На основу члана 17. став 2. и члана 54. став 1. тачка ц) Закона о храни ("Службени гласник БиХ", број 50/04) и члана 17. Закона о Савјету министара Босне и Херцеговине ("Службени гласник БиХ", бр. 30/03, 42/03, 81/06, 76/07, 81/07, 94/07 и 24/08), Савјет министара Босне и Херцеговине, на приједлог Агенције за безбједност хране Босне и Херцеговине у сарадњи са надлежним органима ентитета и Брчко Дистрикта Босне и Херцеговине, на 55. сједници одржаној 26. јуна 2013. године, донио је

ПРАВИЛНИК
О МЕТОДАМА АНАЛИЗЕ МАСЛИНОВОГ УЉА

ДИО ПРВИ - ОПШТЕ ОДРЕДБЕ

Члан 1.
(Предмет)

Овим правилником прописују се аналитичке методе ради испитивања својства уља од плода и комине маслина која се стављају на тржиште ради продаје крајњем потрошачу, а односе се на:

а) физикално-хемијска и органолептичка својства,
б) физикално-хемијска и органолептичка својства сировина,
ц) врсту и количину сировина, додатака и других супстанци које се користе у производњи и преради,
д) методе узорковања и методе анализа физикално-хемијских и органолептичких својстава уља.

ДИО ДРУГИ - ПОСЕБНЕ ОДРЕДБЕ

Члан 2.

(Утврђивање усклађености)

(1) За утврђивање усклађености физикално-хемијских и органолептичких својстава уља из става (2) овог члана са прописаним својствима користе се методе узорковања и анализе које се налазе у анексима овог правилника.

(2) Уља се разврставају у категорије под сљедећим називима:

a) *Дјевичанска маслинова уља*

1) *Екстра дјевичанско маслиново уље* је уље добијено директно из плода маслине искључиво механичким поступцима, које садржи највише 0,8 грама слободних масних киселина изражених као олеинска киселина на 100 грама уља и чија својства одговарају оним наведеним у тачки 1. Анекса I овог правилника;

2) *Дјевичанско маслиново уље* је уље добијено директно из плода маслине искључиво механичким поступцима, које садржи највише 2 грама слободних масних киселина изражених као олеинска киселина на 100 грама уља и чија својства одговарају оним наведеним у тачки 2. Анекса I овог правилника;

3) *Маслиново уље лампанте* је дјевичанско маслиново уље неприхватљивих органолептичких својстава, које садржи више од 2 грама слободних масних киселина изражених као олеинска киселина на 100 грама уља и чија својства одговарају оним наведеним у тачки 3. Анекса I овог правилника;

b) *Рафинисано маслиново уље* је уље добијено рафинацијом дјевичанског маслиновог уља, које не садржи више од 0,3 грама слободних масних киселина изражених као олеинска киселина на 100 грама уља и чија својства одговарају оним наведеним у тачки 4. Анекса I овог правилника;

c) *Маслиново уље састављено од рафинисаних маслинових уља и дјевичанских маслинових уља* је уље добијено мијешањем рафинисаног маслиновог уља и дјевичанских маслинових уља осим маслиновог уља лампанте, који не садржи више од 1 грама слободних масних киселина изражених као олеинска киселина на 100 грама уља и чија својства одговарају оним наведеним у тачки 5. Анекса I овог правилника;

d) *Сирово уље комине маслина* је уље добијено прерадом комине маслина механичким поступцима и/или екстракцијом комине маслина органским растварачима, без рафинације и реестерификације те без мијешања с уљима друге врсте и чија својства одговарају оним наведеним у тачки 6. Анекса I овог правилника;

e) *Рафинисано уље комине маслина* је уље добијено рафинацијом сировог уља комине маслина, који не садржи више од 0,3 грама слободних масних киселина изражених као олеинска киселина на 100 грама уља и чија својства одговарају оним наведеним у тачки 7. Анекса I овог правилника;

f) *Уље комине маслина* је уље добијено мијешањем рафинисаног уља комине маслина и дјевичанских маслинових уља осим маслиновог уља лампанте, које не садржи више од 1 грама слободних масних киселина изражених као олеинска киселина на 100 грама уља и чија својства одговарају оним наведеним у тачки 8. Анекса I овог правилника.

Члан 3.

(Методе узорковања и анализа физикално-хемијских и органолептичких својстава)

(1) Својства уља наведена у Анексу I овог правилника одређују се сљедећим аналитичким методама:

a) за одређивање удјела слободних масних киселина изражених као удио олеинске киселине, метода описана у Анексу II овог правилника,

b) за одређивање пероксидног броја, метода описана у Анексу III овог правилника,

c) за одређивање удјела воскова, метода описана у Анексу IV овог правилника,

d) за одређивање састава и удјела стерола, метода описана у Анексу V овог правилника,

e) за одређивање еритродиола и уваола, метода описана у Анексу VI овог правилника,

f) за одређивање удјела 2-глицерил монопалмитата, метода описана у Анексу VII овог правилника,

g) за SPЕктрофотометријске анализе, метода описана у Анексу VIII овог правилника,

h) за одређивање састава масних киселина, метода описана у Анексу IXа и IXб овог правилника,

i) за одређивање удјела испарљивих халогенираних растварача у маслиновом уљу, метода описана у Анексу X овог правилника,

j) за сензорско оцјењивање дјевичанског маслиновог уља, метода описана у Анексу XI овог правилника,

k) за одређивање стигмастадиена, метода описана у Анексу XII овог правилника,

l) за одређивање триацилглицерола са ECN 42, метода описана у Анексу XIII овог правилника,

m) за одређивање удјела алифатских алкохола, метода описана у Анексу XIV овог правилника,

n) одређивање удјела воскова, метил естара масних киселина и етил естара масних киселина, капиларном гасном хроматографијом, метода описана у Анексу XV овог правилника.

