

Na temelju članka 17. stavak 2. i članka 54. stavak 1. točka c) Zakona o hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 50/04) i članka 17. Zakona o Vijeću ministara Bosne i Hercegovine ("Službeni glasnik BiH", br. 30/03, 42/03, 81/06, 76/07, 81/07, 94/07 i 24/08), Vijeće ministara Bosne i Hercegovine, na prijedlog Agencije za sigurnost hrane Bosne i Hercegovine, u suradnji s nadležnim tijelima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, na 55. sjednici održanoj 26. lipnja 2013. godine, donijelo je

PRAVILNIK O METODAMA ANALIZE MASLINOVOG ULJA DIO PRVI - OPĆE ODREDBE

Članak 1.

(Predmet)

Ovim se pravilnikom propisuju analitičke metode radi ispitivanja svojstva ulja od ploda i komine maslina koja se stavljuju na tržiste radi prodaje krajnjem potrošaču, a odnose se na:

- a) fizičko-kemijska i senzorska svojstva,
- b) fizičko-kemijska i senzorska svojstva sirovina,
- c) vrstu i količinu sirovina, dodataka i drugih tvari koje se koriste u proizvodnji i preradi,
- d) metode uzorkovanja i metode analiza fizičko-kemijskih i senzorskih svojstava ulja.

DIO DRUGI - POSEBNE ODREDBE

Članak 2.

(Utvrđivanje sukladnosti)

- (1) Za utvrđivanje sukladnosti fizičko-kemijskih i senzorskih svojstava ulja iz stavka (2) ovoga članka s propisanim svojstvima koriste se metode uzorkovanja i analize koje se nalaze u aneksima ovoga pravilnika.
- (2) Ulja se razvrstavaju u kategorije pod sljedećim nazivima:
 - a) *Djevičanska maslinova ulja*
 - 1) *Ekstra djevičansko maslinovo ulje* je ulje dobiveno izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima, koje sadrži najviše 0,8 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja i čija svojstva odgovaraju onima navedenim u točki 1. Aneksa I. ovoga pravilnika;
 - 2) *Djevičansko maslinovo ulje* je ulje dobiveno izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima, koje sadrži najviše 2 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja i čija svojstva odgovaraju onima navedenim u točki 2. Anekса I. ovoga pravilnika;
 - 3) *Maslinovo ulje lampante* je djevičansko maslinovo ulje neprihvatljivih senzorskih svojstava, koje sadrži više od 2 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja i čija svojstva odgovaraju onima navedenim u točki 3. Aneksa I. ovoga pravilnika;
 - b) *Rafinirano maslinovo ulje* je ulje dobiveno rafinacijom djevičanskog maslinovog ulja, koje ne sadrži više od 0,3 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja i čija svojstva odgovaraju onima navedenim u točki 4. Aneksa I. ovoga pravilnika;
 - c) *Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja* je ulje dobiveno miješanjem rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih

maslinovih ulja osim maslinovog ulja lampante, koji ne sadrži više od 1 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja i čija svojstva odgovaraju onima navedenim u točki 5. Aneksa I. ovoga pravilnika;

d) *Sirovo ulje komine maslina* je ulje dobiveno preradom komine maslina mehaničkim postupcima i/ili ekstrakcijom komine maslina organskim otapalima, bez rafinacije i reesterifikacije te bez miješanja s uljima druge vrste i čija svojstva odgovaraju onima navedenim u točki 6. Aneksa I. ovoga pravilnika;

e) *Rafinirano ulje komine maslina* je ulje dobiveno rafinacijom sirovog ulja komine maslina, koji ne sadrži više od 0,3 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja i čija svojstva odgovaraju onima navedenim u točki 7. Aneksa I. ovoga pravilnika;

f) *Ulje komine maslina* je ulje dobiveno miješanjem rafiniranog ulja komine maslina i djevičanskih maslinovih ulja, osim maslinovog ulja lampante, koje ne sadrži više od 1 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja i čija svojstva odgovaraju onima navedenim u točki 8. Aneksa I. ovoga pravilnika.

Članak 3.

(Metode uzorkovanja i analiza fizičko-kemijskih i senzorskih svojstava)

- (1) Svojstva ulja navedena u Aneksu I. ovoga pravilnika određuju se sljedećim analitičkim metodama:
 - a) za određivanje udjela slobodnih masnih kiselina izraženih kao udio oleinske kiseline – metoda opisana u Aneksu II. ovoga pravilnika;
 - b) za određivanje peroksidnog broja – metoda opisana u Aneksu III. ovoga pravilnika;
 - c) za određivanje udjela voskova – metoda opisana u Aneksu IV. ovoga pravilnika;
 - d) za određivanje sastava i udjela sterola – metoda opisana u Aneksu V. ovoga pravilnika;
 - e) za određivanje eritrodiola i uvaola – metoda opisana u Aneksu VI. ovoga pravilnika;
 - f) za određivanje udjela 2-gliceril monopalmitata – metoda opisana u Aneksu VII. ovoga pravilnika;
 - g) za spektrofotometrijske analize – metoda opisana u Aneksu VIII. ovoga pravilnika;
 - h) za određivanje sastava masnih kiselina – metoda opisana u Aneksu IX.a. i IX.b. ovoga pravilnika;
 - i) za određivanje udjela hlapljivih halogeniranih otapala u maslinovom ulju, metoda opisana u Aneksu X. ovoga pravilnika;
 - j) za senzorsko ocjenjivanje djevičanskog maslinovog ulja – metoda opisana u Aneksu XI. ovoga pravilnika;
 - k) za određivanje stigmastadiena – metoda opisana u Aneksu XII. ovoga pravilnika;
 - l) za određivanje triacilglicerola s ECN 42 – metoda opisana u Aneksu XIII. ovoga pravilnika;
 - m) za određivanje udjela alifatskih alkohola – metoda opisana u Aneksu XIV. ovoga pravilnika;
 - n) za određivanje udjela voskova metil-estra masnih kiselina i etil-estra masnih kiselina kapilarnom plinskom kromatografijom – metoda opisana u Aneksu XV. ovoga pravilnika.

Članak 4.

(Provjera senzorskih svojstava)

- (1) Provjeru senzorskih svojstava ulja iz članka 2. stavka (2) točke a) ovoga pravilnika provode tijela nadležna za provođenje službenih kontrola u Bosni i Hercegovini.
- (2) Senzorska svojstva djevičanskih maslinovih ulja provjeravaju se posredstvom skupina odabranih i oposobljenih ocjenjivača senzorskih svojstava djevičanskih maslinovih ulja (u daljem tekstu: paneli) koje je na prijedlog Agencije za sigurnost hrane Bosne i Hercegovine (u daljem tekstu: Agencija) ovlastilo Vijeće ministara Bosne i Hercegovine.
- (3) Smatra se da su senzorska svojstva ulja iz članka 2. stavka (2) točke a) ovoga pravilnika sukladna označenoj kategoriji ako ovlašteni panel potvrdi kategorizaciju.
- (4) Ako ovlašteni paneli ne potvrde označenu kategoriju, tijela nadležna za provođenje službenih kontrola dužna su na zahtjev zainteresirane stranke organizirati dvije zasebne provjere, koje će provesti drugi ovlašteni paneli, pri čemu najmanje jednu provjeru treba provesti panel ovlašten u zemlji proizvođača.
- (5) Ako obje provjere iz stavka (4) ovoga članka potvrde označenu kategoriju ulja iz stavka (1) ovoga članka, smatra se da je ulje ispravno označeno.
- (6) U slučaju suprotnom od stavka (5) ovoga članka, zainteresirana stranka iz stavka (4) ovoga članka dužna je snositi troškove provjera.

Članak 5.

(Uzorkovanje i priprema uzoraka za ispitivanje)

- (1) Sukladno metodama iz članka 3. ovoga pravilnika, pri provjeri svojstava ulja koju provodi tijelo nadležno za provođenje službene kontrole uzorci trebaju biti uzeti u skladu s normama BAS EN ISO 5555 o uzorkovanju i BAS EN ISO 661 o pripremi uzoraka za ispitivanje. Bez obzira na točku 6.8. norme BAS EN ISO 5555 o uzorkovanju, u slučaju serije ulja čija ambalaža ne prelazi 100 litara uzorak mora biti uzet sukladno Aneksu I.a. ovoga pravilnika.
- (2) Ne dovodeći u pitanje normu BAS EN ISO 5555 o uzorkovanju i Poglavlje 6. norme BAS EN ISO 661 o pripremi uzoraka za ispitivanje, uzeti uzorci moraju u što kraćem roku biti smješteni na tamno mjesto zaštićeno od svjetlosti i jakih izvora topline, te poslani u laboratorij na analizu ne kasnije od:
 - a) desetoga radnog dana nakon uzimanja uzoraka, u razdoblju od listopada do svibnja, i
 - b) petoga radnog dana nakon uzimanja uzoraka, u razdoblju od lipnja do rujna.

Članak 6.

(Vremenska ograničenja)

- (1) Za potrebe potvrde predviđene člankom 4. ovoga pravilnika, analize iz aneksa II., III., VIII., IX. i XI. ovoga pravilnika i, kad je primjenljivo, bilo koje druge analize propisane posebnim propisima, biti će obavljene četiri mjeseca prije isteka roka trajanja.
- (2) Ako je uzorkovanje obavljeno više od četiri mjeseca prije isteka roka trajanja, analize iz stavka (1) ovoga članka biti će obavljene najkasnije prije isteka četvrtoga mjeseca računajući od mjeseca u kojem je uzet uzorak.
- (3) Na druge analize predviđene člankom 3. ovoga pravilnika ne primjenjuju se vremenska ograničenja.
- (4) Ako rezultati analiza ne potvrde svojstva označene kategorije ulja, tijelo nadležno za provođenje službene kontrole obaveštava o tome zainteresiranu stranku najkasnije mjesec dana prije kraja razdoblja iz stavka (2) ovoga članka, osim ako je uzorak uzet mjesec dana ili kraće od isteka roka trajanja.

Članak 7.

(Rezultati analiza)

Za ulja iz članka 2. stavka (2) ovoga pravilnika smatra se da odgovaraju označenoj kategoriji ako se rezultati analiza dobiveni sukladno metodama iz članka 3. ovoga pravilnika nalaze unutar granica propisanih ovim pravilnikom.

Članak 8.

(Utvrđivanje označene kategorije)

Postupak provjere zadovoljavaju li uzorci označenu kategoriju može se provesti na sljedeće načine:

- a) provodeći analize iz Aneksa I. ovoga pravilnika (bilo kojim redoslijedom) ili
- b) prateći redoslijed naveden u Aneksu I.b. ovoga pravilnika u stablu odluke, dok se ne dođe do jednog od zaključaka iz toga stabla.

Članak 9.

(Ovlašćivanje panela)

- (1) Agencija, u suradnji s nadležnim tijelima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, predlaže Vijeću ministara Bosni i Hercegovini panele koje treba ovlastiti kako bi tijelo nadležno za provođenje službene kontrole moglo provjeriti i potvrditi senzorska svojstva ulja iz članka 2. stavka (2) točke a) ovoga pravilnika, u skladu s posebnim propisom o ovlašćivanju panela.
- (2) Ako Agencija nađe na poteškoće pri uspostavi panela u Bosni i Hercegovini, može se pozvati na panel koji je ovlašten u nekoj drugoj zemlji Europske unije pod uvjetima istovrijednim onima u posebnom propisu o ovlašćivanju panela iz stavka (1) ovoga članka.
- (3) Agencija, u suradnji s nadležnim tijelima entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine, donijet će poseban propis o ovlašćivanju panela za ocjenjivanje senzorskih svojstava djevičanskih maslinovih ulja.
- (4) Do donošenja posebnog propisa o ovlašćivanju panela iz stavka (3) ovoga članka Vijeće ministara Bosne i Hercegovine, na prijedlog Agencije, može ovlastiti panel iz države članice Europske unije.
- (5) Agencija vodi popis panela ovlaštenih sukladno uvjetima iz st. (1), (2) i (4) ovoga članka te ga objavljuje u "Službenom glasniku BiH".
- (6) Za ovlašćivanje panela trebaju biti ispunjeni uvjeti propisani Aneksom XI. točka 4. ovoga pravilnika.
- (7) Agencija će osnovati povjerenstvo za odabir panela koje treba predložiti Vijeću ministara Bosne i Hercegovine za ovlašćivanje.

Članak 10.

(Količina ulja u uljnim pogačama)

- (1) Količina ulja u uljnim pogačama i drugim ostacima dobivenim pri ekstrakciji maslinovog ulja (CN oznake 2306 90 11 00 i 2306 90 19 00) određuje se metodom iz Aneksa XV. ovoga pravilnika.
- (2) Količina ulja iz stavka (1) ovoga članka izražava se kao udio mase ulja u masi suhe tvari.

Članak 11.

(Halogenirana otapala)

- (1) Prisutnost kontaminanata oreduje se Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama za određene kontaminante u hrani ("Službeni glasnik BiH", br. 37/09 i 39/12).
- (2) Najveće dopuštene količine halogeniranih otapala za sve kategorije maslinovog ulja su:
 - a) najveća količina svakog pojedinačnog halogeniranog otapala iznosi 0,1 mg/kg,
 - b) ukupna najveća količina halogeniranih otapala iznosi 0,2 mg/kg.

Članak 12.

(Registracija objekata za pakiranje maslinovog ulja)

Registraciju objekata za pakiranje maslinovih ulja s registriranim oznakom obavljaju nadležna tijela entiteta i Brčko Distrikta Bosne i Hercegovine.

DIO TREĆI - PRIJELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE**Članak 13.**

(Aneksi)

Aneksi I., I.a., I.b., II., III., IV., V., VI., VII., VIII., IX.a., IX.b., X., XI., XII., XIII., XI. i XV., čine sastavni dio ovoga pravilnika.

Članak 14.

(Službena kontrola i inspekcijski nadzor)

- (1) Službena kontrola i inspekcijski nadzor provode se u skladu s važećim propisima.
- (2) Za povredu odredaba ovoga pravilnika primjenjuju se kaznene mjere u skladu s odredbama Poglavlja XVI. Zakona o hrani ("Službeni glasnik BiH", broj 50/04), ako posebnim propisima nije drukčije propisano.

Članak 15.

(Prestanak važenja odredaba)

- (1) Stupanjem na snagu ovoga pravilnika prestaje važiti Pravilnik o jugoslavenskom standardu za sirovo maslinovo

ulje ("Službeni list SFRJ", broj 62/91 i "Službeni list RBiH", broj 2/92). Pravilnik o kvalitetu jestivog maslinovog ulja i miješanog maslinovog ulja ("Službeni list SFRJ", broj 51/91, i "Službeni list RBiH", broj 2/92) u dijelu koji se odnosi na metode analiza maslinovog ulja, te Pravilnik o jugoslovenskim standardima za ulja i masti biljnog i životinjskog porijekla ("Službeni list SFRJ", broj 05/91, i "Službeni list RBiH", broj 2/92) u dijelu koji se odnosi na maslinovo ulje.

- (2) Ulje uzorkovano i analizirano sukladno odredbama propisa navedenim u stavku 1. ovoga pravilnika može se stavljati na tržište 12 mjeseci od dana stupanja na snagu ovoga pravilnika.

Članak 16.

(Stupanje na snagu)

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmoga dana od dana objave u "Službenom glasniku BiH".

VM broj 189/13
26. lipnja 2013. godina
Sarajevo

Predsjedatelj
Vijeća ministara BiH
Vjekoslav Bevanda, v. r.

ANEKS I.**SVOJSTVA POJEDINIH KATEGORIJA MASLINOVOG ULJA**

Kategorija	Masnih kiselina metilnih estera (FAMEs) i masnih kiselina etil esteri (FAEEs)	Slobodne masne kiseline (%)	Peroksi-dni broj O ₂ /kg (*)	Voskovi mg/kg (**)	2-gliceril monopalmitat (%)	Stigma-stadieni mg/kg (1)	Razlika između HPLC ECN42 i teoretskog teoretskog	K232 (*)	K270 (*)	Delta-K (*)	Medijan mana (Mm)	Senzorska analiza	Medijan voćnosti (Mv)	(*)	(*)	(*)	(*)
I. Ekstra djivičansko maslinovo ulje	$\Sigma FAME + FAEE \leq 75 \text{ mg / kg ili } 75 \text{ mg / kg} < \Sigma FAME + FAEE \leq 150 \text{ mg/kg}$ i $(FAEE/FAME \leq 1,5)$	$\leq 0,8$	≤ 20	≤ 250	$\leq 0,9$ ako je udio palmitinske kiseline $\leq 14\%$ $\leq 1,0$ ako je udio palmitinske kiseline $> 14\%$	$\leq 0,2$	$\leq 2,50$	$\leq 0,22$	$\leq 0,01$	$Mm = 0$	$Mv > 0$						

2. Djevičansko maslinovo ulje	–	$\leq 2,0$	≤ 20	≤ 250	$\leq 0,9$ ako je udio palmitinske kiseline % ≤ 14 $\leq 1,0$ ako je udio palmitinske kiseline % > 14	$\leq 0,10$	$\leq 0,2$	$\leq 2,60$	$\leq 0,25$	$\leq 0,01$	$Mm \leq 3,5$	$Mv > 0$
3. Maslinovo ulje lampante	–	$> 2,0$	—	$\leq 300(3)$	$\leq 0,9$ ako je udio palmitinske kiseline % ≤ 14 $\leq 1,1$ ako je udio palmitinske kiseline % > 14	$\leq 0,50$	$\leq 0,3$	—	—	—	$Mm > 3,5^{(2)}$	—
4. Rafinirano maslinovo ulje	–	$\leq 0,3$	≤ 5	≤ 350	$\leq 0,9$ ako je udio palmitinske kiseline % ≤ 14 $\leq 1,1$ ako je udio palmitinske kiseline % > 14	—	$\leq 0,3$	—	$\leq 1,10$	$\leq 0,16$	—	—
5. Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja	–	$\leq 1,0$	≤ 15	≤ 350	$\leq 0,9$ ako je udio palmitinske kiseline % ≤ 14 $\leq 1,0$ ako je udio palmitinske kiseline % > 14	—	$\leq 0,3$	—	$\leq 0,90$	$\leq 0,15$	—	—
6. Sirovo ulje komine maslina	–	—	—	$> 350 (4)$	$\leq 1,4$	—	$\leq 0,6$	—	—	—	—	—
7. Rafinirano ulje komine maslina	–	$\leq 0,3$	≤ 5	> 350	$\leq 1,4$	—	$\leq 0,5$	—	$\leq 2,00$	$\leq 0,20$	—	—
8. Ulje komine maslina	–	$\leq 1,0$	≤ 15	> 350	$\leq 1,2$	—	$\leq 0,5$	—	$\leq 1,70$	$\leq 0,18$	—	—

Sastav masnih kiselina (1)							Sastav sterola				Ukupni steroli (mg/kg)	
Kate- gorija	Miris- tinska (%)	Lino- lenska (%)	Ara- min-ska (%)	Gado- Leinska (%)	Behe- nska (%)	Ligno- cerinska (%)	Suma transole- inskih izomera (%)	Kole- sterol (%)	Brasi- kasterol (%)	Kampe- sterol (%)	Stig- maste- rol (%)	Delta- 7- stig- master (%)
1. Ekstra djevi- čansko masli- novo ulje	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≤ 0,5
2. Djevi- čansko masli- novo ulje	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	> 93,0	≤ 0,5
3. Masli- novo ulje lampa- nte	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≤ 0,5

(1) Suma izomera koji se mogu (ali ne moraju) odijeliti kapilarnom kolonom.

(2) Ili ako je medijan manja $M_m \leq 3,5$, a medijan voćnog = 0.

(3) Ulja s udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se maslinovim uljima lampante ako je ukupni udio alifatskih alkohola ≤ 350 mg/kg ili ako je udio eritrodiola i uvaola $\leq 3,5\%$.

(4) Ulja s udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se sirovim uljima komine maslinne ako je ukupni udio alifatskih alkohola > 350 mg/kg i ako je udio eritrodiola i uvaola $> 3,5\%$.

(5) HPLC ECN42 = metoda određivanja triacilglicerola.

(6) $K270, K232$, delta K = ekstinkcijski koeficijent.

4. Rafini- rano masli- novo ulje	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,20$	$\leq 0,30$	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	$< \text{kamp.}$	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	
5. Masi- novo ulje sastav- ljeno od rafi- niranog masli- novog ulja i djevičans kih masli- novih ulja	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,20$	$\leq 0,30$	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	$< \text{kamp.}$	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$	
6. Sirovo ulje komine maslina	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,3$	$\leq 0,2$	$\leq 0,20$	$\leq 0,10$	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	$-$	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 2\ 500$	$\leq 4,5$
7. Rafini- rano ulje komine maslina	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,3$	$\leq 0,2$	$\leq 0,40$	$\leq 0,35$	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	$< \text{kamp.}$	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 800$	$> 4,5$
8. Ulje komine maslina	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,3$	$\leq 0,2$	$\leq 0,40$	$\leq 0,35$	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	$< \text{kamp.}$	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 600$	$> 4,5$

(1) Druge prisutne masne kiseline (%): palmitinska: 7,5 do 20,0; palmitoleinska: 0,3 do 3,5; heptadekanska: $\leq 0,3$; heptadecenska: $\leq 0,3$; stearinska: 0,5 do 5,0; oleinska: 55,0 do 83,0; linolna: 3,5 do 21,0.

(2) Suma: delta-5,23-stigmastadienola + klerosterola + beta-sitosterola + sitostanola + sitosterola + delta-5-avenasterola + delta-5,24-stigmastadienola.

(3) Ulja s udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se maslinovim uljima lampante ako je ukupni udio alifatskih alkohola $\leq 350 \text{ mg/kg}$ ili ako je udio eritrodiola i uvaola $\leq 3,5\%$.

(4) Ulja s udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se sirovim uljima komine maslina ako je ukupni udio alifatskih alkohola $> 350 \text{ mg/kg}$ i ako je udio eritrodiola i uvaola $> 3,5\%$.

Napomene:

- (a) Rezultati analiza moraju biti izraženi onim brojem decimalnih mjestra kojim je izražena granična vrijednost za pojedino svojstvo. Zadnja znamenka mora se uvećati za jednu jedinicu ako je znamenka koja slijedi veća od 4.
- (b) Ako najmanje jedno od svojstava ne odgovara navedenim vrijednostima, ulje se može ili svrstati u drugu kategoriju ili svrstati u ulje smanjene kakvoće za svrhe ovoga Pravilnika.
- (c) Svojstva označena jednom zvjezdicom (*), a odnose se na kakvoči ulja, podrazumijevaju slijedeće:
- u slučaju djevičanskih maslinovih ulja, ako vrijednost najmanje jednog od označenih svojstava ne udovoljava graničnoj vrijednosti, ulje se svrstava u drugu odgovarajuću kategoriju unutar djevičanskih maslinovih ulja.
 - u slučaju maslinovog ulja lampante, dovoljno je da barem jedno od označenih svojstava odgovara propisanim vrijednostima.
- (d) Ako je svojstvo označeno dvjema zvjezdicama (**), znači da za sve tipove ulja komine maslina nije nužno da sva označena svojstva istovremeno udovoljavaju propisanim vrijednostima.

ANEKS I.A.

**UZORKOVANJE ULJA OD PLODA ILI KOMINE
MASLINA KOJE SE ISPORUČUJE U OBLIKU
POJEDINAČNIH AMBALAŽA ČIJI VOLUMEN NE
PRELAZI 100 l**

Ova se metoda uzorkovanja primjenjuje na isporuke ulja od ploda ili komine maslina koje ne prelaze 125.000 litara, a u pojedinačnim ambalažama koje ne prelaze 100 litara.

Ukoliko isporuka prelazi 125.000 litara, treba se podijeliti u serije od 125.000 litara ili manje. Ukoliko je isporuka manja od 125.000 litara, smatra se jednom serijom. Metoda se tada primjenjuje na svaku seriju.

Najmanji broj primarnih uzoraka koje treba uzeti određen je veličinom serije u skladu s tablicom iz točke 1.

Veličina primarnog uzorka određuje se na temelju volumena pojedinačne ambalaže, u skladu s tablicom iz točke 2.1.

Definicije pojmove "isporuka", "primarni uzorak" i "laboratorijski uzorak" navedene su u normi BAS ISO 5555.

"Serija" označava skup prodajnih jedinica koje su proizvedene i zapakirane u takvim uvjetima da se ulje sadržano u svim tim prodajnim jedinicama smatra homogenim u pogledu svih analitičkih svojstava.

1. BROJ PRIMARNIH UZORAKA KOJI TREBA UZETI

Najmanji broj primarnih uzoraka koji treba uzeti određuje se prema veličini serije, u skladu sa sljedećom tablicom:

Veličina serije (u litrama) manja od	Najmanji broj primarnih uzoraka
7 500	2
25 000	3
75 000	4
125000	5

Pojedinačne ambalaže odabrane za primarni uzorak moraju biti susjedne ambalaže u seriji.

U slučaju sumnje, treba povećati broj uzetih primarnih uzoraka.

2. SADRŽAJ PRIMARNIH UZORAKA

2.1. Primarni uzorci moraju sadržavati:

Ako pojedinačna ambalaža ima volumen od:	Primarni uzorak treba sadržavati ulje iz:
(a) 5 litara ili više	(a) 3 pojedinačne uzastopne ambalaže
(b) 3 litre ili više, ali manje od 5 litara	(b) 3 pojedinačne uzastopne ambalaže
(c) 2 litre ili više, ali manje od 3 litre	(c) 3 pojedinačne uzastopne ambalaže
(d) 1 litre ili više, ali manje od 2 litre	(d) 6 pojedinačnih uzastopnih ambalaže
(e) 0,75 litara ili više, ali manje od 1 litre	(e) 6 pojedinačnih uzastopnih ambalaže
(f) manje od 0,75 litara	(f) Trostruka količina ulja iz najmanjeg broja ambalaža, ukupnog volumena većeg od 1,5 litara

2.2. Primarni uzorci moraju se čuvati u pojedinačnim ambalažama do trenutka analize. Ulje u primarnim uzorcima tada treba, po potrebi, podijeliti u tri laboratorijska uzorka kako bi se obavile:

2.2. Primarni uzorci moraju se čuvati u pojedinačnim ambalažama do trenutka analize. Ulje u primarnim uzorcima tada treba, po potrebi, podijeliti u tri laboratorijska uzorka kako bi se obavile:

- (a) analize iz aneksa II., III., VIII. i IX. ovoga pravilnika,
- (b) analiza iz Anekса XI. ovog pravilnika,
- (c) druge analize.

2.3. Pretpakovine koje tvore primarni uzorak treba podijeliti u skladu s postupcima kontrole propisanim nacionalnim zakonodavstvom.

3. ANALIZE I REZULTATI

- (a) Svaki od primarnih uzoraka iz točke 1. treba podijeliti u laboratorijske uzorke, u skladu s točkom 2.5. norme BAS EN ISO 5555, i analizirati kako slijedi:
 - odrediti slobodne masne kiseline, prema članku 3. stavku (1) točki a) ovoga pravilnika,
 - odrediti peroksidni broj, prema članku 3. stavku (1) točki b) ovoga pravilnika,
 - obaviti spektrofotometrijsku analizu, prema članku 3. stavku (1) točki g) ovoga pravilnika,
 - odrediti sastav masnih kiselina, prema članku 3. stavku (1) točki h) ovoga pravilnika.
- (b) Ako jedan od rezultata analiza iz stavka (a) tablice za barem jedan od primarnih uzoraka iz iste serije ne odgovara svojstvima označene kategorije ulja, cijela se ta serija smatra neodgovarajućom.
Ako rezultati analiza iz stavka (a) tablice za svaki od primarnih uzoraka uzetih iz iste serije nisu jednak, uvezvi u obzir ponovljivost metoda o kojima je riječ, cijela se serija smatra nehomogenom i svaki se primarni uzorak podvrgava drugim propisanim analizama. U suprotnome, druge propisane analize provode se samo na jednom primarnom uzorku.
- (c) Ako jedan od rezultata analiza iz drugog odlomka točke (b) ne odgovara svojstvima označene kategorije ulja, cijela se ta serija smatra neodgovarajućom.
Ako svi rezultati analiza iz drugog odlomka točke (b) odgovaraju svojstvima označene kategorije ulja, cijela se ta serija smatra odgovarajućom

ANEKS I.B.

**STABLO ODLUKE ZA UTVRDJIVANJE ODGOVARA LI
UZORAK MASLINOVOG ULJA OZNAČENOJ
KATEGORIJI**

Analize kojima se utvrđuje odgovara li ulje od ploda ili komine maslina označenoj kategoriji mogu se obavljati provodeći analize predviđene za svrhe utvrđivanja sukladnosti sa svojstvima iz Aneksa I. ovoga pravilnika:

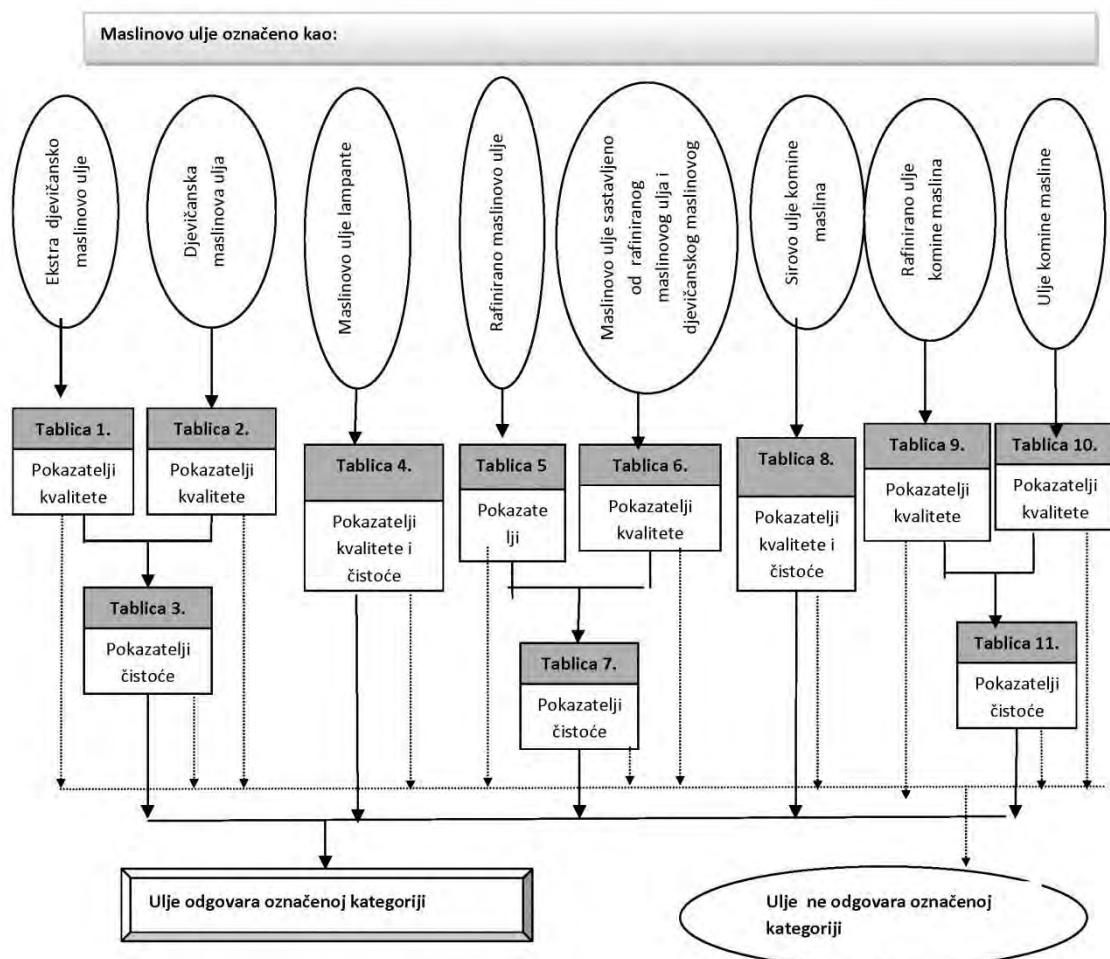
- (a) ili bilo kojim redoslijedom
- (b) ili redoslijedom prikazanim u stablu odluke, dok se ne dođe do jedne od odluka navedenih u stablu.

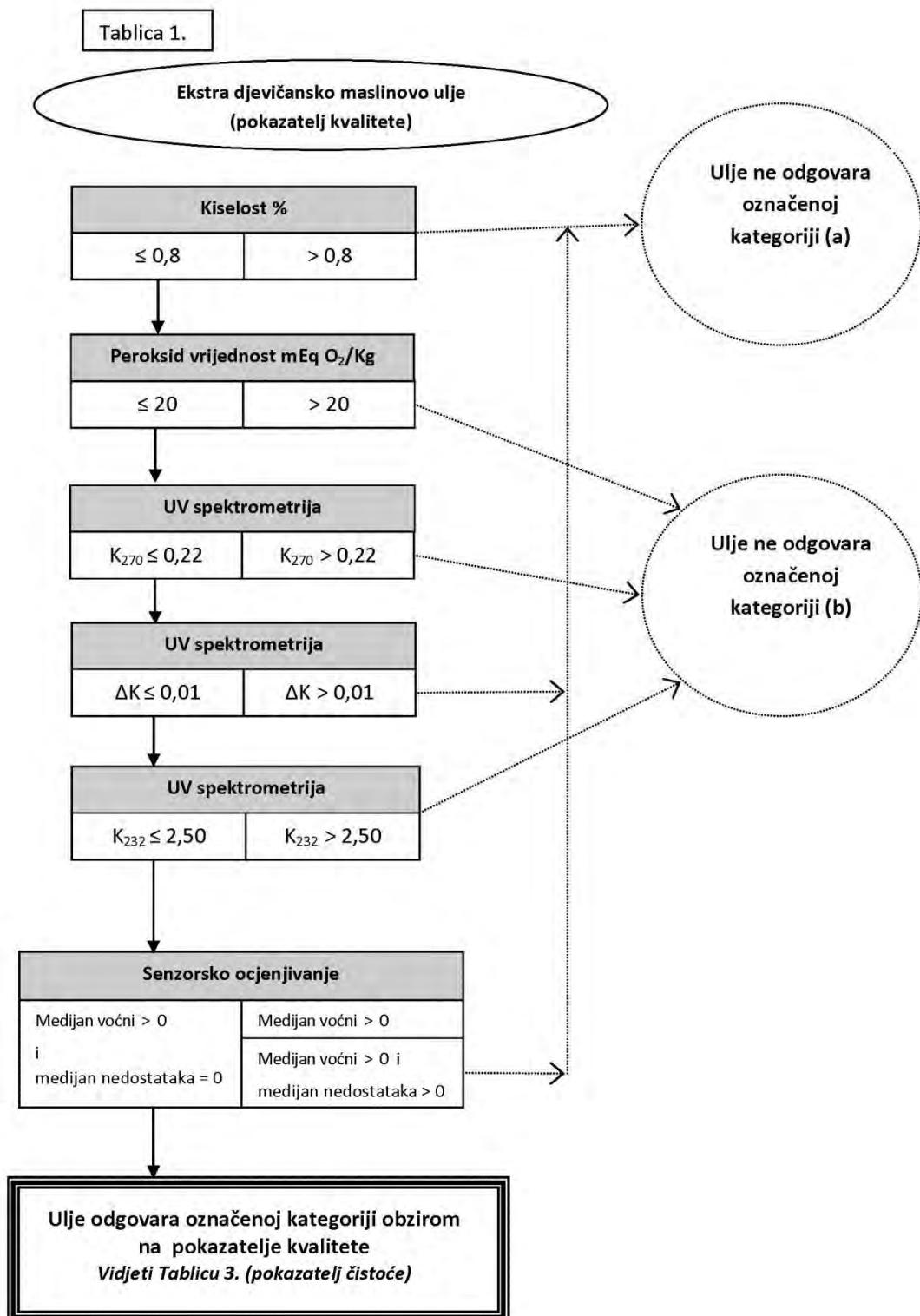
Analize kontaminanata potrebne za utvrđivanje sukladnosti s važećim propisima provode se neovisno o utvrđivanju sukladnosti sa svojstvima iz Aneksa I. ovoga pravilnika.

