visina	60 mm ± 1 mm,
— promjer grla	50 mm ± 1 mm,
— promjer čaše na najširem dijelu	70 mm ± 1 mm,
— promjer dna	35 mm ± 1 mm,
— debljina stranica čaše	1,5 mm ± 0,2 mm,
— debljina dna čaše	5 mm ± 1 mm.

Svaka čaša mora biti opremljena satnim stakalcem čiji promjer mora biti 10 mm veći od promjera grla čaše. To se stakalce koristi kao pokrivalo koje sprečava gubitak arome i ulazak prašine.

2.2. Karakteristike izrade

Čaša mora biti izrađena od izdržljivog stakla; mora biti tamne boje tako da se ne vidi boja njezina sadržaja, a staklo ne smije biti ogrebano niti u sebi imati mjehuriće.

Rub mora biti pravilan, gladak i s prirubom.

Čaša mora biti od kaljenog stakla tako da podnosi temperaturne promjene koje mora izdržati prilikom ocjenjivanja.

2.3. Upute za uporabu

Čaše se moraju prati neparfimiranim sapunom ili deterdžentom i nakon toga se ispiru toliko dugo dok sredstvo za čišćenje nije u potpunosti odstranjeno. Zadnje ispiranje provodi se destiliranom vodom, nakon čega se čaše ostavljaju da se ocijede, a zatim se suše u eksikatoru.

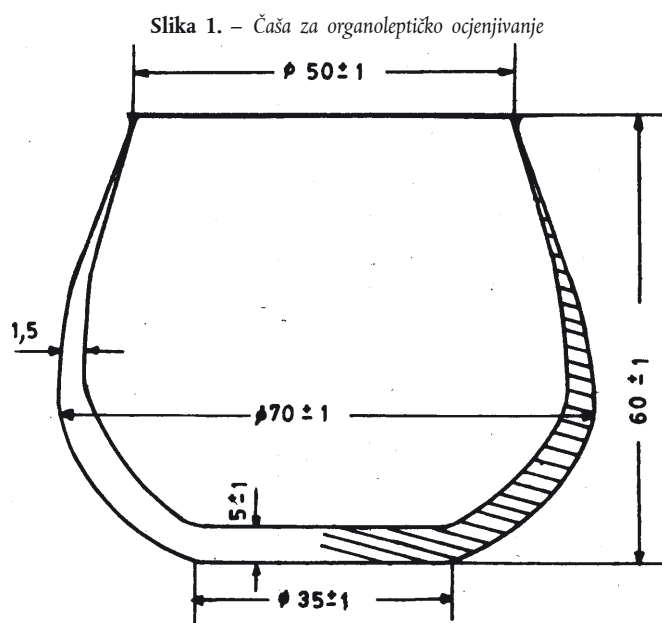
Ne smiju se upotrebljavati koncentrirane kiseline niti mješavine kromne kiseline.

Čaše se do uporabe moraju čuvati u eksikatoru, ili se moraju čuvati u ormaru u kojem su zaštićene od zagađenja bilo kakvim stranim mirisima.

Prije uporabe svaku čašu treba pomirisati kako bi se uvjerilo da nema stranih mirisa. Prilikom pripremanja ocjenjivanja treba obratiti pažnju da se zabilježi šifra svake čaše i ulje koje sadrži. Jedina osoba koja smije znati koja šifra odgovara kojem ulju je predsjednik komisije.