Члан 4.

(Провјера органолептичких својстава)

(1) Провјеру органолептичких својстава уља из члана 2. став (2) тачке а) овог правилника спроводе тијела надлежна за спровођење службених контрола у Босни и Херцеговини.

(2) Органолептичка својства дјевичанских маслинових уља провјеравају се посредством група одабраних и оспособљених оцјењивача органолептичких својстава дјевичанских маслинових уља (у даљем тексту: панели) који су на предлог Агенције за безбједност хране Босне и Херцеговине (у даљем тексту: Агенција) овлашћени од Свајет министара Босне и Херцеговине.

(3) Сматра се да су органолептичка својства уља из члана 2. став (2) тачке а) овог правилника усклађена са означеном категоријом ако овлашћени панел потврди категоризацију.

(4) Ако овлашћени панели не потврде означену категорију, тијела надлежна за спровођење службених контрола дужна су да на захтјев заинтересоване странке организују двије засебне провјере које ће спровести други овлашћени панели, при чему најмање једну провјеру треба да спроведе панел овлашћен у земљи произвођача.

(5) Ако обје провјере из става (4) овог члана потврде означену категорију уља из става (1) овог члана, сматра се да је уље исправно означено.

(6) У случају супротном од става (5) овог члана, заинтересована странка из става (4) овог члана дужна је да сноси трошкове провјера.

Члан 5.

(Узорковање и припрема узорака за испитивање)

(1) У складу са методама из члана 3. овог правилника, при провјери карактеристика уља коју спроводи тијело надлежно за спровођење службене контроле, узорци треба да буду узети у складу са нормама BAS EN ISO 5555 о узорковању и BAS EN ISO 661 о припреми узорака за испитивање. Без обзира на тачку 6.8. норме BAS EN ISO 5555 о узорковању, у случају серије уља чија амбалажа не прелази 100 литара, узорак мора бити узет у складу са Анексом Ia овог правилника.

(2) Не доводећи у питање норму BAS EN ISO 5555 о узорковању и Поглавље 6 норме BAS EN ISO 661 о припреми узорака за испитивање, узети узорци морају у што краћем року бити смјештени на тамно мјесто заштићено од свјетлости и јаких извора топлоте те послани у лабораторију на анализу не касније од:

а) десетог радног дана након узимања узорака, у периоду од октобра до маја, и

б) петог радног дана након узимања узорака, у периоду од јуна до септембра.

Члан 6.

(Временска ограничења)

(1) За потребе потврде предвиђене чланом 4. овог правилника, анализе из Анекса II, III, VIII, IX и XI овог правилника и, гдје је примјенљиво, било које друге анализе прописане посебним прописима биће урађене четири мјесеца прије истека рока трајања.

(2) Ако је узорковање урађено више од четири мјесеца прије истека рока трајања, анализе из става (1) овог члана биће урађене најкасније прије истека четвртог мјесеца рачунајући од мјесеца у којем је узорак узет.

(3) На друге анализе предвиђене чланом 3. овога правилника не примјењују се временска ограничења.

(4) Ако резултати анализа не потврде својства означене категорије уља, тијело надлежно за спровођење службене контроле обавјештава о томе заинтересовану странку најкасније мјесец дана прије краја периода из става (2) овог члана, осим ако је узорак узет мјесец дана или краће од истека рока трајања.

Члан 7.

(Резултати анализа)

За уља из члана 2. став (2) овог правилника сматра се да одговарају означеној категорији ако се резултати анализа добијени у складу са методама из члана 3. овог правилника налазе унутар граница прописаних овим правилником.

Члан 8.

(Утврђивање означене категорије)

Поступак провјере да ли узорци задовољавају означену категорији може се извести на сљедеће начине:

а) обављајући анализе из Анекса I овог правилника (било којим редослиједом) или

б) пратећи редослијед наведен у Анексу Iб овог правилника у стаблу одлуке, док се не дође до једног од закључака из тог стабла.

Члан 9.

(Овлашћивање панела)

(1) Агенција, у сарадњи са надлежним органима ентитета и Брчко Дистрикта Босне и Херцеговине, предлаже Савјету министара Босни и Херцеговини панеле које треба овластити како би тијело надлежно за спровођење службене контроле могло провјерити и потврдити органолептичка својства уља из члана 2. став (2) тачке а) овог правилника, у складу са посебним прописом о овлашћивању панела.

(2) Ако Агенција наиђе на тешкоће при успостављању панела у Босни и Херцеговини, може се позвати на панел који је овлашћен у некој другој земљи Европске уније под условима еквивалентним онима у посебном пропису о овлашћивању панела из става (1) овог члана.

(3) Агенција ће, у сарадњи са надлежним органима ентитета и Брчко Дистрикта Босне и Херцеговине, донијети посебан пропис о овлашћивању панела за оцјењивање органолептичких својстава дјевичанских маслинових уља.

(4) До доношења посебног прописа о овлашћивању панела из става (3) овог члана, Савјет министара Босне и Херцеговине, на предлог Агенције, може овластити панел из земље чланице Европске уније.

(5) Агенција води списак панела овлашћених у складу са условима из ст. (1), (2) и (4) овог члана те га објављује у "Службеном гласнику БиХ".

(6) За овлашћивање панела треба да буду испуњени услови прописани Анексом XI тачке 4. овог правилника.

(7) Агенција ће формирати комисију за одабир панела које треба да предложи Савјету министара БиХ за овлашћивање.

Члан 10.

(Количина уља у уљним погачама)

(1) Количина уља у уљним погачама и другим остацима добијеним при екстракцији маслиновог уља (CN ознаке 2306 90 11 00 и 2306 90 19 00) одређује се методом из Анекса XV овог правилника.

(2) Количина уља из става (1) овог члана изражава се као удио масе уља у маси суве материје.

Члан 11.