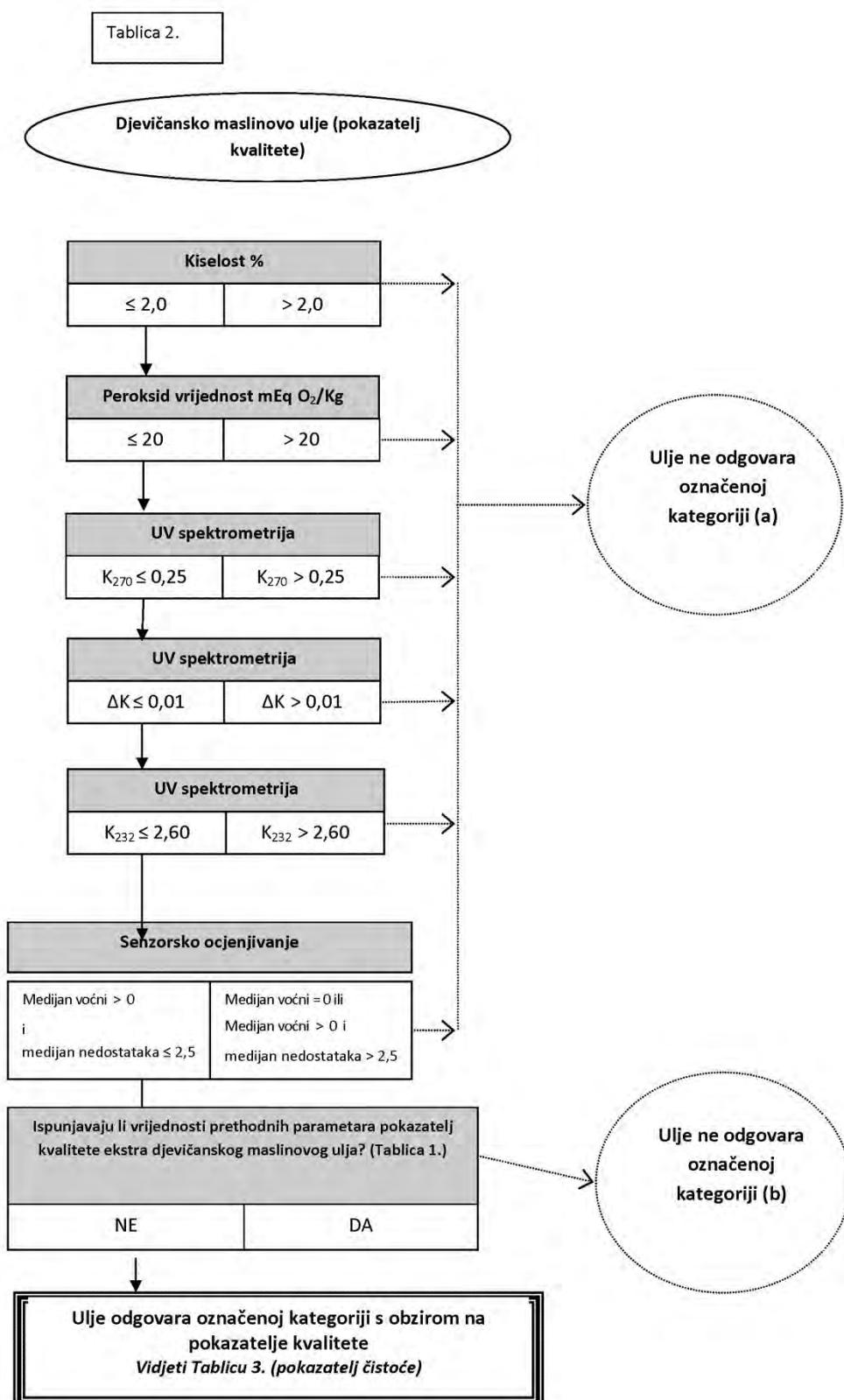
Stablu odluke primjenjuje se na sve kategorije ulja od ploda i komine maslina. Sastoji se od tablica označenih brojevima od 1 do 11, kojima se pristupa na temelju označene kategorije ulja koje se analizira, redoslijedom navedenim u općoj tablici.

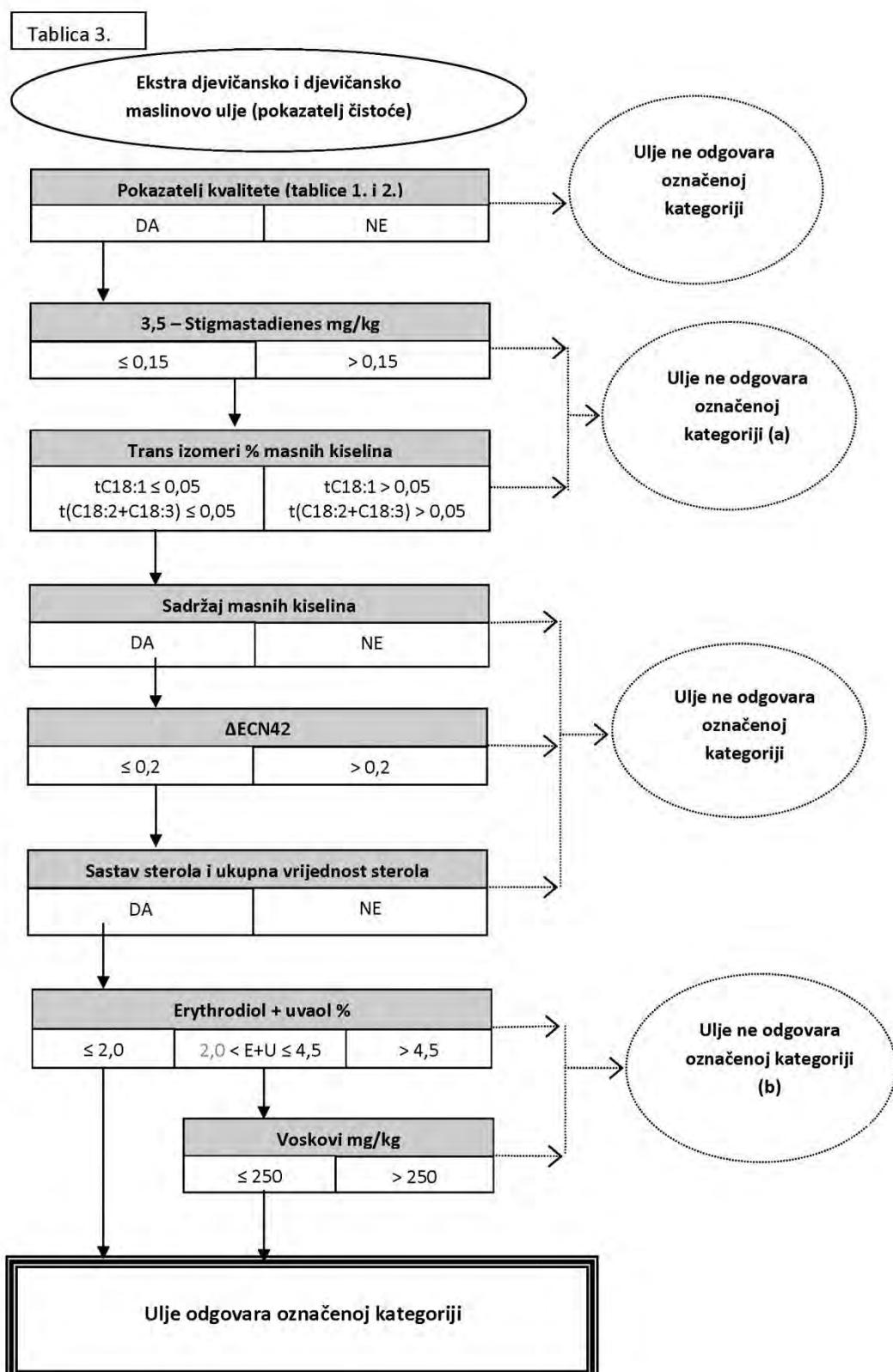
- Objasnjenje oznaka korištenih u tablicama:
- dvostruka crta (=) označuje smjer koji treba slijediti u slučaju sukladnosti (pozitivan odgovor) s kriterijima iz prethodnog okvira. Točkasta crta (...) upućuje na alternativni smjer koji treba slijediti u slučaju nesukladnosti,
- naslovi u okvirima u tablicama od 1. do 11. odnose se na analize propisane ovim pravilnikom na temelju tablica ekvivalencije iz Dodatka I. ovog Aneksa,
- slova u zagradama, koja se pojavljuju u kružnim simbolima (negativne odluke) u tablicama od 1. do 11., upućuju na napomene iz Dodatka II. ovog Aneksa. Slova sama po sebi ne obvezuju na obavljanje analiza, niti označuju vjerodostojnost navedenih pretpostavki.

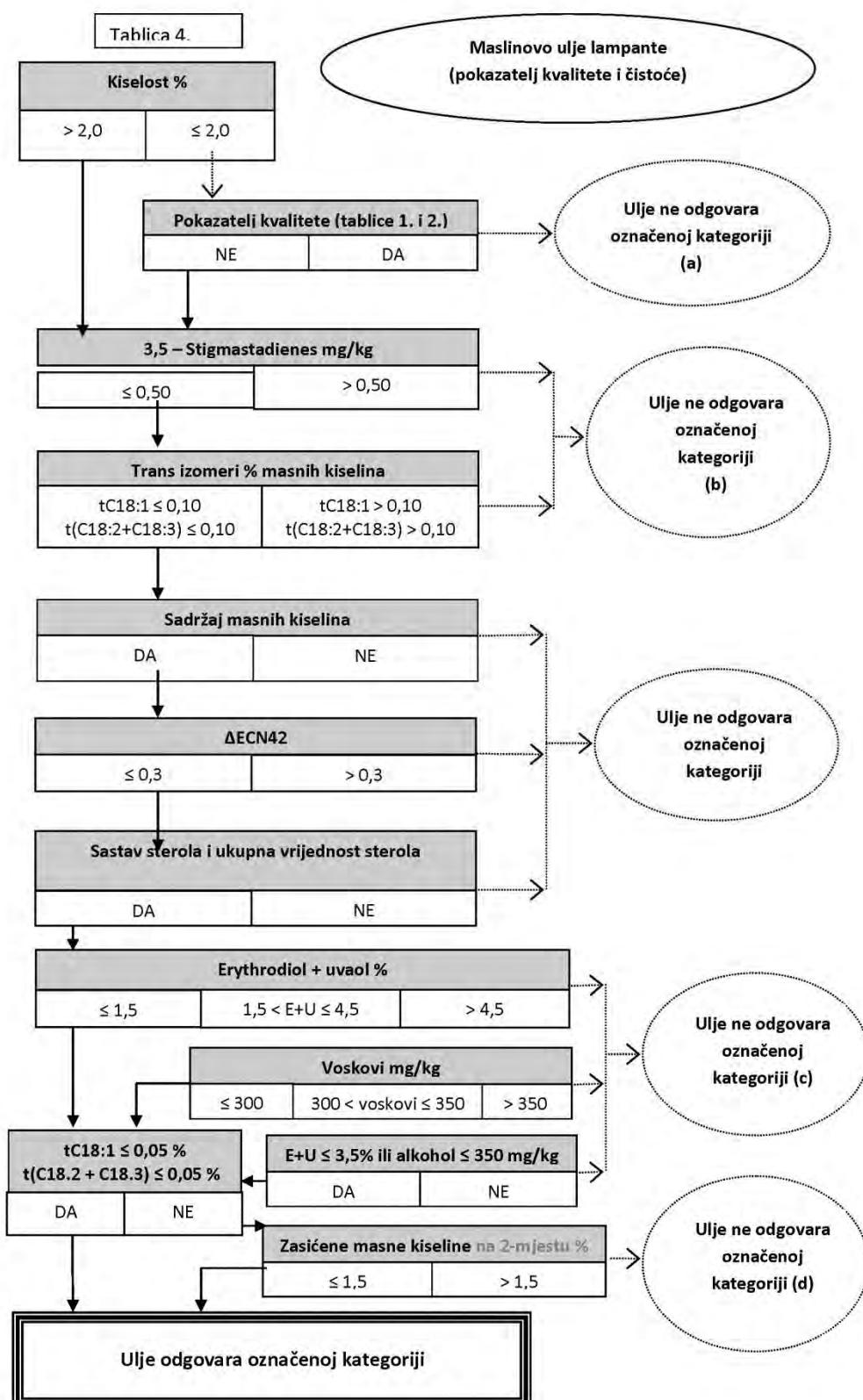
Opća tablica



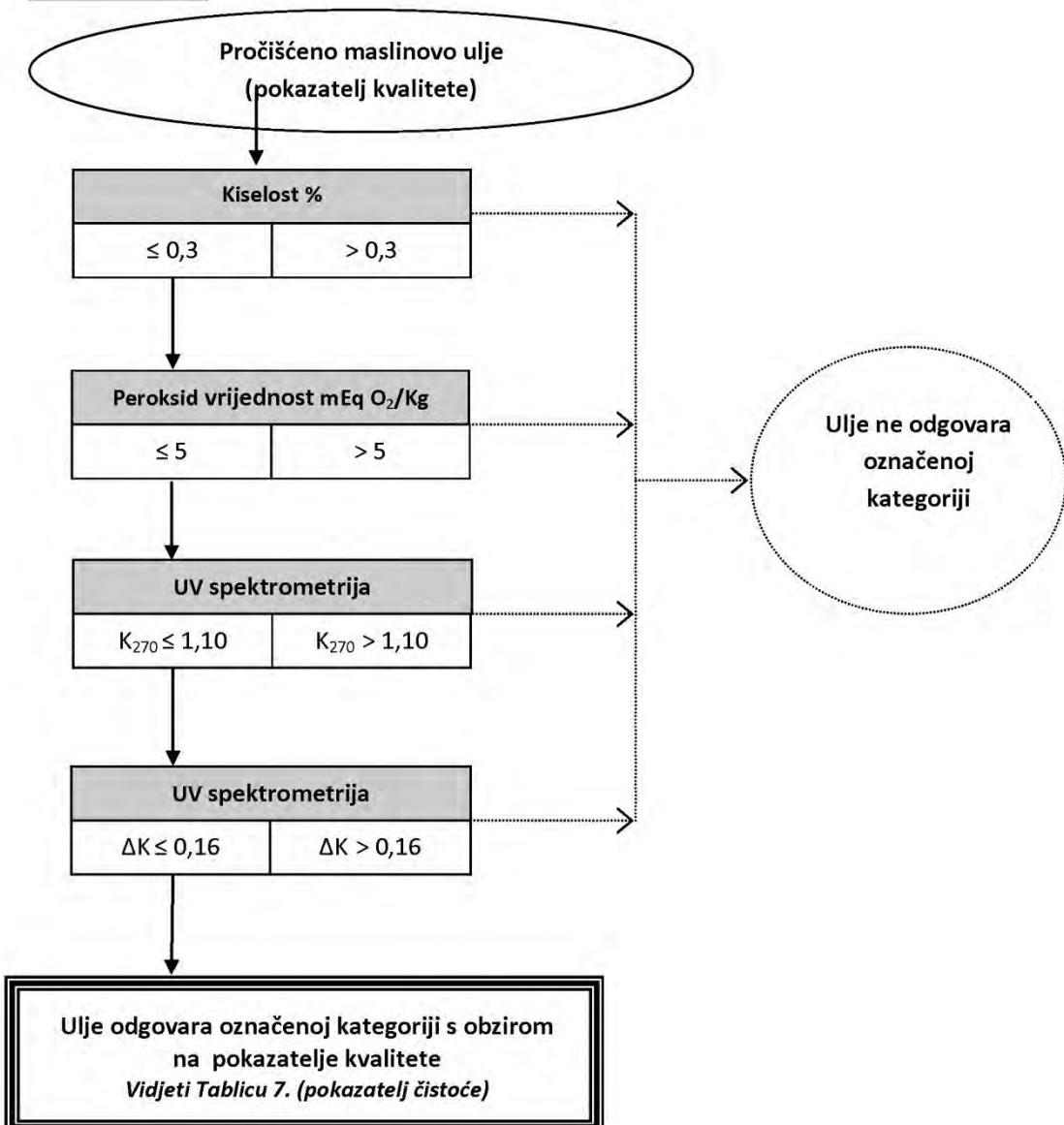




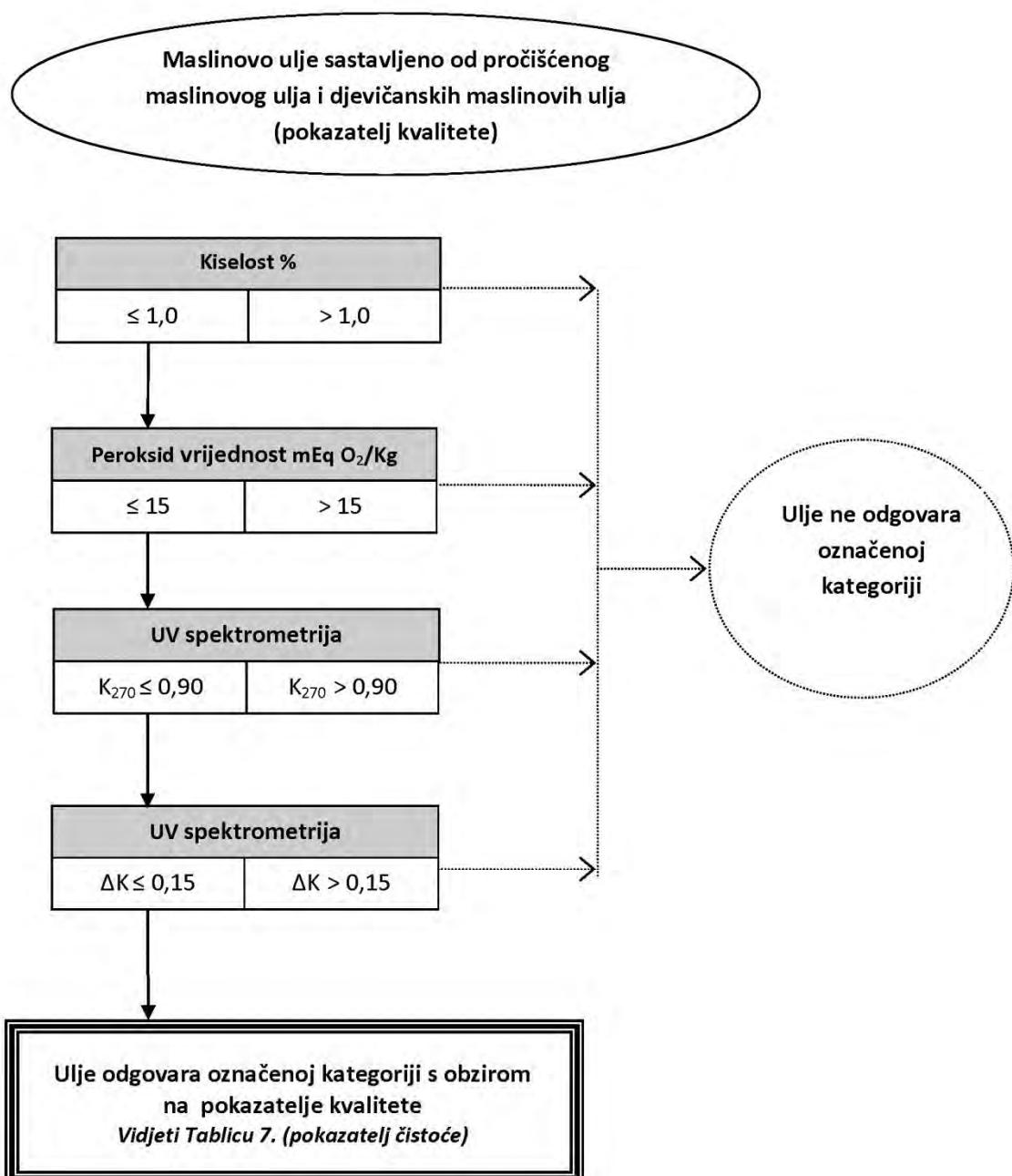


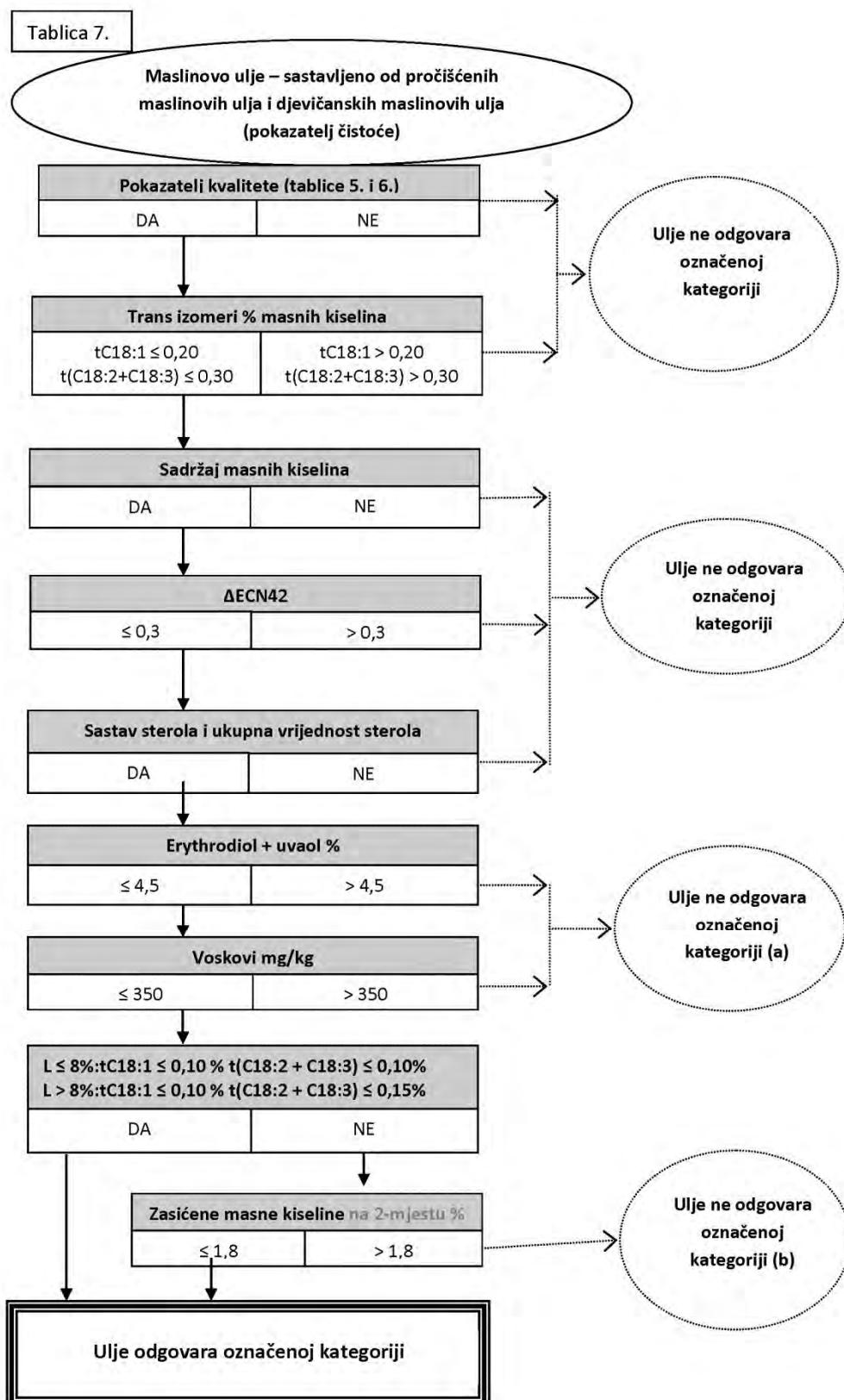


Tablica 5.

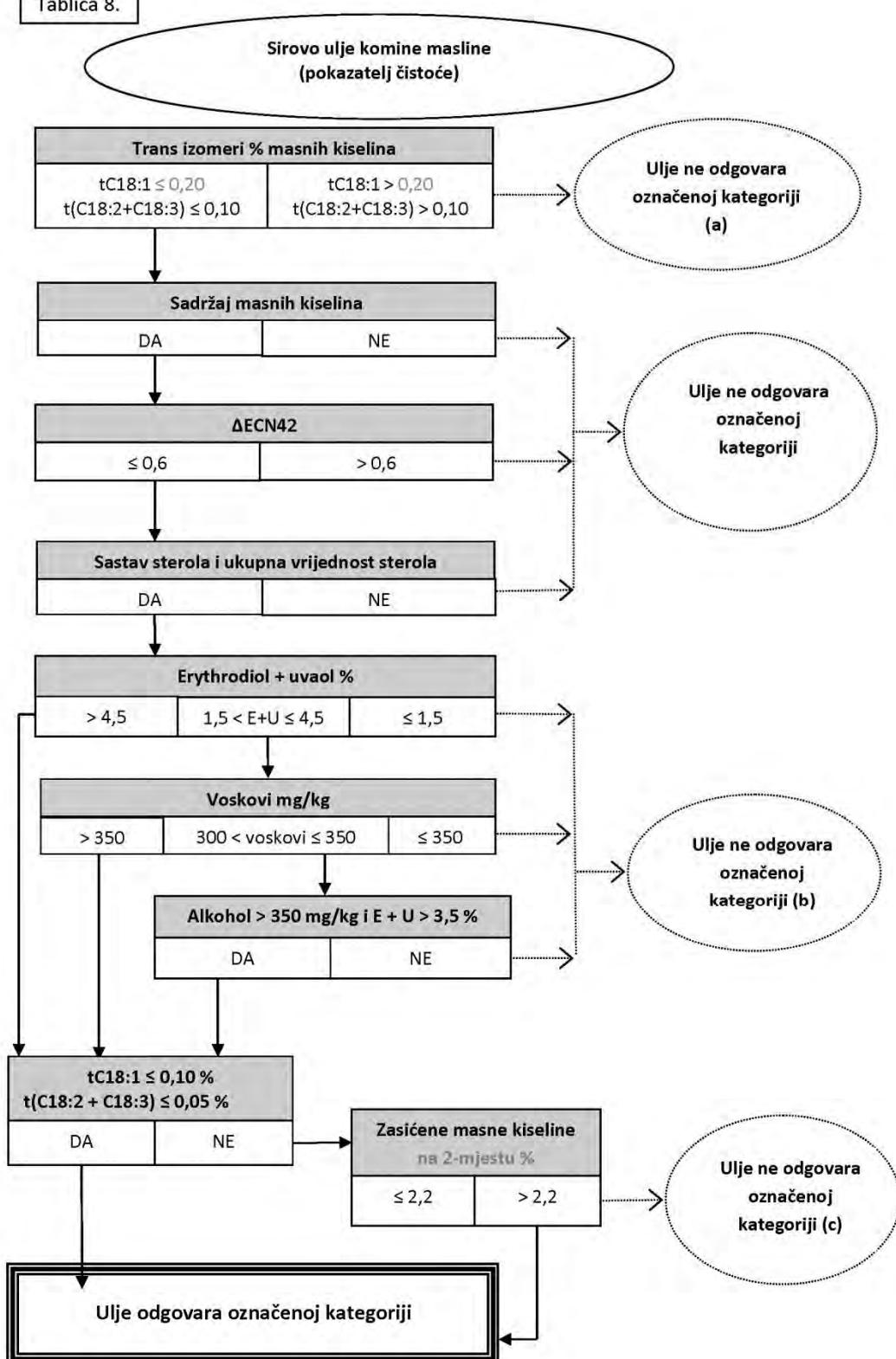


Tablica 6.

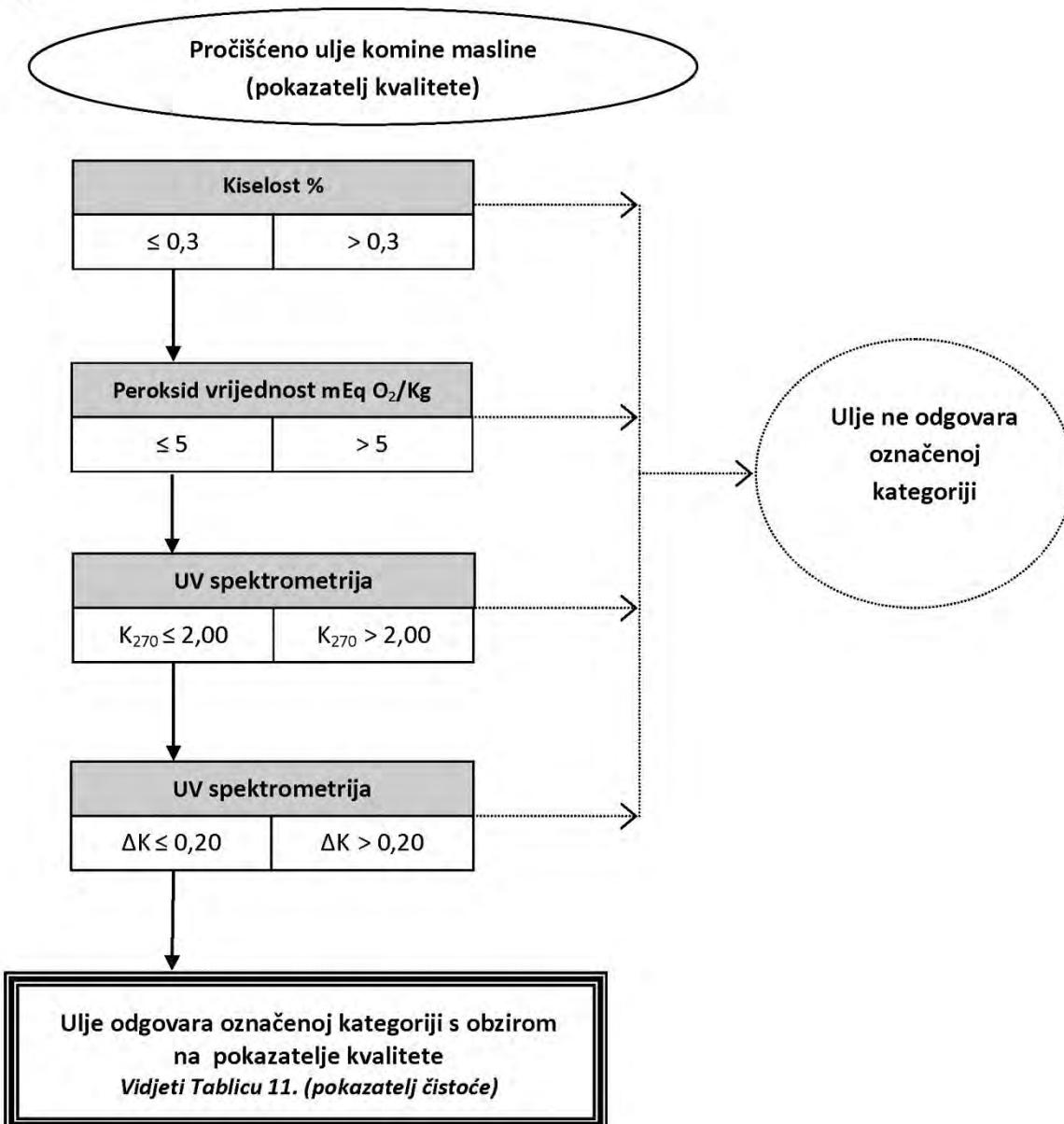




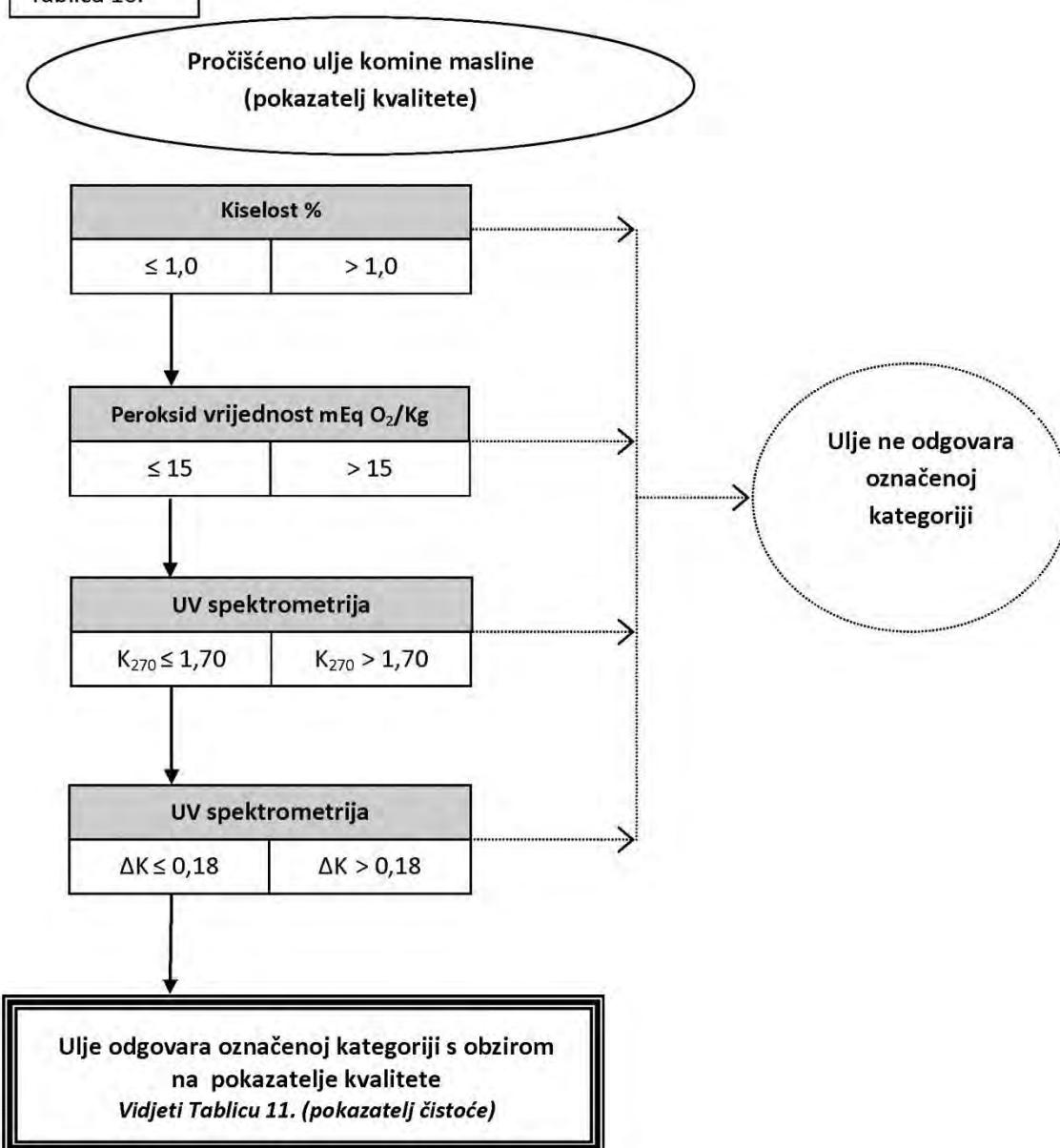
Tablica 8.



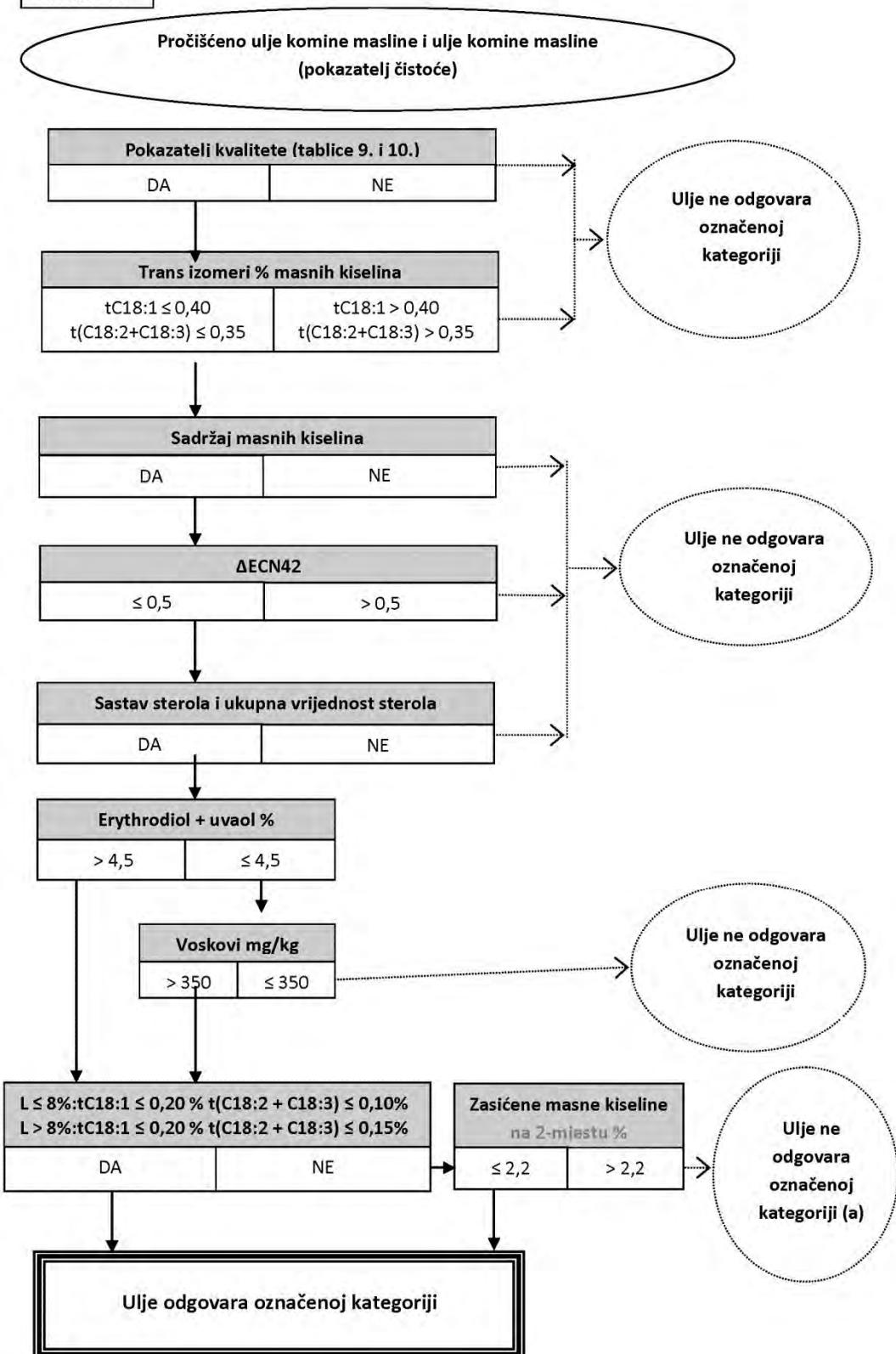
Tablica 9.