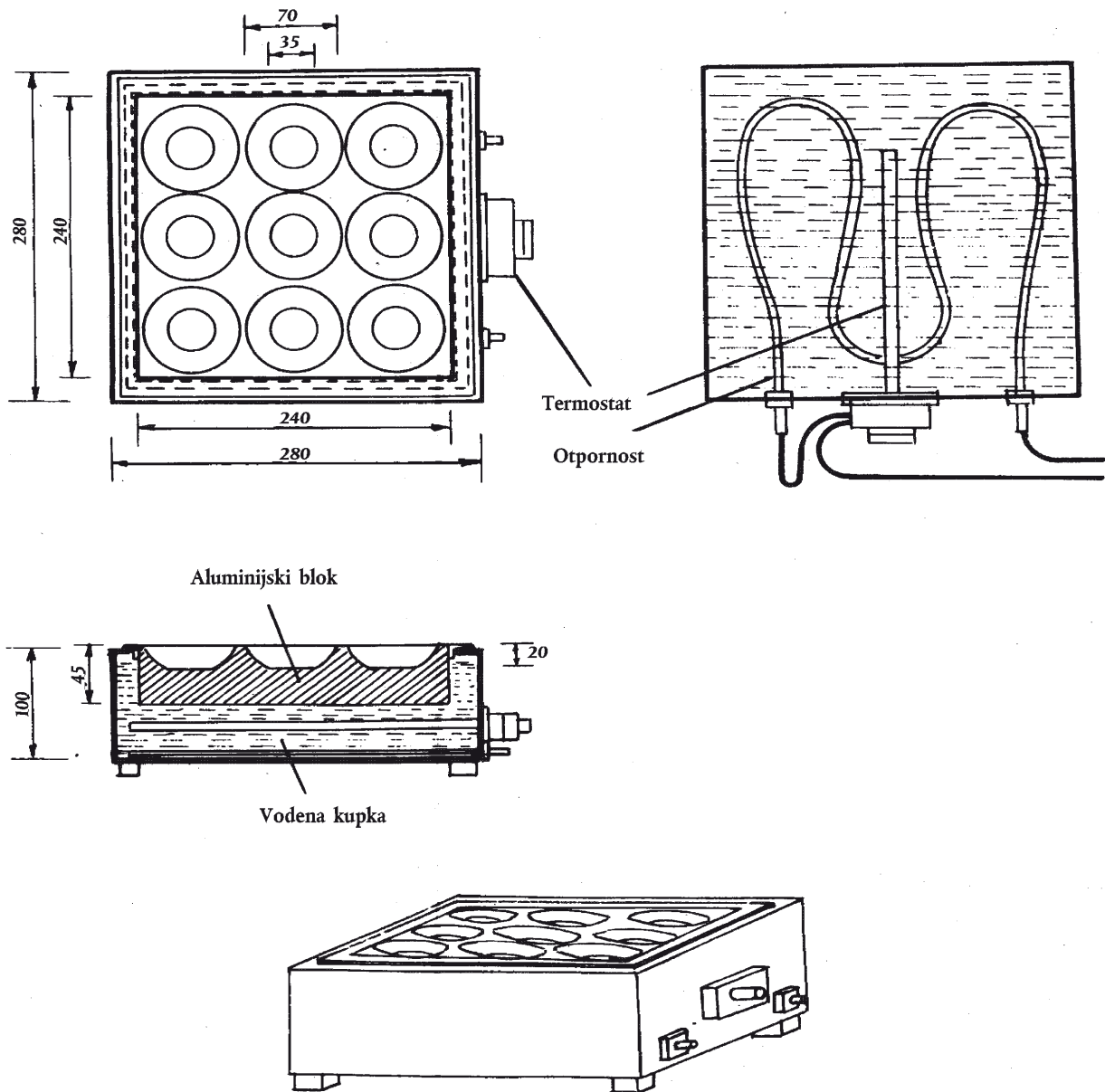
3. UREĐAJ ZA ZAGRIJAVANJE UZORAKA

U svrhu organoleptičkog ocjenjivanja uzorci moraju biti zagrijani na propisanu temperaturu koja, u slučaju ulja, mora biti 28 ± 2 °C. Zbog toga se u svaki odjeljak mora ugraditi uređaj za zagrijavanje (vidjeti sliku 2.), koji se organoleptičkom ocjenjivaču mora nalaziti nadohvat ruke. Sastoji se od aluminijskog bloka koji je uronjen u termostatski kontroliranu vodenu kupelj koja ga održava na stalnoj temperaturi. Blok u sebi ima niz udubina u koje se može smjestiti dno čaše. Temperaturna razlika između uređaja za zagrijavanje i umetnutih čaša ne smije biti viša od ± 2 °C.



mjere (u mm)

Slika 2. - Uređaj za zagrijavanje uzoraka (mjere u milimetrima)



UPUTE ZA OPREMANJE PROSTORA ZA ORGANOLEPTIČKO OCJENJIVANJE

1. UVOD

Prostor za ocjenjivanje dizajniran je tako da ocjenjivačkoj komisiji koja sudjeluje u ocjenjivanju senzornih svojstava omogući primjerenu, udobnu i standardiziranu okolinu koja olakšava rad i osigurava ponovljivost i reproducibilnost rezultata.

2. OPSEG

Svrha ove norme je određivanje osnovnih uvjeta koji moraju biti ispunjeni prilikom opremanja prostora za ocjenjivanje.

3. OPĆENITE SPECIFIKACIJE ZA OPREMANJE

Prostori, bez obzira na veličinu (vidjeti 3.1.), moraju zadovoljavati sljedeće specifikacije:

Moraju biti ugodni i odgovarajuće osvijetljeni (vidjeti 3.2.), ali uređeni neutralno. U tu se svrhu za zidove preporuča umirujuća, jednostavna i svijetla boja koja osigurava umirujuću atmosferu⁽¹⁾.

Prostori se moraju jednostavno čistiti i moraju biti izolirani od buke. U prostoru ne smije biti vanjskih mirisa te bi u tu svrhu, ako je moguće, trebao biti opremljen učinkovitim ventilacijskim uređajem. Ako su izražena kolebanja u temperaturi okoline, prostor za ocjenjivanje mora biti opremljen klimatizacijskim sustavom koji će održavati stalnu temperaturu između 20 i 22 °C.

3.1. Dimenzije

Dimenzije prostora često ovise o mogućnostima laboratorija ili tvrtki. U načelu, prostor bi trebao biti dovoljno prostran da u njega stanu 10 odjeljaka i prostor za pripremanje uzoraka.

Međutim, očigledno je da je veći prostor pogodniji, jer se u njega mogu smjestiti i pomoćni sadržaji, primjerice, prostor za čišćenje opreme, za kuhanje ili održavanje otvorenih ocjenjivačkih skupova.

3.2. Osvjetljenje

Osvjetljenje, prirodno ili umjetno (primjerice, fluorescentne svjetiljke), mora biti ujednačeno, difuzno i imati mogućnost kontroliranja.

3.3. Temperatura i vlažnost

U prostoru se moraju održavati stalna ugodna temperatura i vlaga. Osim u posebnim uvjetima, preporučuje se temperatura između 20 i 22 °C i relativna vlažnost od između 60 i 70 %.

4. OPIS ODJELJKA

4.1. Opće karakteristike

Odjeljci za senzorsku analizu moraju se postaviti jedan do drugoga, moraju biti identični i odvojeni pregradama koje moraju biti dovoljno visoke i široke da međusobno izoliraju organoleptičke ocjenjivače kad sjednu.

Odjeljci mogu biti izrađeni od bilo kojeg prikladnog materijala koji se lako čisti i održava (primjerice, drvo, glazirana šperploča, višeslojna drvena oplata itd.). U slučaju kad je materijal obojan, boja nakon sušenja mora biti potpuno bez mirisa.

Stolice u kabinama moraju biti udobne i podesive po visini.

Svaki odjeljak također mora imati individualni izvor svjetla i to takav da se njegov smjer i intenzitet mogu podešavati.

Preporuča se da odjeljci budu opremljeni gumbom koji je spojen na vanjsku lampicu koja omogućava organoleptičkom ocjenjivaču da obznani osobi koja nadgleda organoleptičko ocjenjivanje da je on ili ona završio/la s ocjenjivanjem, da treba dodatne uzorke, da nedostaje dio opreme, da je primijetio/la neke nepravilnosti, da želi neke informacije itd., a da pritom ne ometa druge organoleptičke ocjenjivače.

⁽¹⁾ Boja sobe i osvjjetljenje mogu utjecati na rezultate senzorne analize.

4.2. Dimenzije

Odjeljci moraju biti dovoljno veliki i udobni. Općenito, moraju imati sljedeće dimenzije:

- širina:
 - 0,75 m (bez sudopera)
 - 0,85 m (sa sudoperom);
- dužina:
 - 0,50 m (stol)
 - 0,20 m dodatno za pregradu;
- visina pregrade:
 - najmanje 0,60 m od stola;
- visina stola:
 - 0,75 m.

4.3. Uređenje

Površina stola mora biti takva da se lako čisti.

Na dijelu ove površine mora biti smješten sudoper koji je opremljen tekućom pitkom vodom. U slučaju da to nije izvedivo, na taj se prostor može postaviti pladanj, pljuvačnica ili slična posuda.

Ako tijekom ocjenjivanja uzorke treba održavati na stalnoj temperaturi koja je viša ili niža od temperature u prostoru, preporučuje se uporaba prikladnog uređaja za tu namjenu (vodena kupelj, grijaća ploča itd.).

Na visini od približno 1,10 metara od poda može se postaviti policica za odlaganje različitih predmeta (čša, manjih uređaja itd.).