(Халогенирани растварачи)

(1) Присуство контамиманата дефинише се Правилником о максимално дозвољеним количинама за одређене контаминанте у храни ("Службени гласник БиХ", бр. 37/09 и 39/12).

(2) Максималне дозвољене количине халогенираних раставарача за све категорије маслиновог уља су:

а) максимална количина сваког појединачног халогенираног растварача износи 0,1 mg/kg,

b) укупна максимална количина халогенираних растварача износи 0,2 mg/kg.

Члан 12.

(Регистрација објеката за паковање маслиновог уља)

Регистрацију објеката за паковање маслинових уља са регистрованом ознаком обављају надлежни органи ентитета и Брчко Дистрикта Босне и Херцеговине.

ДИО ТРЕЋИ - ПРЕЛАЗНЕ И ЗАВРШНЕ ОДРЕДБЕ

Члан 13.

(Анекси)

Анекси: I, Ia, Iб, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IXa, IXб, X, XI, XII, XIII, XIV, XV чине саставни дио овог правилника.

Члан 14.

(Службена контрола и инспекцијски надзор)

(1) Службена контрола и инспекцијски надзор спроводе се у складу са важећим прописима.

(2) За повреду одредаба овог правилника примјењују се казнене мјере у складу са одредбама поглавља XVI Закона о храни ("Службени гласник БиХ", број 50/04), уколико посебним прописима није другачије прописано.

Члан 15.

(Престанак важења одредаба)

(1) Ступањем на снагу овог правилника престаје да важи Правилник о југословенском стандарду за сирово маслиново уље ("Службени лист СФРЈ", број 62/91 и "Службени лист РБиХ", број 2/92), Правилник о квалитету јестивог маслиновог уља и мијешаног маслиновог уља ("Службени лист СФРЈ", број 51/91 и "Службени лист РБиХ", број 2/92), у дијелу који се односи на методе анализа маслиновог уља, Правилник о југословенским стандардима за уља и масти биљног и животињског поријекла ("Службени лист СФРЈ", број 05/91 и "Службени лист Р БиХ", број 2/92), у дијелу који се односи на маслиново уље.

(2) Уље узорковано и анализирано у складу са одредбама прописа наведеним у ставу 1. овог правилника може се стављати на тржиште 12 мјесеци од дана ступања на снагу овог правилника.

Члан 16.

(Ступање на снагу)

Овај правилник ступа на снагу осмог дана од дана објављивања у "Службеном гласнику БиХ".

СМ број 189/13
26. јуна 2013. године
Сарајево

Предсједавајући
Савјета министара БиХ
Вјекослав Беванда, с. р.

АНЕКС I

СВОЈСТВА ПОЈЕДИНИХ КАТЕГОРИЈА МАСЛИНОВОГ УЉА

Категорија	Масних киселина метилних естера (FAMEs) и масних киселина етил естери (FAEEs)	Слободне масне киселине (%) (*)	Пероксидни број ммол O_2/kg (*)	Воскови mg/kg (**)	2-глицерил монопалмитат (%)	Стигмастадиени mg/kg (1)	Разлика између HPLC ECN42 и теоретског ECN42	K232 (*)	K270 (*)	Делта-К (*)	Органолептичка анализа Медијан мана (Мм) (*)	Органолептичка анализа Медијан воћности (Мв) (*)

1.Екстра дјевичанско маслиново уље	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg / kg или75 mg / kg<ΣFAME +FAEE≤ 150 mg/kg и(FAEE/FAME ≤ 1,5	≤ 0,8	≤20	≤ 250	≤ 0,9 ако је удио палмитинске киселине % ≤14 ≤1,0 ако је удио палмитинске киселине % >14	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Мм = 0	Мв > 0
2.Дјевичанско маслиново уље	–	≤ 2,0	≤20	≤ 250	≤ 0,9 ако је удио палмитинске киселине % ≤14 ≤1,0 ако је удио палмитинске киселине % >14	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Мм ≤ 3,5	Мв > 0
3.Маслиново уље лампанте	–	> 2,0	—	≤ 300(3)	≤ 0,9 ако је удио палмитинске киселине % ≤14 ≤1,1 ако је удио палмитинске киселине % >14	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Мм>3,5(2)	–

4.Рафинисано маслиново уље	–	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 ако је удио палмитинске киселине % ≤14 ≤1,1 ако је удио палмитинске киселине % >14	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	–
5. Маслиново уље састављено од рафинисаног маслиновог уља и дјевичанских маслинових уља	–	≤ 1,0	≤15	≤ 350	≤ 0,9 ако је удио палмитинске киселине % ≤14 ≤1,0 ако је удио палмитинске киселине % >14	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	
6. Сирово уље комине маслина	–	—	—	> 350 (4)	≤1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	
7.Рафинисано уље комине маслина	–	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	
8.Уље комине маслина	–	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	

(1) Сума изомера који се могу (али не морају) одијелити капиларном колоном.

(2) Или ако је медијан мана Мм ≤ 3,5, а медијан воћног = 0.

(3) Уља с удјелом воскова између 300 mg/kg и 350 mg/kg сматрају се маслиновим уљима лампанте ако је укупни удио алифатских алкохола ≤ 350 mg/kg или ако је удио еритродиола и уваола ≤ 3,5%.

(4) Уља с удјелом воскова између 300 mg/kg и 350 mg/kg сматрају се сировим уљима комине маслина ако је укупни удио алифатских алкохола > 350 mg/kg и ако је удио еритродиола и уваола > 3,5%.

(5) HPLC ECN42 = метода одређивања триацилглицерола.

(6) К270,К232,делта К= екстинкцијски коефицијент.