Tablica 10.



Tablica 11.



DODATAK 1.**TABLICA EKVIVALENCIJE IZMEĐU POJMOVA U STABLU ODLUKE I ANEKSA OVOGA PRAVILNIKA S NAZIVIMA ANALITIČKIH METODA**

Pojam iz stabla odluke	Oznaka ANEKSA	Naziv metode
- Kiselost	ANEKS II.	Određivanje slobodnih masnih kiselina, hladna metoda
- Peroksidni broj	ANEKS III.	Određivanje peroksidnog broja
- UV spektrometrija	ANEKS VIII.	Spektrofotometrijska analiza
- Senzorsko ocjenjivanje	ANEKS XI.	Senzorsko ocjenjivanje djevičanskog maslinovog ulja
- 3,5-stigmastadieni	ANEKS XII.	Metoda određivanja stigmastadiena u bilnjim uljima
- Trans izomeri masnih kiselina	ANEKS IXa ANEKS IXb	Određivanje metil-estera masnih kiselina plinskom kromatografijom Priprema metil-estera masnih kiselina
- Sastav masnih kiselina	ANEKS IX.a. ANEKS IX.b.	Određivanje metil-estera masnih kiselina plinskom kromatografijom Priprema metil-estera masnih kiselina
- ΔECN42	ANEKS XIII.	Određivanje sastava triglicerida s ECN42 (razlika između rezultata dobivenih HPLC-om i teoretske količine)
- Sastav sterola i ukupni steroli	ANEKS V.	Određivanje sastava i udjela sterola plinskom kromatografijom
- Eritrodiol i uvaol	ANEKS VI.	Određivanje eritrodiola i uvaola
- Voskovi	ANEKS IV.	Određivanje udjela voskova kapilarnom plinskom kromatografijom
- Alifatski alkoholi	ANEKS XIV.	Određivanje udjela alifatskih alkohola kapilarnom plinskom kromatografijom
- 2-gliceril monopalmitat (%)	ANEKS VII.	Određivanje udjela 2-gliceril monopalmitata
-udjela voskova, metil-estara masnih kiselina i etil-estara masnih kiselina,	ANEKS XV.	Određivanje udjela voskova, metil-estara masnih kiselina i etil-estara masnih kiselina kapilarnom plinskom kromatografijom, metoda opisana u Aneksu XV. ovoga Pravilnika

DODATAK 2.

Tablica 1.

- (a) Vidjeti djevičansko maslinovo ulje ili maslinovo ulje lampante (pokazatelji kvalitete Tablica 2. ili pokazatelji kvalitete i čistoće Tablica 4.)
- (b) Vidjeti maslinovo ulje lampante (pokazatelji kvalitete i čistoće Tablica 4.).

Tablica 2.

- (a) Vidjeti maslinovo ulje lampante (pokazatelji kvalitete i čistoće Tablica 4.)
- (b) Vidjeti ekstra djevičansko maslinovo ulje (pokazatelji kvalitete Tablica 1.)

Tablica 3.

- (a) Prisutnost rafiniranih ulja (maslinovog ili drugih)
- (b) Prisutnost ulja komine masline

Tablica 4.

- (a) Vidjeti ekstra djevičansko maslinovo ulje i djevičansko maslinovo ulje (pokazatelji kvalitete Tablica 1. i Tablica 2.)
- (b) Prisutnost rafiniranih ulja (maslinovog ili drugih)
- (c) Prisutnost ulja komine masline
- (d) Prisutnost esterificiranih ulja

Tablica 7.

- (a) Prisutnost ulja komine masline
- (b) Prisutnost esterificiranih ulja

Tablica 8.

- (a) Prisutnost rafiniranih ulja (maslinovog ili drugih)
- (b) Vidi maslinovo ulje lampante (pokazatelji kvalitete i čistoće Tablica 4.)
- (c) Prisutnost esterificiranih ulja

Tablica 11.

- (a) Prisutnost esterificiranih ulja

ANEKS II.**ODREĐIVANJE SLOBODNIH MASNIH KISELINA (KISELOSTI), HLADNA METODA****1. SVRHA**

Određivanje slobodnih masnih kiselina u maslinovim uljima. Udio slobodnih masnih kiselina dogovorno se izražava kao kiselost izračunata na konvencionalan način.

1.1. Princip

Uzorak se otopi u smjesi otapala, a prisutne slobodne masne kiseline titriraju se etanolnom otopinom kalijeva hidroksida.

1.2. Reagensi

Svi reagensi trebaju biti p.a. čistoće, a voda treba biti destilirana ili ekvivalentne čistoće.

1.2.1. Dietil-eter / 95%-tni etanol (v/v), smjesa u omjeru 1:1 (v/v).

Napomena: Dietil-eter je izuzetno zapaljiv i može tvoriti eksplozivne perokside pa pri njegovoj upotrebi treba biti posebno oprezan.

Smjesu treba neutralizirati neposredno prije upotrebe otopinom kalijevog hidroksida (1.2.2.), uz dodatak 0,3 ml otopine fenolftaleina (1.2.3.) na 100 ml smjese.

Napomena: U nedostatku dietil-etera može se koristiti smjesa otapala koja sadrži etanol i toluen. Ukoliko je potrebno, etanol se može zamijeniti 2-propanolom.

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

Točna koncentracija etanolne otopine kalijevog hidroksida mora biti poznata i provjerena neposredno prije upotrebe. Treba koristiti otopinu pripremljenu barem pet dana prije upotrebe i dekantranu u bocu od smedeg stakla s gumenim čepom. Otopina treba biti bezbojna ili bljedožute boje.

Napomena: Stabilna bezbojna otopina kalijevog hidroksida može se pripremiti na sljedeći način: zagrije se do vrenja 1000 ml etanola s 8 g kalijevog hidroksida i 0,5 g strugotina aluminija i nastavi s vrenjem uz povratno hladilo jedan sat. Odmah se destilira. U destilatu se otopi propisana količina kalijevog

hidroksida. Ostavi se nekoliko dana i dekantira bistri supernatant od taloga kalijevog karbonata.

Otopina se može pripremiti i bez destilacije na sljedeći način: u 1000 ml etanola doda se 4 ml aluminijevog butilata i smjesa se ostavi nekoliko dana. Dekantira se supernatant i otopi propisana količina kalijevog hidroksida. Otopina je spremna za upotrebu.

1.2.3. Fenolftalein, otopina koncentracije 10 g/l u 95-96%-tnom etanolu (v/v), ili (u slučaju intenzivno obojenih ulja) otopina alkalanog modrila koncentracije 20 g/l u 95-96%-tnom etanolu (v/v).

1.3. Aparatura

Uobičajena laboratorijska aparatura koja uključuje:

1.3.1. Analitičku vagu;

1.3.2. Erlenmeyerovu tikvicu od 250 ml;

1.3.3. Biretu od 10 ml, s podjelom na 0,05 ml.

1.4. Postupak

1.4.1. Priprema uzorka za analizu

(Za analizu se koristi filtrirani uzorak. Ukoliko voda i nečistoće zajedno čine manje od 1%, uzorak se može koristiti bez daljne obrade; ukoliko premašuju 1%, potrebno je filtriranje.)

1.4.2. Uzorak

Količina uzorka ovisi o očekivanoj kiselosti, prema sljedećoj tablici:

Očekivana kiselost	Masa uzorka (g)	Točnost 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 se odvaze u Erlenmeyerovu tikvicu (1.3.2.).

1.4.3. Određivanje

Uzorak (1.4.2.) se otopi u 50 do 150 ml prethodno neutralizirane smjese dietil-etera i etanola (1.2.1.).

Titrira se uz miješanje otopinom kalijevog hidroksida (1.2.2.) koncentracije 0,1 mol/l (vidjeti Napomenu 2) do promjene boje indikatora (ružičasta boja fenolftaleina zadržava se najmanje 10 sekundi).

Napomena 1. Standardizirana etanolna otopina kalijevog hidroksida (1.2.2.) može se zamijeniti vodenom otopinom kalijevog ili natrijevog hidroksida, pod uvjetom da volumen vode dodane prilikom titracije ne izazove razdvajanje faza.

Napomena 2. Ako potrebna količina 0,1 mol/l otopine kalijevog hidroksida premašuje 10 ml, upotrijebiti otopinu koncentracije 0,5 mol/l.

Napomena 3. Ako se otopina zamuti tijekom titracije, dodati dovoljno smjese otapala (1.2.1.) da se dobije bistra otopina.

1.5. Udio slobodnih masnih kiselina (kiselost), izražen kao postotak oleinske kiseline

Udio slobodnih masnih kiselina (kiselost), izražen kao maseni udio, jednak je:

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

pri čemu je:

V = volumen standardizirane otopine kalijevog hidroksida upotrijebjen pri titraciji, u ml;

c = točna koncentracija standardizirane otopine kalijevog hidroksida, u mol/l;

M = molarna masa, u g/mol, kiseline koja se koristi za izražavanje rezultata (oleinska = 282);

m = masa uzorka u g.

Rezultat predstavlja aritmetičku sredinu dva određivanja.

ANEKS III.

ODREĐIVANJE PEROKSIDNOG BROJA

1. SVRHA

U ovom se Aneksu opisuje metoda određivanja peroksidnog broja ulja i masti.

2. PODRUČJE PRIMJENE

Ova se metoda može primjeniti na ulja i masti životinjskog i biljnog podrijetla.

3. DEFINICIJA

Peroksidni broj je količina onih tvari u uzorku, izražena u milimolima aktivnog kisika po kilogramu, koje oksidiraju kalijev jodid u opisanim radnim uvjetima. Može se izraziti i u miliekvivalentima aktivnog kisika po kilogramu.

4. PRINCIP

Tretiranje uzorka, otopljenog u octenoj kiselini i kloroformu, otopinom kalijevog jodida. Titriracija oslobođenog joda standardnom otopinom natrijevog tiosulfata.

5. APARATURA

Sva upotrijebljena oprema mora biti bez prisutnih reducirajućih ili oksidirajućih tvari.

Napomena: Brušene površine ne smiju se mastiti.

5.1. Staklena kapsula od 3 ml

5.2. Tikvice od oko 250 ml, s brušenim grlom i čepom, osušene prije upotrebe i napunjene čistim, suhim inertnim plinom (dušikom ili još bolje ugljičnim dioksidom)

5.3. Bireta od 25 ili 50 ml, s podjelom na 0,1 ml.

6. REAGENSI

6.1. Kloroform, analitičke čistoće, iz kojeg je prethodno uklonjen kisik propuštanjem struje čistog, suhog inertnog plina

6.2. Ledena octena kiselina, analitičke čistoće, iz koje je prethodno uklonjen kisik propuštanjem struje čistog, suhog inertnog plina

6.3. Kalijev jodid, zasićena vodena otopina, svježe pripremljena, bez prisutnog joda i jodata

6.4. Natrijev tiosulfat, standardna vodena otopina koncentracije 0,01 mol/l ili 0,002 mol/l, precizno standardizirane vodene otopine, standardizirana neposredno prije upotrebe

6.5. Otopina škroba, koncentracije 10 g/l, svježe pripremljena od prirodног topljivog škroba.

7. UZORAK

Uzorak se uzima i skladišti zaštićeno od izvora svjetlosti i topline, u staklenim posudama napunjениm do vrha i hermetički zatvorenim čepovima od brušenog stakla ili pluta.

8. POSTUPAK

Ispitivanje se treba obavljati pod difuznim dnevnim ili umjetnim svjetлом. U staklenu kapsulu (5.1.) ili, u nedostatku kapsule, u tikvici (5.2.), odvaze se uz točnost od 0,001 g masa uzorka prema sljedećoj tablici, ovisno o očekivanom peroksidnom broju:

Očekivani peroksidni broj (mmol O ₂ /kg)	Masa uzorka (meq O ₂ /kg)	Masa uzorka (g)
0 do 6	0 do 12	5,0 do 2,0
6 do 10	12 do 20	2,0 do 1,2
10 do 15	20 do 30	1,2 do 0,8
15 do 25	30 do 50	0,8 do 0,5
25 do 45	50 do 90	0,5 do 0,3

Otčepi se tikvica (5.2.) i ubaci staklena kapsula koja sadrži uzorak. Doda se 10 ml kloroform (6.1.), brzo otopi uzorak miješanjem i doda 15 ml octene kiseline (6.2.), a zatim 1 ml otopine kalijevog jodida (6.3.). Tikvica se brzo začepi, trese jednu minutu i ostavi točno 5 minuta u tami pri temperaturi od 15-25 °C.

Doda se oko 75 ml destilirane vode. Oslobođeni jod titriра se otopinom natrijevog tiosulfata (6.4.) (koncentracija 0,002 mol/l za očekivane vrijednosti manje od 6 mmol O₂/kg ili 12 meq O₂/kg, odnosno koncentracija 0,01 mol/l za očekivane vrijednosti veće od 6 mmol O₂/kg ili 12 meq O₂/kg) uz snažno mučkanje, koristeći otopinu škroba (6.5.) kao indikator.

Za svaki uzorak provode se dva određivanja.

Istovremeno se provodi slijepa proba. Ukoliko volumen utrošen za titraciju slijepе probe premašuje 0,05 ml otopine natrijevog tiosulfata koncentracije 0,01 mol/l (6.4.), potrebno je zamijeniti nečiste reagense.

9. IZRAŽAVANJE REZULTATA

Peroksidni broj (PV), izražen u milimolima aktivnog kisika po kilogramu, dan je izrazom:

$$PV = \frac{V \times T \times 1000}{2 \times m}$$

Peroksidni broj, izražen u miliekivalentima aktivnog kisika po kilogramu, dan je izrazom:

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

pri čemu je:

V = volumen standardizirane otopine natrijevog tiosulfata u ml (6.4.), korigiran za vrijednost slijepе probe;

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

m = masa uzorka u g.

Rezultat predstavlja aritmetičku sredinu dva određivanja.

ANEKS IV.

ODREĐIVANJE UDJELA VOSKOVA KAPILARNOM PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda opisuje postupak određivanja udjela voskova u maslinovim uljima. Voskovi se razdvajaju prema broju ugljikovih atoma. Posebno se može koristiti za razlikovanje maslinovog ulja dobivenog prešanjem od ulja dobivenog ekstrakcijom (ulja komine maslina).

2. PRINCIPI

Mast ili ulje, kojima je dodan odgovarajući interni standard, frakcionira se pomoću kromatografske kolone punjene hidratiziranim silikagelom. Frakcija koja je prva eluirana u uvjetima propisanim ovom metodom (polarnost niža od polarnosti triglicerida), potom se analizira kapilarnom plinskom kromatografijom.

3. APARATURA

3.1. Erlenmeyerova tikvica od 25 ml

3.2. Staklena kolona za plinsku kromatografiju, unutarnjeg promjera 15,0 mm i duljine 30-40 cm s pipcem

3.3. Plinski kromatograf s kapilarnom kolonom, opremljen sustavom za izravno injektiranje uzorka u kolonu, koji se sastoji od:

3.3.1. termostatske komore za kolone, opremljene regulatorom temperature

3.3.2. hladnog injektoru za izravno unošenje uzorka u kolonu

3.3.3. plameno-ionizacijskog detektora s pretvaračem – pojačalom

3.3.4. pisača-integratora koji se može povezati s pretvaračem-pojačalom (3.3.3.), s vremenom odziva manjim od 1 sekunde, s promjenjivom brzinom papira (također je moguće koristiti kompjutorizirane sustave koji omogućavaju dobivanje podataka o plinskoj kromatografiji putem osobnog računala)

3.3.5. kapilarne staklene ili silikatne kolone duljine od 8 do 12 mm, unutarnjeg promjera 0,25-0,32 mm, s tekućom fazom, s ravnomjernom debeljinom sloja od 0,10 do 0,30 µm (na tržištu postoje tekuće faze pogodne za upotrebu tipa SE-52 ili SE-54)

3.4. Mikrošprica od 10 µl za izravno unošenje uzorka u kolonu, s čvrsto fiksirano iglom

3.5. Elektrovibrator

3.6. Rotacijski vakuum-uparivač

3.7. Visokotemperaturna peć (mufolna peć)

3.8. Analitička vaga osjetljivosti od ± 0,1 mg

3.9. Uobičajeno laboratorijsko stakleno posude.

4. REAGENSI

4.1. Silikagel veličine zrna 60 – 200 µm

Staviti gel u peć na 500 °C najmanje četiri sata. Nakon hlađenja dodati 2% vode na količinu silikagela. Dobro protresti kako bi se suspenzija homogenizirala. Držati na tamnom mjestu najmanje 12 sati prije upotrebe.

4.2. n-heksan, za kromatografiju

4.3. etil-eter, za kromatografiju

4.4. n-heptan, za kromatografiju

4.5. standardna otopina lauril arahidata, 0,1% (m/v) u heksanu (interni standard) (Moguće je koristiti palmitil palmitat ili miristil stearat.)

4.5.1. sudan 1 (1-fenil-azo-2-naftol)

4.6. plin nositelj: vodik ili helij, čistoće za plinsku kromatografiju

4.7. pomoćni plinovi:

– čisti vodik, za plinsku kromatografiju,

– čisti zrak, za plinsku kromatografiju.

5. POSTUPAK

5.1. Priprema kromatografske kolone

Otopiti 15 g silikagela (4.1.) u n-heksanu (4.2.) i unijeti u kolonu (3.2.). Ostaviti da se istaloži. Dovršiti taloženje pomoću elektrovibratora (3.5) da se dobije ujednačeniji kromatografski sloj. Propustiti 30 ml n-heksana da se uklone sve nečistoće. Na vagi (3.8.) odvagati točno 500 mg uzorka u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 25 ml (3.1.), dodati odgovarajući udio internog standarda (4.5.) prema pretpostavljenom udjelu voska. Naprimjer, za maslinovo ulje dodati 0,1 mg lauril arahidata, a za ulje od komine masline od 0,25 do 0,5 mg. Pripravljeni uzorak prenijeti u kromatografsku kolonu pomoću dva puta po 2 ml n-heksana (4.2.).

Otapalo ispuštati dok ne dosegne 1 mm iznad gornje razine absorbenta, potom s dalnjih 70 ml n-heksana ispirati da se uklone prirodno prisutni n-alkani. Potom započeti kromatografsko eluiranje dok se ne sakupi 180 ml mješavine n-heksana/etyl-etera (omjer 99:1, v/v), pri brzini protoka od oko 15 kapi svakih 10 sekundi na sobnoj temperaturi, 22 ± 4 °C.

Napomena:

– Mješavina n-heksana/etyl-etera (99:1) mora se svakodnevno prirediti.

– Za vizualnu provjeru ispravnog eluiranja voskova, uzorku u otopini može se dodati 100 µl 1%-tne otopine sudana u mješavini n-heksana/etyl-etera

(omjer 99:1, v/v). S obzirom da bojilo ima retenciju između voskova i triglicerida, kada obojenje dosegne dno kolone, eluiranje treba obustaviti, jer su svii voskovi eluirali.

Tako dobivenu frakciju osušiti u rotacijskom vakuum-uparivaču (3.6.) dok se ne ukloni gotovo svo otapalo. Preostala 2 ml otapala treba odstraniti pomoću slabe struje dušika, a zatim dodati 2-4 ml n-heptana.

5.2. Analiza plinskom kromatografijom

5.2.1. Pripremni radovi

Postaviti kolonu na plinski kromatograf (3.3.) povezivajućem ulaznog otvora na sustav neposredno na koloni i izlaznog otvora na detektor. Obaviti provjeru plinskog kromatografa (protok plina, rad detektora i pisača itd.).

Ako se kolona koristi prvi put, potrebno ju je najprije kondicionirati. Pustiti da kroz kolonu prode malo plina, potom uključiti plinski kromatograf. Postupno zagrijavati tako da se za 4 sata postigne temperatura od 350 °C. Održavati temperaturu najmanje dva sata, a zatim uređaj podešiti na radne uvjete (postaviti protok plina, zapaliti plamen, povezati na električki pisač (3.3.4.), postaviti temperaturu komore za kolonu, regulirati detektor itd.) i zabilježiti signal pri osjetljivosti koja je najmanje dvostruka od one koju zahtijeva analiza. Bazna crta mora biti linearna, bez pikova ili odstupanja.

Negativno odstupanje ukazuje da kolona nije čvrsto spojena; pozitivno odstupanje da kolona nije dovoljno kondicionirana.

5.2.2. Izbor radnih uvjeta

Radni uvjeti općenito su sljedeći:

- temperatura kolone:

	20 °C/minuti	5 °C/minuti		20 °C/minuti	
Početno °C (1 min)	80 →	240 °C →		325 °C → (6 min)	340 °C (10 min)

- temperatura detektora: 350 °C;
- količina injektiranog uzorka: 1 µl otopine u n-heptan (2 – 4 ml);
- plin nositelj: helij ili vodik pri optimalnoj linearnoj brzini za odabran plin (vidjeti Dodatak);
- osjetljivost instrumenta: pogodno za sljedeće uvjete:

Uvjete je moguće promijeniti prema osobinama kolone i plinskog kromatografa kako bi se postiglo razdvajanje svih voskova i zadovoljavajuće razdvajanje pikova (vidi sliku); vrijeme zadržavanja internog standarda C₃₂ mora biti 18 ± 3 minute. Glavni pik koji pripada voskovima mora dosezati najmanje 60% pune ljestvice.

Integracijski parametri pikova moraju biti utvrđeni tako da se dobije ispravna ocjena površina pikova.

NAPOMENA: Zbog visoke konačne temperature, dozvoljeno je pozitivno odstupanje od najviše 10% pune ljestvice.

5.3. Provodenje analize

Mikrošpricom od 10 µl uzeti 1µl otopine; povući klip šprice tako da igla bude prazna. Staviti iglu u injektor i nakon 1-2 sekundi brzo ubrizgati; nakon pet sekundi polagano izvući iglu. Registrirati kromatogram dok voskovi potpuno ne eluiraju. Bazna crta mora stalno ispunjavati tražene uvjete.

5.4. Identifikacija pikova

Identifikacija pojedinačnih pikova mora se temeljiti na vremenu zadržavanja, usporedbom s vremenima zadržavanja poznatih mješavina voskova analiziranih pod jednakim uvjetima.

Na slici je kromatogram voskova djevičanskog maslinovog ulja.

5.5. Određivanje udjela

Pomoću integratora izračunati površine pikova internog standarda i alifatskih estera C₄₀ do C₄₆.

Izračunati udio svakog alifatskog estera u mg/kg ulja korištenjem izraza:

$$\text{Ester(mg/kg)} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

pri čemu je:

A_x = površina pika pojedinog estera u kvadratnim milimetrima;

A_s = površina pika internog standarda u kvadratnim milimetrima;

m_s = masa dodanog internog standarda, u miligramima;

m = masa uzorka za analizu, u gramima.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

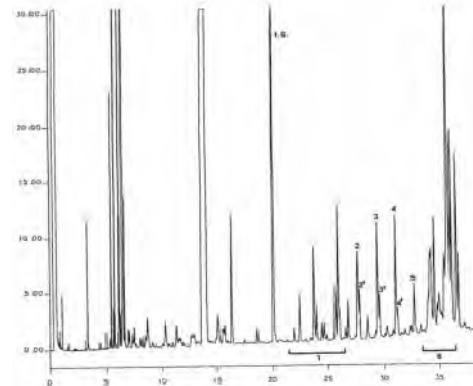
Ukupan udio različitih voskova, tj. alifatskih estera C₄₀ do C₄₆, izražava se u mg/kg (ppm).

NAPOMENA: Komponente koje treba kvantificirati odnose se na pikove s parnim brojevima ugljika između alifatskih estera C₄₀ i C₄₆; za primjer može se koristiti kromatogram voskova maslinovog ulja prikazan na donjoj slici. Ukoliko se C₄₆ ester pojavi dva puta, preporuča se da se za njegovu identifikaciju analizira frakcija voskova ulja komine masline, pri čemu je pik C₄₆ jednostavno identificirati jer je očigledno najveći.

Rezultati trebaju biti izraženi na jednu decimalu.

Slika

Kromatogram voskova maslinovog ulja⁽¹⁾



Legenda:

I.S. = lauril arahidat

1. = diterpenski estser

2 + 2' = esteri C₄₀

3 + 3' = esteri C₄₂

4 + 4' = esteri C₄₄

5. = esteri C₄₆

6. = sterolni esteri i triterpenski alkohol

⁽¹⁾ Nakon eluiranja sterolnih estera kromatogram ne smije pokazivati signifikantne pikove (triglyceridi).

DODATAK ODREDIVANJE LINEARNE BRZINE PLINA

U plinski kromatograf podešen na normalne radne uvjete injektira se 1 do 3 µl metana (ili propana). Mjeri se vrijeme koje je potrebno plinu da prode kroz kolonu, od trenutka injektiranja do pojave pika (t_M).

Linearna brzina, u cm/s, dana je formulom L/t_M, pri čemu je L duljina kolone u cm, a t_M vrijeme izmjeren u sekundama.

ANEKS V.

**ODREĐIVANJE SASTAVA I UDJELA STEROLA
KAPILARNOM PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM**

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda opisuje postupak određivanja udjela pojedinačnih i ukupnih sterola u mastima.

2. PRINCIP METODE

Mast kojoj je dodan α -kolestanol kao interni standard saponificira se otopinom kalijevog hidroksida u etanolu, a neosapunjive tvari zatim se ekstrahiraju dietil-eterom.

Iz neosapunjivog ekstrakta izdvaja se sterolna frakcija tankslojnom kromatografijom na silikagelu. Steroli, ekstrahirani iz silikagela, prevode se u trimetilsilil etere i analiziraju kapilarnom plinskom kromatografijom.

3. APARATURA

3.1. Tikvica od 250 ml s povratnim hladilom, s priključcima od brušenog stakla

3.2. Lijevci za odjeljivanje od 500 ml

3.3. Tikvice od 250 ml

3.4. Kompletна oprema za analizu tankslojnom kromatografijom sa staklenim pločama dimenzija 20×20 cm

3.5. Ultraljubičasta svjetiljka s valnim duljinama od 366 ili 254 nm

3.6. Mikrošprica od 100 μl i 500 μl

3.7. Cilindrični lijevak za filtriranje s G3 porama filtra (poroznost 15-40 μm), promjera približno 2 cm i dubine približno 5 cm, s nastavkom prikladnim za vakuumsku filtraciju i priključkom 12/21 s vanjskim brušenim stakлом

3.8. Boca sisaljka od 50 ml, s priključkom 12/21 s unutarnjim brušenim stakлом, prikladna za priključak na lijevak za filtriranje (3.7.)

3.9. Epruveta od 10 ml s koničnim dnom i nepropusnim čepom

3.10. Plinski kromatograf s kapilarnom kolonom, sa sustavom za razdvajanje protoka (*splitting*), koji čine:

3.10.1. termostatirana peć za kolone, s mogućnošću održavanja željene temperature uz točnost $\pm 1^\circ\text{C}$

3.10.2. injektor s mogućnošću podešavanja temperature, s elementom za isparavanje od persilaniziranog stakla

3.10.3. plameno-ionizacijski detektor i pretvarač s pojačalom

3.10.4. pisač-integrator koji se može povezati s pretvaračem s pojačalom (3.10.3.), s vremenom odziva od najviše jedne sekunde i promjenjivom brzinom papira

3.11. Staklena ili silikatna kapilarna kolona duljine 20 do 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 do 0,32 mm, potpuno prekrivena SE-52, SE-54 ili drugom ekvivalentnom tekućom stacionarnom fazom, ravnomjerne debljine sloja između 0,10 i 0,30 μm

3.12. Mikrošprica za plinsku kromatografiju od 10 μl , s čvrsto fiksiranom iglom.

4. REAGENSI

4.1. Kalijev hidroksid, etanolna otopina koncentracije približno 2 mol/l. Uz hlađenje otopi se 130 g kalijevog hidroksida (minimalne čistoće 85%) u 200 ml destilirane vode te nadopuni etanolom do 1 litre. Otopina se čuva u dobro zatvorenim bocama od tamnog stakla

4.2. Dietil-eter, analitičke čistoće

4.3. Bezwodni natrijev sulfat, analitičke čistoće

4.4. Staklene ploče sa slojem silikagela, bez indikatora fluorescencije, debljine 0,25 mm (na tržištu su dostupne ploče spremne za upotrebu)

4.5. Kalijev hidroksid, etanolna otopina koncentracije 0,2 mol/l. Otopi se 13 g kalijevog hidroksida u 20 ml destilirane vode i nadopuni 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. Dietil-eter, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.)

4.10. Kloroform, analitičke čistoće (vidjeti 5.2.2.)

4.11. Referentna otopina za tankslojnu kromatografiju: kolesterol ili fitosteroli, 2%-tna otopina u kloroformu

4.12. 2,7-diklorfluorescein, 0,2%-na otopina u etanolu.

Doda se nekoliko kapi etanolne otopine kalijevog hidroksida koncentracije 2 mol/l, radi postizanja bazične reakcije

4.13. Bezwodni piridin, za kromatografiju

4.14. Heksametil disilazan

4.15. Trimetilklorosilan

4.16. Referentna otopina sterol trimetilsilil etera. Priprema se neposredno prije upotrebe od čistih sterola ili mješavina sterola dobivenih iz ulja koja ih sadrže

4.17. α -kolestanol, 0,2%-tna otopina (m/V) u kloroformu (interni standard)

4.18. Plin nositelj: vodik ili helij, plinsko-kromatografske čistoće

4.19. Pomočni plinovi:

– vodik, plinsko-kromatografske čistoće,

– zrak, plinsko-kromatografske čistoće.

5. POSTUPAK**5.1. Priprema neosapunjivog**

5.1.1. Pomoću mikrošprice od 500 μl u tikvicu od 250 ml prenese volumen 0,2%-tne otopine α -kolestanola u kloroformu (4.17), koji sadrži udio kolestanola koji odgovara približno 10% udjela sterola u alikvotu uzorka uzetog za određivanje. Naprimjer, na 5 g uzorka treba dodati 500 μl 0,2%-tne otopine α -kolestanola za maslinova ulja i 1 500 μl za ulja komine masline.

Standard se otpari u struji dušika do suha te se u istu tikvicu odvaze točno 5 g suhog i filtriranog uzorka.

Ulja koja sadrže znatne udjele kolesterola mogu davati pik čije je vrijeme zadržavanja istovjetno kolestanolu. U tom slučaju moraju se provesti dvije analize sterolne frakcije, s internim standardom i bez njega, ili se umjesto kolestanola mora koristiti betulinol.

5.1.2. Doda se 50 ml etanolne otopine kalijevog hidroksida koncentracije 2 mol/l, tikvica se spoji na povratno hladilo te se zagrijava u vodenoj kupelji do laganog vrenja uz stalno snažno miješanje, do pojave osapanjenja (otopina postaje bistra). Nakon toga nastavi se zagrijavati još 20 minuta, a zatim se doda 50 ml destilirane vode kroz hladilo, odvoji hladilo i tikvica, ohladi na približno 30°C .

5.1.3. Sadržaj tikvice kvantitativno se prenese u lijevak za odjeljivanje od 500 ml, ispirući tikvicu nekoliko puta s ukupno oko 50 ml destilirane vode. Doda se približno 80 ml dietil-etera, snažno trese približno 30 sekundi i ostavi stajati (vidjeti Napomenu 1).

Donji se vodeni sloj odijeli ispuštanjem u drugi lijevak za odjeljivanje. Vodena se faza na isti način ekstrahira još dva puta, svaki put s 60 do 70 ml dietil-etera.

Napomena 1: Ukoliko se stvori emulzija, može se ukloniti dodavanjem malih količina etanola ili metanola.

5.1.4. Eterski ekstrakti skupe se u jedan lijevak za odjeljivanje te se isperu destiliranim vodom (u obrocima od 50 ml) do neutralne reakcije vode za ispiranje.

Nakon uklanjanja vode za ispiranje osuši se dodatkom bezvodnog natrijevog sulfata i filtrira kroz bezwodni natrijev sulfat u prethodno izvaganu tikvicu od 250 ml, ispirući lijevak i filter malim količinama dietil-etera.

5.1.5. Eter se ukloni destilacijom do nekoliko ml, a zatim osuši u lagom vakuumu ili struji dušika, dovršavajući sušenje u

peći na 100 °C približno četvrt sata te izvaže nakon hlađenja u eksikatoru.

5.2. Odjeljivanje sterolne frakcije

5.2.1. Priprema bazičnih ploča. Cijele ploče sa silikagelom (4.4.) urone se u etanolnu otopinu kalijevog hidroksida koncentracije 0,2 mol/l (4.5.) u trajanju od 10 sekundi, zatim suše dva sata u digestoru i na kraju jedan sat u peć na 100 °C.

Izvade se iz peći i do upotrebe čuvaju u eksikatoru napunjeno kalcijevim kloridom (ploče obradene na ovaj način moraju se upotrijebiti u roku od 15 dana).

Napomena 2: Kada se bazične ploče sa silikagelom koriste za odvajanje sterolne frakcije, nema potrebe tretirati neosapunjivo aluminijevim oksidom. Na taj se način sve komponente koje daju kiselu reakciju (masne kiseline i drugo) zadržavaju na startnoj crti, a traka sterola jasno je odijeljena od trake alifatskih i triterpenskih alkohola.

5.2.2. U komoru za razvijanje ploča stavi se smjesa benzena i acetona u omjeru 95:5 (v/v), dubine oko 1 cm. Alternativno se može koristiti smjesa heksana i dietil-etera u omjeru 65:35 (v/v). Komora se zatvori odgovarajućim poklopcem i ostavi približno 30 minuta kako bi se uspostavila ravnoteža tekuće-plinovito. Na unutarnje stjenke komore mogu se staviti trake filter-papira umoćene u eluent. Time se skraćuje vrijeme razvijanja za približno jednu trećinu i omogućava ravnomjernije i pravilnije eluiranje komponenata.

Napomena 3: Smjesu za razvijanje treba mijenjati za svaku analizu, kako bi se postigli savršeno ponovljivi uvjeti eluiranja.

5.2.3. Pripremi se približno 5%-tna otopina neosapunjivog (5.1.5.) u kloroformu i, pomoću mikrošprice od 100 µl, nanese 300 µl na kromatografsku ploču (5.2.1), približno 2 cm od ruba ploče, u što tanjoj i ravnomjernoj liniji. Na istoj visini s ovom linijom nanese se 2-3 µl referentne otopine sterola (4.11.) na jednom kraju ploče, kako bi se po završetku razvijanja mogla identificirati traka sterola.

5.2.4. Ploča se postavi u komoru za razvijanje pripremljenu kako je opisano u 5.2.2. Temperaturu treba održavati između 15 i 20 °C. Komora se odmah zatvori poklopcom i ostavi da eluira dok fronta otapala ne dosegne približno 1 cm od gornjeg ruba ploče. Ploča se ukloni iz komore za razvijanje te se otapalo otpari u struju vrućeg zraka ili ostavljanjem ploče kratko vrijeme u digestoru.

5.2.5. Ploča se lagano i ravnomjerno poprska otopinom 2,7-diklorofluoresceina. Kada se ploča promatra pod ultraljubičastim svjetлом, može se identificirati traka sterola usporedbom s mrljom referentne otopine. Rubovi trake uzduž ruba fluorescencije označe se crnom olovkom.