Kad raspored odjeljaka u prostoru za ocjenjivanje to omogućava, preporučljivo je ugraditi uređaj za lakše posluživanje uzoraka. To mogu biti klizna vratašca (slika 1.), okomita okretna vratašca (slika 2.) koja su pogodna za šalice ili čaše (visoke posude), ili vodoravna vratašca u slučaju da su posudice u kojima se nalaze uzorci niske (slika 3.). Najvažnije je da otvor bude dovoljno velik da kroz njega mogu proći pladnjevi i čaše s uzorcima.

Na slici 4. prikazan je primjer prostora za organoleptičko ocjenjivanje i dodatne sadržaje.

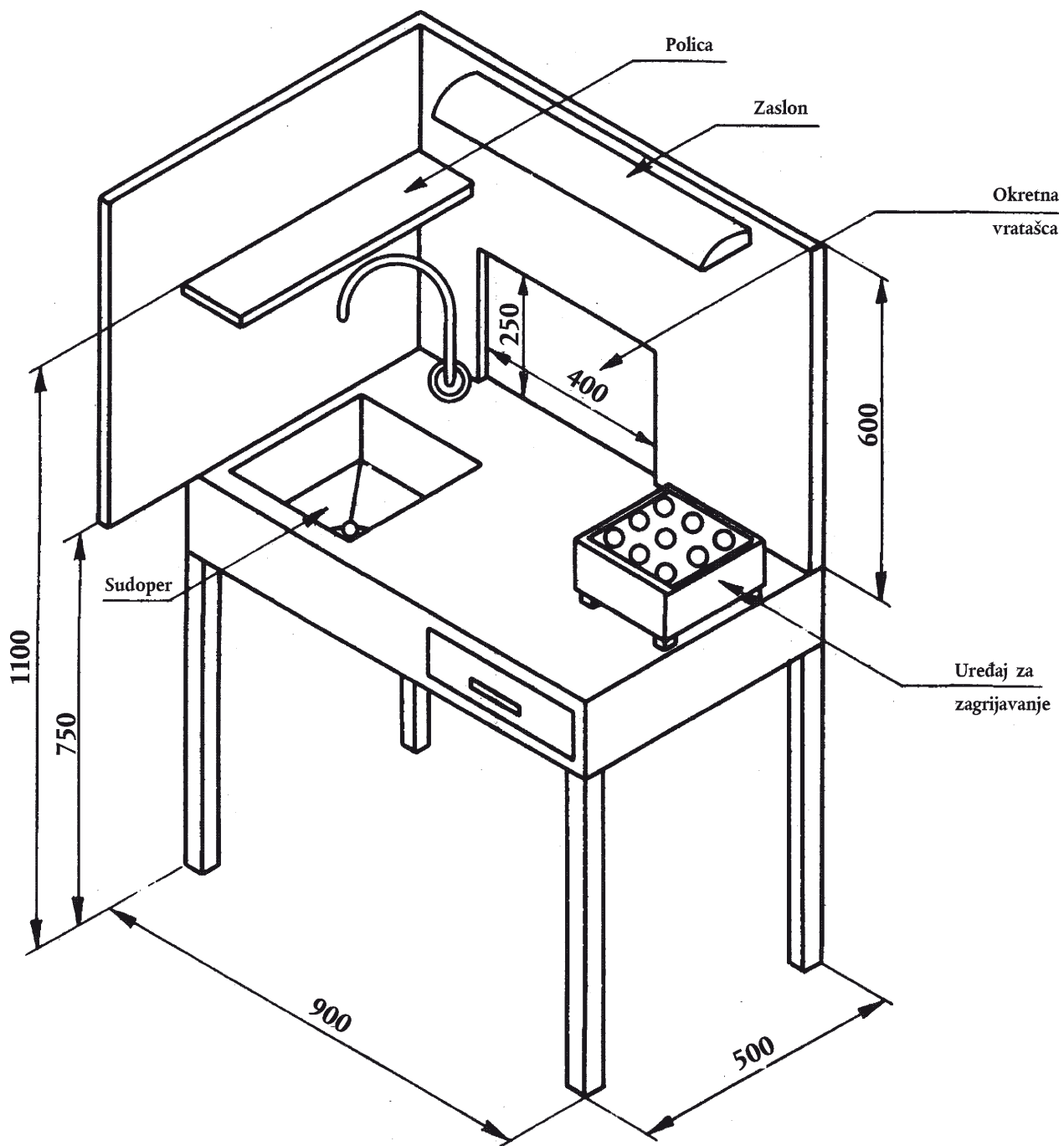
5. DODATNI PROSTORI

Ako je prostor dovoljno velik, preporučuje se da se osiguraju odvojene prostorije za pripremanje uzoraka (kuhanje ili drugo), pripremanje čaša ili uređaja, te za održavanje rasprava prije ili nakon organoleptičkog ocjenjivanja. Ako postoje, ti prostori moraju biti čisti; mirisi, buka ili razgovori u tim prostorima ne smiju ometati rad ocjenjivača u prostoriji za ocjenjivanje.

Bilješka: Opisani su idealni uvjeti. Međutim, u slučaju kad takvo uređenje nije moguće isključivo za senzorsku analizu, ocjenjivanje se može održati u prostoru koji ispunjava minimalne opisane uvjete (osvjetljenje, temperatura, buka, mirisi) tako da se postave pokretni odjeljci sastavljeni od sklopivih elemenata koji barem izoliraju organoleptičke ocjenjivače jedne od drugih.

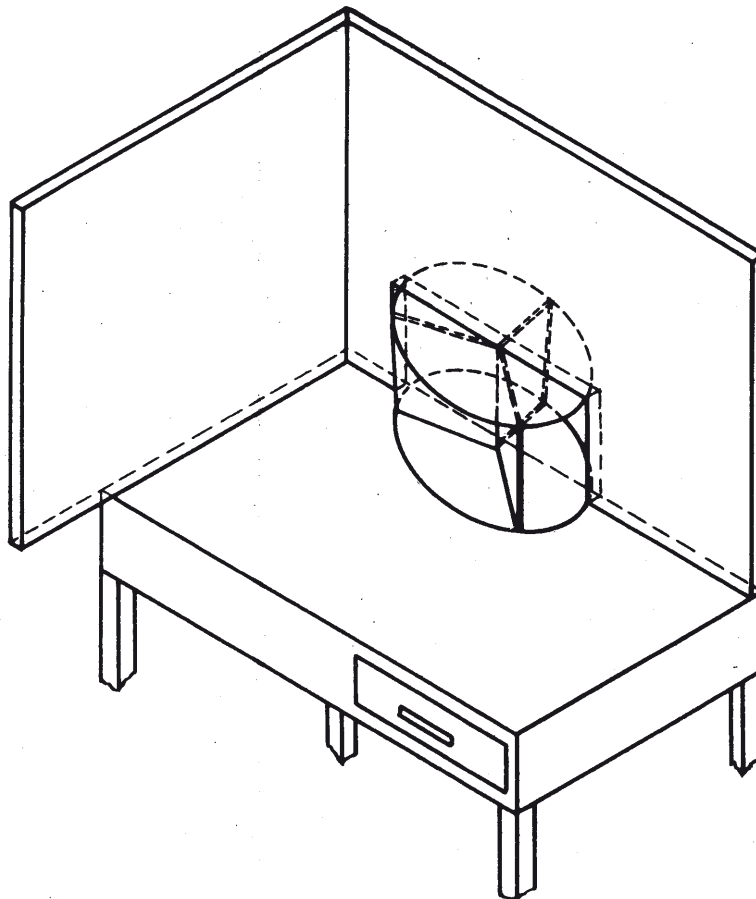
UREĐENJE ODJELJKA ZA OCJENJIVANJE

Slika 1.