Категорија	Састав масних киселина (1)						Сума трансолеинских изомера (%)	Сума транслинолних и транслиноленских изомера (%)	Састав стерола						Укупни стероли (mg/kg)	Еритродиол и уваол (%) (**)
	Миристинска (%)	Линоленска (%)	Арахинска (%)	Гадолеинска (%)	Бехенска (%)	Лигноцеринска (%)			Холестерол (%)	Брасикастерол (%)	Кампестерол (%)	Стигмастерол (%)	Бета-ситостерол(%) (2)	Делта-7-стигмастерол(%)		
1. Екстрадјевичанско маслиново уље	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< камп.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5

2. Дјевичанско масли ново уље	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< кам п.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Масли ново уље лампанте	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (3)
4. Рафинисано масли ново уље	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< кам п.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Масли ново уље састављено од рафинисаног масли новог уља и	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< кам п.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5

дјевичанских маслинових уља																
6. Сирово уље комине маслина	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (4)
7. Рафинисано уље комине маслина	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< кам п.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Уље комине маслина	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< кам п.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

(1) Друге присутне масне киселине (%): палмитинска: 7,5 до 20,0; палмитолеинска: 0,3 до 3,5; хептадеканска: ≤ 0,3; хептадеценска: ≤ 0,3; стеаринска: 0,5 до 5,0; олеинска: 55,0 до 83,0; линолна: 3,5 до 21,0.

(2)Сума:делта-5,23-стигмастадиенола + клеростерола + бета-ситостерола + ситостанола + делта-5-авенастерола + делта-5,24-стигмастадиенола.

(3) Уља с удјелом воскова између 300 mg/kg и 350 mg/kg сматрају се маслиновим уљима лампанте ако је укупни удио алифатских алкохола ≤ 350 mg/kg или ако је удио еритродиола и уваола ≤ 3,5%.

(4) Уља с удјелом воскова између 300 mg/kg и 350 mg/kg сматрају се сировим уљима комине маслина ако је укупни удио алифатских алкохола > 350 mg/kg и ако је удио еритродиола и уваола > 3,5%

Напомене:

(а) Резултати анализа морају бити изражени оним бројем децималних мјеста којим је изражена гранична вриједност за поједино својство. Задња бројка мора се увећати за једну јединицу ако је бројка која слиједи већа од 4.

(б) Ако најмање једно од својстава не одговара наведеним вриједностима, уље се може или сврстати у другу категорију или сврстати у уље смањеног квалитета за сврхе овог правилника.

(ц) Својства означена једном звјездицом (*), а односе се на квалитет уља, подразумијевају сљедеће:

– код дјевичанских маслинових уља, ако вриједност најмање једног од означених својстава не задовољава граничну вриједност, уље се сврстава у другу одговарајућу категорију унутар дјевичанских маслинових уља;

– код маслиновог уља лампанте, довољно је да барем једно од означених својстава одговара прописаним вриједностима.

(д) Ако је својство означено са двије звјездице (**), значи да за све типове уља комине маслина није нужно да сва означена својства истовремено удовољавају прописаним вриједностима.

АНЕКС Iа
УЗОРКОВАЊЕ УЉА ОД ПЛОДА ИЛИ КОМИНЕ МАСЛИНА КОЈЕ СЕ ИСПОРУЧУЈЕ У ОБЛИКУ ПОЈЕДИНАЧНИХ АМБАЛАЖА ЧИЈИ ВОЛУМЕН НЕ ПРЕЛАЗИ 100 л

Ова се метода узорковања примјењује на испоруке уља од плода или комине маслина које не прелазе 125 000 литара, у појединачним амбалажама које не прелазе 100 литара.

Уколико испорука прелази 125 000 литара, треба се подијелити у серије од 125 000 литара или мање. Уколико је испорука мања од 125 000 литара, сматра се једном серијом. Метода се тада примјењује на сваку серију.

Минимални број примарних узорака које треба узети одређен је величином серије у складу са табелом из тачке 1.

Величина примарног узорка одређује се на основу волумена појединачне амбалаже, у складу са табелом из тачке 2.1.

Дефиниције појмова "испорука", "примарни узорак" и "лабораторијски узорак" наведене су у норми BAS ISO 5555.

"Серија" означава скуп продајних јединица које су произведене и запаковане у таквим условима да се уље садржано у свим тим продајним јединицама сматра хомогеним у погледу свих аналитичких својстава.

1. БРОЈ ПРИМАРНИХ УЗОРАКА КОЈЕ ТРЕБА УЗЕТИ

Минимални број примарних узорака који треба узети одређује се према величини серије, у складу са сљедећом таблицом:

Величина серије (у литрама) мања од	Минимални број примарних узорака
7 500	2
25 000	3
75 000	4
125000	5

Појединачне амбалаже одабране за примарни узорак морају бити сусједне амбалаже у серији.

У случају сумње, треба повећати број узетих примарних узорака.

2. САДРЖАЈ ПРИМАРНИХ УЗОРАКА
2.1. Примарни узорци морају садржавати:

Ако појединачна амбалажа има волумен од:	Примарни узорак треба садржавати уље из:
(а) 5 литара или више	(а) 3 појединачне узастопне амбалаже
(б) 3 литре или више, али мање од 5 литара	(б) 3 појединачне узастопне амбалаже
(ц) 2 литре или више, али мање од 3 литра	(ц) 3 појединачне узастопне амбалаже
(д) 1 литре или више, али мање од 2 литра	(д) 6 појединачних узастопне амбалажа
(е) 0,75 литара или више, али мање од 1 литра	(е) 6 појединачних узастопне амбалажа
(ф) мање од 0,75 литара	(ф) Трострука количина уља из минималног броја амбалажа, укупног волумена већег од 1,5 литара

2.2. Примарни узорци морају се чувати у појединачним амбалажама до тренутка анализе. Уље у примарним узорцима треба се тада, по потреби, подијелити у три лабораторијска узорка како би се извршиле:

(а) анализе из анекса II, III, VIII и IX овог правилника,
(б) анализа из Анекса XI овог правилника,
(ц) друге анализе.