5.2.6. Pomoću metalne lopatice sastruže se silikagel unutar označenog područja. Fino usitnjeni sastrugani materijal prebacici se u lijevak za filtriranje (3.7.). Doda se 10 ml vrućeg kloroform-a, pažljivo izmiješa metalnom lopaticom i filtrira pod vakuumom, skupljajući filtrat u Erlenmeyerovu tikvicu (3.8.) spojenu na lijevak za filtriranje.

Ostatak u lijevku se triput ispere dietil-eterom (svaki put s približno 10 ml), sakupljajući filtrat u istu tikvicu spojenu na lijevak. Filtrat se upari do volumena od 4 do 5 ml, ostatak otopine prenese u prethodno izvaganu epruvetu od 10 ml (3.9.), upari do suha laganim zagrijavanjem u laganoj struji dušika, doda nekoliko kapi acetona, ponovo upari do suha, stavi u peć na 105 °C približno 10 minuta, zatim ostavi da se ohladi u eksikatoru i izvaže.

Ostatak u epruveti sastoji se od sterolne frakcije.

5.3. Priprema trimetilsilil etera

5.3.1. U epruvetu koja sadrži sterolnu frakciju po svakom miligramu sterola doda se 50 µl reagensa za silaniziranje, koji predstavlja mješavinu piridina, heksametildisilazana i trimetilklo-

rosilana u omjeru 9:3:1 (v/v/v) (Napomena 4), izbjegavajući pritom vezanje vlage (Napomena 5).

Napomena 4: Na tržištu su dostupne otopine spremne za upotrebu. Takoder su dostupni i drugi reagensi za silaniziranje, kao npr. bis-trimetilsililtrifluoracetamid + 1% trimetil klorosilan, koji se treba razrijetiti jednakim volumenom bezvodnog piridina.

5.3.2. Epruveta se začepi i pažljivo protrese (bez preokretanja) do potpunog otapanja sterola. Ostavi se barem 15 minuta pri sobnoj temperaturi te zatim centrifugira nekoliko minuta. Bistra otopina spremna je za analizu plinskom kromatografijom.

Napomena 5: Lagano zamućenje koje se može pojaviti normalna je pojava i ne izaziva smetnje. Stvaranje bijelog flokulata ili pojava ružičaste boje upućuju na prisutnost vode ili nečiste reagense. U tom slučaju, analiza se mora ponoviti.

5.4. Plinsko-kromatografska analiza

5.4.1. Priprema kolone

5.4.1.1. Kolona se učvrsti na plinski kromatograf, priključujući početak kolone na isparivač sa sustavom za odjeljivanje, a kraj kolone na detektor.

Obave se opće provjere plinskog kromatografa (dovod plina, učinkovitost detektora, učinkovitost sustava odjeljivanja i pisača itd.).

5.4.1.2. Ako se kolona koristi prvi put, preporučuje se njezino kondicioniranje. Lagani tok plina se propusti kroz kapilarnu kolonu, plinski kromatograf se uključi i započne postupno zagrijavati do temperature najmanje 20 °C iznad radne temperature (Napomena 6). Ta se temperatura održava najmanje dva sata, a zatim se cijeli uredaj namjesti na radne uvjete (podešavanje protoka plina i dijeljenja, paljenje plamena, priključak na elektronički pisač, podešavanje peći za kolonu, temperature detektora i injektora) i potom snimi signal s osjetljivošću najmanje dvostrukom većom od one koja će se koristiti za analizu. Bazna crta mora biti linearna, bez ikakvih pikova ili otklona.

Negativni otklon bazne crte upućuje na neispravno priključenu kolonu; pozitivni otklon upućuje na nepravilno kondicioniranje kolone.

Napomena 6: Temperatura kondicioniranja uvijek mora biti najmanje 20 °C niža od maksimalne temperature odredene za upotrijebljenu stacionarnu fazu.

5.4.2. Izbor radnih uvjeta

5.4.2.1. Opći radni uvjeti su sljedeći:

- temperatura kolone: $260 \pm 5^{\circ}\text{C}$,
- temperatura isparivača: 280°C ,
- temperatura detektora: 290°C ,
- linearna brzina plina nositelja: helij $20\text{-}35 \text{ cm/s}$, vodik $30\text{-}50 \text{ cm/s}$,
- omjer razdvajanja protoka: od 1:50 do 1:100,
- osjetljivost uređaja: od 4 do 16 puta veća od najmanjeg prigušenja,
- osjetljivost detektora: 1 do 2 mV pune ljestvice,
- brzina papira: $30 \text{ do } 60 \text{ cm/h}$,
- količina injektirane tvari: $0,5\text{-}1 \mu\text{l}$ otopine trimetilsilil etera (TMSE).

Ovi se uvjeti mogu prilagođavati svojstvima kolone i plinskog kromatografa tako da se dobiju kromatogrami koji ispunjavaju sljedeće zahtjeve:

- vrijeme zadržavanja β -sitosterola treba biti 20 ± 5 minuta,
- visina pika kampesterola treba biti: za maslinovo ulje (prosječna količina 3%) 15 ± 5 pune ljestvice; za sojino ulje (prosječna količina 20%) 80 ± 10 pune ljestvice,
- svi prisutni steroli moraju biti razdvojeni. Pored toga, pikovi također moraju biti potpuno razdvojeni, tj. prethodni pik mora se vratiti na baznu crtu prije

početka sljedećeg pika. Međutim, nepotpuna se rezolucija tolerira uz uvjet da se pik pri relativnom vremenu zadržavanja od 1,02 može kvantificirati pomoću okomice.

3.3.3. Postupak analize

5.4.3.1. Pomoću mikrolitarske šprice od 10 μl povuče se 1 μl heksana, usiše 0,5 μl zraka i zatim 0,5-1 μl otopine uzorka. Pritom se klip šprice povuče tako da se igla isprazni. Igla se uvede kroz membranu injektoru te se nakon 1-2 sekunde brzo injektira, a nakon približno 5 sekundi igla lagano izvruče.

2.2.2.2. Nastavi se sa snimanjem dok se TMSE prisutnih sterola u potpunosti ne eluiraju. Bazna crta mora sve vrijeme ispunjavati uvjete (5.4.1.2.).

5.4.4. Identifikacija pikova

Pojedinačni se pikovi identificiraju na osnovi njihovih vremena zadržavanja i usporedbom sa smjesama sterolnih TMSE analiziranih u jednakim uvjetima.

Steroli se eluiraju sljedećim redoslijedom: kolesterol, brasikasterol, 24-metilenkolesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, $\Delta 7$ -kampesterol, $\Delta 5,23$ -stigmastadienol, klerosterol, β -sitosterol, sitostanol, $\Delta 5$ -avenasterol, $\Delta 5,24$ -stigmastadienol, $\Delta 7$ -stigmastenol, $\Delta 7$ -avenasterol.

U Tablici 1. prikazana su vremena zadržavanja za sitosterol i kolone SE-52 i SE-54.

Slike 1. i 2. prikazuju tipične kromatograme nekih ulja.

5.4.5. Kvantitativno određivanje

5.4.5.1. Površine pikova α -kolestanola i sterola izračunaju se pomoću integratora. Pikovi komponenata koje nisu navedene u Tablici 1. ne uzimaju se u obzir. Koeficijent odziva α -kolestanola mora biti jednak 1.

5.4.5.2. Izračuna se koncentracija svakog pojedinog sterola u mg/100 g ulja prema sljedećem izrazu:

$$\text{Sterol } x = \frac{A_x \times m_s \times 100}{A_s \times m}$$

pri čemu je:

A_x = površina pika sterola x ;

A_s = površina pika α -kolestanola;

m_s = masa dodanog α -kolestanola, u mg;

m = masa uzorka upotrijebljena za analizu, u g.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

6.1. Zabilježi se koncentracija pojedinačnih sterola u mg/100 g ulja te njihov zbroj kao "ukupni steroli".

6.2. Izračuna se postotak svakog pojedinog sterola iz omjera odgovarajućih površina pikova i ukupne površine pikova sterola, prema izrazu:

$$\% \text{ sterola } x = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

pri čemu je:

A_x = površina pika za x ;

$\sum A$ = ukupna površina pikova za sterole.

DODATAK

ODREĐIVANJE LINEARNE BRZINE PLINA

U plinski kromatograf podešen na normalne radne uvjete injektira se 1 do 3 μl metana (ili propana) i mjeri vrijeme potrebno plinu da prode kroz kolonu od trenutka injektiranja do trenutka pojave pika (tM).

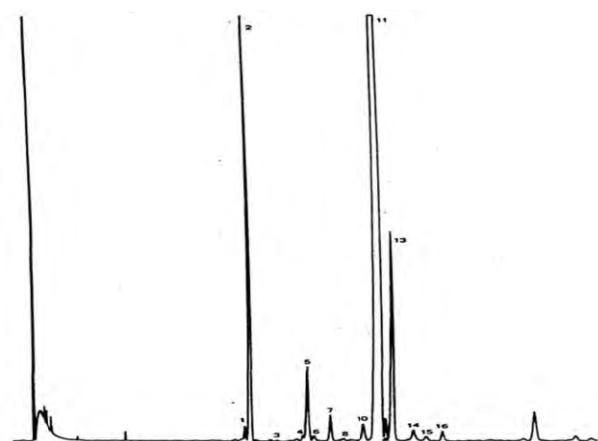
Linearna brzina u cm/s dana je s L/tM , gdje je L duljina kolone u cm, a tM izmjereno vrijeme u sekundama.

Tablica I.

Relativna vremena zadržavanja sterola

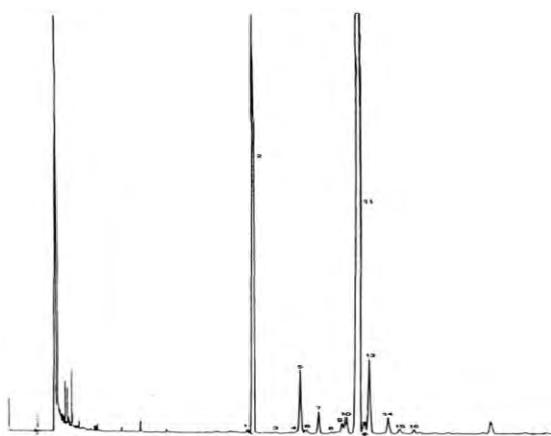
Pik	Identifikacija	Relativno vrijeme zadržavanja	Kolona SE-54	Kolona SE-52
1	kolesterol	$\Delta 5$ -kosten-3 β -ol	0,67	0,63
2	kolestanol	5α -kolestan-3 β -ol	0,68	0,64
3	brasikasterol	[24S]-24-metil- $\Delta 5,22$ -kolestadien-3 β -ol	0,73	0,71
4	24-metilenkolesterol	24-metilen- $\Delta 5,24$ -kosten-3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

Slika 1.
Plinski kromatogram sterolne frakcije nerafiniranog maslinovog ulja



Slika 2.

Plinski kromatogram sterolne frakcije rafiniranog maslinovog ulja



ANEKS VI.

ODREĐIVANJE ERITRODIOLA I UVAOILA

UVOD

Eritrodiol (pod čime se uobičajeno podrazumijevaju glikoli eritrodiol i uvaol zajedno) je sastojak neosapunjive frakcije, karakterističan za neke vrste masti. U maslinovom ulju ekstrahiranom otapalima nalazi se u znatno većim koncentracijama nego u drugim uljima, kao što je prešano maslinovo ulje ili ulje grožđanih sjemenki, koja ga također sadrže, tako da njegova prisutnost može potvrditi prisutnost maslinovog ulja ekstrahiranog otapalima.

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda opisuje postupak određivanja eritrodiola u mastima.

2. PRINCIP METODE

Mast se saponificira etanolnom otopinom kalijevog hidroksida. Neosapunjiva frakcija se ekstrahira dietil-eterom i pročisti propuštanjem kroz kolonu napunjenu aluminijevim oksidom.

Neosapunjivo se podvrgava tankoslojnoj kromatografiji na ploči sa silikagelom dok se ne izdvoje trake koje odgovaraju frakcijama sterola i eritrodiola. Dobiveni steroli i eritrodioli prevode se u trimetilsilil etere (TMSE) te se smjesa analizira plinskom kromatografijom.

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

3. APARATURA

3.1. Aparatura opisana u Aneksu V. (Određivanje udjela sterola).

4. REAGENSI

4.1. Reagensi opisani u Aneksu V. (Određivanje udjela sterola)

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

5. POSTUPAK

5.1. Priprema neosapunjivog

Kako je opisano u točki 5.1.2. Aneksa V.

5.2. Izdvajanje eritrodiola i sterola

5.2.1. Vidjeti točku 5.2.1. Aneksa V..

5.2.2. Vidjeti točku 5.2.2. Aneksa V..

5.2.3. Priprema 5%-tne otopine neosapunjivog u kloroformu.

Mikrošpricom od 0,1 ml nanese se na kromatografsku ploču 0,3 ml otopine približno 1,5 cm od donjeg ruba, u što tanjoj i ravnomjernoj liniji.

Na jednom kraju ploče nanese se nekoliko mikrolitara otopina kolesterola i eritrodiola, koje služe kao referentne mrlje.

5.2.4. Ploča se postavi u komoru za razvijanje pripremljenu kako je opisano u točki 5.2.1.

Temperatura treba biti oko 20 °C. Komora se odmah zatvori poklopcom i ostavi da eluira dok fronta otapala ne dosegne približno 1 cm od gornjeg ruba ploče. Ploča se ukloni iz komore za razvijanje, a otapalo se otpari u struju vrućeg zraka.

5.2.5. Ploča se lagano i ravnomjerno poprska alkoholnom otopinom 2,7-diklorofluoresceina.

Promatranjem ploče pod ultraljubičastim svjetlom i usporednjom s referentnim mrljama mogu se identificirati trake sterola i eritrodiola, koje se označe točkom malo izvan područja fluorescencije.

5.2.6. Pomoću metalne lopatice sastruže se silikagel unutar označenih područja. Materijal s ploče prenese se u tikvicu od 50 ml. Doda se 15 ml vrućim kloroformom, dobro protrese i filtrira kroz lijevak s diskom od sinter stakla tako da se silikagel prenese na filter. Triput se ispere vrućim kloroformom (10 ml svaki put), sakupljajući filtrat u tikvicu od 100 ml. Filtrat se upari do volumena od 4-5 ml, prenese u prethodno izvaganu epruvetu za centrifugiranje s konusnim dnom, uz blago zagrijavanje osuši u strujni duši i izvaze.

5.3. Priprema trimetilsilil etera

Kako je opisano u točki 5.3. Aneksa V.

5.4. Analiza plinskom kromatografijom

Kako je opisano u točki 5.4. gore navedene metode. Radni uvjeti plinskokromatografske analize moraju biti tako podešeni tako da se pored razdvajanja sterola odvoje i TMSE eritrodioli i uvaola.

Kad se uzorak injektira, kontinuirano se obavlja snimanje dok se ne eluiraju prisutni steroli, eritrodiol i uvaol. Zatim se identificiraju pikovi (vremena zadržavanja eritrodiola i uvaola u odnosu na β-sitosterol su oko 1,45 odnosno 1,55) i izračunaju površine kao za sterole.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

$$\text{Eritrodiol \%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{sterola}}} \times 100$$

pri čemu je: A_1 = površina pika eritrodiola; A_2 = površina pika uvaola; $\sum A_{\text{sterola}}$ = ukupna površina pikova sterola. Rezultat se izražava na jedno decimalno mjesto.

ANEKS VII.

ODREĐIVANJE UDJELA 2-GLICERIL MONOPALMITATA

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda opisuje postupak određivanja udjela palmitinske kiseline na položaju 2 triglicerida određivanjem udjela 2-gliceril monopalmitata.

Ova metoda može se primijeniti na biljna ulja koja su tekuća na sobnoj temperaturi (20 °C).

2. PRINCIP

Nakon pripreme uzorak ulja se podvrgava djelovanju pankreasne lipaze: parcijalna i specifična hidroliza u položajima 1 i 3 molekule triglicerida uzrokuje pojavu monoglicerida u položaju 2. Postotak 2-gliceril monopalmitata u frakciji

monoglycerida određuje se nakon silaniziranja kapilarnom plinskom kromatografijom.

3. APARATURA I PRIBOR

- 3.1. Erlenmeyerova tikvica od 25 ml
- 3.2. Čaše od 100, 250 i 300 ml
- 3.3. Staklena kromatografska kolona unutarnjeg promjera 21-23 mm, duljine 400 mm, s pločicom od sinter stakla i pipcem
- 3.4. Mjerni cilindari (menzure) 10, 50, 100 i 200 ml
- 3.5. Tikvice od 100 i 250 ml
- 3.6. Rotacijski uparivač
- 3.7. Epruveta za centrifugiranje s koničnim dnom od 10 ml i brušenim staklenim čepom
- 3.8. Centrifuga za epruvete od 10 i 100 ml
- 3.9. Termostat koji omogućava održavanje stabilne temperature od $40 \pm 0,5$ °C
- 3.10. Pipete 1 i 2 ml
- 3.11. Šprica od 1 ml, s tankom iglom
- 3.12. Mikrošprica od 100 µl
- 3.13. Lijevak od 1000 ml
- 3.14. Kapilarni plinski kromatograf opremljen za hladno injektiranje i za (direktno) izravno unošenje uzorka i peći s mogućnosti održavanja odabrane temperature oko 1 °C
- 3.15. Hladni injektor za izravno (direktno) unošenje uzorka u kolonu
- 3.16. Plameno-ionizacijski detektor i mjerni pretvarač (elektrometar)
- 3.17. Pisač-integrator povezan s mjernim pretvaračem s vremenom odaziva manjim od 1 sekunde i promjenjivom brzinom papira
- 3.18. Staklena ili silikatna kapilarna kolona duljine 8-12 metara, unutarnjeg promjera 0,25-0,32 mm, prekrivena/obložena 5% metilpolisiloxanom ili fenilmetsiloskanom, debljine 0,10-0,30 µm, koja se može koristiti na 370 °C
- 3.19. Mikrošprica od 10 µl s čvrsto fiksiranom iglom, duljine najmanje 7,5 cm za direktno unošenje uzorka u kolonu.

4. REAGENSI

- 4.1. Slikagel veličine zrnaca od 0,063 – 0,200 mm (70/280 mesha) pripremljen na sljedeći način:
staviti silikagel u porculansku posudu i sušiti u sušioniku na 160 °C četiri sata, ohladiti u eksikatoru na sobnoj temperaturi. Dodati 5% vode na masu silikagela kako slijedi: odvagati 152 g silikagela u tikvicu i dodati 8 g destilirane vode, čep i lagano protresti da se voda jednakomjerno rasporedi.
Ostaviti da stoji najmanje 12 sati prije upotrebe.
- 4.2. n-heksan (za kromatografiju)
- 4.3. Isopropanol
- 4.4. Vodena otopina isopropanola, 1/1 (v/v)
- 4.5. Pankreasna lipaza. Mora imati aktivnost između 2,0 i 10 lipaznih jedinica po mg (pankreasna lipaza, s aktivnošću od 2,0-10 lipaznih jedinica po mg enzima, dostupna na tržištu)
- 4.6. Puferska otopina tris-hidroksimetilaminometana; 1 M vodena otopina, podešena s konc. HCl (1/1 v/v) na pH 8 (provjeriti potenciometrom)
- 4.7. Natrijev holat, 0,1% vodena otopina enzimske kvalitete (otopina se mora uoptrijebiti u roku od dva tjedna od izrade)
- 4.8. Kalcijev klorid, 22%-tina vodena otopina
- 4.9. Dietil-eter za kromatografiju
- 4.10. Otopina za razvijanje: mješavina n-heksana/dietil-etera (87:13 v/v)
- 4.11. Natrijev hidroksid, 12% masene otopine
- 4.12. Fenolftalein, 1% otopina u etanolu
- 4.13. Plin nositelj: vodik ili helij, za plinsku kromatografiju
- 4.14. Pomoćni plinovi: vodik, čistoće najmanje 99%, bez vlage i organskih tvari, i zrak, za plinsku kromatografiju, isto čisto

4.15. Reagens za silaniziranje: mješavina piridina/heksametilsilazane, trimetilklorosilan 9/3/1 (v/v/v). (Otopine pripremljene za upotrebu dostupne su na tržištu. Mogu se upotrebljavati i drugi reagensi za silaniziranje, posebno bistri metilsilil trifloracetamid + 1% trimetilklorosilan, razrijeđen jednakim volumenom bezvodnog piridina.)

4.16. Referentni uzorci: čisti monoglyceridi ili mješavine monoglycerida s poznatim postotnim udjelima sličnim uzorku.

5. METODA

5.1. Priprema uzorka

5.1.1. Ulje sa slobodnim masnim kiselinama manjim od 3% prije kromatografije nije potrebno neutralizirati na silikagel koloni. Ulje sa slobodnim masnim kiselinama većim od 3% mora se neutralizirati kao u točki 5.1.1.1.

5.1.1.1. Staviti 50 g ulja i 200 ml n-heksana u lijevak obujma 1 000 ml (3.1.). Dodati 100 ml izopropanola i količinu otopine 12% natrijevog nitroksida (4.11) koja odgovara udjelu slobodnim masnim kiselinama (SMK) u ulju uvećanom za 5%. Jednu minutu snažno tresti. Dodati 100 ml destilirane vode, ponovo protresti i ostaviti da stoji.

Nakon razdvajanja slojeva, ukloni se donji sloj sapuna, kao i meduslojevi (sluz, netopive tvari). Heksansku otopinu neutraliziranog ulja ispirati dodavanjem otopine 1/1 (v/v) izopropanol/voda (4.4.) u obrocima 50-60 ml do nestanka ljubičaste boje fenolftaleina.

Najveći dio heksana ukloniti vakuumskom destilacijom (koristeći se rotirajućem vakuumskim uparivačem, naprimjer) i ulje prenijeti u tikvicu od 100 ml (3.5.). Sušiti ulje u vakuumu dok se otapalo potpuno ne ukloni.

Nakon okončanja postupka kiselost ulja treba biti manja od 0,5%.

5.1.2. Staviti 1,0 g ulja pripravljenog kao što je gore navedeno u Erlenmeyerovu tikvicu obujma 25 ml (3.1.) i otopiti u 10 ml otopine za razvijanje (4.10.). Ostaviti otopinu da stoji najmanje 15 minuta prije kolonske kromatografije sa silikagelom.

Ukoliko je otopina mutna, centrifugirati ju kako bi se osigurali optimalni uvjeti za kromatografiju (mogu se koristiti gotova pakiranja 500 mg silikagela SPE pripremljena za upotrebu).

5.1.3. Priprema kromatografska kolone

Staviti oko 30 ml otopine za razvijanje (4.10.) u kolonu (3.3.), u donji dio kolone staviti komad vate i staklenim štapićem istisnuti zrak.

U časi pripremiti otopinu 25 g silikagela (4.1.) u oko 80 ml otopine za razvijanje i pomoću lijevka naliti u kolonu.

Provjeriti da li je sav silikagel prenesen u kolonu; isprati s otopinom za razvijanje (4.10.), otvoriti pipac i ispustiti tekućinu do nivoa oko 2 mm iznad silikagela.

5.1.4. Kolonska kromatografija

U Erlenmeyerovu tikvicu volumena 25 ml (3.1.) točno odvagati 1,0 g uzorka pripremljenog kao u točki 5.1.

Otopiti uzorak u 10 ml otopine za razvijanje (4.10.). Naliti otopinu u kromatografsku kolonu pripremljenu kao u točki 5.1.3. Izbjegavati "uzburkavanje" površine kolone.

Otvoriti pipac i pustiti otopinu uzorka kroz kolonu dok ne dosegne razinu silikagela. Eluirati s 150 ml otopine za razvijanje. Podesiti brzinu protoka na 2 ml/min (tako da 150 ml prođe kroz kolonu za oko 60-70 min).

Eluat skupiti u prethodno izvaganu tikvicu od 250 ml. Otapalo upariti pod vakuumom, tragove otapala ukloniti u struji dušika.

Izaglati i izračunati dobiveni ekstrakt.

(Ukoliko se koristi komercijalni silikagel SPE pripremljen za upotrebu, primijeniti sljedeći metodu: staviti 1 ml otopine (5.1.2.) u pripremljene patronе s 3 ml n-heksana).

Nakon filtriranja otopine razviti s 4 ml n-heksana/dielti etera 9/1(v/v).

Sakupiti eluat u epruvetu obujma 10 ml i upariti do suha u struji dušika.

Izložiti suhi ostatak pankreasnoj lipazi (5.2) (bitno je provjeriti sastav masnih kiselina prije i nakon prolaska preko silikagela SPE).

5.2. Hidroliza pankreasnom lipazom

5.2.1. U epruvetu za centrifugiranje odvagati 0,1 g ulja pripremljenog kao u točki 5.1. Dodati 2 ml puferske otopine (4.6.), 0,5 ml otopine natrijevog holata (4.7.) i 0,2 ml otopine kalcijevog klorida, dobro promučati nakon svakog dodavanja. Zatvoriti epruvetu čepom od brušenog stakla i staviti u termostat pri $40 \pm 0,5$ °C.

5.2.2. Dodati 20 mg lipaze, pažljivo protresti (izbjegći vlaženje čepa) i staviti epruvetu u termostat točno dvije minute. Potom izvaditi, dobro tresti jednu minutu i ostaviti da se hlađi.

5.2.3. Dodati 1 ml dietil-etera, začepiti i snažno protresti, zatim centrifugirati i prenijeti otopinu etera pomoću mikrošprice u čistu, suhu epruvetu.

5.3. Priprema silaniziranih derivata i plinska kromatografija

5.3.1. Mikrošpricom prenijeti 100 µl otopine (5.2.3.) u epruvetu s konusnim dnem obujma 10 ml.

5.3.2. Ukloniti otapalo uvodenjem blage struje dušika, dodati 200 µl reagensa za silaniziranje (4.15.), začepiti epruvetu i ostaviti da stoji 20 minuta.

5.3.3. Nakon 20 minuta dodati 1 do 5 ml n-heksana (ovisno o kromatografskim uvjetima): dobivena otopina spremna je za plinsku kromatografiju.

5.4. Plinska kromatografija

Radni uvjeti:

- temperatura injektor-a (injektor neposredno na koloni) niža od vrelista otapala (68 °C);
- temperatura detektora: 350 °C
- temperatura kolone; programiranje temperature peći: 60 °C u trajanju od jedne minute, povećanje za 15 °C po minuti do 180 °C, zatim 5 °C po minuti do 340 °C, potom 13 minuta na 340 °C;
- plin nositelj: vodik ili helij, postavljen na linearnu brzinu dostatnu da se dobije rezolucija naznačena na slici 1. Vrijeme zadržavanja triglicerida C54 mora biti 40 ± 5 minuta (vidi sliku 2.). (Gore naznačeni radni uvjeti su indikativni. Operateri će ih morati optimizirati za dobivanje željene rezolucije. Pik koji odgovara 2-gliceril monopalmitatu mora imati minimalnu visinu jednaku 10% skale pisača.)
- količina injektirane tvari: 0,5-1 µm otopine n-heksana (5 ml) (5.3.3.).

5.4.1. Identifikacija pikova

Pojedini monoglyceridi identificiraju se prema retencijskom vremenu i usporedbom s dobivenim vremenom za standardne monoglyceridne smjese pod jednakim uvjetima.

5.4.2. Kvantitativna ocjena

Površina svakog pika izračunava se korištenjem elektroničkog integratora.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

Postotak gliceril monopalmitata izračunava se iz omjera između površine odgovarajućeg pika i površina pikova svih monoglycerida (vidi sliku 2.) korištenjem formule:

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

pri čemu je:

A_x = površina pika koja odgovara gliceril monopalmitatu

ΣA = zbroj površina pikova svih monoglycerida

Rezultat mora biti izražen na jednu decimalu.

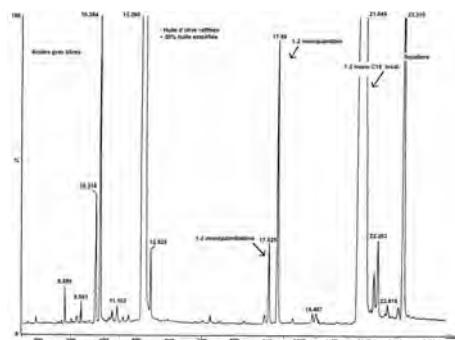
7. IZVJEŠĆE O ANALIZI

Izvješće o analizi mora sadržavati:

- pozivanje na ovu metodu,
- sve informacije potrebne za identifikaciju uzorka,
- rezultat analize,
- svako odstupanje od metode, bilo da je posljedica odluke odnosnih stranaka ili drugog razloga,
- pojedinosti za identifikaciju laboratorija, datum analize i potpis onih koji su odgovorni za analizu.

Slika 1.

Kromatogram produkata silaniziranja provedenog na rafiniranom maslinovom ulju s dodatkom 20% esterificiranog ulja podvrgnutom djelovanju lipaze (100%)

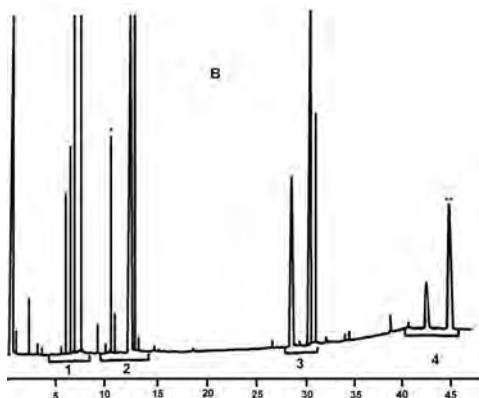


4 =Trigliceridi
* = 2-monopalmitin
** = Triglycerid C₅₄

Kromatogram:

(B) neesterificirano ulje nakon djelovanja lipaze; nakon silaniziranja; pod uvjetima opisanima u točki 5.4. (kapilarna kolona 8-12 m), frakcija voska se eluira istovremeno kada i frakcija diglicerida ili odmah potom.

Nakon djelovanja lipaze, sadržaj triglycerida ne smije prelaziti 15%.



Legenda:

- 1 = Slobodne masne kiseline
- 2 = Monoglyceridi
- 3 = Diglyceridi
- 4 = Triglyceridi
- * = 2-monopalmitin
- ** = Triglycerid C₅₄

8. BILJEŠKE

Bilješka 1. PRIPREMA LIPAZE

Komercijalno dostupne lipaze imaju zadovoljavajuću aktivnost. Također se mogu pripremiti u laboratoriju na sljedeći način:

Na temperaturi od 0 °C ohladiti 5 kg svježe svinjske gušterice. Skinuti okolnu krutu mast i vezno tkivo i u miješalici s noževima samljeti u kašastu tekućinu. Kašu miješati 4-6 sati s 2,5 litre bezvodnog acetona, potom centrifugirati. Ostatak još tri puta ekstrahirati s istim volumenom bezvodnog acetona, potom dva puta s mješavinom acetona/dietil-etera (1/1 v/v) i dva puta s dietil-eterom.

Ostatak sušiti u vakuumu 48 sati kako bi se dobio stabilan prah koji se može dugotrajno čuvati u hladnjaku, zaštićen od vlage.

Bilješka 2. PRAĆENJE AKTIVNOSTI LIPAZE

Pripraviti emulziju maslinovog ulja kako slijedi:

U mikseru miješati 10 minuta 165 ml otopine koja sadrži 100 g/l guma arbikuma, 15 g zdrobljenog leda i 20 ml prethodno neutraliziranog maslinovog ulja.

U čašu obujma 50 ml staviti 10 ml emulzije, 0,3 ml otopine 0,2 g/ml natrijevog holata i 20 ml destilirane vode.

Čašu staviti u termostat namješten na 37 °C; namjestiti elektrode pH metra i spiralnu mješalicu.

Biretom dodavati otopinu 0,1 mol/l natrijevog hidroksida, kap po kap, dok se ne dobije pH 8,3.

Dodati alikvot otopine praha lipaze u vodu (0,1 g/ml lipaze). Čim pH metar očita 8,3, pokrenuti kronometar i dodavati otopinu natrijevog hidroksida kap po kap, brzinom kojom se održava pH na 8,3. Očitavati svake minute potrošenu zapremminu otopine.

Zabilježiti podatke na x/y dijagramu, s vremenom na osi x i mililitrima potrošene 0,1 mol/l otopine natrijevog hidroksida za održavanje konstantanog pH na osi y. Dobiva se linearni dijagram.

Aktivnost lipaze, izražena u jedinicama lipaze po mg, dana je u sljedećoj formuli:

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

pri čemu je:

A - aktivnost u jedinicama lipaze /mg

V - mililitri otopine natrijevog hidroksida koncentracije 0,1 mol/l u minuti (izračunato temeljem dijagrama)

N - titar otopine natrijevog hidroksida

m - masa u mg ispitne lipaze.

A jedinica lipaze definira se kao udio enzima koja oslobađa 10 mikroekvivalenta kiseline u minuti.

ANEKS VIII.

SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA U ULTRALJUBIČASTOM PODRUČJU

PREDGOVOR

Spektrofotometrijsko određivanje u ultraljubičastom području može pružiti podatke o kvaliteti masti, njezinom stanju očuvanosti i promjenama prouzročenim tehnološkim procesima.

Do apsorbancije na valnim duljinama navedenim u metodi dolazi zbog prisutnosti konjugiranih dienskih i trienskih sustava. Te apsorbancije izražene su kao specifične ekstinkcije E1% 1 cm (ekstinkcija 1%-tne otopine masti u specificiranom otapalu, debljine 1 cm) i dogovorno se označavaju s K (također i kao "koeficijent ekstinkcije").

1. OPSEG

Metoda opisuje postupak provođenja spektrofotometrijske analize maslinovog ulja u ultraljubičastom području.

2. PRINCIP METODE

Mast se otopi u predviđenom otapalu te se izmjeri ekstinkcija otopine na određenim valnim duljinama u odnosu na čisto otapalo. Iz spektrofotometrijskih očitanja računaju se specifične ekstinkcije.

3. OPREMA

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

3.2. Pravokutne kvarcene kivete s poklopциma, s optičkom duljinom 1 cm. Kivete napunjene vodom ili drugim prikladnim otapalom ne smiju pokazivati međusobne razlike u ekstinkciji veće od 0,01 ekstinkcijskih jedinica

3.3. Odmjerne tikvice od 25 ml

3.4. Kromatografska kolona s gornjim dijelom duljine 270 mm i promjera 35 mm i donjim dijelom duljine 270 mm i promjera približno 10 mm.

4. REAGENSI

4.1. Izo-oktan, spektrofotometrijske čistoće (2,2,4-trimetilpentan). U odnosu na destiliranu vodu, propusnost emitiranog zračenja treba biti najmanje 60% pri 220 nm te najmanje 95% pri 250 nm, ili:

– cikloheksan, spektrofotometrijske čistoće: u odnosu na destiliranu vodu propusnost emitiranog zračenja treba biti najmanje 40% pri 220 nm te najmanje 95% pri 250 nm

4.2. Bazični aluminijski oksid za kromatografiju na koloni, pripremljen i provjeren kako je opisano u Dodatku 1.

4.3. n-heksan, za kromatografiju.

5. POSTUPAK

5.1. Uzorak treba biti potpuno homogen i bez potencijalnih nečistoća. Ulja koja su tekuća pri sobnoj temperaturi moraju se filtrirati preko papira pri temperaturi od oko 30 °C, a krute masti moraju se homogenizirati i filtrirati pri temperaturi od najviše 10 °C iznad tališta.

5.2. Od tako pripremljenog uzorka točno se odvajaže oko 0,25 g u odmjerenu tikvicu od 25 ml, nadopuni do oznake specificiranim otapalom i homogenizira. Dobivena otopina treba biti savršeno bistra. U slučaju uočavanja opalescencije ili mutnoće, otopinu treba brzo filtrirati preko filter-papira.

5.3. Kiveta se napuni priređenom otopinom te se mijere ekstinkcije pri odgovarajućim valnim duljinama između 232 i 276 nm, koristeći upotrijebljeno otapalo kao referenciju.

Očitane vrijednosti ekstinkcija trebaju se nalaziti unutar intervala od 0,1 do 0,8. U suprotnome treba ponoviti mjerena radeći, prema potrebi, s koncentriranjem ili razrjeđenijem otopinama.

5.4. Kada se određivanje specifične ekstinkcije provodi nakon provođenja preko aluminijevog oksida, postupa se kako slijedi: 30 g bazičnog aluminijevog oksida i heksan pomiješaju se u suspenziju i unesu u kromatografsku kolonu. Nakon slijeganja adsorbensa ispušti se višak heksana, do približno 1 cm iznad razine aluminijevog oksida.

10 g masti, homogenizirane i filtrirane kako je opisano u 5.1., otopi se u 100 ml heksana i prenese u kolonu. Eluent se skuplja te se cjelokupno otapalo otpari pod vakuumom pri temperaturi ispod 25 °C.