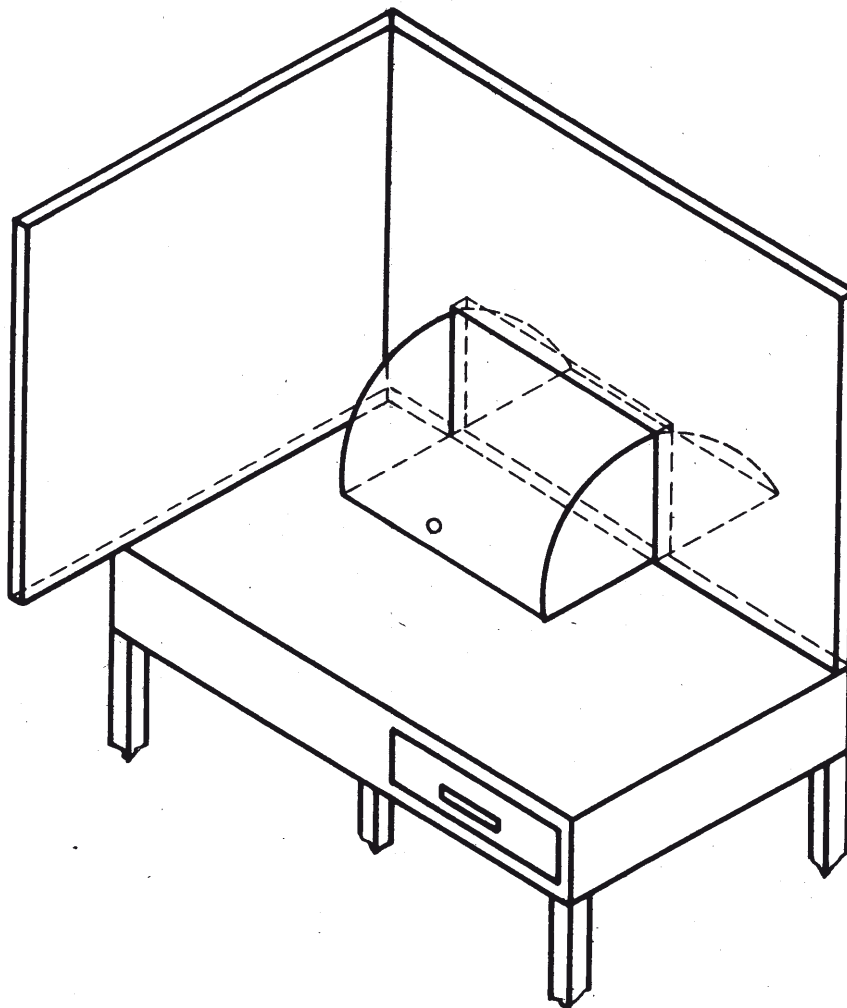
OKOMITA OKRETNA VRATAŠĆA ZA PODJELU UZORAKA

Slika 2.



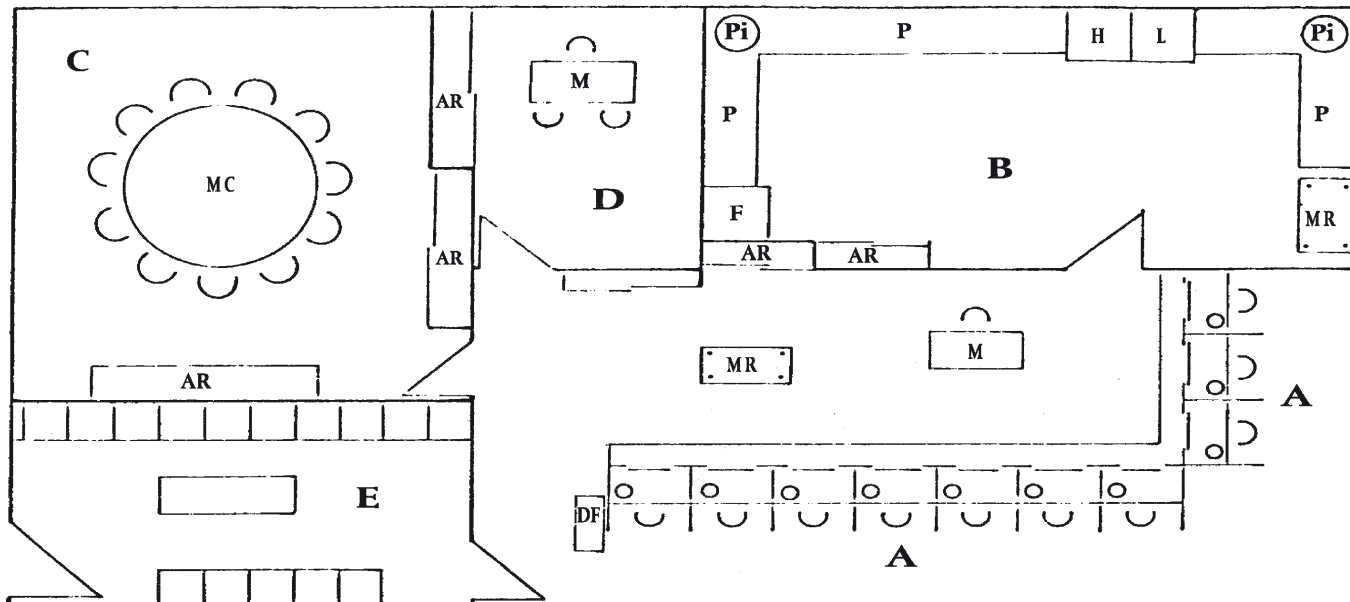
VODORAVNA VRATAŠKA ZA PODJELU UZORAKA

Slika 3.