2.3. Претпаковине које творе примарни узорак треба да се подијеле у складу са поступцима контроле прописаним националним законодавством.

3. АНАЛИЗЕ И РЕЗУЛТАТИ

(а) Сваки од примарних узорака из тачке 1 треба да се подијели у лабораторијске узорке, у складу са тачком 2.5. норме BAS EN ISO 5555 и анализира како слиједи:
- одређивање слободних масних киселина, према члану 3. став (1) тачка а) овог правилника,
- одређивање пероксидног броја, према члану 3.став (1) тачка б) овог правилника,
- спектрофотометријска анализа, према члану 3.став (1) тачка г) овог правилника,
- одређивање састава масних киселина, према члану 3.став (1) тачка х) овог правилника.

(б) Ако један од резултата анализа из става (а) табеле за барем један од примарних узорака из исте серије не одговара својствима означене категорије уља, цијела та серија се сматра неодговарајућом.

Ако резултати анализа из става (а) табеле за сваки од примарних узорака узетих из исте серије нису једнаки, узевши у обзир поновљивост метода о којима је ријеч, цијела серија се сматра нехомогеном и сваки примарни узорак се подвргава другим прописаним анализама. У супротном, друге прописане анализе спроводе се само на једном примарном узорку.

(ц) Ако један од резултата анализа из другог одломка тачке (б) не одговара својствима означене категорије уља, цијела та серија сматра се неодговарајућом.

Ако сви резултати анализа из другог одломка тачке (б) одговарају својствима означене категорије уља, цијела та серија сматра се одговарајућом

АНЕКС Iб.
СТАБЛО ОДЛУКЕ ЗА УТВРЂИВАЊЕ ДА ЛИ УЗОРАК МАСЛИНОВОГ УЉА ОДГОВАРА ОЗНАЧЕНОЈ КАТЕГОРИЈИ

Анализе којима се утврђује да ли уље од плода или комине маслина одговара означеној категорији могу се извршавати спроводећи анализе предвиђене за сврхе утврђивања усклађености са својствима из Анекса I овог правилника:

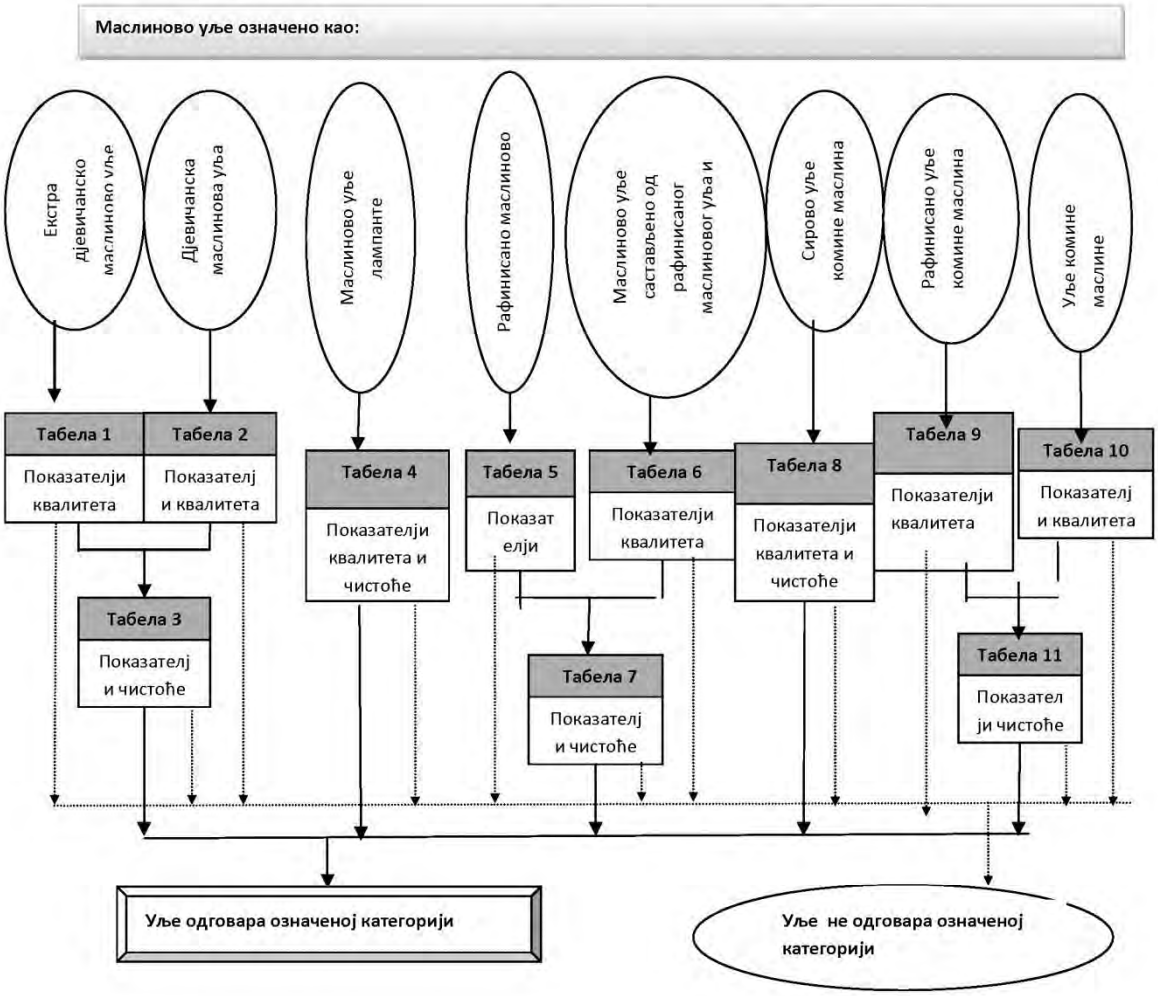
(а) или било којим редослиједом
(б) или редослиједом приказаним у стаблу одлуке, док се не дође до једне од одлука наведених у стаблу.