S tako dobivenom masti odmah se nastavi s postupkom opisanim u 5.2.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

6.1. Zabilježe se specifične ekstinkcije (koeficijenti ekstinkcije) pri različitim valnim duljinama, izračunate kako slijedi:

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

pri čemu je:

K_λ = specifična ekstinkcija pri valnoj duljini λ
 E_λ = izmjereni ekstinkcija pri valnoj duljini λ
 c = koncentracija otopine u g/100 ml
 s = debljina kivete u cm.

Rezultati se izražavaju s dva decimalna mjesta.

6.2. Spektrofotometrijska analiza maslinovog ulja, u skladu sa službenom metodom u važećim propisima, specificira određivanje specifične ekstinkcije u otopini izo-oktana pri valnim duljinama 232 i 270 nm i određivanje K prema sljedećem izrazu:

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

pri čemu je Km specifična ekstinkcija pri valnoj duljini m, tj. valnoj duljini oko 270 nm na kojoj je zabilježena maksimalna apsorbancija.

DODATAK I.

PRIPREMA ALUMINIJEVOG OKSIDA I PROVJERA NJEGOVE AKTIVNOSTI

A.1.1. Priprema aluminijevog oksida

Aluminijev oksid, prethodno osušen u peći pri temperaturi 380-400 °C u trajanju od tri sata, prenese se u posudu koja se može hermetički zatvoriti, doda destilirana voda u količini od 5

ml na 100 g aluminijevog oksida. Posuda se odmah zatvori, više puta protrese te ostavi da miruje najmanje 12 sati prije upotrebe.

A.1.2. Provjera aktivnosti aluminijevog oksida

Pripremi se kromatografska kolona s 30 g aluminijevog oksida. Radeći kako je opisano u točki 5.4., kroz kolonu se propusti smjesa koja se sastoji od:

- 95% djevičanskog maslinovog ulja, specifične ekstinkcije manje od 0,18 pri 268 nm,
- 5% ulja kikirikija, tretiranog aktivnom zemljom u procesu rafinacije, specifične ekstinkcije ne manje od 4 pri 268 nm.

Ukoliko nakon prolaska kroz kolonu smjesa ima specifičnu ekstinkciju veću od 0,11 pri 268 nm, aluminijev oksid je prihvativ; ako ne, treba povećati razinu dehidracije.

DODATAK II.

KALIBRACIJA SPEKTROFOTOMETRA

A.2. Redovito se mora provjeravati podešenje valne duljine i točnost odziva uređaja (najmanje svakih šest mjeseci).

A.2.1. Valna duljina može se provjeravati pomoću živine vakuumske svjetiljke ili prikladnim filterima.

A.2.2. Kako bi se provjerio odziv fotočelije i fotomultiplikatora, postupi se na sljedeći način: izvaze se 0,2000 g čistog kalijevog kromata za spektrometriju i otopi u otopini kalijevog hidroksida, koncentracije 0,05 mol/l u odmernoj tikvici od 1000 ml, te nadopuni do oznake. Uzme se točno 25 ml dobivene otopine, prenese u odmernu tikvicu od 500 ml i razrijedi do oznake istom otopinom kalijevog hidroksida.

Mjeri se ekstinkcija tako dobivene otopine pri 275 nm, koristeći otopinu kalijevog hidroksida kao referenciju. Ekstinkcija izmjerena uz korištenje kivete od 1 cm treba biti $0,200 \pm 0,005$.

ANEKS IX.A.

ODREĐIVANJE METIL-ESTERA MASNIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. OPSEG

Ovom se metodom daju opće upute za primjenu plinske kromatografije, uz upotrebu punjenih ili kapilarnih kolona, za određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava smjese metil-estera masnih kiselina dobivenih u skladu s metodom opisanom u Aneksu IX.b.

Ova se metoda ne može primijeniti na polimerizirane masne kiseline.

2. REAGENSI

2.1. Plin nositelj

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

Napomena 1. Vodik, koji se koristi kao plin nositelj samo u kapilarnim kolonama, može uđovostručiti brzinu analize, ali je opasan. Potrebno je poduzeti odgovarajuće mјere sigurnosti.

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

Smjesa metil-estera čistih masnih kiselina ili metil-estera masti poznatog sastava, po mogućnosti sličnog sastavu masti koja se analizira.

Potrebno je poduzeti mјere za sprječavanje oksidacije polinezasićenih masnih kiselina.

3. APARATURA

Dane upute odnose se na uobičajenu opremu koja se koristi za plinsku kromatografiju, uz upotrebu punjenih i/ili kapilarnih kolona i plameno-ionizacijskog detektora. Pogodna je svaka aparatura kojom se postižu točnost i rezolucija sukladno točki 4.1.2.

3.1. Plinski kromatograf

Plinski kromatograf treba sadržavati sljedeće elemente:

3.1.1. Sustav za injektiranje

Koristi se sustav za injektiranje:

- (a) ili s punjenim kolonama, s najmanjim mogućim mrtvim prostorom (*deadspace*); u ovom slučaju sustav za injektiranje treba biti takav da se može zagrijavati na temperaturu 20-50 °C višu od temperature kolone; ili
- (b) s kapilarnim kolonama; u tom slučaju sustav za injektiranje treba biti posebno oblikovan za upotrebu s takvim kolonama. Može biti s razdvajanjem protoka (tipa "split") ili bez razdvajanja protoka (tipa "splitless") za izravno unošenje u kolonu (*on-column*).

Napomena 2. U odsutnosti masnih kiselina s manje od 16 C-atoma, može se koristiti injektor s pokretnom iglom.

3.1.2. Pećnica

Pećnica mora biti takva da omogući zagrijavanje kolone na temperaturu od najmanje 260 °C i zadržavanje željene temperature u granicama $\pm 1^{\circ}\text{C}$ u slučaju punjene kolone, odnosno $0,1^{\circ}\text{C}$ u slučaju kapilarne kolone. Ovaj posljednji uvjet osobito je važan kada se koristi kvarcna kapilara.

Preporučuje se upotreba temperaturno programiranog zagrijavanja u svim slučajevima, a posebno za masne kiseline s manje od 16 C-atoma.

3.1.3. Punjena kolona

3.1.3.1. Kolona, od materijala inertnog prema tvarima koje se analiziraju (tj. od stakla ili nehrdajućeg čelika), sljedećih dimenzija:

- (a) duljina: od 1 do 3 m. Kada su prisutne dugolančane masne kiseline (iznad C20), trebaju se koristiti relativno kratke kolone. Kada se analiziraju kiseline s 4 ili 6 C-atoma, preporučuje se upotreba kolona duljine 2 m;
- (b) unutarnji promjer: 2 do 4 mm.

Napomena 3. Ako su prisutne polinezasičene komponente s više od tri dvostrukе veze, u koloni od nehrdajućeg čelika može doći do njihove razgradnje.

Napomena 4. Može se koristiti sustav s dvostrukim kolonama.

3.1.3.2. Punjenje, koje sadrži sljedeće elemente:

- (a) čvrsti nosač: dijatomejska zemlja, isprana kiselinom i silanizirana ili drugi prikladni inertni čvrsti nosač s uskim rasponom veličine čestica (raspon od 25 μm unutar granica od 125 do 200 μm), pri čemu prosječna veličina čestica ovisi o unutarnjem promjeru i duljini kolone;
- (b) stacionarna faza: poliesterni tip polarne tekućine (npr. dietilenglikol polisukcinat, butandiol polisukcinat, etilenglikol poliadipat itd.), cijanosilikoni ili bilo koja druga tekućina koja omogućuje traženo kromatografsko razdvajanje (vidjeti točku 4.). Stacionarna faza treba činiti od 5% do 20% (m/m) punjenja. Za neka razdvajanja može se koristiti nepolarna stacionarna faza.

3.1.3.3. Kondicioniranje kolone

Uz kolonu, po mogućnosti odvojenu od detektora, postupno se zagrijava pećnica do 185 °C i propušta struja inertnog plina kroz sveže pripremljenu kolonu brzinom od 20 do 60 ml/min najmanje 16 sati pri toj temperaturi te sljedeća dva sata pri 195 °C.

3.1.4. Kapilarna kolona

3.1.4.1. Kapilara, od materijala inertnog prema tvarima koje se analiziraju (obično se koristi staklena ili kvarcna kapilara). Unutarnji promjer treba biti između 0,2 i 0,8 mm. Unutarnja

površina treba biti odgovarajuće obradena (npr. priprema površine, inaktivacija) prije nanošenja sloja stacionarne faze. U većini slučajeva dovoljna je duljina od 25 mm.

3.1.4.2. Stacionarna faza, obično tipa poliglikol (polietilenglikol 20 000), poliester (butandiol polisukcinat) ili polarni polisilosanski (cijanosilikoni). Prikladne su i vezane odnosno umrežene stacionarne faze.

Napomena 5. Postoji opasnost da polarni polisilosanski izazovu teškoće u identifikaciji i razdvajaju linolenske kiseline i C20 kiselina.

Sloj treba biti tanak, tj. od 0,1 do 0,2 μm .

3.1.4.3. Umetanje i podešavanje kolone

Potrebno je pridržavati se uobičajenih mjera opreza pri umetanju kapilarnih kolona – smještaj kolone u pećnici (nosač), izbor i priključivanje spojeva (nepropusnost), postavljanje krajeva kolone u injektor i detektor (smanjenje mrtvog prostora). Kolonu treba postaviti pod strujom plina nositelja (npr. 0,3 bar (30 kPa) za kolonu duljine 25 mm i unutarnjeg promjera 0,3 mm).

Kolona se kondicionira programiranjem temperature pećnice na 3 °C/min, od sobne temperature do temperatupe 10 °C niže od granične temperature raspadanja stacionarne faze. Pećnica se održava na toj temperaturi jedan sat do stabiliziranja bazne linije. Vrati se na 180 °C za rad u izotermalnim uvjetima.

Napomena 6. Na tržištu su dostupne prikladne unaprijed kondicionirane kolone.

3.1.5. Detektor, po mogućnosti takav da se može zagrijavati na temperaturu višu od temperature kolone.

3.2. Šprica

Šprica s iglom treba imati maksimalni kapacitet od 10 μl i podjelu na 0,1 μl .

3.3. Pisač

Ako se koristi krivulja pisača za izračun sastava analizirane smjese, potreban je elektronički pisač visoke preciznosti, spojiv s korištenim uređajem. Pisač mora imati sljedeće osobine:

- (a) vrijeme odziva kraće od 1,5 s, po mogućnosti 1 s (vrijeme odziva je vrijeme potrebno da igla pisača priđe put od 0 do 90% nakon trenutnog uvođenja signala od 100%);
- (b) širina papira najmanje 20 cm;
- (c) brzina papira podesiva na vrijednosti između 0,4 i 2,5 cm/min.

3.4. Integrator

Brz i točan izračun moguć je uz pomoć elektroničkog integratora. Na ovaj način dobiva se linearni odziv odgovarajuće osjetljivosti, a korekcija na devijaciju startne linije mora biti zadovoljavajuća.

4. POSTUPAK

Postupci opisani u točkama 4.1.-4.3. odnose se na upotrebu plameno-ionizacijskog detektora.

Alternativno se može koristiti plinski kromatograf s katarometrom (detektorom toplinske vodljivosti). Radni uvjeti moraju se u tom slučaju izmjeniti kako je opisano u točki 6.

4.1. Uvjeti analize

4.1.1. Odabir optimalnih radnih uvjeta

4.1.1.1. Punjena kolona

Pri izboru radnih uvjeta potrebno je uzeti u obzir:

- (a) duljinu i promjer kolone;
- (b) vrstu i količinu stacionarne faze;
- (c) temperaturu kolone;
- (d) protok plina nositelja;
- (e) traženu rezoluciju;
- (f) veličinu uzorka, koja mora biti odabrana tako da detektor i elektrometar daju linearan odziv;
- (g) trajanje analize.

Općenito, vrijednosti navedene u Tablici 1. i Tablici 2. dovest će do želenih rezultata, tj. najmanje 2 000 teoretskih tavana po metru duljine kolone za metil-stearat i njegovo eluiranje za približno 15 minuta.

Ako uređaj to dopušta, injektor treba biti na temperaturi od oko 200 °C, a detektor na temperaturi jednakoj ili višoj od temperature kolone.

U pravilu, odnos protoka vodika u plameno-ionizacijskom detektoru prema protoku plina nositelja varira od 1:2 do 1:1, ovisno o promjeru kolone. Protok kisika je 5-10 puta veći od protoka vodika.

Tablica 1.

Unutarnji promjer kolone (mm)	Protok plina nositelja (ml/min)
2	15 do 25
3	20 do 40
4	41 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 kapilarnih kolona (učinkovitost i propusnost) znače da razdvajanje spojeva i trajanje analize u velikoj mjeri ovise o protoku plina nositelja u koloni. Stoga je nužno optimizirati radne uvjete podešavanjem ovog parametra (ili jednostavnije promjene tlaka), ovisno o tome želi li se poboljšati razdvajanje ili postići veća brzina analize.

4.1.2. Određivanje broja teoretskih učinkovitosti i rezolucije

(Vidjeti Sliku 1.)

Obavi se analiza smjese metil-stearata i metil-oleata u približno jednakim udjelima (naprimjer, metil-esteri iz kakaovog maslaca).

Temperatura kolone i protok plina nositelja odaberu se tako da maksimum pika metil-stearata bude zabilježen oko 15 minuta nakon pika otapala. Upotrijebi se dovoljna količina smjese metil-estera, tako da pik metil-stearata doseže oko $\frac{3}{4}$ pune skale.

Izračuna se broj teoretskih tavana, n (učinkovitost), pomoću izraza:

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

i rezolucija, R, koristeći izraz:

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

pri čemu je:

dr_1 - zadržavanje udaljenosti u milimetrima od početka kromatograma do maksimuma pika metil-stearata;

ω_1 i ω_2 - širine, u milimetrima, pikova metil-stearata odnosno metil-oleata, mjereno između sjecišta tangentih u točkama infleksije krivulje s baznom linijom;

Δ - udaljenost, u milimetrima, između maksimuma pikova metil-stearata odnosno metil-oleata;

i - indeks rezolucije, lr, prema izrazu

$$\frac{a}{b}$$

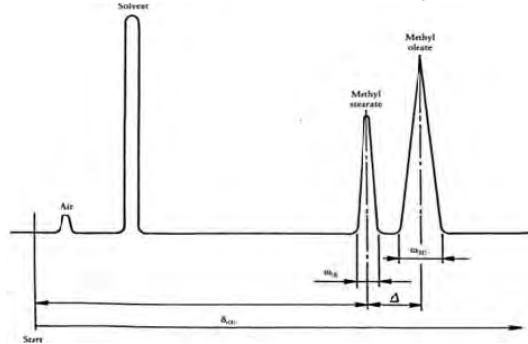
pri čemu je:

a = visina najmanjeg pika, mjerena od bazne crte;

b = visina najniže točke dola između dva susjedna pika, mjereno od bazne crte.

Slika 1.

Kromatogram za određivanje broja teoretskih tavana (učinkovitosti) i rezolucije



Radni uvjeti moraju biti tako odabrani da omoguće najmanje 2 000 teoretskih tavana po metru duljine kolone za metil-stearat i rezoluciju od najmanje 1,25.

4.2. Količina uzorka za ispitivanje

Pomoću šprice s iglom (3.2) uzme se 0,1 do 2 µl otopine metil-estera, pripremljene u skladu s Aneksom IX.b., i injektira u kolonu.

U slučaju estera koji nisu otopljeni, pripremi se otopina od približno 100 mg/ml u heptanu kromatografske kvalitete i injektira 0,1 do 1 ml te otopine.

Ako se analiziraju tvari prisutne samo u tragovima, veličina uzorka može se povećati (do 10 x).

4.3. Analiza

Općenito, radni uvjeti trebaju biti oni definirani u točki 4.1.1.

Međutim, moguće je raditi uz niže temperature kolone ako se traži određivanje masnih kiselina s manje od 12 C-atoma, ili uz više temperature ako se određuju masne kiseline s više od 20 C-atoma. U oba slučaja moguće je upotrijebiti temperaturno programiranje. Naprimjer, ako uzorak sadrži metil-estere masnih kiselina s manje od 12 C-atoma, uzorak se injektira pri 100 °C (ili pri 50-60 °C ako je prisutna maslačna kiselina) i odmah povisi temperaturu brzinom 4-8 °C/min do optimuma. U određenim slučajevima, ova se dva postupka mogu kombinirati.

Nakon programiranog zagrijavanja nastavi se eluiranje pri konstantnoj temperaturi dok sve komponente nisu eluirane. Ako uređaj nema programirano zagrijavanje, radi se na dvije stalne temperature između 100 i 195 °C.

Ako je potrebno, preporučuje se da se analiza obavi na dvije faze različitih polarnosti, kako bi se potvrdila odsutnost maskiranih pikova, naprimjer u slučaju istovremene prisutnosti C_{18:3} i C_{20:0}, ili konjugiranih C_{18:3} i C_{18:2}.

4.4. Priprema referentnog kromatograma i referentnih grafova

Analizira se referentni standard mješavine (2.3) u istim radnim uvjetima kao i za uzorak, te se izmjeri vrijeme zadržavanja udaljenosti za masne kiseline u standardu. Na polilogaritamskom papiru konstruiraju se, za svaki stupanj nezasićenosti posebno, grafovi koji prikazuju ovisnost logaritma

vremena ili zadržavanja udaljenosti kao funkcije broja C-atoma. U izotermalnim uvjetima, grafovi za ravnolančane kiseline istog stupnja nezasićenosti trebaju biti ravne crte. Te crte trebaju biti približno paralelne.

Treba izbjegavati uvjete koji bi mogli dovesti do »maskiranih pikova«, tj. gdje je rezolucija nedovoljna za razdvajanje dviju komponenata.

5. IZRAŽAVANJE REZULTATA

5.1. Kvalitativna analiza

Identificiraju se pikovi metil-estera za uzorak iz grafova pripremljenih u točki 4.4., ako je potrebno interpolacijom.

5.2. Kvantitativna analiza

5.2.1. Određivanje sastava

Osim u iznimnim slučajevima, koristi se metoda unutarnje normalizacije, tj. pretpostavi se da su sve komponente uzorka prisutne na kromatogramu, tako da ukupna površina ispod pikova predstavlja 100% sastojaka (potpuno eluiranje).

Ako oprema uključuje integrator, koriste se na taj način dobivene brojčane vrijednosti. Ako ne, odredi se površina ispod svakog pika množenjem visine pika s njegovom širinom na polovici visine i ako je potrebno uzme u obzir različito prigušenje tijekom ispisa.

5.2.2. Način izračuna

5.2.2.1. Opći slučaj

Izračuna se količina dane komponente i , izražena kao maseni postotak metil-estera, određivanjem postotka koji predstavlja površina odgovarajućeg pika u odnosu na sumu površina svih pikova, prema izrazu:

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

pri čemu je:

A_i - površina ispod pika koji odgovara komponenti i ;

ΣA - suma površina ispod svih pikova.

Rezultat se izražava na jedno decimalno mjesto.

Napomena 7: U ovom općem slučaju, smatra se da rezultat izračuna na temelju relativnih površina predstavlja maseni udio. Za slučajeve u kojima ova pretpostavka nije prihvatljiva, vidjeti točku 5.2.2.2.

5.2.2.2. Upotreba faktora korekcije

U određenim slučajevima, naprimjer u prisutnosti masnih kiselina s manje od osam C-atoma ili masnih kiselina sa sekundarnim grupama, kada se koriste detektori toplinske vodljivosti ili kada se zahtijeva najveći stupanj točnosti, trebaju se koristiti faktori korekcije za pretvorbu postotaka površine pika u masene udjele komponenata.

Faktori korekcije određe se uz pomoć kromatograma dobivenog analizom referentne smjese metil-estera poznatog sastava, izvršenom u istovjetnim radnim uvjetima kao pri analizi uzorka.

Za ovu referentnu smjesu, maseni udio komponente i dan je izrazom:

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

pri čemu je:

m_i - masa komponente i , u referentnoj smjesi;

$\sum m$ - zbroj masa različitih komponenata referentne smjese.

Iz kromatograma referentne smjese (4.4.) izračuna se postotak (površina/površina) za komponentu i , prema izrazu:

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

pri čemu je:

A_i - površina ispod pika koji odgovara komponenti i ;

$\sum A$ - suma površina ispod svih pikova.

Faktor korekcije tada se računa kao:

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

Uobičajeno, faktori korekcije izražavaju se u odnosu na KC16, tako da relativni faktori postaju:

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

Za uzorak, količina svake komponente i , izražena kao maseni udio metil-estera, je:

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

Rezultati se izražavaju na jedno decimalno mjesto.

5.2.2.3. Upotreba internog standarda

U određenim analizama (naprimjer kada se ne određuju količine svih masnih kiselina, kao npr. kad su uz kiseline s 16 i 18 C-atoma prisutne kiseline s 4 i 6 C-atoma ili kada je nužno odrediti apsolutnu količinu masne kiseline u uzorku) nužno je upotrijebiti interni standard. Obično se koriste masne kiseline s 5, 15 ili 17 C-atoma. Potrebno je odrediti faktor korekcije (ako postoji) za interni standard.

Maseni udio komponente i , izražene kao metil-ester, dan je izrazom:

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

pri čemu je:

A_i - površina ispod pika koji odgovara komponenti i ;

$\sum A$ - suma površina ispod svih pikova;

K'_i - faktor korekcije za komponentu i (u odnosu na K_{C16});

K_s' - faktor korekcije za interni standard (u odnosu na K_{C16});

m - masa uzorka u mg;

ms - masa internog standarda u mg.

Rezultati se izražavaju na jedno decimalno mjesto.

6. POSEBAN SLUČAJ - ODREĐIVANJE TRANS IZOMERA

Moguće je odrediti udio *trans* izomera u masnim kiselinama s 10-24 C-atoma, razdvajanjem metil-estera plinsko-kromatografskim kapilarnim kolonama specifične polarnosti.

6.1. Silikatna kapilarna kolona, unutarnjeg promjera između 0,25 i 0,32 mm i duljine 50 m, obložena cijanopropilsilikonom,

debljine sloja između 0,1 i 0,3 µm (tip SP 2380, C.P. sil 88, silor 10 i slični tipovi).

6.2. Metil-esteri pripremaju se prema postupku B. opisanom Aneksu IX.b. Kao mjera opreza, masne tvari s više od 3% slobodnih masnih kiselina moraju se neutralizirati u skladu s točkom 5.1.1 Aneksa VII.

6.3. Radni uvjeti za plinsku kromatografiju općenito su sljedeći:

- temperatura kolone postavljena između 150 °C i 230 °C (npr. 15 minuta pri 165 °C, povećavajući nakon toga za 5 °C u minuti do 200 °C);
- temperatura injektor-a: 250 °C ako se koristi sustav s razdvajanjem protoka, ili početna temperatura kolone ako se koristi sustav kolona;
- temperatura detektor-a: 260 °C;
- brzina protoka plina nositelja (helija i vodika): 1,2 ml u minuti.

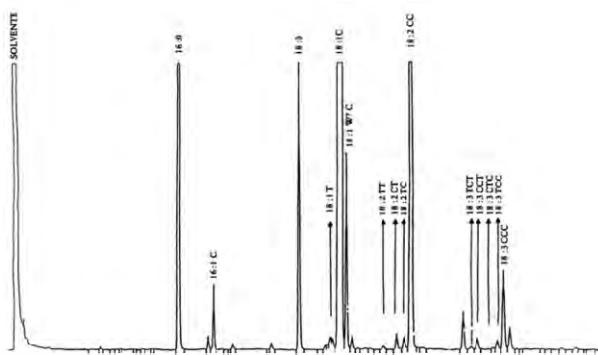
Injektirana količina mora biti takva da je u danim uvjetima osjetljivosti visina pika koji odgovara metil-esteru arahidonske kiseline jednaka ili veća od 20% na dnu ljestvice.

6.4. Identifikacija različitih metil-estera postiže se na osnovi vremena zadržavanja, koja se uspoređuju s onima za referentnu smjesu (kako je navedeno u točki 2.3.).

Esteri trans masnih kiselina eluiraju se prije odgovarajućih cis izomera. Primjer kromatograma dan je na slici 2.

Slika 2.

Plinski kromatogram trans izomera masnih kiselina uz upotrebu kapilarne kolone



6.5. Učinkovitost kolone, određena u skladu s točkom 4.1.2., mora biti takva da omogući separaciju određenih kritičnih parova, npr. formiranog para spajanjem pikova trans-izoleinske kiseline i oleinske kiseline (trans C18:1/cis C18:1), uz indeks rezolucije veći od 2.

6.6. Postotak različitih *trans* masnih kiselina računa se na temelju odnosa između površine pojedinog pika i sume površina svih prisutnih pikova.

U obzir se uzimaju postotci:

- *trans*-oktadecene kiseline (T 18:1) navedene u Aneksu I. ovoga Pravilnika kao suma transizomera oleinske kiseline;
- *cis-trans* i *trans-cis* oktadekadienske kiseline [(CT/TC) 18:2], navedenih u Aneksu I. ovoga Pravilnika kao suma trans izomera linolne kiseline;
- *trans-cis-trans*, *cis-cis-trans*, *cis-trans-cis*, *trans-cis-cis*-oktadekatrienske kiseline [(TCT + CCT + CTC + TCC) 18:3], navedenih u Aneksu I. ovoga Pravilnika kao suma trans izomera linolenske kiseline.

Napomena 8: Uzimajući u obzir posebna svojstva ove metode, rezultat se izražava na dva decimalna mjesta.

7. POSEBAN SLUČAJ UPOTREBA KATAROMETRA (DETEKTORA TOPLINSKE VODLJIVOSTI)

Plinski kromatograf s detektorom koji radi na principu promjena toplinske vodljivosti (katarometar) također se može koristiti za određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava smjese metil-estera masnih kiselina. Kada se koristi, uvjeti iz točaka 3. i 4. trebaju se modificirati kako je prikazano u Tablici 3.

Za kvantitativnu analizu koriste se faktori korekcije definirani u točki 5.2.2.2.

Tablica 3.

Varijabla	Vrijednost/uvjet
Kolona	Duljina: od 2 do 4 m Unutarnji promjer: 4 mm
Čvrsti nosač	Veličina zrna punila između 160 i 200 µm
Koncentracija stacionarne faze	15 do 25% (m/m)
Plin nositelj	Helij ili, ako nije dostupan, vodik, sa što je manje mogućim udjelom kisika
Pomoćni plinovi	Ne
Temperatura injektor-a	Od 40 do 60 °C iznad temperature kolone
Temperatura kolone	180 do 200 °C
Protok plina nositelja	Obično između 60 i 80 ml/min
Veličina injektiranog uzorka	Obično između 0,5 i 2 µl

8. ANALITIČKO IZVJEŠĆE

U analitičkom izvješću trebaju biti navedene metode pripreme metil-estera i plinsko kromatografske analize te dobiveni rezultati. Također treba navesti sve radne uvjete koji nisu specificirani u ovome Pravilniku ili su navedeni kao neobaveznici, zajedno s pojedinostima o bilo kakvim nepredviđenim dogadjajima koji bi mogli utjecati na rezultate.

Analitičko izvješće treba uključivati sve potrebne podatke za potpunu identifikaciju uzorka.

ANEKS IX.B.

1. PRIPREMA METIL-ESTERA MASNIH KISELINA IZ ULJA OD PLODA I KOMINE MASLINE

Sljedeće dvije metode preporučuju se za pripremu metil-estera masnih kiselina iz ulja od ploda i komine masline:

Metoda A:	Transesterifikacija hladnom metanolnom otopinom kalijevog hidroksida
Metoda B:	Metilacija zagrijavanjem s natrijevim metilatom u metanolu, iza čega slijedi esterifikacija u kiselom mediju

Izbor metode ovisi o analitičkom parametru koji se određuje i kategoriji ulja, kako je navedeno:

- (a) određivanje razlike između stvarnog i teoretskog udjela triglicerida s ECN42 (Δ ECN42):
 - metoda A primjenjuje se na uzorce svih kategorija ulja nakon pročišćavanja ulja prolaskom kroz kolonu silikagela;
- (b) određivanje sastava masnih kiselina:
 - metoda A primjenjuje se izravno na uzorce sljedećih kategorija ulja:
 - djevičansko maslinovo ulje s kiselosti višom od 3,3%,
 - rafinirano maslinovo ulje,
 - maslinovo ulje (mješavina djevičanskih maslinovih ulja i rafiniranog maslinovog ulja),
 - rafinirano ulje komine masline,
 - ulje komine masline (mješavina djevičanskih maslinovih ulja i rafiniranog ulja komine masline),

- metoda B primjenjuje se izravno na uzorke sljedećih kategorija ulja:
 - djevičansko maslinovo ulje s više od 3,3% slobodnih masnih kiselina,
 - sirovo ulje komine maslina;
- (c) određivanje trans izomera masnih kiselina:
- metoda A primjenjuje se izravno na uzorke sljedećih kategorija ulja:
 - djevičansko maslinovo ulje s manje od 3,3% slobodnih masnih kiselina,
 - rafinirano maslinovo ulje,
 - maslinovo ulje (mješavina djevičanskih maslinovih ulja i rafiniranog maslinovog ulja), rafinirano ulje komine maslina,
 - ulje komine maslina (mješavina djevičanskih maslinovih ulja i rafiniranog ulja komine maslina),
 - metoda A primjenjuje se na sljedeće kategorije ulja nakon pročišćavanja ulja prolaskom kroz kolonu silikagela:
 - djevičansko maslinovo ulje s više od 3,3% slobodnih masnih kiselina,
 - sirovo ulje komine maslina.

2. PROČIŠĆAVANJE UZORAKA ULJA

Kada je potrebno, uzorci ulja pročišćavaju se prolaskom kroz kolonu silikagela, eluiranjem smjesom heksana i dietiletera (87:13, v/v) kako je opisano u IUPAC metodi 2.507.

Druga mogućnost je ekstrakcija na čvrstoj fazi uz upotrebu SPE silikagel kolona. SPE silikagel kolona (1 g, 6 ml) smjesti se u uređaj za eluiranje pod vakuumom i ispere sa 6 ml heksana. Vakuum se isključi kako se kolona ne bi isušila, a zatim se u kolonu stavi otopina ulja (oko 0,12 g) u 0,5 ml heksana i uključi vakuum tako da otopina prodre u silikagel. Eluira se pod vakuumom s 10 ml smjese heksan/dietileter (87:13 v/v). Ukupni eluat se homogenizira i podijeli na dva po volumenu približno jednaka dijela. Prvi dio se upari do suha u rotacijskom vakuumskom uparivaču na sobnoj temperaturi. Ostatak se otopi u 1 ml heptana. Otopina je spremna za analizu masnih kiselina plinskom kromatografijom. Drugi dio se upari, a ostatak otopi u 1 ml acetona za analizu triglicerida HPLC metodom, ukoliko je potrebno.

3. METODE PRIPREME METIL-ESTERA MASNIH KISELINA

1. Metoda A: Transesterifikacija hladnom metanolnom otopinom kalijevog hidroksida

1.1. Svrha

Ova brza metoda primjenjiva je na ulja od ploda i komine maslina s manje od 3,3% slobodnih masnih kiselina. Slobodne masne kiseline ne esterificiraju se kalijevim hidroksidom. Etil-esteri masnih kiselina transesterificiraju se sporije od gliceridnih estera i mogu se samo djelomično metilirati.

1.2. Princip

Metil-esteri formiraju se transesterifikacijom s metanolnom otopinom kalijevog hidroksida, kao međufaza prije nego što nastupi saponifikacija (naslov 5 u BAS EN ISO 12966-2, naslov 5 u IUPAC metodi 2.301).

1.3. Reagensi

Metanol koji ne sadrži više od 0,5% (m/m) vode.

Heptan, kromatografske kvalitete.

Kalijev hidroksid, metanolna otopina koncentracije oko 2 mol/l: otopi se 11,2 g kalijevog hidroksida u 100 ml metanola.

1.4. Aparatura

Epruvete od 5 ml s navojnim čepom s PTFE spojem

Graduirane ili automatske pipete od 2 ml i 0,2 ml.

U epruvetu s navojnim čepom od 5 ml odvaje se oko 0,1 g uzorka ulja. Doda se 2 ml heptana i protrese. Doda se 0,2 ml 2 mol/l metanolne otopine kalijevog hidroksida, čvrsto zatvori i jako trese 30 sekundi. Ostavi se da se slegne dok se gornja otopina ne razbistri. Dekantira se gornji sloj koji sadrži metil-estere. Heptanska otopina pogodna je za injektiranje u plinski kromatograf. Preporučuje se čuvanje otopine u hladnjaku do plinsko-kromatografske analize, i ne dulje od 12 sati.

2. Metoda B: Metilacija zagrijavanjem s metanolnom otopinom natrijevog metilata, iza čega slijedi esterifikacija u kiselim mediju

2.1. Svrha

Ova metoda primjenjiva je na ulja od ploda i komine maslina s više od 3,3% slobodnih masnih kiselina.

2.2. Princip

Neutralizacija slobodnih masnih kiselina i alkalna metanoliza glicerida, nakon čega slijedi esterifikacija masnih kiselina u kiselim mediju (naslov 4.2. u IUPAC metodi 2.301).

2.3. Reagensi

- Heptan, kromatografske kvalitete
- Metanol koji ne sadrži više od 0,05% (m/m) vode
- 0,2 mol/l metanolna otopina natrijevog metilata: otopi se 5 g natrija u 1 000 ml metanola (može se pripremiti od otopina dostupnih na tržištu)
 - Fenolftalein, 0,2%-tina metanolna otopina
 - Sulfatna kiselina, 0,5 mol/l u metanolnoj otopini: u 100 ml metanola doda se 3 ml 96%-tne sulfatne kiseline
 - Zasićena otopina natrijevog klorida u vodi.

2.4. Aparatura

- Volumetrijske tikvice ravnog dna od 50 ml s dugim, uskim vratom od brušenog stakla
- Povratno hladilo: zračno hladilo (dugo 1 m) s brušenim spojevima prikladnim za grlo tikvice
 - kuglice za vrenje
 - stakleni lijevak.

2.5. Postupak

Oko 0,25 g uzorka ulja prenese se u volumetrijsku tikvicu s brušenim grlom od 50 ml. Uz pomoć lijevka doda se 10 ml 0,2 mol/l otopine natrijevog metilata u metanolu i kuglice za vrenje. Spoji se povratno hladilo, protrese i zagrije do vrenja. Otopina treba postati bistra, što se obično dogodi za oko 10 minuta. Reakcija je završena nakon 15 minuta. Tikvica se ukloni s izvora topline, pričeka da prestane vraćanje kondenzata, ukloni hladilo i doda dvije kapi otopine fenolftaleina. Doda se nekoliko ml 0,5 mol/l metanolne otopine sulfatne kiseline, sve dok otopina ne postane bezbojna, a zatim doda 1 ml u suvišku. Spoji se hladilo i stavi da ponovno vrije 20 minuta. Ukloni se s izvora topline i tikvica ohladi pod mlazom tekuće vode. Ukloni se hladilo, doda 20 ml zasićene otopine natrijevog klorida i protrese. Doda se 5 ml heptana. Tikvica se začepi i snažno trese 15 sekundi.

Ostavi se da se slegne dok se faze ne razdvoje. Ponovo se dodaje zasićena otopina natrijevog klorida dok vodenii sloj ne dosegne donji rub grla tikvice. Gornji sloj koji sadrži metil-estere ispunjava grlo tikvice. Ova je otopina spremna za injektiranje u plinski kromatograf.

Upozorenje: Metilacija metodom B mora se raditi u digestoru.

2.6. Alternative metilaciji prema Metodi B

2.6.1. Metoda C

2.6.1.1. Princip

Masna tvar koja se analizira tretira se metanolnom otopinom kloridne kiseline, u zatvorenoj kapsuli, pri 100 °C.

2.6.1.2. Aparatura

- Čvrsta staklena kapsula od oko 5 ml (visine 40 do 45 mm, promjera 14 do 16 mm)
- Graduirane pipete od 1 i 2 ml.

2.6.1.3. Reagensi

Otopina kloridne kiseline u 2%-tnom metanolu. Priprema se od plinovite kloridne kiseline i bezvodnog metanola (Napomena 1).

Heksan, kromatografske kvalitete.

Napomena 1: Mogu se koristiti otopine klorovodika u metanolu dostupne na tržištu. Male količine plinovite kloridne kiseline mogu se lako pripremiti u laboratoriju iz komercijalne otopine ($\rho = 1,18$) dodavanjem nekoliko kapi koncentrirane sulfatne kiseline. Budući da metanol vrlo brzo apsorbira kloridnu kiselinsku, preporučuju se uobičajene mjere opreza pri otapanju, npr. plin se uvodi kroz mali naopako okrenuti lijevak, čiji rub dodiruje površinu tekućine. Moguće je unaprijed pripremiti velike količine metanolne otopine kloridne kiseline, jer se može dobro čuvati na tamnom mjestu u staklenim bocama sa staklenim čepom. Kao druga mogućnost, ovaj se reagens može pripremiti otapanjem acetil klorida u bezvodnom metanolu.