LABORATORIJ ZA SENZORSKU ANALIZU (primjer)

Slika 4. – Primjer prostora za organoleptičko ocjenjivanje



- A: odjeljci za organoleptičko ocjenjivanje,
 B: prostorija za čišćenje uređaja i pripremanje uzoraka,
 C: otvoreni ocjenjivački skup,
 D: ured,
 E: čekaonica,
 F: hladnjak,
 H: peć,
 L: perilica suda,
 Pi: sudoper,
 AR: ormarić,
 MR: kolica,
 DF: podjela formulara,
 MC: okrugli stol,
 P: radna površina.

PRILOG XIII.

DOKAZIVANJE DA JE PROVEDEN POSTUPAK RAFINIRANJA

1. NEUTRALIZACIJA I DEKOLORIZACIJA MASLINOVOG ULJA U LABORATORIJU
 - 1.1. **Neutralizacija ulja**
 - 1.1.1. **Oprema**
 - visoka čaša volumena 300 ml,
 - laboratorijska centrifuga s epruvetama volumena 100 ml,
 - čaša volumena 250 ml,
 - tikvice s okruglim dnom volumena 100 ml,
 - lijevak za odjeljivanje volumena 1 litre.
 - 1.1.2. **Reagensi**
 - 12 %-tna vodena otopina natrijevog hidroksida,
 - 1 %-tna otopina fenolfaleina u etilnom alkoholu,
 - čisti heksan, analitičke čistoće,
 - čisti propan-2-ol, analitičke čistoće.
 - 1.1.3. **Postupak**
 - (a) *Ulja sa sadržajem slobodnih masnih kiselina, koje su iskazane kao oleinska kiselina, manjim od 30 %.*

U visoku čašu volumena 300 ml odmjerite 50 g sirovog ulja i zagrijte ga do temperature od 65 °C u vodenoj kupelji. Dodajte onoliko količinu 12 %-tne otopine natrijevog hidroksida koja odgovara slobodnim masnim kiselinama u ulju, uvećanu za 5 %, uz neprekidno pažljivo miješanje. Nastavite miješati još pet minuta, uz održavanje temperature od 65 °C.

Mješavinu rasporedite u epruvete za centrifugiranje volumena 100 ml i centrifugiranjem odijelite sapunastu masu. Izlijte dekantirano ulje u čašu volumena 250 ml i isperite s 50 do 60 ml kipuće destilirane vode, koju potom odstranite pomoću sifona. Ponavljajte postupak ispiranja sve dok ne odstranite sve tragove ostatka sapuna (ružičasta boja u fenolfaleinu mora nestati).

Ulje je zatim potrebno centrifugirati da bi se odstranile preostale male količine vode.
 - (b) *Ulja sa sadržajem slobodnih masnih kiselina, koje su iskazane kao oleinska kiselina, većim od 30 %.*

U lijevak za odjeljivanje volumena 1 litre stavite 50 g sirovog ulja, 200 ml heksana, 100 ml propan-2-ola i onoliko količinu 12 %-tne otopine natrijevog hidroksida koja odgovara slobodnim masnim kiselinama u ulju, uvećanu za 0,3 %.

Energično miješajte jednu minutu. Dodajte 100 ml destilirane vode, ponovno promiješajte i pustite da se slegne.

Nakon što je završeno odjeljivanje slojeva ispustite donji sapunasti sloj. Između dva sloja (uljnog na vrhu i vodenog ispod njega) često se formira međusloj koji sadrži sluz i netopive tvari koje također treba odstraniti.
 - 1.2. **Dekolorizacija neutraliziranog ulja**
 - 1.2.1. **Oprema**
 - tikvica s okruglim dnom volumena 250 ml s tri grla od brušenog stakla za umetanje:
 - (a) termometra graduiranog u stupnjevima koji omogućava očitavanje temperature u području oko 90 °C;
 - (b) mehaničke miješalice s 250 do 300 okretaja u minuti koja se može koristiti u vakuumu;
 - (c) priključka za vakuumsku pumpicu,
 - vakuumska pumpica s manometrom koja može postići podtlak od 15 do 30 milibara.

1.2.2. Postupak

U tikvicu s tri grla odmjerite približno 100 g neutraliziranog ulja. Umetnite termometar i miješalicu, spojite vakuumsku pumpicu i, uz neprekidno miješanje, zagrijte na temperaturu od 90 °C. Održavajte tu temperaturu i nastavite s miješanjem sve dok se iz ulja koje analizirate u potpunosti ne odstrani voda (oko 30 minuta). Zatim prekinite vakuum i dodajte između 2 i 3 g aktivne zemlje.

Ponovo uspostavite vakuum sve dok se ne postigne podtlak od 15 do 30 milibara, a zatim uz održavanje stalne temperature od 90 °C nastavite s miješanjem uz otprilike 250 okretaja u minuti idućih 30 minuta.

Još vruće ulje filtrirajte u termostatskoj peći (između 50 i 60 °C).

PRILOG XIV.

DODATNE BILJEŠKE 2., 3. I 4. UZ POGLAVLJE 15. KOMBINIRANE NOMENKLATURE

1. „Bilješka 2. A: Za potrebe oznaka 1509 i 1510 KN-a (kombinirane nomenklature), „maslinovo ulje“ označava ulja koja su dobivena isključivo preradom maslina, u što nisu uključena reesterificirano maslinovo ulje niti mješavine maslinovog ulja s drugim uljima.

Prisutnost reesterificiranog maslinovog ulja ili drugih ulja ustanovljuje se pomoću metoda koje su utvrđene u prilogima V., VII., IX., X. i XII. Analitičke karakteristike sterola i kiselinski sastav svih maslinovih ulja pod KN oznakama 1509 i 1510 postavljeni su u donjoj tablici.

Tablica I. – Kiselinski sastav kao postotak u ukupnom sastavu		Tablica II. – Sastav sterola kao postotak u ukupnom sastavu	
Miristinska kiselina	M 0,1	Kolesterol	M 0,5
Linolenska kiselina	M 0,9	Brasikasterol	M 0,2
Arahinska kiselina	M 0,7	Kampesterol	M 0,4
Eikozenska kiselina	M 0,5	Stigmasterol	< kampesterol
Behenska kiselina	M 0,3	Betasitosterol ⁽¹⁾	m 93,0
Lignocerinska kiselina	M 0,5	Δ 7-stigmasterol	M 0,5

M = maksimum

m = minimum

⁽¹⁾ Delta-5,23-stigmasterol + kolesterol + betasitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-stigmastadienol.