Анализе контаминаната потребне за утврђивање усклађености са важећим прописима спроводе се независно од утврђивања усклађености са својствима из Анекса I овог правилника.

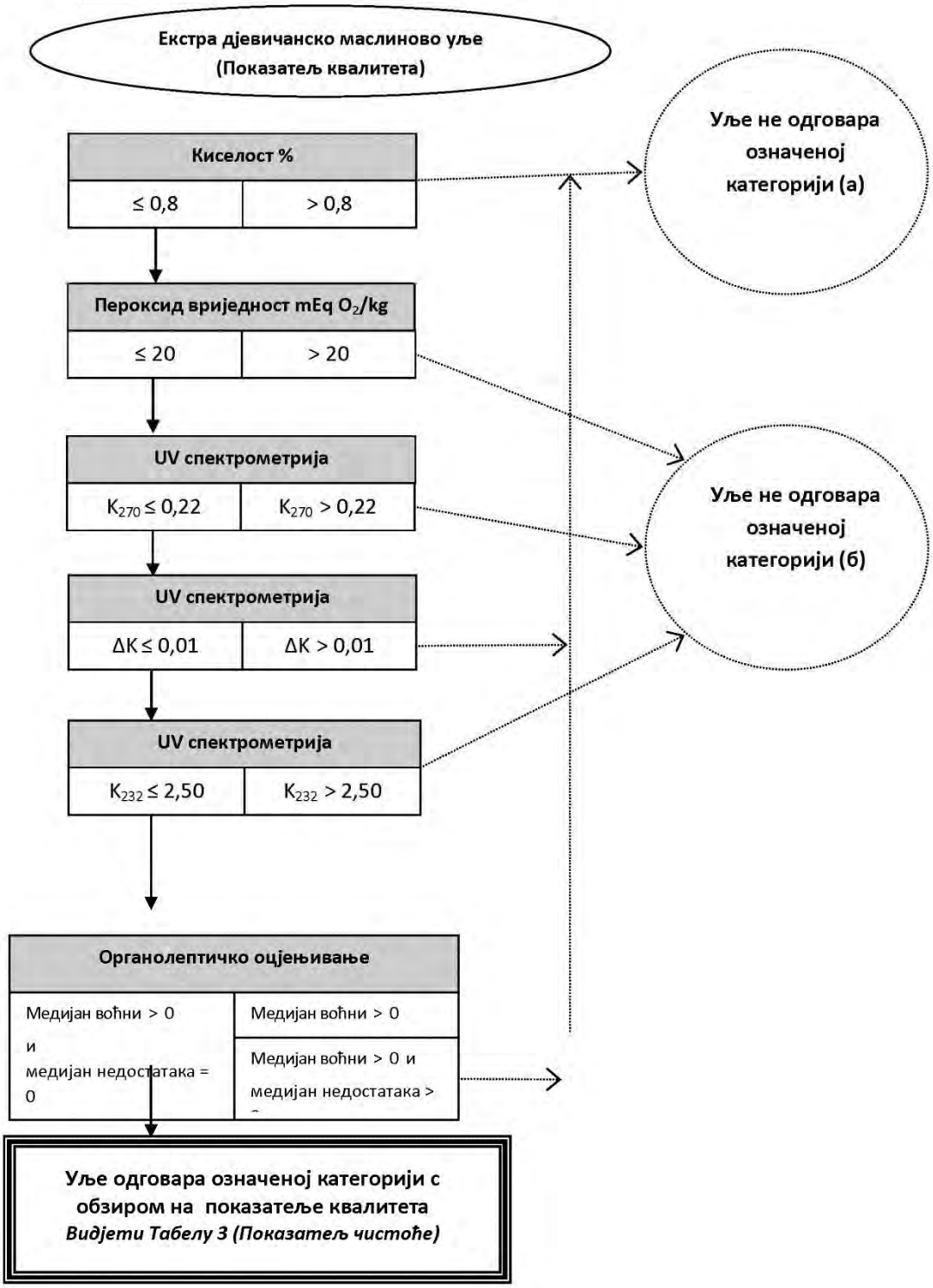
Стабло одлуке примјењује се на све категорије уља од плода и комине маслина. Састоји се од таебла означених бројевима од 1 до 11, којима се приступа на основу означене категорије уља која се анализира, редослиједом наведеним у општој табели.

Објашњење ознака коришћених у табелама:
- двострука линија (=) означава смјер који треба слиједити у случају усклађености (позитиван одговор) са критеријумима из претходног оквира. Тачкаста линија (...) упућује на алтернативни смјер који треба слиједити у случају неусклађености,
- наслови у оквирима у табелама 1 до 11 односе се на анализе прописане овим правилником на основу табела еквиваленције из Додатка I овог анекса,
- слова у заградама, која се појављују у кружним симболима (негативне одлуке) у табелама од 1 до 11 упућују на напомене из Додатка II овог анекса. Слова сама по себи не обавезују на извршавање анализа, нити значе вјеродостојност наведених претпоставки.