2.6.1.4. Postupak

- U staklenu kapsulu stavi se 0,2 g masne tvari, prethodno osušene natrijevim sulfatom i filtrirane, i 2 ml metanolne otopine kloridne kiseline. Kapsula se zatvori plamenom.
- Kapsula se uroni na 100 °C na 40 minuta.
- Kapsula se ohladi pod mlazom tekuće vode, otvori, doda 2 ml destilirane vode i 1 ml heksana.
- Centrifugiranjem se odvoji heksanska faza, koja je spremna za upotrebu.

2.6.2. Metoda D

2.6.2.1. Princip

Masna tvar koja se analizira zagrijava se uz povrat sa smjesom metanola, heksana i sulfatne kiseline. Dobiveni metil esteri ekstrahiraju se petroleterom.

2.6.2.2. Aparatura

- Epruvete od oko 20 ml, sa zračnim povratnim hladilom duljine oko 1 m, sa spojevima od brušenog stakla
- Graduirane pipete od 5 ml
- Lijevak za odjeljivanje od 50 ml
- Čaše od 10 ml i 25 ml
- Epruvete od 15 ml s konusnim dnem.

2.6.2.3. Reagensi

- Reagens za metilaciju: bezvodna smjesa metanola, heksana i koncentrirane sulfatne kiseline ($\rho = 1,84$) u omjeru 75:25:1 (v/v/v)

- Petroleter, od 40 do 60 °C
- Bezvodni natrijev sulfat.

2.6.2.4. Postupak

U epruvetu od 20 ml stavi se 0,1 g ulja i doda 5 ml reagensa za metilaciju.

Spoji se povratno hladilo i zagrijava 30 minuta u kipućoj vodenoj kupelji (Napomena 2).

Smjesa se kvantitativno prenese u lijevak za odjeljivanje od 50 ml, uz pomoć 10 ml destilirane vode i 10 ml petroletera. Snažno se protrese i ostavi da se razdvoje faze, ukloni vodena faza i dvaput ispere eterski sloj s po 20 ml destilirane vode. U lijevak za odjeljivanje doda se mala količina bezvodnog natrijevog sulfata, protrese, ostavi da se slegne nekoliko minuta i filtrira, skupljajući filtrat u epruvetu od 15 ml s konusnim dnem.

Otapalo se ispari u vodenoj kupelji u struji dušika.

Napomena 2: Kako bi vrenje bilo kontrolirano, u epruvetu se stavi stakleni štapić, a temperatura vodene kupelji ne smije prijeći 90 °C.

3. Pokazatelji preciznosti

Statističku ocjenu preciznosti metoda A i B objavilo je Međunarodno vijeće za maslinovo ulje u svojoj metodi CO/T.20/CO. Br. 24.

4. PREPORUKE ZA PLINSKO-KROMATOGRAFSKU ANALIZU ESTERA MASNIH KISELINA IZ ULJA OD PLODA I KOMINE MASLINA

1. Postupak

Plinsko-kromatografska analiza otopina masnih estera u heptanu provodi se u skladu sa standardom BAS EN ISO 5508 uz upotrebu kapilarne kolone (duljine 50 m, unutarnjeg promjera 0,25 ili 0,32 mm) impregnirane cijanopropilsilikonskom fazom, kako je navedeno za određivanje *trans* izomera masnih kiselina (CO/T.20/Doc. Br. 17).

Na Slici 1. prikazan je tipični plinsko-kromatografski profil ulja komine maslina s metil i etil-esterima masnih kiselina te *trans* izomerima metil-estera.

2. Izračun

2.1. Za izračun sastava masnih kiselina i $\Delta ECN42$, u obzir se uzimaju sve navedene masne kiseline:

Miristinska (C14:0);

Palmitinska (C16:0). Suma površina pikova koji odgovaraju metil i etil-esterima;

Palmitoleinska (C16:1). Suma površina pikova koji odgovaraju $\omega 9$ i $\omega 7$ izomerima metil-estera;

Heptadekanska/margarinska (C17:0);

Heptadecenska/margaroleinska (C17:1);

Stearinska (C18:0);

Oleinska (C18:1). Suma površina pikova koji odgovaraju $\omega 9$ i $\omega 7$ izomerima metil-estera, etil-esterima i *trans* izomerima metil-estera;

Linolna (C18:2). Suma površina pikova koji odgovaraju metil i etil-esterima i *trans* izomerima metil-estera;

Arahinska (C20:0);

Linolensa (C18:3). Suma površina pikova metil-estera i *trans* izomera metil-estera;

Gadoleinska (C20:1);

Behenska (C22:0);

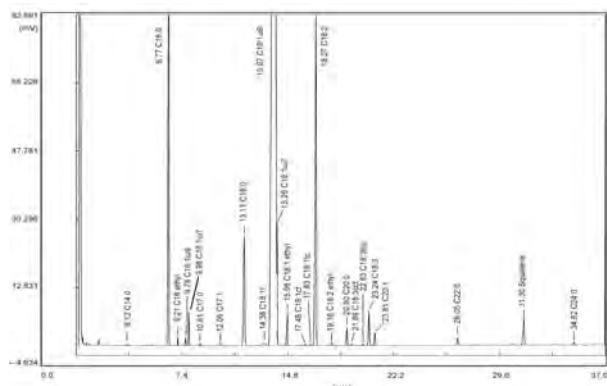
Lignocerinska (C24:0).

Skvalen se ne uzima u obzir za izračun ukupne površine.

2.2. Za izračun postotka *trans*-C18:1 koristi se pik koji odgovara metil-esterima ove masne kiseline. Za sumu [*trans*-C18:2 + *trans*-C18:3], zbrajaju se svi pikovi koji odgovaraju *trans* izomerima ovih dviju masnih kiselina. Za izračun ukupne površine, uzimaju se u obzir svi pikovi navedeni u 2.1. (vidjeti CO/T.20/Doc. Br. 17).

Postotak svake masne kiseline izračunava se prema formuli:

$$\% X = (\text{površina } X \times 100) / (\text{ukupna površina})$$



Slika 1.: Plinsko-kromatografski profil dobiven metodom hladne metilacije iz ulja komine maslina. Kromatografski pikovi odgovaraju metil i etil-esterima, ako nije drukčije naznačeno.

ANEKS X.

ODREDIVANJE UDJELA HALOGENIRANIH OTAPALA U MASLINOVOM ULJU

1. METODA

Analiza plinskog kromatografijom i primjenom tehnike nadprostora (*head space*).

2. OPREMA

2.1. Plinski kromatograf s detektorom elektroničkog zahvata (ECD)

2.2. Oprema za *head space* tehniku

2.3. Staklena kromatografska kolona za plinsku kromatografiju duljine 2 m i promjera 2 mm. Stacionarna faza: 10% OV 101 ili ekvivalentna, impregnirana na kalcificiranu diatomskoj zemlji, isprana kiselinom i silanizirana; veličine čestica 80-100 mesh.

2.4. Plin nositelj i pomoćni plin: dušik za plinsku kromatografiju, prikladan za ECD detektor

2.5. Staklene tikvice od 10 do 15 ml, s teflonskom prevlakom i aluminijskim prstenom, što omogućuje zatvaranje tikvice i uzimanje uzorka iglom šprice

2.6. Klijesta za hermetičko zatvaranje

2.7. Šprica s iglom za plin od 0,5 do 2 ml.

3. REAGENSI

Standard: halogenirana otapala čistoće prikladne za plinsku kromatografiju.

4. POSTUPAK

4.1. Točno se odvaže oko 3 g ulja u staklenu tikvicu (koja se ne može ponovno upotrijebiti) koja se hermetički zatvori. Tikvica se ostavi u termostatu jedan sat pri 70 °C. Pomoću šprice se iz parne faze, koja je u ravnoteži s tekućinom (*head space*), usiše između 0,2 i 0,5 ml te se injektira u kolonu plinskog kromatografa koji je podešen na sljedeće uvjete:

- temperatura injektor-a: 150 °C
- temperatura kolone: 70 – 80 °C
- temperatura detektora: 200 – 250 °C.

Može se raditi i na drugim temperaturama uz uvjet da rezultati ostanu ekvivalentni.

4.2. Referentne otopine: standardne otopine pripremaju se koristeći rafinirano maslinovo ulje bez tragova otapala, u koncentracijama između 0,05 i 1 ppm (mg/kg), ovisno o predviđenom udjelu halogeniranih otapala u uzorku. Halogenirana otapala mogu se po potrebi razrijediti pentanom.

4.3. Kvantitativno odredivanje: uspostavi se korelaciju između površina ili visina pikova uzorka i površina/visina pikova standardne otopine čija je koncentracija najbljiža očekivanoj

koncentraciji. Ukoliko je odstupanje veće od 10%, potrebno je ponoviti analizu usporednom s drugom standardnom otopinom dok se ne postigne odstupanje manje od 10%. Udio se određuje na temelju prosjeka pojedinačnih injektiranja.

4.4. Izražavanje rezultata: u ppm (mg/kg). Granica osjetljivosti metode je 0,01 mg/kg.

ANEKS XI.

METODA MEĐUNARODNOG VIJEĆA ZA MASLINU ZA SENZORSKO OCJENJIVANJE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

1. SVRHA I PRIMJENA

Ovim se Aneksom propisuje postupak ocjene senzorskih svojstava djevičanskih maslinovih ulja u smislu članka 2. stavak (2) točke a) ovoga pravilnika, te postupak njihove klasifikacije na temelju tih svojstava. Ovaj Aneks sadrži i upute za neobavezno označavanje proizvoda.

Ova se metoda može primjenjivati samo za klasificiranje i označavanje djevičanskih maslinovih ulja na temelju intenziteta utvrđenih negativnih svojstava, intenziteta voćnog mirisa i okusa te ostalih pozitivnih svojstava, što obavlja skupina odabralih, uvježbanih i provjerjenih ocjenjivača, koji čine panel.

2. OPĆENITO

U pogledu definicija osnovnih pojmoveva, prostorija za ocjenjivanje, časa za kušanje te bilo kojeg drugog pitanja vezanog uz ovu metodu, preporučuje se sukladnost s odredbama posebnog propisa o reviziji metode za senzorsko ocjenjivanje djevičanskih maslinovih ulja.

3. SPECIFIČNI RJEČNIK

3.1. Pozitivna svojstva

Voćno: ukupnost mirisnih svojstava (ovisno o sorti) karakterističnih za ulje od zdravih i svježih plodova, bilo zelenih ili zrelih, zapaženih izravno ili neizravno (retronazalno).

Svojstvo voćno definira se zelenim ako mirisna svojstva podsećaju na zelene plodove, tj. karakteristična su za ulje dobiveno od zelenih plodova.

Svojstvo voćno definira se zrelim ako mirisna svojstva podsećaju na zrele plodove, tj. karakteristična su za ulje dobiveno od zelenih i zrelih plodova.

Gorko: karakterističan okus ulja dobivenog od zelenih ili djelomično obojenih maslina, koji se percipira putem okruženih papila, poredanih na jeziku u obliku slova V.

Pikantno: taktički osjet peckanja svojstven uljima proizvedenim na početku sezone, uglavnom od još nedozrelih maslina, koji se može raspoznati po cijeloj usnoj šupljini, a osobito u grlu.

3.2. Negativna svojstva

Budav plod/uljni talog: prepoznatljiv okus i miris ulja dobivenog od sabijenih maslina kod kojih je došlo do visokog stupnja anaerobne fermentacije ili ulja koje je ostalo u dodiru s uljnim talogom koji je fermentirao anaerobnim uvjetima.

Pjesnivo/vlažno: prepoznatljiv okus i miris ulja od maslina na kojima je došlo do značajnog razvoja plijesni i kvasaca kao posljedica čuvanja u vlažnim uvjetima više dana.

Vinski-octikavo/kiselo: prepoznatljiv okus i miris nekih ulja koji podsjeća na vino ili ocac. Uzrokovani je prvenstveno aerobnom fermentacijom maslina ili ostataka maslinovog tjestea na neodgovarajuće očišćenim slojnicama, što dovodi do stvaranja octene kiseline, etil acetata i etanola.

Metalno: okus i miris koji podsjeća na metal. Svojstven je uljima koja su duže vrijeme bila u dodiru s metalnim površinama tijekom mljevenja, miješanja, prešanja ili skladištenja.

Užeglo: prepoznatljiv okus i miris ulja koja su bila izložena intenzivnim oksidacijskim procesima.

Kuhano ili prekuhan: prepoznatljiv okus i miris uzrokovani pretjeranim i/ili predugim zagrijavanjem tijekom prerade, a osobito miješenjem maslinovog tjesteta u termički nepovoljnim uvjetima.

Sijeno/drvo: prepoznatljiv okus i miris nekih ulja koja potječe od sasušenih plodova maslina.

Teško (grubo): osjećaj gustoće i pastoznosti u ustima koji daju pojedina stara ulja.

Sredstvo za podmazivanje: okus i miris ulja koji podsjeća na naftu odnosno na mineralno ulje ili mast za podmazivanje.

Biljna voda: okus i miris koji poprimaju ulja koja su dulje bila u dodiru s fermentiranom bilnjom vodom.

Salamura: okus i miris ulja dobivenog od maslina koje su prije prerade čuvane u otopini soli.

Slojnica: okus i miris karakterističan za ulja dobivena od maslina prešanih na novim slojnicama od biljnih vlakana, a različit je ovisno o tome jesu li slojnica načinjene od zelenih ili suhih vlakana.

Zemlja: okus i miris ulja dobivenog od maslina sakupljenih sa zemljom ili blatinjavih i neopranih maslina.

Crvljivo: okus i miris ulja dobivenog od maslina jako napadnutih ličinkama maslinove mušice (*Bactrocera oleae*).

Krastavac: okus i miris karakterističan za ulja predugo čuvana u hermetički zatvorenim posudama, osobito limenim, a potječe od stvaranja 2,6-nonadienal-a.

Vlažno drvo: okus i miris karakterističan za ulja dobivena od maslina koje su bile smrznute na stablu.

3.3. Neobavezna terminologija pri označavanju proizvoda

Na zahtjev, voditelj panela može izdati potvrdu o sukladnosti ulja s tvrdnjama i intervalima koji, u pogledu intenziteta i percepcije svojstava, odgovaraju sljedećim pridjevima:

a) za svako od pozitivnih svojstava iz točke 3.1. (voćno, eventualno definirano kao nedozrelo ili zrelo, te pikantno i gorko):

i) pojam "intenzivno" može se koristiti kad je medijan svojstva veći od 6;

ii) pojam "srednje" može se koristiti kad je medijan svojstava između 3 i 6;

iii) pojam "blago" može se koristiti kad je medijan svojstava manji od 3;

iv) pojedina svojstva mogu se označiti na proizvodu i bez pojmove pod i), ii) i iii) kad je medijan dotičnog svojstva veći ili jednak 3;

b) pojam »skladno« može se koristiti za ulje koje nije neuravnoteženo. Pod neuravnoteženim se podrazumijevaju okusno-mirišna i taktilna svojstva ulja čiji je medijan intenzitet za gorko i/ili pikantno za dvije i više točki veći od medijana intenziteta voćnog;

c) pojam "blago ulje" može se koristiti za ulje čiji su medijani intenziteta za gorko i pikantno manji ili jednak 2.

4. PANEL

Panel čine voditelj panela i 8-12 ocjenjivača.

Voditelj panela treba biti izvježbani stručnjak koji dobro poznaje različite vrste ulja. Voditelj je odgovoran za organizaciju i djelovanje panela, uključujući pripremu, šifriranje i dostavljanje uzoraka ocjenjivačima, te za prikupljanje i statističku obradu podataka.

Voditelj odabire ocjenjivače, brine se za njihovu obuku i provjerava njihovu sposobnost ocjenjivanja s ciljem održavanja na prikladnoj razini.

Ocenjivači moraju biti odabrani i obučeni na temelju svojih sposobnosti razlikovanja sličnih uzoraka, u skladu s priručnikom Međunarodnog vijeća za maslinu o odabiru, obuci i nadzoru kvalificiranih ocjenjivača maslinovog ulja.

Panel mora sudjelovati u senzorskim analizama na nacionalnoj, EU i međunarodnoj razini, organiziranim u svrhu redovitog nadzora i uskladivanja kriterija opražanja. Takoder mora svake godine dostaviti državi članici potpune informacije o sastavu panela i broju analiza obavljenih u svojstvu odobrenog panela.

5. POSTUPAK SENZORSKE ANALIZE I KLASIFICIRANJE

5.1. Upotreba ocjenjivačkog listića od strane ocjenjivača
Listić koji koriste ocjenjivači prikazan je u Dodatku A.

Svaki ocjenjivač mora pomirisati, a zatim i kušati⁽¹⁾ ulje koje se nalazi u čaši za ocjenjivanje te na linjskoj ljestvici od 10 cm na obrascu za ocjenjivanje označiti intenzitet svakog negativnog i pozitivnog svojstva. Ako ocjenjivač raspozna zeleni ili zreli tip voćnog mirisa i okusa, tada to treba označiti u odgovarajućem kvadratiku na obrascu za ocjenjivanje.

Ako ocjenjivač zamijeti negativna svojstva koja nisu navedena na listiću, ona se moraju navesti pod "Ostalo", koristeći gore navedene izraze ili pojmove koji ih najbolje opisuju.

⁽¹⁾Ocenjivač se može suzdržati od degustacije ako se osjeće neke vrlo intenzivne negativne karakteristike kada miriše ulje, u tom slučaju mora navesti ovu izvanrednu okolnost i opis stanja.

5.2. Obrada podataka od strane voditelja panela

Voditelj panela skuplja ispunjene listiće i provjerava intenzitete označene za pojedina svojstva. U slučaju uočene nepravilnosti, voditelj treba zatražiti od ocjenjivača da pregledaju svoje listiće i, ako je to potrebno, ponove analizu.

Voditelj panela može unijeti podatke svakog ocjenjivača u računalni program za izračun medijana prema metodi navedenoj u Dodatku B. Podaci za svaki uzorak unose se u tablicu od 9 stupaca za 9 senzorskih svojstava i po jednog retka za svakog ocjenjivača.

Ako više od 50% članova panela navede negativno svojstvo pod "Ostalo", voditelj mora i za to svojstvo izračunati medijan te u skladu s time klasificirati ulje.

Voditelj panela može izdati potvrdu o sukladnosti ulja sa zahtjevima iz točke 3.3.a) za korištenje pojmove nedozrelo ili zrelo samo ako je najmanje 50% članova panela označilo da ulje ima dotični tip voćnog mirisa i okusa.

U slučaju analize u svrhu nadzora sukladnosti sa standardima, ocjenjivanje uzorka provodi se jedanput. Za potrebe druge analize, ocjenjivanje uzorka provodi se u dva ponavljanja. Za potrebe konačne odluke, ocjenjivanje uzorka provodi se u tri ponavljanja. Medijani svojstava u tim se slučajevima računaju kao srednje vrijednosti medijana svakog pojedinog ponovljenog ocjenjivanja. Svako od ponovljenih ocjenjivanja moraju se obaviti u odvojenim sjednicama.

5.3. Klasificiranje uzorka ulja

Ulje se klasificira u niže navedene kategorije, prema medijanu negativnih svojstava i medijanu voćnog mirisa. Pod medijanom negativnih svojstava podrazumijeva se medijan negativnog svojstva s najvećim intenzitetom. Medijan negativnog svojstva i medijan voćnog mirisa izražavaju se s jednim decimalnim mjestom, a vrijednost grubog koeficijenta varijacije za dotični svojstva mora biti manja ili jednak 20%.

Klasificiranje uzorka ulja provodi se usporedbom vrijednosti medijana negativnih svojstava i medijana voćnog mirisa s niže navedenim rasponima. Rasponi su određeni uvezvi u obzir grešku metode, pa se smatraju apsolutnima. Pomoću računalnog programa moguće je predočiti klasifikaciju u obliku tablice te u obliku grafičkog prikaza.

(a) Ekstra djevičansko maslinovo ulje: medijan negativnih svojstava jednak nuli, a medijan voćnog mirisa veći od nule;

- (b) Djevičansko maslinovo ulje: medijan negativnih svojstava veći od nule i manji ili jednak 3,5 a medijan voćnog mirisa veći od nule;
- (c) Maslinovo ulje lampante: medijan negativnih svojstava veći od 3,5; ili medijan negativnih svojstava manje ili jednak 3,5 a medijan voćnog mirisa jednak nuli.

5.4. Poseban slučaj

Ako je medijan pozitivnog svojstva, izuzev voćnog mirisa, veći od 5,0, voditelj panela to mora naznačiti na analitičkom izvješću.

DODATAK A.

OBRAZAC ZA OCJENJIVANJE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

ZAMIJEĆENA NEGATIVNA SVOJSTVA	INTENZITET	
Upaljen plod/uljni	→	
Pljesnivo/vlažno	→	
Vinski-octikavo/kiselo	→	
Metalno	→	
Užeglo	→	
Ostalo (navesti)	→	
ZAMIJEĆENA POZITIVNA SVOJSTVA		
Voćno	→	
≤ nedozrelo	≤zrelo	
Gorko	→	
Pikantno	→	
Ime ocjenjivača:		
Šifra uzorka:		
Datum:		
Komentari:		

DODATAK B.

METODA IZRAČUNA MEDIJANA I INTERVALA POUZDANOSTI

Medijan

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

Medijan je realni broj Xm za koji vrijedi da je vjerojatnost (P) da vrijednosti distribucije (X) budu niže od tog broja, manja ili jednako 0,5 te da je istovremeno vjerojatnost (P) da vrijednosti distribucije (X) budu manje ili jednake Xm veća ili jednako 0,5. Prema drugoj definiciji je medijan 50-ti postotnik unutar distribucije brojeva u rastućem nizu. Drugim riječima, medijan predstavlja središnju vrijednost serije s neparnim brojem elemenata ili srednju vrijednost dvaju središnjih elemenata u seriji s parnim brojem elemenata.

Gruba standardna devijacija

U cilju pouzdanog procjenjivanja varijabilnosti oko medijana, koristi se procjena grube standardne devijacije prema Stuart i Kendallu. Sljedeća jednadžba prikazuje asimptotsku standardnu devijaciju, tj. grubu procjenu varijabilnosti

promatranih podataka, pri čemu N predstavlja broj podataka, a IQR je međukvartilni interval. IQR obuhvaća točno 50% slučajeva u bilo kojoj distribuciji vjerojatnosti.

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

Međukvartilni interval izračunava se računanjem razlike između 75-tog i 25-tog postotnika.

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

Postotnik je ona vrijednost Xpc za koju vrijedi da je vjerojatnost (P) da vrijednosti distribucije budu manje od Xpc niže ili jednaka određenom postotku, te da je istovremeno vjerojatnost (P) da vrijednosti distribucije budu manje ili jednake Xpc veća ili jednaka tom postotku. Postotak ukazuje na odabrani dio distribucije. U slučaju medijana ovaj odabrani dio je 50/100.

$$\text{Postotnik} = \left[P(X < Xpc) \leq \frac{n}{100} \wedge P(X \leq Xpc) \geq \frac{n}{100} \right]$$

Drugim riječima, postotnik je ona vrijednost distribucije koja odgovara određenoj površini ispod krivulje distribucije ili gustoće. Naprimjer, 25. postotnik predstavlja vrijednost distribucije koja odgovara površini od 0,25 ili 25/100.

Grubi koeficijent varijacije (%)

Grubi koeficijent varijacije (rVC) predstavlja čisti broj, tj. bezdimenzijsku veličinu, koja ukazuje na postotak varijabilnosti analizirane serije brojeva; iz tog razloga ovaj je koeficijent posebno koristan za ispitivanje pouzdanosti ocjenjivača u panelu.

$$rVC\% = \frac{S}{Me} 100$$

Interval pouzdanosti od 95% u odnosu na medijan

Interval pouzdanosti (I.C.) od 95% (vrijednost pogreške prve vrste iznosi 0,05 ili 5%) je interval unutar kojega bi vrijednost medijana mogla varirati kada bi bilo moguće bezbroj puta ponoviti ocjenjivanje. Praktično predstavlja interval varijabilnosti ocjenjivanja u danim uvjetima rada, u slučaju da se ono ponavlja više puta. Interval pomaže u procjeni pouzdanosti ocjenjivanja, kao i u slučaju (rVC%) grubog koeficijenta varijacije.

$$I.C. \text{ gornji} = Me + (c.S^*)$$

$$I.C. \text{ donji} = Me - (c.S^*)$$

pri čemu c u slučaju pouzdanosti od 0,95 ima vrijednost 1,96.

ANEKS XII. ODREĐIVANJE STIGMASTADIENA U BILJNIM ULJIMA

1. SVRHA

Određivanje stigmastadiena u biljnim uljima, koja sadrže te ugljikovodike u malim količinama, a posebno u djevičanskem maslinovom ulju i sirovom ulju iz komine maslina.

2. PRIMJENA

Metoda se može primijeniti na sva biljna ulja, ali je pouzdana samo kad se količina ovih ugljikovodika kreće od 0,01 do 4,0 mg/kg. Metoda je posebno pogodna za utvrđivanje prisutnosti rafiniranih biljnih ulja (maslinovog, komine maslina, suncokretovog, palminog itd.) u djevičanskem maslinovom ulju,

jer rafinirana ulja za razliku od djevičanskih sadrže stigmastadiene.

3. PRINCIP

Izdvajanje neosapunjivog. Odjeljivanje steroidne ugljikovodične frakcije kromatografijom na koloni sa silikagelom te analiza kapilarnom plinskom kromatografijom.

4. APARATURA

4.1. Tikvice s okruglim dnem od 250 ml, prikladne za upotrebu s povratnim hladilom.

4.2. Lijevci za odjeljivanje od 500 ml.

4.3. Tikvice s okruglim dnem od 100 ml.

4.4. Rotirajući vakuum-uparivač.

4.5. Staklena kromatografska kolona (unutarnjeg promjera 1,5-2,0 cm, duljine 50 cm), s teflonskim pipcem te čepom od staklene vune ili pločicom od sinter stakla na dnu. Kolona se priprema ulijevanjem heksana do visine od oko 5 cm te nadolijevanjem suspenzije 15 g silikagela u 40 ml heksana, uz pomoć malih količina heksana. Ravnomjerno punjenje kolone postiže se laganim tresenjima. Doda se bezvodni natrijev sulfat do visine sloja od oko 0,5 cm. Svišak heksana se eluira.

4.6. Plinski kromatograf s plameno-ionizacijskim detektorom, injektorom s razdvajanjem protoka (tipa *split*) ili tipa *splitless* za izravno unošenje u kolonu (cold on-column) te peći s mogućnošću programiranja temperature uz maksimalno odstupanje od $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.7. Kapilarna silikatna kolona za plinsku kromatografiju (unutarnjeg promjera 0,25 ili 0,32 mm, duljine 25 m) sa stacionarnom fazom koja sadrži 5% fenilmetilsilikona, debljine sloja 0,25 mm.

Napomena 1:

Mogu se upotrijebiti i druge kolone slične ili niže polarnosti.

4.8. Pisač-integrator s mogućnošću integriranja između dva minimuma (*valley-valley*).

4.9. Mikrolitarska šprica za plinsku kromatografiju od 5 do 10 ml sa čvrsto fiksiranim iglom.

4.10. Električni grijači plašt ili ploča.

5. REAGENSI

Ako nije drukčije naznačeno, svi reagensi trebaju biti p.a. čistoće. Voda treba biti destilirana ili ekvivalentne čistoće.

5.1. Heksan ili mješavina alkana s rasponom vrelišta od 65 do 70°C , destiliran na koloni za rektifikaciju.

Napomena 2:

Otapalo se mora destilirati kako bi se uklonile nečistoće.

5.2. 96%-tni etanol (v/v).

5.3. Bezwodni natrijev sulfat.

5.4. Alkoholna otopina kalijevog hidroksida, 10%-tina. 10 ml vode doda se u 50 g kalijevog hidroksida, promješa i nadopuni do 500 ml etanolom.

Napomena 3:

Ova otopina tijekom stajanja mijenja boju u smeđu pa je treba svježe pripremati svakog dana i čuvati u dobro začepljenim bocama od tamnog stakla.

5.5. Silikagel 60 za kromatografiju na koloni, 70-230 mesh (Merck, ref. 7734 ili drugi odgovarajući).

Napomena 4:

U pravilu, može se koristiti silikagel iz izvornog pakiranja bez bilo kakve obrade. Međutim, neke proizvodne serije silikagela pokazuju nižu aktivnost, što dovodi do lošeg kromatografskog razdvajanja. U tom se slučaju silikagel obrađuje na sljedeći način: aktivira se zagrijavanjem na 550°C najmanje četiri sata. Nakon zagrijavanja, silikagel se smjesti u eksikator, gdje se hlađi te zatim prebacu u tikvicu s čepom. Doda se 2% vode i trese do nestanka grudica i postizanja sipkosti.

Serijsi silikageli koje dovode do interferencije pikova kromatograma moraju se obraditi kako je gore opisano. Kao alternativa, može se upotrijebiti ekstra čisti silikagel 60 (Merck, ref. 7754).

5.6. Početna otopina (200 ppm) kolesta-3,5-diena (Sigma, čistoće 99%) u heksanu (10 mg u 50 ml).

5.7. Standardna otopina kolesta-3,5-diena u heksanu koncentracije 20 ppm, pripremljena razrjeđivanjem početne otopine.

Napomena 5:

Otopine 5.6. i 5.7. ostaju stabilne barem četiri mjeseca ako se čuvaju na temperaturi ispod 4°C .

5.8. Otopina n-nonakosana u heksanu, koncentracije približno 100 ppm.

5.9. Plin nositelj za plinsku kromatografiju: vodik ili helij čistoće 99,9990%.

5.10. Pomoći plinovi za plameno-ionizacijski detektor: vodik čistoće 99,9990% i pročišćeni zrak.

6. POSTUPAK

6.1. Priprema neosapunjivih tvari

6.1.1. Odvajaže se $20 \pm 0,1$ g ulja u tikvicu od 250 ml (4.1.), doda 1 ml standardne otopine kolesta-3,5-diena (20 μg) i 75 ml 10%-tne alkoholne otopine kalijevog hidroksida. Prikluči se povratno hladilo i 30 minuta lagano kuha. Tikvica s uzorkom se ohlađi (ne sasvim, jer se tada sadržaj skrutiće) te se doda 100 ml vode i prebacu u lijevak za odjeljivanje (4.2.) pomoći 100 ml heksana. Sadržaj se snažno miješa 30 sekundi i zatim ostavi mirovati radi razdvajanja faza.

Napomena 6:

U slučaju stvaranja vrlo stabilne emulzije, dodaju se male količine etanola.

6.1.2. Donji vodeni sloj prenese se u sljedeći lijevak za odjeljivanje i ponovno ekstrahira sa 100 ml heksana. Nakon odbacivanja donjeg vodenog sloja, heksanski ekstrakti (spojeni u drugom lijevku za odjeljivanje) isperu se tri puta s po 100 ml smjese etanol-voda (1:1), do neutralnog pH.

6.1.3. Isprani heksanski slojevi propuste se preko bezvodnog natrijevog sulfata (50 g), isperu s 20 ml heksana i upare do suha pomoći rotacijskog vakuumskog uparivača na 30°C .

6.2. Izdvajanje frakcije steroidnih ugljikovodika

6.2.1. Ostatak nakon isparavanja prenese se u kolonu pomoći dva puta po 1 ml heksana. Uzorak se propusti kroz kolonu tako da se razina otopine spusti do površine natrijevog sulfata. Eluira se heksanom uz brzinu protoka od oko 1 ml/min. Odbaci se prvi 25-30 ml, a sljedećih 40 ml skupi i prebacu u tikvicu s okruglim dnem od 100 ml (4.3).

Napomena 7:

Prva frakcija sadrži zasićene ugljikovodike (Slika 1.a.), a druga steroidne ugljikovodike. Daljnjim eluiranjem dobiva se skvalen i srođni spojevi. U cilju zadovoljavajućeg razdvajanja između zasićenih i steroidnih ugljikovodika, potrebno je optimirati volumene frakcija. Volumen prve frakcije treba podesiti tako da pri analizi druge frakcije pikovi koji pripadaju zasićenim ugljikovodicima budu niski (Slika 1.c.). U slučaju da se ti pikovi ne pojave, a istovremeno je pik internog standarda nizak, nužno je smanjiti volumen. U svakom slučaju, potpuno razdvajanje komponenata prve i druge frakcije nije nužno, budući da prilikom analize plinskom kromatografijom u uvjetima opisanim u točki 6.3.1. ne dolazi do preklapanja pripadajućih pikova. Optimiranje volumena druge frakcije uglavnom nije potrebno, jer dolazi do dobrog razdvajanja daljnijih komponenata. Međutim, pojava velikog pika koji pripada skvalenu, s vremenom zadržavanja oko 1,5 minute kraćim u odnosu na interni standard, ukazuje na loše razdvajanje frakcija.

6.2.2. Druga frakcija otparava se do suha pomoću rotacijskog vakuumskog uparivača pri 30 °C, a ostatak se odmah otopi u 0,2 ml heksana. U ovom obliku otopina se može čuvati do analize u hladnjaku.

Napomena 8:

Ostaci iz točaka 6.1.3. i 6.2.2. ne smiju se čuvati suhi niti na sobnoj temperaturi. Čim se dobiju, treba dodati otapalo i čuvati otopine u hladnjaku.

6.3. Plinska kromatografija

6.3.1. Uvjeti rada za sustav injektiranja s razdvajanjem protoka:

- temperatura injektor-a: 300 °C,
- temperatura detektor-a: 320 °C,
- pisač-integrator: parametri integriranja trebaju biti podešeni tako da omoguće ispravnu procjenu površina. Preporučuje se način integriranja između dva minimuma (*valley-valley*),
- osjetljivost: oko 16 puta veća u odnosu na najmanje prigušenje,
- količina injektiranog uzorka: 1 µl,
- programiranje temperature peći: početno 235 °C/6 min, zatim povećavati za 2 °C/min do 285 °C,
- injektor s razdvajanjem protoka (split) u omjeru 1:15,
- plin nositelj: helij ili vodik pod tlakom od oko 120 kPa.

Ovi se uvjeti mogu prilagoditi svojstvima plinskog kromatografa i kolone tako da se dobiju kromatogrami koji udovoljavaju sljedećim zahtjevima: pik internog standarda mora se pojaviti uz odstupanje od približno 5 minuta u odnosu na vrijeme navedeno u točki 6.3.2.; visina pika internog standarda mora dosezati najmanje 80% pune skale kromatograma.

Kromatografski sustav treba provjeriti injektiranjem smjese početne otopine kolestadiena (5.6.) i otopine n-nonakosana (5.8.). Pik kolesta-3,5-diena treba se pojaviti na kromatogramu prije n-nonakosana (Slika 1c); u suprotnom potrebno je sniziti temperaturu peći i/ili primijeniti kolonu niže polarnosti.

6.3.2. Identifikacija pikova

Pik internog standarda javlja se nakon približno 19 minuta, dok pik 3,5-stigmastadiena ima relativno vrijeme zadržavanja od oko 1,29 (Slika 1b.). 3,5-stigmastadien se javlja s malim količinama izomera, a obično oba eluiraju zajedno dajući jedinstveni pik. Međutim, u slučaju previsoke polarnosti kolone ili visoke moći razdvajanja, izomer se može pojaviti kao mali pik neposredno ispred pika 3,5-stigmastadiena (Slika 2.). Kako bi se osiguralo da se oba izomera pojave zajedno kao jedinstveni pik, preporučuje se upotreba manje polarne kolone ili kolone većeg unutarnjeg promjera.

Napomena 9:

Referentni kromatogram stigmastadiena može se dobiti analizom rafiniranog biljnog ulja uz korištenje manjih količina uzorka (1-2 g). Stigmastadieni daju uočljiv i lako prepoznatljiv pik.