Bilješka 2. B: „Djevičansko maslinovo ulje“ znači ulja koja su dobivena isključivo iz maslina mehaničkim postupkom ili kakvim drugim fizikalnim putem pod uvjetima, a posebno termičkim uvjetima, koji ne dovode do kvarenja ulja te koja nisu bila podvrgnuta niti jednom drugom postupku osim pranja, dekantiranja, centrifugiranja ili filtriranja, što međutim ne uključuje ulja koja su ekstrahirana iz maslina pomoću otapala (1510) i koja su definirana u odjeljcima I. i II. dolje.

I. Za potrebe podrubrike 1509 10 10, izraz „djevičansko maslinovo ulje lampante“, bez obzira na njegovu kiselost, označava maslinovo ulje s:

- (a) sadržajem alifatskih alkohola koji ne prelazi 400 mg/kg;
- (b) sadržajem eritrodiole i uvaole koji ne prelazi 4,5 %;
- (c) sadržajem zasićenih masnih kiselina u položaju 2. na trigliceridima koji ne prelazi 1,3 % i/ili;
- (d) jednim od sljedećih svojstava:
 - (d1) peroksidnim brojem koji prelazi 20 meq O₂/kg;
 - (d2) sadržajem hlapivih halogeniranih otapala koji prelazi 0,2 mg/kg ukupno, ili koji prelazi 0,1 mg/kg za bilo koje pojedino otapalo;
 - (d3) K₂₇₀ (100) ekstinkcijski koeficijent koji je viši od 0,250 i nakon tretiranja ulja aktivnim aluminijskim oksidom nije viši od 0,11. Neka ulja u kojima je sadržaj slobodnih masnih kiselina, koje su iskazane kao oleinska kiselina, viši od 3,3 g na 100 g nakon prelaska preko aluminijevog oksida, u skladu s metodom postavljenom u Prilogu XV., mogu imati ekstinkcijski koeficijent K₂₇₀ viši od 0,11. U tom slučaju, nakon neutralizacije i dekolorizacije u laboratoriju, ona moraju imati sljedeća svojstva:

- ekstinkcijski koeficijent K_{270} ne smije biti viši od 1,20;
 - odstupanje ekstinkcijskog koeficijenta (ΔK) ⁽¹⁾ u području 270 nm, više od 0,01, ali ne više od 0,16;
 - (d4) organoleptičke karakteristike koje uključuju prepoznatljive nedostatke koji nadilaze granice prihvatljivosti i ocjenu ocjenjivačke komisije nižu od 3,5.
- II. Za potrebe podrubrike 1509 10 90, izraz 'djevičansko ulje' označava maslinovo ulje koje ima sljedeće karakteristike:
- (a) sadržaj kiselina, koje su iskazane kao oleinska kiselina, koji nije viši od 3,3 g na 100 g;
 - (b) peroksidni broj koji ne prelazi 20 meq O₂/kg;
 - (c) sadržaj alifatskih alkohola koji ne prelazi 300 mg/kg;
 - (d) sadržaj hlapivih halogeniranih otapala koji ne prelazi 0,2 mg/kg ukupno i ne prelazi 0,1 mg/kg za svako pojedino otapalo;
 - (e) K_{270} ekstinkcijski koeficijent nije viši od 0,250, a nakon tretiranja ulja aktivnim aluminijevim oksidom nije viši od 0,10 ⁽²⁾;
 - (f) odstupanje ekstinkcijskog koeficijenta (ΔK), u području 270 nm, nije veće od 0,010;
 - (g) organoleptičke karakteristike koje mogu uključivati prepoznatljive nedostatke koji se nalaze unutar granica prihvatljivosti i ocjenu ocjenjivačke komisije višu od 3,5;
 - (h) sadržaj eritrodiola i uvaola koji ne prelazi 4,5 %;
 - (i) sadržaj zasićenih masnih kiselina u položaju 2. na trigliceridima koji ne prelazi 1,3 %.

Bilješka 2. C: Podrubrika 1509 90 00 odnosi se na maslinovo ulje koje je dobiveno obradom maslinovih ulja koja su obuhvaćena podrubrikom 1509 10 10 ili 1509 10 90, bez obzira na to jesu li ili nisu miješana s djevičanskim maslinovim uljem, a koja imaju sljedeće karakteristike:

- (a) sadržaj kiselina, koje su iskazane kao oleinska kiselina, koji ne prelazi 3,3 g na 100 g;
- (b) sadržaj alifatskih alkohola koji ne prelazi 350 mg/kg;
- (c) K_{270} ekstinkcijski koeficijent (100) koji je viši od 0,250, ali ne viši od 1,20, a nakon tretiranja ulja aktivnim aluminijevim oksidom viši je od 0,10;
- (d) odstupanje ekstinkcijskog koeficijenta (ΔK), u području 270 nm, koje je veće od 0,010, ali nije veće od 0,160;
- (e) sadržaj eritrodiola i uvaola koji ne prelazi 4,5 %;
- (f) sadržaj zasićenih masnih kiselina u položaju 2. na trigliceridima ne prelazi 1,5 %.

Bilješka 2. D: Za potrebe podrubrike 1510 00 10, izraz 'sirova ulja' označava ulja, posebno ulja komine maslina, koja imaju sljedeće karakteristike:

- (a) sadržaj kiselina, koje su iskazane kao oleinska kiselina, koji je viši od 2 g na 100 g;
- (b) sadržaj eritrodiola i uvaola koji prelazi 12 %;
- (c) sadržaj zasićenih masnih kiselina na položaju 2. triglicerida koji ne prelazi 1,8 %.

Bilješka 2. E: Ulja iz podrubrike 1510 00 90 uključuju ulja koja su dobivena obradom ulja obuhvaćenih podrubrikom 1510 00 10, bez obzira na to jesu li ili nisu miješana s djevičanskim maslinovim uljem, a koja nemaju karakteristike ulja koje su navedene u točkama I. i II., pod uvjetom da njihov sadržaj zasićenih masnih kiselina u položaju 2. na trigliceridima ne prelazi 2 %."

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

K_m označava ekstinkcijski koeficijent na valnoj duljini pika apsorpcijske krivulje u području 270 nm.

$K_{m-4} + K_{m+4}$ označava ekstinkcijske koeficijente na valnim duljinama koje su 4 nm niže ili više od valne duljine K_m .

⁽²⁾ Ako K_{270} prelazi 0,25, nakon prolaza preko aluminijevog oksida mora se provesti novo ispitivanje. K_{270} ne smije prelaziti 0,10.