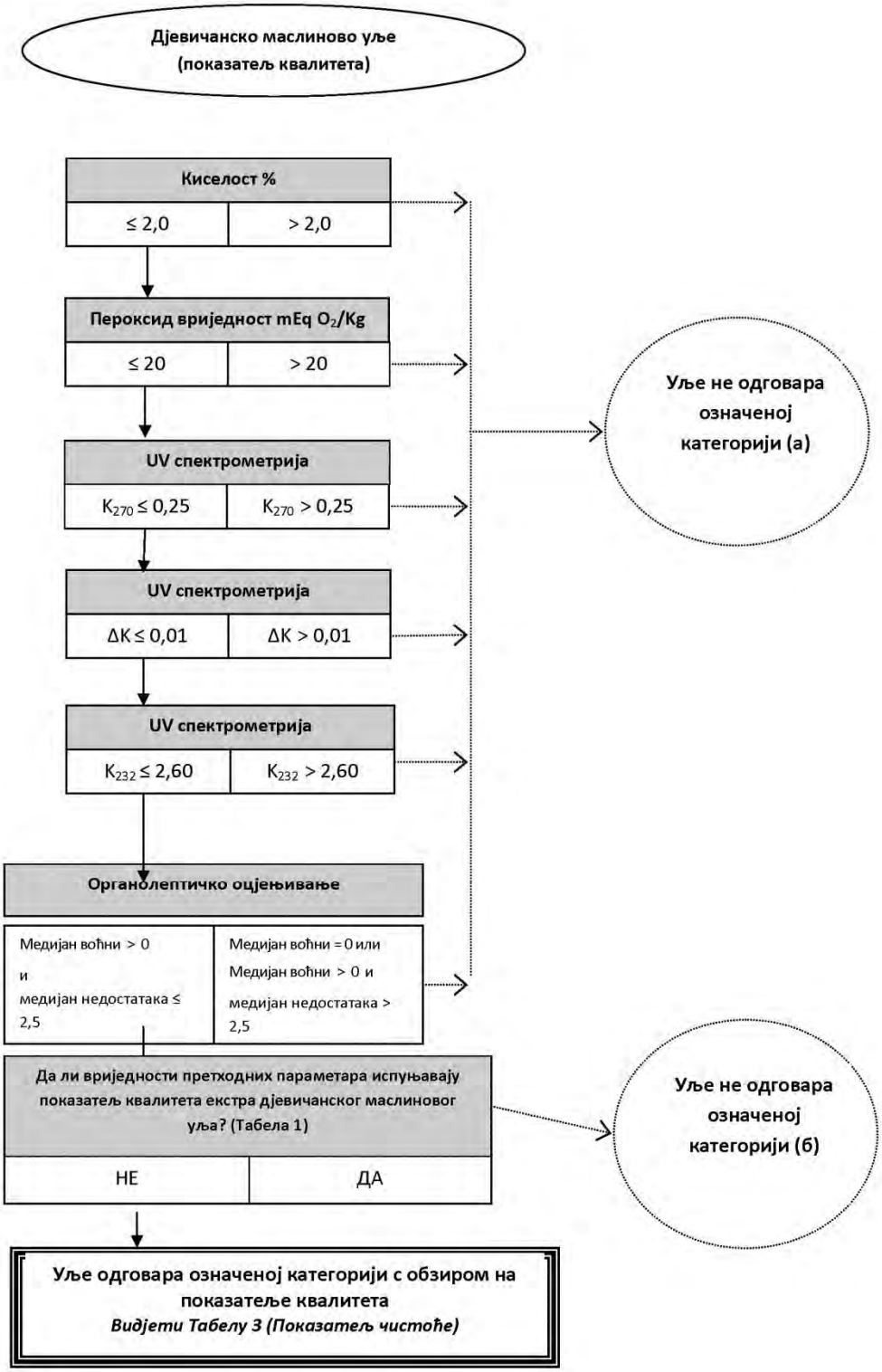
Општа табела



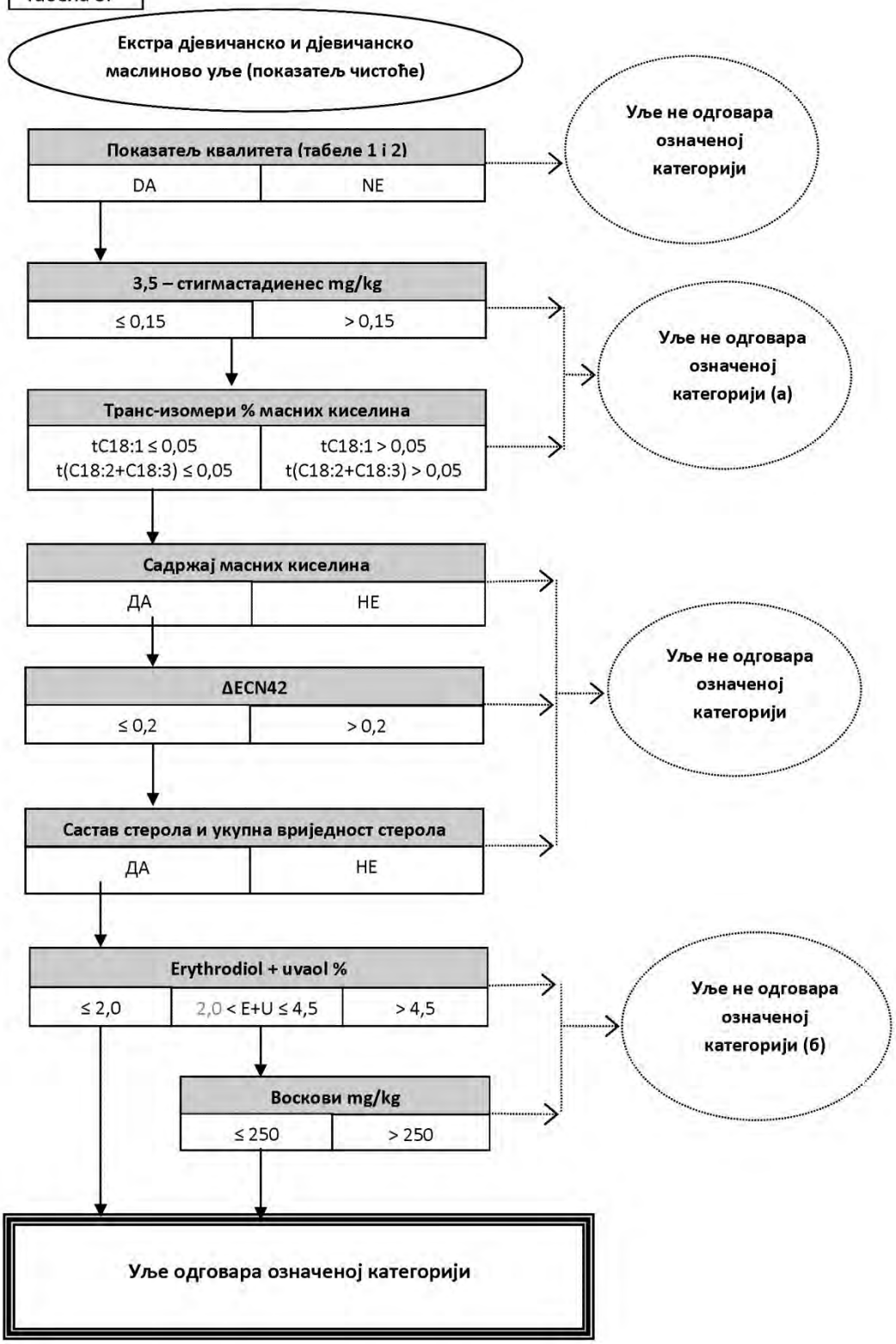
Табела 1.