6.3.3. Kvantitativna analiza

Udio stigmastadiena određuje se pomoću sljedećeg izraza:

$$\text{mg/kg stigmastadiena} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

pri čemu je:

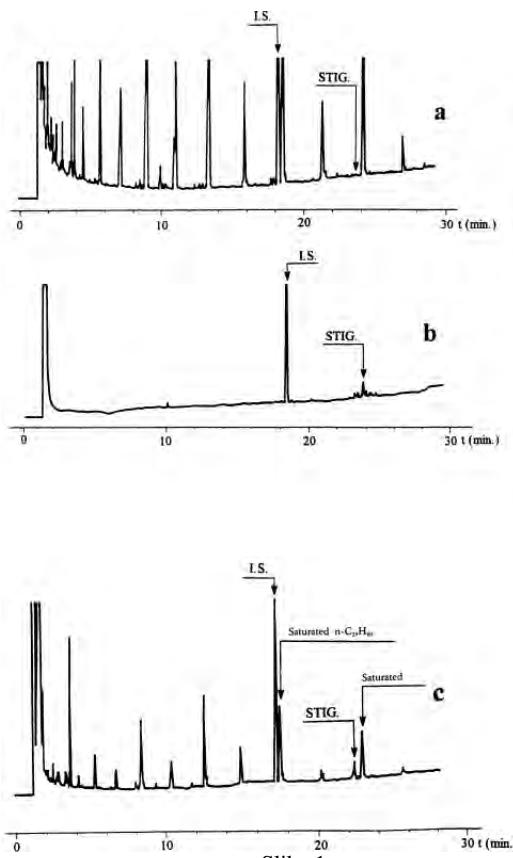
As = površina pika stigmastadiena (u slučaju dva izomera, zbroj površina dvaju pikova)

Ac = površina internog standarda (kolestadien)

M_c = masa dodanog standarda, u mikrogramima

M_o = masa ulja, u gramima

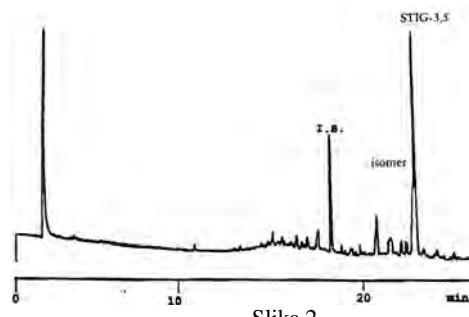
Granica detekcije: oko 0,01 mg/kg.



Slika 1.

Plinski kromatogrami uzoraka maslinovog ulja analizirani kapilarnom silikatnom kolonom (unutarnjeg promjera 0,25 mm, promjera 25 m) s 5% fenilmetilsilikona debljine sloja 0,25 µm:

- (a) Prva frakcija (30 ml) djevičanskog maslinovog ulja, s dodanim standardom.
- (b) Druga frakcija (40 ml) maslinovog ulja koje sadrži 0,10 mg/kg stigmastadiena.
- (c) Druga frakcija (40 ml) koja sadrži malu količinu prve frakcije.



Slika 2.

Plinski kromatogram uzorka rafiniranog maslinovog ulja analiziranog kolonom DB-5 na kojem se vidi izomer 3,5-stigmastadiena.

ANEKS XIII.**ODREĐIVANJE TRIACILGLICEROILA S ECN 42
(RAZLIKA IZMEĐU PODATAKA DOBIVENIH HPLC-
OM I TEORETSKE KOLIČINE)****1. OPSEG**

Određivanje sastava triacilglicerola (TAG) u maslinovom ulju obzirom na njihov ekvivalentni broj ugljika (ECN), kao razlike između analitičkih rezultata dobivenih visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) i teoretske količine, izračunate na osnovi sastava masnih kiselina.

2. PODRUČJE PRIMJENE

Metoda se primjenjuje za dokazivanje prisutnosti malih količina sjemenskih ulja (bogatih linolnom kiselinom) u svim kategorijama maslinovih ulja.

3. PRINCIPI

Udio triacilglicerola s ECN 42 određena metodom HPLC i teoretski udio triacilglicerola s ECN 42 (izračunata na temelju sastava masnih kiselina koji je utvrđen plinskom kromatografijom) podudaraju se unutar određenih granica za čista ulja. Razlika veća od vrijednosti utvrđenih ovim Pravilnikom za pojedine vrste ulja ukazuje da ulje sadrži sjemenska ulja.

4. METODA

Metoda izračuna teoretskog udjela triacilglicerola s ECN 42 te razlike između teoretskog udjela i rezultata dobivenih metodom HPLC, u osnovi predstavlja usporedbu analitičkih podataka dobivenih pomoću drugih metoda. Moguće je razlikovati tri faze: određivanje sastava masnih kiselina kapilarnom plinskom kromatografijom, izračun teoretskog sastava triacilglicerola s ECN 42 te određivanje triacilglicerola s ECN 42 metodom HPLC.

4.1. Aparatura

4.1.1. Tikvice s okruglim dnom od 250 i 500 ml.

4.1.2. Laboratorijske čaše od 100 ml.

4.1.3. Staklena kromatografska kolona unutarnjeg promjera 21 mm, duljine 450 mm, s pipcem i konusnim nastavkom od brušenog stakla (s unutarnje strane) pri vrhu.

4.1.4. Lijevci za odjeljivanje od 250 ml, s nastavkom od brušenog stakla (s vanjske strane) na dnu, prikladni za spajanje na vrh kolone.

4.1.5. Stakleni štapići duljine 600 mm.

4.1.6. Stakleni lijevak promjera 80 mm.

4.1.7. Odmjerne tikvice od 50 ml.

4.1.8. Odmjerne tikvice od 20 ml.

4.1.9. Rotirajući vakuumski uparivač.

4.1.10. Tekućinski kromatograf visoke učinkovitosti (HPLC), s mogućnošću termostatske kontrole temperature kolone.

4.1.11. Jedinica za injektiranje volumena 10 µl.

4.1.12. Detektor: diferencijalni refraktometar. Osjetljivost na punoj ljestvici treba biti najmanje 10^{-4} jedinica indeksa refrakcije.

4.1.13. Kolona: kolona od nehrđajućeg čelika duljine 250 mm i unutarnjeg promjera 4,5 mm, punjena zrncima silikagela promjera 5 µm, s 22 do 23% ugljika u obliku oktadecilsilana (vidjeti Napomenu 2).

4.1.14. Pisač i/ili integrator.

4.2. Reagensi

Reagensi trebaju biti analitičke čistoće. Iz otapala za eluiranje treba biti uklonjen plin, a mogu se reciklirati nekoliko puta bez utjecaja na razdvajanje.

4.2.1. Petroleter (od 40 do 60 °C), kromatografske čistoće.

4.2.2. Dietil-eter, bez tragova peroksida, destiliran neposredno prije upotrebe.

4.2.3. Otapalo za eluiranje za kromatografiju na koloni: smjesa petroletera i dietil-etera u omjeru 87:13 (v/v).

4.2.4. Silikagel, 70-230 mesha, tip Merck 7734, sa standardiziranim udjelom vode od 5% (v/v).

4.2.5. Staklena vuna.

4.2.6. Aceton.

4.2.7. Acetonitril.

4.2.8. Otapalo za eluiranje za HPLC: acetonitril + aceton (omjer treba prilagoditi tako da se postigne željeni stupanj razdvajanja; započinje se sa smjesom 50:50).

4.2.9. Otapalo: aceton.

4.2.10. Referentni triglyceridi: moguće je koristiti triglyceride dostupne na tržištu (tripalmitin, triolein i dr.) pa se u tom slučaju vremena zadržavanja prikazuju grafički u odnosu na ekvivalentni broj ugljika. Druga mogućnost su referentni kromatogrami sojina ulja, smjese sojina i maslinova ulja u omjeru 30:70 te čistog maslinovog ulja (vidjeti napomene 3 i 4 i slike 1., 2., 3. i 4.).

4.3. Priprema uzorka

Budući da niz tvari može dovesti do lažnih pozitivnih rezultata, uzorak se svaki puta mora pročistiti prema IUPAC-ovoj metodi 2.507, koja se koristi za određivanje polarnih tvari u oksidiranim uljima.

4.3.1. Priprema kromatografske kolone

Kolona (4.1.3.) napuni se s oko 30 ml otapala za eluiranje (4.2.3.), a zatim se u kolonu unese nešto staklene vune (4.2.5.), gurajući je do dna kolone staklenim štapićem (4.1.5.).

U čaši od 100 ml pripremi se suspenzija 25 g silikagela (4.2.4.) u 80 ml smjese otapala (4.2.3.) te prebaciti u kolonu pomoću staklenog lijevka (4.1.6.).

Kako bi se osiguralo da je silikagel u potpunosti prenesen u kolonu, čaša se nekoliko puta ispere smjesom otapala za eluiranje, prebacujući i to u kolonu.

Otvaranjem pipca pri dnu kolone, otapalo se ispusti do visine od 1 cm iznad površine silikagela.

4.3.2. Kromatografija na koloni

S točnošću od 0,001 g odvaže se $2,5 \pm 0,1$ g prethodno filtriranog, homogeniziranog i, ako je potrebno, osušenog ulja u odmjernu tikvicu od 50 ml (4.1.7.). Otopi se u oko 20 ml otapala za eluiranje (4.2.3.), po potrebi uz lagano zagrijavanje radi lakšeg otapanja. Ohladi se na sobnu temperaturu i nadopuni do oznake otapalom za eluiranje.

Trbušastom pipetom unese se 20 ml otopine u kolonu pripremljenu kako je opisano u točki 4.3.1., otvor pipac i otapalo propusti do površine silikagela.

Eluiru se sa 150 ml otapala za eluiranje (4.2.3.), podešavajući brzinu protoka na oko 2 ml/min (150 ml otapala treba proći kroz kolonu u 60-70 minuta).

Eluat se skuplja u tikvici od 250 ml (4.1.1.), prethodno tariranoj u peći i točno izvaganjo. Otapalo se ukloni na rotirajućem vakuumskom uparivaču te zatim izvaže ostatak u tikvici koji će se koristiti za pripremu otopine za HPLC-ovu analizu i za pripremu metil-estera.

Udio skupljenog uzorka iz kolone mora biti najmanje 90% za ekstra djevičansko, djevičansko, obično rafinirano i maslinovo ulje te najmanje 80% za lampante i ulje komine maslina.

4.4. Analiza metodom HPLC

4.4.1. Priprema uzorka za kromatografiju

5%-tina otopina uzorka priprema se vaganjem $0,5 \pm 0,001$ g uzorka u odmjernu tikvicu od 10 ml te nadopunjavanjem do oznake otapalom (4.2.9.).

4.4.2. Postupak

Uključi se kromatograf. Otapalo za eluiranje (4.2.8.) pumpa se kroz kolonu protokom od 1,5 ml/min, u cilju ispiranja čitavog sustava. Pričeka se da bazna crta postane stabilna. Injektira se 10 µl uzorka pripremljenog prema točki 4.3.

4.4.3. Izračun i izražavanje rezultata

Koristi se metoda normalizacije površine, tj. pretpostavlja da je zbroj površina pikova koji odgovaraju TAG od ECN 42 do ECN 52 jednak 100%. Izračuna se relativni udio svakog pojedinog triglicerida pomoću izraza:

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

Rezultati se izražavaju na najmanje dva decimalna mjesta.

Napomena 1: Redoslijed eluiranja može se odrediti izračunom ekvivalentnog broja ugljika, koji se često definira izrazom $ECN = CN - 2n$, pri čemu je CN broj atoma ugljika, a n broj dvostrukih veza. ECN se može preciznije izračunati uzimajući u obzir porijeklo dvostrukе veze. Ako su n_o , n_l i n_{ln} brojevi dvostrukih veza oleinske, linolne odnosno linolenske kiseline, ekvivalentni broj ugljika može se izračunati pomoću izraza:

$$ECN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln}$$

pri čemu se koeficijenti d_o , d_l i d_{ln} mogu izračunati na osnovi referentnih triglicerida. U uvjetima propisanim ovom metodom, približno vrijedi sljedeći odnos:

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

Napomena 2: Primjeri: Lichrosorb (Merck) RP18 Art. 50333

Lichrosphere (Merck) 100 CH18 Art. 50377.

Napomena 3: Pomoću nekih referentnih triglicerida moguće je izračunati rezoluciju u odnosu na triolein uz primjenu korigiranog (smanjenog) vremena zadržavanja $RT' = RT - RT_{\text{Totapala}}$:

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

Graf $\log \alpha$ u ovisnosti o f (broj dvostrukih veza) omogućuje određivanje vremena zadržavanja za sve triglyceride masnih kiselina koji su prisutni u referentnim trigliceridima – vidjeti sliku 2.

Napomena 4: Učinkovitost kolone mora omogućiti jasno odvajanje pikova trilinoleina od pikova triglicerida sličnog vremena zadržavanja. Eluiranje se provodi do pika ECN 52.

Napomena 5: Ispravno određivanje površina svih pikova važnih za analizu osigurano je ako drugi pik koji odgovara ECN 50 doseže 50% punе skale pisača.

4.5. Izračun udjela triacilglicerola

4.5.1. Određivanje sastava masnih kiselina

Sastav masnih kiselina određuje se plinskom kromatografijom prema metodi opisanoj u Aneksu IX.a ovoga Pravilnika, uz upotrebu kapilarne kolone. Metil-esteri masnih kiselina pripremaju se prema Aneksu X.b. ovoga Pravilnika (alkoholna otopina natrijevog metilata).

4.5.2. Masne kiseline koje se uzimaju u obzir za izračun

Triglyceridi se grupiraju prema njihovom ekvivalentnom broju ugljika (ECN), uzimajući u obzir sljedeće ekvivalentnosti između ECN i masnih kiselina. U obzir se uzimaju samo masne kiseline sa 16 i 18 atoma ugljika, jer su samo one bitne za maslinovo ulje.

Masna kiselina (MK)	Kratika	Molekulska masa (MM)	ECN
palmitinska kiselina	P	256,4	16
palmitoleinska kiselina	Po	254,4	14
stearinska kiselina	S	284,5	18
oleinska kiselina	O	282,5	16
linolna kiselina	L	280,4	14
linolenska kiselina	Ln	278,4	12

4.5.3. Preračunavanje površina (%) u molove za sve masne kiseline

$$\left. \begin{aligned} mol P &= \frac{površina \% P}{MW P} mol S = \frac{površina \% S}{MW S} mol Po = \frac{površina \% Po}{MW Po} \\ mol O &= \frac{površina \% O}{MW O} mol L = \frac{površina \% L}{MW L} mol Ln = \frac{površina \% Ln}{MW Ln} \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

4.5.4. Normalizacija masnih kiselina na 100%

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

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

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

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

(2)

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

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

Kao rezultat se dobiva udio pojedine masne kiseline u molnim postotcima s obzirom na sve položaje u trigliceridima (1,2,3-).

Zatim se izračunava zbroj zasićenih masnih kiselina P i S (ZMK) te nezasićenih masnih kiselina Po, O, L i Ln (NMK):

$$\left. \begin{array}{l} \text{Mol \% ZMK} = \text{Mol \% P} + \text{Mol \% S} \\ \text{Mol \% NMK} = 100 - \text{Mol \% ZMK} \end{array} \right\} (3)$$

4.5. Izračun sastava masnih kiselina na 2- i 1,3- položaju TAG

Masne kiseline raspoređuju se u tri skupine na sljedeći način: dvije istovjetne skupine za 1- i 3-položaj te jedna za 2-položaj, s različitim koeficijentima za zasićene (P i S) odnosno nezasićene masne kiseline (Po, O, L i Ln).

4.5.5.1. Zasićene masne kiseline na 2-položaju [P(2) i S(2)]:

$$\left. \begin{array}{l} \text{Mol \% P(2)} = \text{Mol \% P (1,2,3)} \times 0,06 \\ \text{Mol \% S(2)} = \text{Mol \% S (1,2,3)} \times 0,06 \end{array} \right\} (4)$$

4.5.5.2. Nezasićene masne kiseline na 2-položaju [Po(2), O(2), L(2) i Ln(2)]:

(5)

$$\text{mol \% Po(2)} = \frac{\text{mol \% Po(1,2,3)}}{\text{mol \% NMK}} \times [100 - \text{mol \% P (2)} - \text{mol \% S (2)}]$$

$$\text{mol \% O(2)} = \frac{\text{mol \% O(1,2,3)}}{\text{mol \% NMK}} \times [100 - \text{mol \% P (2)} - \text{mol \% S (2)}]$$

$$\text{mol \% L(2)} = \frac{\text{mol \% L(1,2,3)}}{\text{mol \% NMK}} \times [100 - \text{mol \% P (2)} - \text{mol \% S (2)}]$$

$$\text{mol \% Ln(2)} = \frac{\text{mol \% Ln(1,2,3)}}{\text{mol \% NMK}} \times [100 - \text{mol \% P (2)} - \text{mol \% S (2)}]$$

4.5.5.3. Masne kiseline u 1,3-položajima [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) i Ln(1,3)]:

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

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

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

(6)

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

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

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

4.5.6. Izračun triacilglicerola

4.5.6.1. TAG sa samo jednom masnom kiselinom (AAA, tj. LLL i PoPoPo)

(7)

$$mol \% AAA = \frac{mol \% A(1,3) \times mol \% A(2) \times mol \% A(1,3)}{10000}$$

4.5.6.2. TAG s dvije masne kiseline (AAB, tj. PoPoL i PoLL)

$$mol \% AAB = \frac{mol \% A(1,3) \times mol \% A(2) \times mol \% B(1,3) * 2}{10000}$$

(8)

$$mol \% ABA = \frac{mol \% A(1,3) \times mol \% B(2) \times mol \% A(1,3)}{10000}$$

4.5.6.3. TAG s tri različite masne kiseline (A,B,C, tj. OLLn, PLLn, PoOLn, PPoLn)

$$mol \% ABC = \frac{mol \% A(1,3) \times mol \% B(2) \times mol \% C(1,3) \times 2}{10000}$$

$$mol \% BCA = \frac{mol \% B(1,3) \times mol \% C(2) \times mol \% A(1,3) \times 2}{10000}$$

(9)

$$mol \% CAB = \frac{mol \% C(1,3) \times mol \% A(2) \times mol \% B(1,3) \times 2}{10000}$$

4.5.6.4. Triacilgliceroli s ECN 42

Sljedeći triacilgliceroli s ECN 42 uzimaju su u obzir prema jednadžbama 7, 8 i 9, redoslijedom očekivanog eluiranja pri analizi metodom HPLC (obično samo tri pika):

LLL

PoLL i pozicijski izomer LPoL

OLLn i pozicijski izomeri OLnL i LnOL

PoPoL i pozicijski izomer PoLPo

PoOLn i pozicijski izomeri OPoLn i OLnPo

PLLn i pozicijski izomeri LLnP i LnPL

PoPoPo

SLnLn i pozicijski izomer LnSLn

PPoLn i pozicijski izomeri PLnPo i PoPLn

Triacilgliceroli s ECN 42 izraženi su kao zbroj ovih devet triacilglicerola, uključujući njihove pozicijske izomere, a rezultati se izražavaju na najmanje dva decimalna mjesta.

5. OCJENA REZULTATA

Izračunati teoretski udio navedenih triacilglicerola usporeduje se s udjelom koji je utvrđen metodom HPLC. Ako je razlika između ovih dvaju podataka veća od vrijednosti propisane Uredbom za tu kategoriju ulja, uzorak sadrži sjemenska ulja.

Napomena: Rezultati se izražavaju na jedno decimalno mjesto.

6. Primjer (brojevi se odnose na odlomke u tekstu metode)

4.5.1. Izračun molarnih % masnih kiselina iz podataka dobivenih plinskom kromatografijom (% površine)

Plinskom kromatografijom dobivaju se sljedeći podaci o sastavu masnih kiselina:

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

4.5.3. Preračun % površina u molove za sve masne kiseline

$$\begin{aligned} \text{mol } P &= \frac{10}{256,4} \\ &= 0,03900 \text{ mol } P \end{aligned}$$

Vidjeti jednadžbu (1)

$$\begin{aligned} \text{mol } S &= \frac{3}{284,5} \\ &= 0,01054 \text{ mol } S \end{aligned}$$

Vidjeti jednačinu (1)

$$\begin{aligned} \text{mol } Po &= \frac{1}{254,4} \\ &= 0,00393 \text{ mol } Po \end{aligned}$$

Vidjeti jednadžbu (1)

$$\begin{aligned} \text{mol } O &= \frac{75}{282,5} \\ &= 0,26549 \text{ mol } O \end{aligned}$$

Vidjeti jednadžbu (1)

$$\begin{aligned} \text{mol } L &= \frac{10}{280,4} \\ &= 0,03566 \text{ mol } L \end{aligned}$$

Vidjeti jednadžbu (1)

$$\begin{aligned} \text{mol } Ln &= \frac{1}{278,4} \\ &= 0,003594 \text{ mol } Ln \end{aligned}$$

Vidjeti jednadžbu (1)

$$\text{Ukupno} = 0,35822 \text{ mol TAG}$$

4.5.4. Normalizacija masnih kiselina na 100%

$$\begin{aligned} \text{mol \% } P(1,2,3) &= \frac{0,03900 \text{ mol } P \times 100}{0,35822 \text{ mol}} \\ &= 10,888\% \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednadžbu (2)}$$

$$\text{mol \% } S(1,2,3) = \frac{0,01054 \text{ mol } S \times 100}{0,35822 \text{ mol}} = 2,94\% \quad \text{Vidjeti jednadžbu (2)}$$

$$\begin{aligned} \text{mol \% } Po(1,2,3) &= \frac{0,00393 \text{ mol } Po \times 100}{0,35822 \text{ mol}} \\ &= 1,097\% \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednadžbu (2)}$$

$$\begin{aligned} \text{mol \% } O(1,2,3) &= \frac{0,26549 \text{ mol } O \times 100}{0,35822 \text{ mol}} \\ &= 74,113\% \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednadžbu (2)}$$

$$\begin{aligned} \text{mol \% } L(1,2,3) &= \frac{0,03566 \text{ mol } L * 100}{0,35822 \text{ mol}} \\ &= 9,956\% \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednadžbu (2)}$$

$$\begin{aligned} \text{mol \% } Ln(1,2,3) &= \frac{0,00359 \text{ mol } Ln \times 100}{0,35822 \text{ mol}} \\ &= 1,003\% \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednadžbu (2)}$$

Ukupno Mol \% = 100,0%

Suma zasićenih i nezasićenih masnih kiselina na 1,2,3-položaju TAG:

$$\text{mol \% } ZMK = 10,888\% + 2,944\% = 13,831\% \quad \text{Vidjeti jednačinu (3)}$$

$$\text{mol \% } NMK = 100,00\% - 13,831\% = 86,169\% \quad \text{Vidjeti jednačinu (3)}$$

4.5.5. Izračunavanje sastava masnih kiselina na 2- i 1,3- položaju TAG

4.5.5.1. Zasićene masne kiseline na 2-položaju [P(2) i S(2)]:

$$\begin{aligned} \text{mol \% } P(2) &= 10,888\% * 0,06 \\ &= 0,653 \text{ mol \%} \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednadžbu (4)}$$

$$\begin{aligned} \text{mol \% } S(2) &= 2,944\% * 0,06 \\ &= 0,177 \text{ mol \%} \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednadžbu (4)}$$

4.5.5.2. Nezasićene masne kiseline na 1,3-položaju [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) i Ln(1,3)]:

$$\text{mol \% } Po(2) = \frac{1,097\%}{86,169\%} \times (100 - 0,659 - 0,177) = 1,263 \text{ mol \%}$$

$$\text{mol \% } O(2) = \frac{74,113\%}{86,169\%} \times (100 - 0,659 - 0,177) = 85,295 \text{ mol \%}$$

$$\text{mol \% } L(2) = \frac{9,956 \%}{86,169 \%} \times (100 - 0,659 - 0,177) = 11,458 \text{ mol \%}$$

$$\text{mol \% } Ln(2) = \frac{1,003 \%}{86,169 \%} \times (100 - 0,659 - 0,177) = 1,154 \text{ mol \%}$$

Vidjeti jednadžbu (5)

4.5.5.3. Masne kiseline na 1,3- položajima [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) i Ln(1,3)]:

$$\begin{aligned} \text{mol \% } P(1,3) &= \frac{10,888 - 0,659}{2} 10,888 \\ &= 16,005 \text{ mol} \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednadžbu (6)}$$

$$\begin{aligned} \text{mol \% } S(1,3) &= \frac{2,944 - 0,177}{2} 2,944 \\ &= 4,327 \text{ mol \%} \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednadžbu (6)}$$

$$\begin{aligned} \text{mol \% } Po(1,3) &= \frac{1,097 - 1,263}{2} 1,097 \\ &= 1,015 \text{ mol \%} \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednadžbu (6)}$$

$$\begin{aligned} \text{mol \% } O(1,3) &= \frac{74,113 - 85,295}{2} 74,113 \\ &= 68,522 \text{ mol \%} \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednadžbu (6)}$$

$$\begin{aligned} \text{mol \% } L(1,3) &= \frac{9,956 - 11,458}{2} 9,956 \\ &= 9,205 \text{ mol \%} \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednadžbu (6)}$$

$$\begin{aligned} \text{mol \% } Ln(1,3) &= \frac{1,003 - 1,154}{2} 1,003 \\ &= 0,927 \text{ mol \%} \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednadžbu (6)}$$

Vidjeti jednadžbu (6)

4.5.6. Izračun triacilglicerola:

Iz izračunatog sastava masnih kiselina na sn-2- i sn-1,3-položajima (vidjeti gore):

MK u:	1,3-položaju	2-položaju
P	16,005 %	0,653 %
S	4,327 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,263 %
O	68,522 %	85,295 %
L	9,205 %	11,458 %
Ln	0,927 %	1,154 %
Ukupno	100,0 %	100,0 %

Izračunavaju se sljedeći triacilgliceroli:

LLL

PoPoPo

PoLL s jednim pozicijskim izomerom

SLnLn s jednim pozicijskim izomerom

PoPoL s jednim pozicijskim izomerom

PPoLn s dva pozicijska izomera

OLLn s dva pozicijska izomera

PLLn s dva pozicijska izomera

PoOLn s dva pozicijska izomera

4.5.6.1. TAG sa samo jednom masnom kiselinom (LLL i PoPoPo) Vidjeti jednadžbu (7)

$$mol \% LLL = \frac{9,205\% \times 11,458\% \times 9,205\%}{10000} = 0,09708 \text{ mol } LLL$$

$$mol \% PoPoPo = \frac{1,015\% \times 1,263\% \times 1,015\%}{10000} = 0,00013 \text{ mol } PoPoPo$$

4.5.6.2. TAG s dvije masne kiseline (PoLL, SLnLn, PoPoL) Vidjeti jednadžbu (8)

$$mol \% PoLL + LLPo = \frac{1,015\% \times 11,458\% \times 9,205\% \times 2}{10000} = 0,02141$$

$$mol \% LPoL = \frac{9,205\% \times 1,263\% \times 9,205\%}{10000} = 0,01070$$

0,03211 mol PoLL

$$mol \% SLnLn + LnLnS = \frac{4,327\% \times 1,154\% \times 0,927\% \times 2}{10000} = 0,00093$$

$$mol \% LnSLm = \frac{0,927\% \times 0,177\% \times 0,927\%}{10000} = 0,00002$$

0,00095 mol SLnLn

$$mol \% PoPoL + LPoPo = \frac{1,015\% \times 1,263\% \times 9,205\% \times 2}{10000} = 0,00236$$

$$mol \% PoLPo = \frac{1,015\% \times 11,458\% \times 1,015\%}{10000} = 0,00118$$

0,00354 mol PoPoL

4.5.6.3. TAG s tri različite masne kiseline (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn)

Vidjeti jednadžbu (9)

$$mol \% PPoLn = \frac{16,005\% \times 1,263\% \times 0,927\% \times 2}{10000} = 0,00375$$

$$mol \% LnPPo = \frac{0,927\% \times 0,653\% \times 1,015\% \times 2}{10000} = 0,00012$$

$$mol \% PoLnP = \frac{1,015\% \times 1,154\% \times 16,005\% \times 2}{10000} = 0,00375$$

0,00762 mol PPoLn

$$mol \% OLLn = \frac{68,522\% \times 11,458\% \times 0,927\% \times 2}{10000} = 0,14577$$

$$mol \% LnOL = \frac{0,927\% \times 85,295\% \times 9,205\% \times 2}{10000} = 0,14577$$

$$mol \% LLnO = \frac{9,205\% \times 1,154\% \times 68,522\% \times 2}{10000} = 0,14577$$

0,43671 mol OLLn

$$mol \% PLLn = \frac{16,005\% \times 11,458\% \times 0,927\% \times 2}{10000} = 0,03400$$

$$mol \% LnPL = \frac{0,927\% \times 0,653\% \times 9,205\% \times 2}{10000} = 0,00111$$

$$mol \% LLnP = \frac{9,205\% \times 1,154\% \times 16,005\% \times 2}{10000} = 0,03400$$

0,06911 mol PLLn

$$mol \% PoOLn = \frac{1,015\% \times 85,295\% \times 0,927\% \times 2}{10000} = 0,01605$$

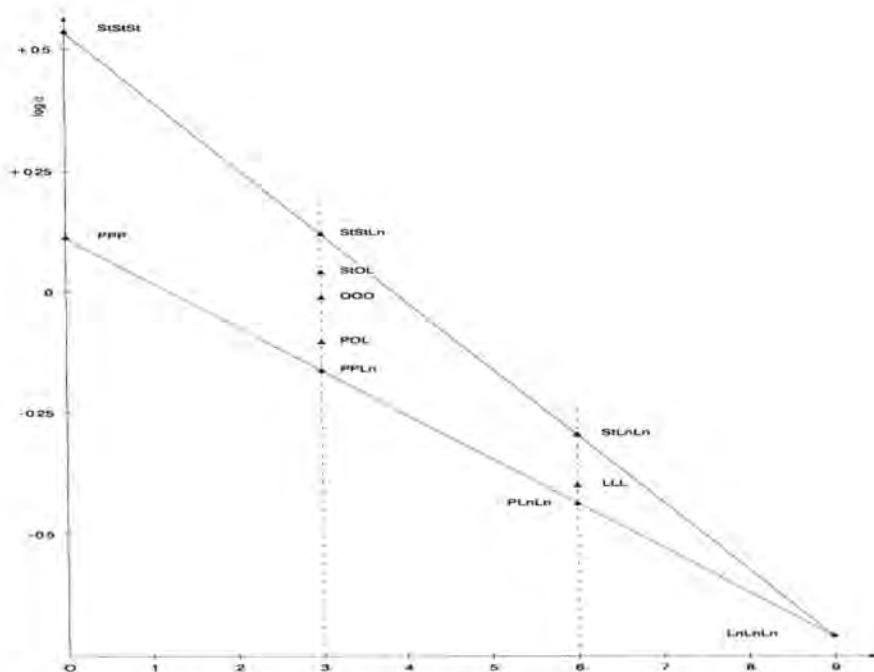
$$mol \% LnPoO = \frac{0,927\% \times 1,263\% \times 68,522\% \times 2}{10000} = 0,01605$$

$$mol \% OLnPo = \frac{68,522\% \times 1,154\% \times 1,015\% \times 2}{10000} = 0,01605$$

0,04815 mol PoOLN

ECN = 0,69540 mol TAG

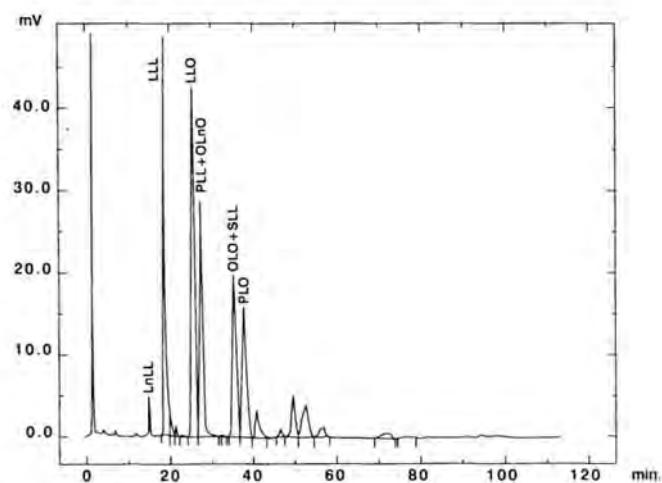
Slika 1. Graf ovisnosti $\log \alpha$ o f (broj dvostrukih veza)



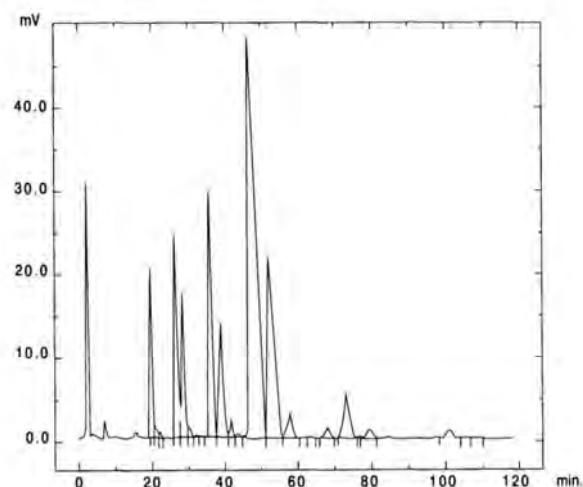
Broj dvostrukih veza (n)

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

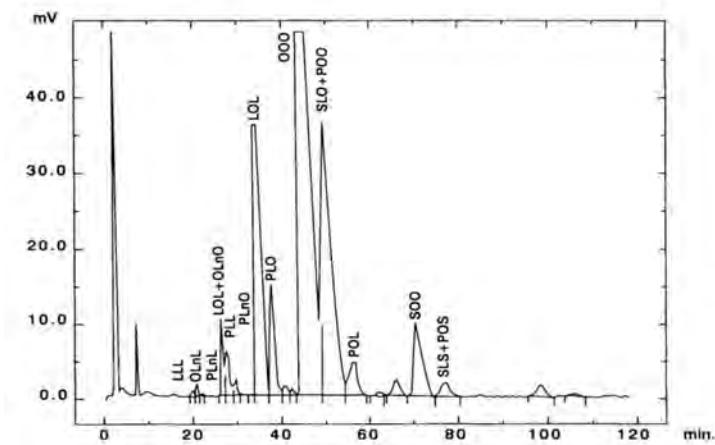
Slika 2. Sojino ulje



Slika 3. Sojino ulje/maslinovo ulje 30/70



Slika 4. Maslinovo ulje



ANEKS XIV.**ODREĐIVANJE UDJELA ALIFATSKIH ALKOHOOLA
KAPILARNOM PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM****1. PODRUČJE PRIMJENE**

Ovom se metodom opisuje postupak određivanja udjela alifatских alkohola u uljima i mastima.

2. PRINCIP METODE

Masna tvar, s dodanim 1-eikosanolom kao internim standardom, saponificira se etanolnom otopinom kalijevog hidroksida, nakon čega se neosapunjiva tvar ekstrahirala etil-eterom. Alkoholna se frakcija odjeljuje od neosapunjive tvari tankoslojnom kromatografijom na bazičnoj silikagel ploči. Alkoholi zadržani na silikagelu prevode se u trimetilsilil etere i analiziraju kapilarnom plinskom kromatografijom.

3. OPREMA

3.1. Tikvica sa zaobljenim dnom od 250 ml, s povratnim hladilom s brušenim spojevima.

3.2. Lijevak za odjeljivanje od 500 ml.

3.3. Tikvice sa zaobljenim dnom od 250 ml.

3.4. Staklena kada za razvijanje ploča za tankoslojnu kromatografiju, za staklene ploče dimenzija 20 x 20 cm.

3.5. Ultraljubičasta svjetiljka s valnim duljinama od 366 ili 254 nm.

3.6. Mikrošprice od 100 µl i 500 µl.

3.7. Cilindrični lijevak za filtriranje s G3 porama filtra (poroznost 15-40 µm), promjera približno 2 cm i dubine približno 5 cm, s nastavkom prikladnim za vakuum filtraciju i priključkom 12/21 s vanjskim brušenim stakлом.

3.8. Boca sisaljka od 50 ml, s priključkom 12/21 s unutarnjim brušenim stakлом, prikladna za priključak na lijevak za filtriranje (3.7.).

3.9. Epruveta od 10 ml s koničnim dnom i nepropusnim čepom.

3.10. Plinski kromatograf s kapilarnom kolonom i "split" sustavom razdvajanja protoka, koji čine:

3.10.1. Termostatirana komora za kolone (peć za kolone), s mogućnošću održavanja željene temperature uz točnost $\pm 1^{\circ}\text{C}$;

3.10.2. Jedinica za injektiranje s mogućnošću podešavanja temperature, s elementom za isparavanje od persilaniziranog stakla;

3.10.3. Plameno-ionizacijski detektor i mjerni pretvarač s pojačalom;

3.10.4. Pisač-integrator koji se može povezati s pretvaračem s pojačalom (3.10.3.), s vremenom odziva od najviše jedne sekunde i promjenjivom brzinom papira.

3.11. Staklena ili silikatna kapilarna kolona duljine 20 do 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 do 0,32 mm, potpuno prekrivena SE-52, SE-54 ili drugom ekvivalentnom tekućom stacionarnom fazom, ravnomjerne debljine sloja između 0,10 i 0,30 µm.

3.12. Mikrolitarska šprica za plinsku kromatografiju od 10 µl, s čvrsto fiksiranom iglom.

3.13. Analitička vaga osjetljivosti 1 mg (s podjelom od 0,1 mg).

4. REAGENSI

4.1. Kalijev hidroksid, približno 2 mol/l etanolna otopina: 130 g kalijevog hidroksida (minimalne koncentracije 85%) otopi se uz hlađenje u 200 ml destilirane vode i zatim nadopuni etanolom do jedne litre. Otopina se treba čuvati u dobro začepljenoj boci od mlječnog stakla.