-
2. „Bilješka 3.: Podrubrike 1522 00 31 i 1522 00 39 ne obuhvaćaju:
- (a) komine koje su nastale kao rezultat obrade masnih tvari koje sadrže ulje čiji je jodni broj, koji je određen u skladu s metodom utvrđenom u Prilogu XVI., niži od 70 ili viši od 100;
 - (b) komine koje su nastale kao rezultat obrade masnih tvari koje sadrže ulje čiji jodni broj nije niži od 70 niti viši od 100, a čija površina pika koja predstavlja retencijski volumen -sitosterola, koji je određen u skladu s Prilogom Uredbi kako je navedeno u dodatnoj bilješki 4. dolje, iznosi manje od 93 % ukupnih površina pikova sterola.”
3. „Bilješka 4.: Analitičke metode za određivanje karakteristika gore spomenutih proizvoda jesu one koje su utvrđene u prilogima Uredbi (EEZ) br. 2568/91.”
-

PRILOG XV.

1. SADRŽAJ ULJA U KOMINI MASLINA

1.1. **Oprema**

- primjeren uređaj za ekstrakciju opremljen tikvicom s okruglim dnom volumena 200 – 250 ml,
- električno grijana kupelj (primjerice, pješčana kupelj ili vodena kupelj) ili grijača ploča,
- analitička vaga,
- sušionik postavljen na maksimalnu temperaturu od 80 °C
- električno grijani sušionik s ugrađenim termostatom postavljenim na 103 ± 2 °C, koji se može pročitati strujom zraka, ili kojim se može rukovati pri sniženom tlaku,
- mehanički mlinac koji se lako čisti te koji omogućava mljevenje komine maslina bez povećanja njezine temperature ili bilo koje druge promjene sadržaja vlage, hlapivih tvari ili tvari koje se ekstrahiraju heksanom,
- čahura za ekstrakciju i vata ili filter-papir s kojeg su već odstranjene tvari koje se mogu ekstrahirati heksanom,
- eksikator,
- sito s otvorima promjera 1 mm,
- male čestice prethodno osušenog kamena plovuća.

1.2. **Reagensi**

Normalni heksan tehničkog stupnja čistoće, iza kojega, nakon što je potpuno ispario, suhi ostatak mora biti manji od 0,002 g na 100 ml.

2. **POSTUPAK**2.1. **Pripremanje uzorka za ispitivanje**

Ako je potrebno, za mljevenje laboratorijskog uzorka upotrijebite prethodno dobro očišćeni mehanički mlinac da uzorak usitnite dovoljno da čestice mogu proći kroz sito.

Upotrijebite otprilike jednu dvadesetinu uzorka da biste obavili postupak čišćenja mlinca, samljeveni materijal bacite, a ostatak sameljite i sakupite, pažljivo promiješajte i odmah ga analizirajte.

2.2. **Uzorak za ispitivanje**

Odmah nakon mljevenja za analizu odvagajte otprilike 10 g uzorka s dopuštenim odstupanjem od 0,01 g.

2.3. **Pripremanje čahure za ekstrakciju**

Uzorak za ispitivanje stavite u čahuru za ekstrakciju i začepite vatom. Ako koristite filter-papir, uzorak za ispitivanje umotajte u njega.

2.4. **Prethodno sušenje**

Ako je komina masline vrlo vlažna (odnosno, ako je sadržaj vlage i hlapivih tvari viši od 10 %), provedite prethodno sušenje tako da napunjenu čahuru za ekstrakciju (ili filter-papir) na odgovarajuće vrijeme stavite u sušionik u kojemu temperatura nije viša od 80 °C, a s ciljem smanjivanja sadržaja vlage i hlapivih tvari na manje od 10 %.

2.5. **Pripremanje tikvice s okruglim dnom**

Odmjerite, uz odstupanje do 1 mg, tikvicu u kojoj se nalaze jedna ili dvije čestice plovuća, prethodno osušenu u sušioniku na 103 ± 2 °C, a nakon toga ohlađenu u eksikatoru ne kraće od jednog sata.

2.6. **Početna ekstrakcija**

Čahuru za ekstrakciju (ili filter-papir) u kojoj je uzorak za ispitivanje umetnuta u uređaj za ekstrahiranje. U tikvicu ulijte potrebnu količinu heksana. Spojite tikvicu s uređajem za ekstrahiranje i sve zajedno stavite na električno grijanu kupelj. Stupanj zagrijavanja prilagodite na takav način da brzina refluksa ne bude sporija od tri kapi u sekundi (umjereno, ne snažno ključanje). Nakon četiri sata ekstrahiranja pustite da se ohladi. Izvadite čahuru za ekstrakciju iz uređaja za ekstrahiranje i postavite je u struju zraka s ciljem odstranjivanja većine otapala.

2.7. Druga ekstrakcija

Sadržaj čahure za ekstrakciju istresite u mikro-drobilicu i sameljite ga čim je sitnije moguće. Vratite svu samljevenu mješavinu u čahuru (bez rasipanja) i postavite je natrag u uređaj za ekstrahiranje.

Nastavite s ekstrahiranjem tijekom sljedeća dva sata koristeći istu tikvicu s okruglim dnom koja je sadržavala inicijalni ekstrakt.

Dobivena otopina u tikvici za ekstrahiranje mora biti bistra. Ako nije, profiltrirajte je kroz filter-papir te prvotnu tikvicu i filter-papir nekoliko puta isperite heksanom. Sakupite filtrat i otopinu za ispiranje u drugu tikvicu s okruglim dnom koja je prethodno bila osušena i izvagana uz odstupanje do 1 mg.

2.8. Odstranjivanje otapala i vaganje ekstrakta

Veći dio otapala odstranite destilacijom na električno grijanoj kupelji. Sve preostale tragove otapala odstranite zagrijavanjem tikvice u sušioniku na 103 ± 2 °C tijekom 20 minuta. Postupak odstranjivanja pospješite bilo upuhivanjem zraka, ili pak, što je preporučljivo, nekog inertnog plina, u određenim vremenskim intervalima ili korištenjem sniženog tlaka.

Ostavite tikvicu da se hladi u eksikatoru ne kraće od jednog sata i zatim je izvažite s odstupanjem do 1 mg.

Ponovo zagrijavajte 10 minuta u istim uvjetima, ohladite u eksikatoru i izvažite.

Razlika između dvaju vaganja ne smije biti veća od 10 mg. Ako je razlika veća, ponovo zagrijavajte u razdobljima od 10 minuta, iza kojih slijede hlađenje i vaganje, sve dok razlika ne bude iznosila 10 mg ili manje. Zabilježite masu dobivenu posljednjim vaganjem tikvice.

Provedite dva usporedna određivanja.

3. ISKAZIVANJE REZULTATA

3.1. Metoda izračunavanja i formula

(a) Ekstrakt, iskazan kao postotak u odnosu na masu zaprimljenog proizvoda, jednak je:

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

pri čemu je: S = maseni udjel ekstrakta u odnosu na zaprimljeni proizvod,
 m_0 = masa uzorka, u gramima,
 m_1 = masa ekstrakta nakon sušenja, u gramima.

Za rezultat uzmite aritmetičku sredinu dvaju usporednih određivanja, pod uvjetom da su ispunjeni zahtjevi za ponovljivost.

Rezultat iskažite jednim decimalnim mjestom.

(b) Ekstrakt se iskazuje na temelju suhe tvari, korištenjem sljedeće formule:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{postotak ulja u ekstraktu na temelju suhe tvari}$$

pri čemu je: S = postotak ekstrakta u smislu zaprimljenog proizvoda (vidjeti točku (a)),
 U = njegov sadržaj vlage i hlapivih tvari.

3.2. Ponovljivost

Razlika između dvaju usporednih određivanja koje isti analitičar provodi istodobno, ili neposredno jedno za drugim, ne smije biti viša od 0,2 g ekstrakta heksana na 100 g uzorka.

Ako ovaj uvjet nije ispunjen, ponovite analizu na druga dva dijela uzorka za ispitivanje. Ako i u tom slučaju razlika bude viša od 0,2 g, kao rezultat uzmite aritmetičku sredinu četiriju određivanja.

PRILOG XVI.

ODREĐIVANJE JODNOG BROJA

1. OPSEG

Ovom Međunarodnom normom utvrđuje se metoda za određivanje jodnog broja u mastima životinjskog i biljnog podrijetla te uljima, u daljnjem tekstu: masti.
2. DEFINICIJA

Za potrebe ove Međunarodne norme primjenjuje se sljedeća definicija:

 - 2.1. *Jodni broj* označava masu joda koju je uzorak apsorbirao u radnim uvjetima koji su utvrđeni ovom Međunarodnom normom.

Vrijednost jodnog broja iskazuje se u gramima joda na 100 g uzorka.
3. PRINCIP

Dio uzorka za ispitivanje rastopi se u otapalu uz dodatak Wijsova reagensa. Nakon određenog vremena dodaju se otopina kalijevog jodida i voda, a oslobođeni se jod titrira otopinom natrijevog tiosulfata.
4. REAGENSI

Svi reagensi moraju biti prihvaćene analitičke čistoće.

 - 4.1. *Voda*, sukladna zahtjevima norme ISO 3693, 3. stupanj.
 - 4.2. *Kalijev jodid*, otopina 100 g/l, koja ne sadrži jodate niti slobodni jod.
 - 4.3. *Škrob*, otopina.

5 g topivog škroba pomiješajte s 30 ml vode, pa ovu mješavinu dodajte u 1 000 ml kipuće vode, pustite da vrije tri minute i zatim ostavite da se ohladi.
 - 4.4. *Natrijev tiosulfat*, standardna volumetrijska otopina koncentracije $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$, koja je standardizirana ne dulje od sedam dana prije uporabe.
 - 4.5. *Otapalo* pripremljeno miješanjem jednakih volumena cikloheksana i octene kiseline.
 - 4.6. *Wijsov reagens*, sadrži jodni monoklorid u octenoj kiselini. Treba koristiti Wijsov reagens koji je dostupan u slobodnoj trgovini.
5. OPREMA

Uobičajena laboratorijska oprema, a posebno sljedeća:

 - 5.1. *Staklene odmjerne posudice*, pogodne za dio uzorka za ispitivanje i njegovo raspoređivanje u tikvice (6.2).
 - 5.2. *Erlenmeyerove tikvice*, volumena 500 ml, s čepovima od brušenog stakla i potpuno suhe.
6. PRIPREMANJE UZORKA ZA ISPITIVANJE

Homogenizirani uzorak osuši se iznad natrijevog sulfata i filtrira.
7. POSTUPAK
 - 7.1. *Uzorak za ispitivanje*

Masa uzorka za ispitivanje razlikuje se ovisno o njegovu očekivanom jodnom broju, kao što je prikazano u tablici 1.

Tablica 1.

Očekivani jodni broj	Masa dijela uzorka za ispitivanje (g)
manje od 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

Uzorak odmjerite u staklenoj odmjernoj posudici (5.1.) uz odstupanje do 0,1 mg.

7.2. Određivanje

Dio uzorka za ispitivanje stavite u tikvicu volumena 500 ml (6.2.). Dodajte 20 ml otapala (4.5.) da bi se rastopila mast. Dodajte točno 25 ml Wijsova reagensa (4.6.), umetnite čep, zavrtite sadržaj i stavite tikvicu na tamno mjesto. Za Wijsov reagens ne smije se koristiti usna pipeta!

Na sličan način pripremite slijepu probu s otapalom i reagensom, ali bez dijela uzorka za ispitivanje.

Za uzorke koji imaju jodni broj manji od 150 ostavite tikvice u tami sat vremena; za one čiji je jodni broj viši od 150 i za polimerizirane proizvode ili u značajnoj mjeri oksidirane proizvode, ostavite u tami dva sata.

Po isteku zadanog vremena u svaku tikvicu dodajte po 20 ml otopine kalijevog jodida (4.2.) i 150 ml vode (4.1.).

Titrirajte standardnom volumetrijskom otopinom natrijevog tiosulfata (4.4.) sve dok žuta boja koju daje jod gotovo u potpunosti ne nestane. Dodajte nekoliko kapi otopine škroba (4.3.) i nastavite titrirati sve dok neposredno nakon vrlo energičnog protresanja ne nestane plava boja.

Bilješka: Dopušteno je potencijometrijsko titriranje za određivanje završne točke.

7.3. Broj određivanja

Provedite dvostruko određivanje na istom uzorku za ispitivanje.

8. ISKAZIVANJE REZULTATA

Jodni broj zadan je sljedećom jednadžbom:

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

pri čemu je:

c = brojčana vrijednost točne koncentracije, iskazana u molima po litri, upotrijebljene standardne volumetrijske otopine natrijevog tiosulfata (4.4.);

V_1 = brojčana vrijednost volumena, u mililitrima, standardne volumetrijske otopine natrijevog tiosulfata (4.4.) koja je korištena za slijepu probu;

V_2 = brojčana vrijednost volumena, u mililitrima, standardne volumetrijske otopine natrijevog tiosulfata (4.4.) koja je korištena za određivanje;

m = brojčana vrijednost mase, u gramima, uzorka za ispitivanje (7.1.).

Za rezultat uzmite aritmetičku sredinu dvaju određivanja, pod uvjetom da su ispunjeni zahtjevi za ponovljivost (9.2.).