4.2. Etil-eter, analitičke čistoće.

4.3. Bezvodni natrijev sulfat, analitičke čistoće.

4.4. Staklene ploče sa slojem silikagela, bez indikatora fluorescencije, debljine 0,25 ml (na tržištu su dostupne ploče spremne za upotrebu).

4.5. Kalijev hidroksid, približno 0,2 mol/l etanolna otopina: 13 g kalijevog hidroksida otopi se u 20 ml destilirane vode i zatim nadopuni 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. Etil-eter, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).

4.10. Kloroform, za kromatografiju.

4.11. Referentna otopina za tankoslojnu kromatografiju: kolesterol ili fitosteroli, 5%-tna otopina u kloroformu.

4.12. 0,2%-tna otopina 2',7'-diklorfluoresceina u etanolu. Dodaje joj se nekoliko kapi 2 mol/l etanolne otopine kalij hidroksida kako bi se dobila bazična reakcija.

4.13. Bezvodni piridin, za kromatografiju.

4.14. Heksametil disilazan.

4.15. Trimetilklorosilan.

4.16. Standardne otopine trimetilsilil etera alifatskih alkohola od C_{20} do C_{28} . Mogu se pripremiti iz smjesa čistih alkohola, neposredno prije upotrebe.

4.17. 0,1%-tna (m/v) otopina 1-eikosanola u kloroformu (interni standard).

4.18. Plin nositelj: vodik ili helij, kromatografske čistoće.

4.19. Pomoći plin: dušik, kromatografske čistoće.

5. POSTUPAK

5.1. Priprava neosapunjivog

5.1.1. Pomoći mikrolitarske šprice od 500 µl u tikvicu okruglog dna od 250 ml prenese se onaj volumen 0,1%-tne otopine 1-eikosanola u kloroformu (4.17.), koji sadrži udio 1-eikosanola približno jednak 10% udjelu alifatskih alkohola u uzorku koji se uzima za analizu. Naprimjer, za 5 g uzorka maslinovog ulja uzima se 250 µl 0,1%-tne otopine 1-eikosanola, a za ulje od komine maslinu 1500 µl.

Upari se do suha u struji dušika i zatim izvaže točno 5 g suhog filtriranog uzorka u istu tikvicu.

5.1.2. Doda se 50 ml 2 mol/l etanolne otopine kalijevog hidroksida, pričvrsti povratno hladilo i zagrijava na parnoj kupelji do laganog vrenja, uz stalno miješanje tijekom zagrijavanja dok ne nastupi saponifikacija (otopina postaje bistra). Nastavi se zagrijavati tijekom sljedećih 20 minuta i zatim kroz hladilo doda 50 ml destilirane vode. Hladilo se zatim odvodi i tikvica ohladi na približno 30°C .

5.1.3. Sadržaj tikvice kvantitativno se prenese u lijevak za odjeljivanje od 500 ml dodajući destiliranu vodu nekoliko puta, tako da se ukupno doda približno 50 ml destilirane vode. Doda se približno 80 ml etil-etera, snažno trese približno 30 sekundi i ostavi da se slegne (Napomena 1).

Odvoji se donja vodenata fazata, koja se skuplja u drugom lijevku za odjeljivanje. Na vodenoj fazi na isti se način provedu daljnje dvije ekstrakcije, koristeći svaki put od 60 do 70 ml etil-etera.

Napomena 1: Ukoliko se stvori emulzija, može se ukloniti prskanjem malim količinama etanola ili metanola.

5.1.4. Ekstrakti u etil-eteru skupljaju se u lijevku za odjeljivanje i ispiru destiliranom vodom (po 50 ml) do neutralne reakcije vode od ispiranja.

Voda od ispiranja se odbaci, eterska faza osuši bezvodnim natrijevim sulfatom i filtrira u prethodno izvaganu tikvicu od 250 ml, uz ispiranje lijevka i filtra malim količinama etil-etera koje se dodaju ukupnom volumenu.

5.1.5. Eter se destilira do volumena od nekoliko ml te zatim suši u laganom vakuumu ili u struji dušika, dovršavajući sušenje u peći pri 100°C približno četvrt sata te zatim važe nakon hlađenja u eksikatoru.

5.2. Odjeljivanje alkoholnih frakcija

5.2.1. Priprema bazičnih ploča za tankoslojnu kromatografiju: ploče sa slojem silikagela (4.4) potpuno se uranjuju u otopinu kalijevog hidroksida, koncentracije $0,2\text{ mol/l}$ (4.5.) na 10 sekundi te zatim ostave da se suše dva sata u digestoru i konačno stave u peć na 100°C jedan sat.

Izvade se iz peći i čuvaju u eksikatoru s kalcijevim kloridom do upotrebe (ploče obrađene na ovaj način moraju se upotrijebiti u roku od 15 dana).

Napomena 2: Kada se koriste bazične ploče sa silikagelom za odvajanje alkoholne frakcije, nije potrebno tretirati neosapunjive tvari aluminijevim oksidom. Na taj se način sve kisele komponente (masne kiseline i druge) zadržavaju na startnoj crti, čime se dobivaju vrpce alifatskih alkohola i vrpce terpenskih alkohola koje su jasno odvojene od vrpce sterola.

5.2.2. U komoru za razvijanje ploča stavi se smjesa heksana i etil-etera u omjeru 65/35 (v/v), do razine od približno 1 cm⁽¹⁾.

Komora se zatvori odgovarajućim poklopcom i ostavi pola sata kako bi se uspostavila ravnoteža između pare i tekućine. Na unutarnje plohe posude mogu se pričvrstiti vrpce od filter-papira uronjene u eluent, čime se skraćuje vrijeme razvijanja za približno jednu trećinu i postiže ravnomjerno eluiranje komponenata.

Napomena 3: Otopina za razvijanje mora se zamjeniti za svaku analizu kako bi se postigli ponovljivi uvjeti razvijanja.

5.2.3. Pripremi se približno 5%-tna otopina neosapunjivih tvari (5.1.5) u kloroformu i, pomoću mikrolitarske šprice od 100 µl, naneće 0,3 ml te otopine u što tanjoj i ravnomjernoj liniji, na TSK ploču približno 2 cm od donjeg ruba TSK ploče. U ravnini originalne mrlje, naneće se 2 do 3 µl referentne otopine alifatskih alkohola (4.11.) kako bi se mogle identificirati vrpce alifatskih alkohola po završetku razvijanja.

5.2.4. Ploča se smjesti u komoru za razvijanje pripremljenu kako je opisano u 5.2.2. Temperatura okoliša treba se održavati između 15 i 20°C . Komora se odmah zatvori poklopcom i ostavi da eluira dok fronta otapala ne dosegne približno 1 cm od gornjeg ruba ploče.

Ploča se zatim izvadi iz komore za razvijanje, a otapalo ispari u struji vrućeg zraka ili se ploča ostavi neko vrijeme u digestoru.

5.2.5. Ploča se lagano i ravnomjerno poprska otopinom 2',7'-diklorfluoresceina te promatra pod ultraljubičastim svjetлом. Vrpce alifatskih alkohola može se identificirati usporedbom s mrljom dobivenom od referentne otopine: rubovi trake označe se crnom olovkom, označavajući zajedno vrpce alifatskih alkohola i vrpce terpenskih alkohola neposredno iznad njene.

⁽¹⁾ U ovim specifičnim slučajevima, mora se koristiti eluent od mješavine benzen/aceton po obujmu 95/5 kako bi se dobile izrazito odvojene skupine (područja).

Napomena 4: Vrpce alifatskih alkohola i terpenskih alkohola uzimaju se zajedno zbog mogućih migracija nekih alifatskih alkohola u vrpcu triterpenskih alkohola.

5.2.6. Pomoću metalne špatule sagrebe se silikagel iz označenog područja. Tako dobiveni fino usitnjeni materijal stavi se u lijevak za filtriranje (3.7.). Doda se 10 ml vrućeg kloroform-a, pažljivo izmiješa metalnom špatulom i filtrira pod vakuumom, skupljajući filtrat u bocu sisaljku (3.8.) spojenu na lijevak za filtriranje.

Ostatak u boci ispere se tri puta etil-eterom (oko 10 ml svaki put), skupljajući filtrat u istu bocu spojenu na lijevak. Filtrat se upari do volumena od 4 do 5 ml, preostala se otopina prenese u

prethodno izvaganu epruvetu od 10 ml (3.9.), upari do suha laganim zagrijavanjem u laganoj struji dušika, doda nekoliko kapi acetona, ponovo upari do suha, smjesti u peć na 105°C približno 10 minuta, ostavi da se ohladi u eksikatoru i važe.

Ostatak u epruveti čini alkoholnu frakciju.

5.3. Priprava trimetilsililara

Reagens za silaniziranje, koji se sastoji od smjese piridina, heksametildisilazana i trimetilklorosilana u omjeru 9:3:1 (v/v/v) (Napomena 5), doda se u epruvetu koja sadrži alkoholnu frakciju u količini od 50 µl za svaki milligram alifatskih alkohola, izbjegavajući apsorpciju vlage (Napomena 6).

Napomena 5: Na tržištu su dostupne otopine spremne za upotrebu. Također su dostupni drugi reagensi za silaniziranje kao što su npr. bis-trimetilsililtrifluoracetamid + 1% trimetil klorosilan, koji se mora razrijediti jednakim volumenom bezvodnog piridina.

Napomena 6: Lagano zamućenje koje se može pojavit normalno je i ne uzrokuje smetnje. Stvaranje bijelog flokulata ili pojava ružičaste boje upućuju na prisutnost vode ili nečiste reagense. U tom slučaju, analiza se mora ponoviti.

5.3.2. Epruveta se začepi, pažljivo protrese (bez preokretanja) dok se alifatski alkoholi potpuno ne otope. Ostavi se da stoji najmanje 15 minuta na sobnoj temperaturi i zatim centrifugira nekoliko minuta. Bistra otopina spremna je za plinsko-kromatografsku analizu.

5.4. Plinsko-kromatografska analiza

5.4.1. Preliminarni postupci, punjenje kolone

5.4.1.1. Kolona se učvrsti u plinski kromatograf, priključujući početak kolone na injektor sa sustavom razdvajanja, a kraj kolone na detektor. Obave se opće provjere plinskog kromatografa (dovod plina, učinkovitost detektora, učinkovitost sustava razdvajanja i pisača itd.).

5.4.1.2. Ako se kolona koristi prvi put, preporučuje se njezino kondicioniranje. Lagani tok plina propusti se kroz kapilarnu kolonu, a zatim uključi plinski kromatograf i započne postupno zagrijavati do temperature najmanje 20°C više od radne temperature (vidjeti Napomenu 7). Ta se temperatura održava najmanje dva sata, a zatim se cijeli uređaj namjesti na radne uvjete (podešavanje protoka plina i razdvajanja, paljenje plamena, priključivanje na elektronički rekorder, podešavanje peći za kolonu, temperature detektora i injektora) i potom snimi signal s osjetljivošću najmanje dvostruko većom od one koja će se koristiti za analizu. Bazna crta mora biti linearna, bez bilo kakvih pikova, i ne smije imati otklon. Negativni otklon bazne crte upućuje na neispravno priključenu kolonu; pozitivni otklon upućuje na nepravilno kondicioniranje kolone.

Napomena 7: Temperatura kondicioniranja mora biti najmanje 20°C niža od maksimalne temperature određene za upotrijebljenu stacionarnu fazu.

5.4.2. Izbor radnih uvjeta

5.4.2.1. Okvirni radni uvjeti su sljedeći:

- – temperatura kolone: početno 180°C osam minuta, a zatim se programira na povećanje od $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 260°C te konačno 15 minuta pri 260°C ,
- – temperatura isparivača: 280°C ,
- – temperatura detektora: 290°C ,
- – linearna brzina plina nositelja: helij 20 do 35 cm/s, vodik 30 do 50 cm/s,
- – omjer razdvajanja protoka: 1:50 do 1:100,
- – osjetljivost uređaja: 4 do 16 x veća od najmanjeg prigušenja,
- – osjetljivost snimanja: 1 do 2 mV pune ljestvice,
- – brzina papira: od 30 do 60 cm/h,
- – količina injektirane tvari: 0,5 do 1 µl TMSE otopine,

Gore navedeni uvjeti mogu se modificirati prema značajkama kolone i plinskog kromatografa kako bi se dobili kromatogrami koji udovoljavaju sljedećim uvjetima:

- vrijeme zadržavanja alkohola C_{26} treba biti 18 ± 5 minuta,
- pik alkohola C_{22} treba biti 80 ± 20 % pune vrijednosti ljestvice za maslinovo ulje odnosno $40 \pm 20\%$ za ulje iz sjemenki.

5.4.2.2. Gore navedeni zahtjevi provjeravaju se ponovljnim injektiranjem standardne smjese TMSE alkohola te se radni uvjeti podešavaju kako bi se postigli najbolji mogući rezultati.

5.4.2.3. Parametri integracije pikova moraju biti postavljeni tako da se omogući ispravna ocjena površina pikova.

5.4.3. Postupak analize

5.4.3.1. Pomoću mikrolitarske šprice od $10 \mu\text{l}$ uvuče se $1 \mu\text{l}$ heksana, zatim $0.5 \mu\text{l}$ zraka te potom 0.5 do $1 \mu\text{l}$ otopine uzorka. Pritom se klip šprice povuče tako da se igla isprazni. Igla se uvede kroz membranu injektoru te se nakon 1-2 sekunde brzo injektira, a nakon približno 5 sekundi igla lagano izvucе.

5.4.3.2. Nastavi se snimati dok se TMSE prisutnih alifatskih alkohola u potpunosti ne eluira. Bazna crta mora sve vrijeme udovoljavati uvjetima 5.4.1.2.

5.4.4. Identifikacija pikova

Identifikacija pojedinačnih pikova obavlja se na temelju vremena zadržavanja i usporednjom sa standardnom smjesom TMSE analiziranom u jednakim uvjetima.

Kromatogram alkoholne frakcije djevičanskog maslinovog ulja prikazan je na Slici 1.

5.4.5. Kvantitativna ocjena

5.4.5.1. Površine pikova 1-eikosanola i alifatskih alkohola C_{22} , C_{24} , C_{26} i C_{28} računaju se elektroničkom integracijom.

5.4.5.2. Količina pojedinog alifatskog alkohola, izražena u $\text{mg}/1000 \text{ g}$ masne tvari, izračunava se na sljedeći način:

$$\text{alkohol } x = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

pri čemu je:

A_x = površina pika alkohola x

A_s = površina 1-eikosanola

m_s = masa 1-eikosanola u miligramima

m = masa uzorka u gramima.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

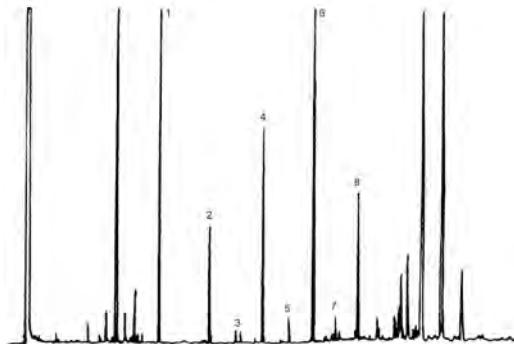
Izražava se podatak o udjelu pojedinih alifatskih alkohola u $\text{mg}/1000 \text{ g}$ masne tvari. Njihovim zbrajanjem dobivaju se "ukupni alifatski alkoholi".

DODATAK

Odredivanje linearne brzine plina

U plinski kromatograf podešen na normalne radne uvjete injektira se od 1 do $3 \mu\text{l}$ metana ili propana i pomoću zapornog sata mjeri vrijeme potrebno plinu da prođe kroz kolonu od trenutka injiciranja do trenutka pojave pika (tM).

Linearna brzina u cm/s dana je s L/tM , gdje je L duljina kolone u cm, a tM izmjereno vrijeme u sekundama.



Slika 1. Kromatogram alkoholne frakcije djevičanskog ulja

- 1 = eikosanol
- 2 = dekosanol
- 3 = trikosanol
- 4 = tetrakosanol
- 5 = pentakosanol
- 6 = heksakosanol
- 7 = heptakosanol
- 8 = oktakosanol.

ANEKS XV.

METODA UTVRDIVANJA SADRŽAJA VOSKOVA, METIL-ESTERA MASNIH KISELINA I ETIL-ESTERA MASNIH KISELINA POMOĆU KAPILARNE PLINSKE KROMATOGRAFIJE

1. SVRHA

Ova metoda služi za utvrđivanje sadržaja voskova, metil-estera masnih kiselina i etil-estera masnih kiselina u raznim vrstama maslinovog ulja. Pojedini voskovi i alkil-esteri su izdvojeni sukladno broju atoma ugljika. Metoda se preporučuje kao alat za razlikovanje između maslinovog ulja i ulja komine maslina, te kao parametar kvalitete za ekstra djevičansko maslinovo ulje koji omogućuje otkrivanje neovlaštenog miješanja ekstra djevičanskog maslinovog ulja s uljima niže kvalitete bilo da se radi o djevičanskom ulju, ulju lampante ili dezodoriranim uljima.

2. POSTUPAK

Dodavanje odgovarajućih internih standarda ulju te frakcioniranje pomoću kromatografije na koloni hidriranog silikagela. Oporavak frakcije izlučene u testnim uvjetima (s nižim polaritetom od polariteta triaciglicerola) i direktna analiza pomoću kapilarne plinske kromatografije.

3. APARATURA

3.1. Erlenmeyerova tirkvica, 25 ml

3.2. Staklena kolona za tekuću kromatografiju, unutarnjeg promjera 15 mm, dužine 30 - 40 cm, opskrbljena odgovarajućim pipcem.

3.3. Plinski kromatograf pogodan za upotrebu s kapilarnom kolonom, opremljen sustavom za izravno uštrcavanje na kolonu.

3.3.1. Termostatski kontrolirana peć s temperaturnim programiranjem

3.3.2. Hladni injektor s izravnim uštrcavanjem na kolonu

3.3.3. Detektor ionizacije plamena i pretvarač-pojačivač

3.3.4. Pisač-integrator (Napomena 1) za upotrebu s pretvaračem-pojačivačem (točka 3.3.3.) s vremenom odgovora ne duljim od 1 sekunde i varijabilnom brzinom papira.

Napomena: Kompjutorizirani sustavi također se mogu koristiti tamo gdje su podatci plinske kromatografije uneseni pomoću računala.

3.3.5. Kapilarna kolona, srašteni silicij (za analizu voskova i metil i etil-estera) dužine 8 – 12 m, unutarnjeg promjera 0.25 – 0.32 mm, interno presvučen tekućom fazom (Napomena 2) do uniformne debljine 0.10 – 0.30 µm.

Napomena 2: Odgovarajuće komercijalne tekuće faze dostupne su za ove svrhe, poput SE₅₂, SE₅₄ itd.

3.4. Mikrošprica 10 µl, s čvrstom iglom, za izravno uštrcavanje na kolonu.

3.5. Elektrovibrator.

3.6. Rotacijski evaporator.

3.7. Omotana peć.

3.8. Analitička vaga za vaganje do točnosti od ± 0.1 mg.

3.9 Standardni laboratorijski stakleni predmeti.

4. REAGENSI

4.1. Silikagel, 60 – 200 µm mreža. Postavite silikagel u omotanu peć na 500 °C najmanje 4 sata. Pustite da se ohladi pa dodajte 2% vode u odnosu na upotrijebljenu količinu silikagela. Dobro protresite kako bi se emulzija homogenizirala te držite u eksikatoru najmanje 12 sati prije upotrebe.

4.2. n-heksan, kromatorografskog razreda ili razreda ostatka (čistoća se mora provjeriti).

UPOZORENJE: Dim se može zapaliti. Držite se podalje od topline, iskri i plamena. Pobrinite se da su boce uvijek zatvorene. Osigurajte odgovarajuću ventilaciju tijekom upotrebe. Izbjegavajte naslage dima te uklonite sve moguće rizike od vatre, kao što su grijalice ili električne aparate koji nisu proizvedeni od nezapaljivog materijala. Ako se udahne, dim može biti poguban, jer može oštetiti živčane stanice. Izbjegavajte udisati dim. Koristite odgovarajuću respiratornu aparaturu ako je potrebno. Izbjegavajte dodir s kožom i očima.

4.3. Etil-eter, kromatorografskog razreda

UPOZORENJE: Jako zapaljivo i umjerenou otrovno. Iritativna kažnja. Pogubno ako se udahne. Može oštetiti oči. Može doći do zakašnjelih učinaka. Može formirati eksplozivne perokside. Dim se može zapaliti. Držite se podalje od topline, iskri i plamena. Pobrinite se da su boce uvijek zatvorene. Osigurajte odgovarajuću ventilaciju tijekom upotrebe. Izbjegavajte naslage dima te uklonite sve moguće rizike od vatre, kao što su grijalice ili električne aparate koji nisu proizvedeni od nezapaljivog materijala. Ne evaporirajte do suhoće. Dodavanje vode ili odgovarajućeg reagensa reduciranja može reducirati formiranje peroksida. Ne pijte. Izbjegavajte udisati dim. Izbjegavajte duži ili ponavljeni dodir s kožom.

4.4. n-heptan, kromatorografskog razreda ili izo-oktan

UPOZORENJE: Zapaljivo. Pogubno ako se udahne. Držite se podalje od topline, iskri i plamena. Pobrinite se da su boce uvijek zatvorene. Osigurajte odgovarajuću ventilaciju tijekom upotrebe. Izbjegavajte udisati dim. Izbjegavajte duži ili ponavljeni dodir s kožom.

4.5. Standardna otopina lauril – arahidat (Napomena 3) na 0.05 % (m/V) u heptanu (interni standard za voskove).

Napomena 3: Mogu se koristiti i palmitil palmitat, miristikil stearat i arahidat laureat.

4.6. Standardna otopina metil-heptadekanoat na 0.02 % (m/V) u heptanu (interni standard za metil i etil-estere)

4.7. Sudan 1 (1-fenilazo-2-naftol)

4.8. Plin nositelj: vodik ili helij, čisti plin kromatorografskog razreda.

UPOZORENJE:

Vodik. Pod tlakom jako zapaljiv. Držite se podalje od topline, iskri i plamena, te uklonite sve moguće rizike od vatre, kao što su grijalice ili električne aparate koji nisu proizvedeni od

nezapaljivog materijala. Pobrinite se da su boce uvijek zatvorene, ako se ne koriste. Prije otvaranja ventila boce otpustite napetost elastičnog podešivača. Nemojte stajati ispred otvora boce prilikom otvaranja ventila. Osigurajte odgovarajuću ventilaciju tijekom upotrebe. Nemojte premještati vodik iz jedne u drugu boču. Ne mijesajte plin u boci. Osigurajte da se boce ne mogu prevrnuti. Držite ih podalje od sunčeve svjetlosti i izvora topline. Skladište u nekorzivnom okruženju. Nemojte koristiti oštećene ili neoznačene boce.

Helij. Komprimiran plin pod visokim tlakom. Smanjuje dostupnu količinu kisika. Bocu držite zatvorenom. Osigurajte odgovarajuću ventilaciju tijekom upotrebe. Uvijek koristite sa smanjivačem tlaka. Prije otvaranja ventila boce, otpustite napetost elastičnog podešivača. Ne premještajte plin iz jedne boce u drugu. Osigurajte da se boce ne mogu prevrnuti. Nemojte stajati ispred otvora boce prilikom otvaranja ventila. Držite ih podalje od sunčeve svjetlosti i izvora topline. Skladište u nekorzivnom okruženju. Nemojte koristiti oštećene ili neoznačene boce. Ne udiate. Koristite samo za tehničke svrhe.

4.9. Pomoćni plinovi:

- Vodik, čisti plin kromatorografskog razreda
- Zrak, čisti plin kromatorografskog razreda

UPOZORENJE:

Zrak. Komprimiran plin pod visokim tlakom. Oprezno rukujte u prisutnosti zapaljivih tvari, jer je temperatura samozapaljivosti većine organskih tvari u zraku znatno niža pod tlakom. Pobrinite se da je ventil boce zatvoren kada se boca ne koristi. Uvijek koristite sa smanjivačem tlaka. Prije otvaranja ventila boce otpustite napetost elastičnog podešivača. Nemojte stajati ispred otvora boce prilikom otvaranja ventila. Ne premještajte plin iz jedne boce u drugu. Nemojte mijesati plin u boci. Osigurajte da se boce ne mogu prevrnuti. Držite ih podalje od sunčeve svjetlosti i izvora topline. Skladište u nekorzivnom okruženju. Nemojte koristiti oštećene ili neoznačene boce. Zrak namijenjen za tehničke svrhe ne smije se koristiti za udisanje ili za respirativne aparate.

5. POSTUPAK

5.1. Priprema kromatografske kolone

Otopite 15 g silika gela (točka 4.1.) u n-heksanu (točka 4.2.) i unesite u kolonu (3.2.). Ostavite da se istaloži. Dovršite taloženje pomoću elektrovibratora kako bi se dobio ujednačeniji kromatografski sloj. Propustite 30 ml n-heksana radi uklanjanja svih nečistoća. Na vagi odvagati točno 500 mg uzorka u tikvicu obujma 25 ml, dodati odgovarajući udio internog standarda (točka 4.5.) prema pretpostavljenom udjelu voska. Naprimjer, za maslinovo ulje dodati 0.1 mg lauril arahidata, a za ulje komine masline 0.25 do 0.5 mg.

Pripremljeni uzorak prenijeti u kromatografsku kolonu pomoću dva puta po 2 ml n-heksana (4.2).

Atapalo ispuštati dok ne stigne 1 mm iznad gornje granice apsorbenta. Potom započeti kromatografsko eluiranje dok se ne skupi 180 ml mješavine n-heksana/etil-etera (omjer 99:1 v/v) pri brzini protoka od oko 15 kapi svakih 10 sekundi (ova frakcija sadrži metil i etil-estere i voskove). (Napomene 4 i 5).

Napomena 4: Mješavina n-heksana/etil-etera (99:1) mora se svakodnevno pripremiti.

Napomena 5: Za vizualnu provjeru ispravnog eluiranja voskova, uzorku u otopini može se dodati 100 µm 1% otopine sudana u mješavini n-heksana/etil-etera.

S obzirom da bojilo ima retenciju između voskova i triglicerida, kada bojenje dosegne dno kolone eluiranje treba obustaviti, jer su svi voskovi eluirali.

Tako dobivenu frakciju osušiti u rotacijskom evaporatoru, dok se ne ukloni gotovo sve atapalo. Preostala 2 ml atapala treba

odstraniti pomoću slabe struje dušika, te dodati 2-4 ml n-heptana ili izo-oktana.

5.2. Analiza plinskom kromatografijom

5.2.1. Prijpremni postupak

Postaviti kolonu na plinski kromatograf (3.3.) povezivanjem ulaznog otvora na sustav neposredno na kolonu i izlaznog otvora na detektor. Provjeriti plinski kromatograf (protok plina, rad detektora, rad pisača itd.).

Ako se kolona koristi prvi put, potrebno je prvo kondicionirati. Pustite da kroz kolonu prođe malo plina, zatim uključite plinski kromatograf. Postupno zagrijavati tako da se za 4 sata postigne temperatura od 350 °C. Održavati temperaturu najmanje 2 sata, a zatim uređaj podesiti na radne uvjete (postaviti protok plina, zapaliti plamen, povezati na električni pisač (točka 3.3.4.), postaviti temperaturu komore za kolonu, regulirati detektor itd.) i zabilježiti signal pri osjetljivosti koja je najmanje dvostruku od one koju zahtijeva analiza. Bazna crta mora biti linearna, bez pikova i odstupanja.

Negativno odstupanje ukazuje da kolona nije ispravno spojena, dok pozitivno odstupanje ukazuje da kolona nije dovoljno kondicionirana.

5.2.2. Izbor radnih uvjeta za voskove i metil- i etil-estere (Napomena 6)

Radni uvjeti su općenito sljedeći:

- Temperatura kolone:
20 °C/min 5 °C/min

Početno 80 °C (1min) ----- 140 °C ----- 335 °C (20)

- Temperatura detektora: 350 °C
- Količina injektiranog uzorka: 1 µl otopine n-hektana (2-4 ml)
- Plin nositelj: helij ili vodik pri optimalnoj linearnoj brzini za odabran plin (vidi Dodatak A.)
- Osjetljivost instrumenata: pogodno ispunjavanje gore nabrojanih uvjeta.

Napomena 6: Zbog visoke konačne temperature, dopušteno je pozitivno odstupanje od najviše 10% pune ljestvice.

Ovi uvjeti mogu se promjeniti prema značajkama kolone i plinskog kromatografa kako bi se postiglo razdvajanje svih voskova i zadovoljavajuće razdvajanje plinova (vidjeti točke 2., 3. i 4.). Vrijeme zadržavanja internog standarda C₃₂ mora biti 18 ± 3 minute. Glavni pik koji pripada voskovima mora dosezati najmanje 60% pune ljestvice.

5.3. Provodenje analize

Mikrošpricom od 1 µl uzeti 1 µl otopine. Povući klip šprice tako da igla bude prazna. Staviti iglu u injektor i nakon 1-2 sekunde brzo ubrizgati. Nakon 5 sekundi polaganо izvući iglu.

Registrirati kromatograf dok voskovi potpuno ne eluiraju.

Bazna crta mora stalno ispunjavati tražene uvjete.

5.4. Identifikacija pikova

Identifikacija pojedinačnih pikova mora se temeljiti na vremenu zadržavanja, usporedbom s vremenima zadržavanja poznatih mješavina voskova analiziranih pod jednakim uvjetima. Alkil-esteri su identificirani iz smjese metil- i etil-estera glavnih masnih kiselina u maslinovom ulju (palminska i oleinska).

Na Slici 1. Prikazan je kromatograf voskova u djevičanskom maslinovom ulju. Na slikama 2. i 3. prikazan je kromatograf dva maloprodajna ekstra djevičanska malinova ulja, jedno s metil- i etil-esterima, a drugo bez njih. Na Slici 4. Prikazan je kromatograf ekstra djevičanskog maslinovog ulja najveće kvalitete te isto ulje poprskano s 20% dezodoriranog ulja.

5.5. Kvantitativna analiza voskova

Izračunajte područja pikova lauril arahidata internog standarda i alifatskih estera iz C₄₀ do C₄₆ pomoću integratora.

Izračunajte ukupni sadržaj voskova dodavanjem svakog pojedinog voska u mg/kg ulja, koristeći izraz:

$$\text{Voskovi, } \frac{\text{mg/kg}}{\text{A}_s \cdot \text{m}} = \frac{(\Sigma \text{A}_x) \cdot \text{m}_s \cdot 1\,000}{\text{A}_s \cdot \text{m}}$$

pri čemu je:

Ax = površina pika pojedinog estera u kvadratnim milimetrima

As = površina pika lauril arahidata i internog standarda u kvadratnim milimetrima

ms = masa dodatnog lauril arahidata i internog standarda u miligramima

m = masa uzorka za analizu u gramima.

5.5.1. Kvantitativna analiza metil- i etil-estera

Pomoću integratora izračunajte područja pikova metil-heptadecanoata internog standarda, metil-estere C₁₆ i C₁₈ masnih kiselina, te etil-estere C₁₆ i C₁₈ masnih kiselina.

Izračunajte sadržaj svakog alkil-estera u mg/kg ulja koristeći izraz:

$$\frac{\text{mg/kg}}{\text{A}_s \cdot \text{m}} = \frac{\text{A}_x \cdot \text{m}_s \cdot 1\,000}{\text{A}_s \cdot \text{m}}$$

Ester

pri čemu je:

Ax = površina pika pojedinih C₁₆ i C₁₈ estera u kvadratnim milimetrima

As = površina pika metil-heptadecanoata internog standarda u kvadratnim milimetrima

ms = masa metil-heptadecanoata internog standarda u miligramima

m = masa uzorka za analizu u gramima.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

Ukupan udio različitih voskova od C₄₀ do C₄₆ (Napomena 7) izražava se u miligramima po kilogramu ulja.

Izrazite ukupan udio metil-estera i etil-estera od C₁₆ do C₁₈ i sumu oba.

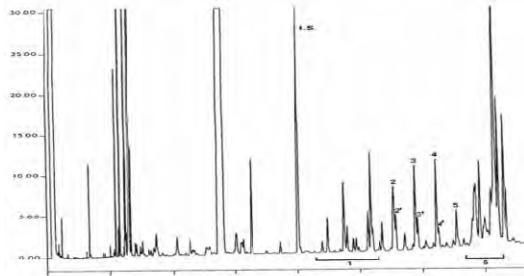
Rezultati se izražavaju najbliže do mg/kg.

Napomena 7: Komponente koje treba kvantificirati odnose se na pikove u parnim brojevima ugljika između alifatskih estera C₄₀ i C₆₀. Za primjer može se koristiti kromatogram voskova prikazan na donjoj slici. Ukoliko se C₄₆ pojavi dva puta, preporučuje se da se za njegovu identifikaciju analizira frakcija voskova ulja komine masline, pri čemu je pik C₄₆ jednostavno identificirati jer je očito najveći.

Izrazite omjer etil-estera i metil-estera.

Slika 1.

Primjer plinskog kromatograma frakcije voskova maslinovog ulja (*)



Pikovi s vremenom zadržavanja od 5 do 8 minuta masnih kiselina metil- i etil-estera

Legenda:

IS = lauril arahidat

1 = diterpetski ester

2 + 2' = esteri C₄₀

3 + 3' = esteri C₄₂

4 + 4' = esteri C₄₄

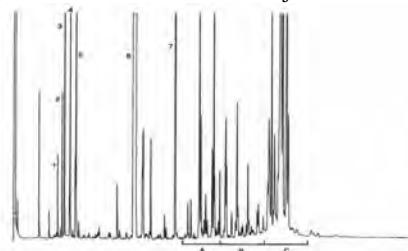
5 = esteri C₄₆

6 = sterolni esteri i triterpenski alkohol

(*) = nakon eluiranja sterolnih estera kromatogram ne smije pokazivati signifikantne pikove (triglyceridi).

Slika 2.

Metil-esteri, etil-esteri i voskovi u djevičanskom maslinovom ulju



Legenda:

1 - metil C₁₆

2 - etil C₁₆

3 - metil-heptadekanoat IS

4 - metil C₁₈

5 - etil C₁₈

6 - squalen

7 - lauril arahidat

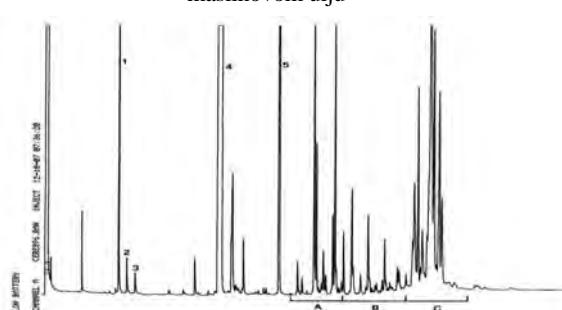
A - diterpetski ester

B - voskovi

C - sterolni esteri i triterpenski esteri.

Slika 3.

Metil-esteri, etil-esteri i voskovi u ekstra djevičanskom maslinovom ulju



Oznake:

1. metil-heptadekanoat I.S.

2. metil C₁₈

3. etil C₁₈

4. skvalen

5. lauril arahidrat I.S.

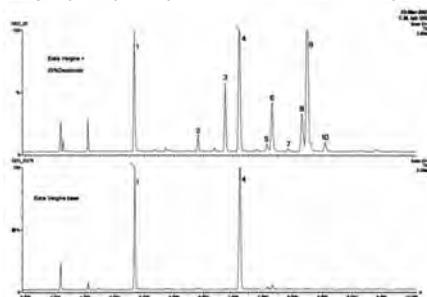
A. diterpenični estri

B. voskovi

C. estri sterola i triterpenični estri.

Slika 4.

Dio hromatograma ekstra djevičanskog maslinovog ulja i istog ulja kojemu je dodano bazmirisno ulje



Legenda:

1. metil-miristat IS

2. metil-palmitat

3. etil-palmitat

4. metil-heptadekanoat IS

5. metil-limoleat

6. metil-oleat

7. metil-stearat

8. etil-linoleat

9. etil-oleat

10. etil-stearat

Dodatak A.

Odredivanje linearne brzine plina

U plinski kromatograf podešen na normanle radne uvjete injektira se od 1 do 3 µl metana (ili propana) i mjeri vrijeme potrebitno plinu da prode kroz kolonu od trenutka injektiranja do trenutka pojave pika (tM).

Linearna brzina u cm/s dana je s L/tM, pri čemu je L duljina kolone u cm, a tM izmjereno vrijeme u sekundama.