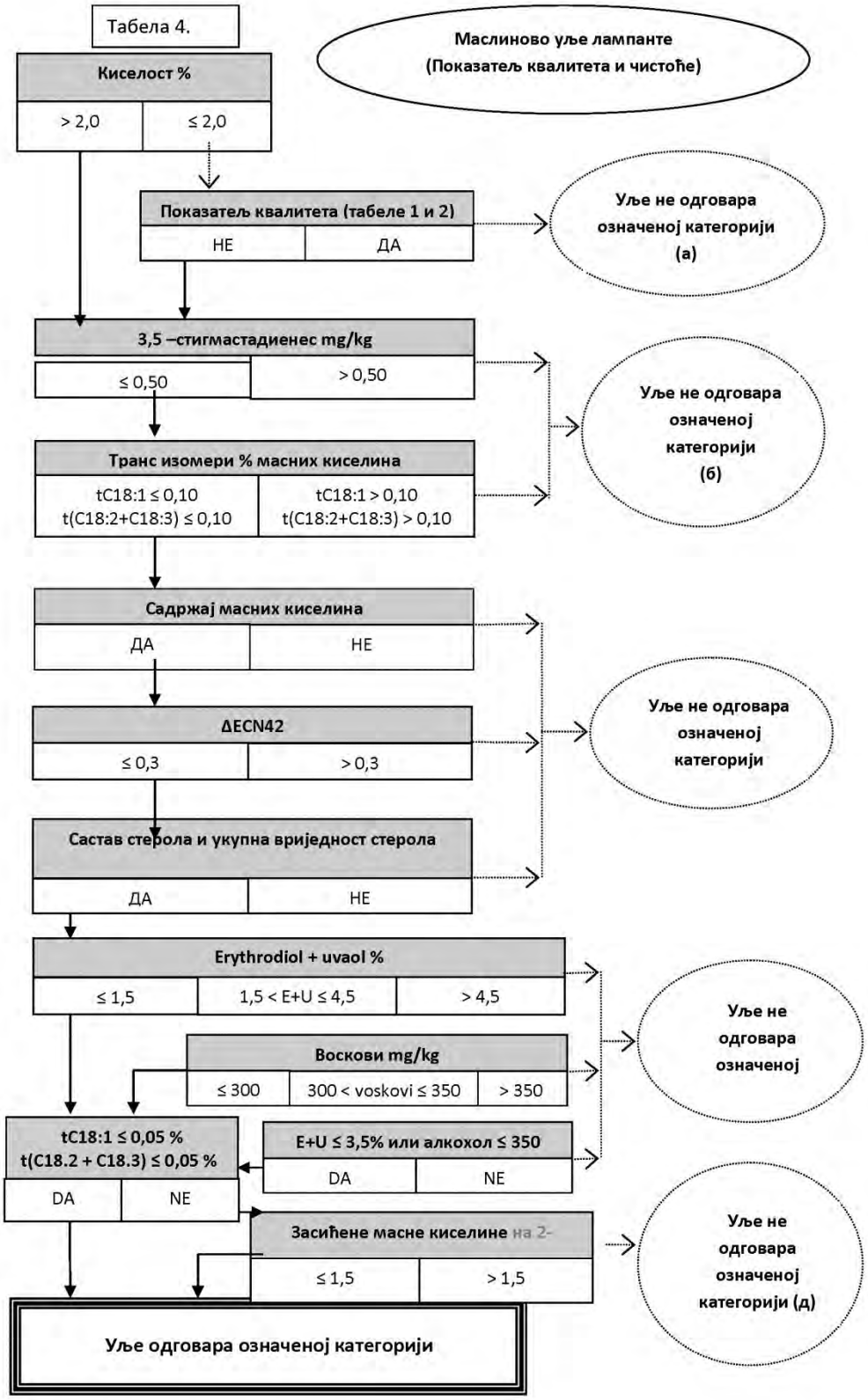

Екстра дјевичанско маслиново уље
(Показатељ квалитета)
Киселост %
≤ 0,8
> 0,8
Уље не одговара означеној категорији (а)
Пероксид вриједност mEq O_2/kg
≤ 20
> 20
UV спектрометрија
K_{270} ≤ 0,22
K_{270} > 0,22
Уље не одговара означеној категорији (б)
UV спектрометрија
ΔK ≤ 0,01
ΔK > 0,01
UV спектрометрија
K_{232} ≤ 2,50
K_{232} > 2,50
Органолептичко оцјењивање
Медијан воћни > 0
и
медијан недостатака = 0
Медијан воћни > 0
Медијан воћни > 0 и
медијан недостатака >
Уље одговара означеној категорији с обзиром на показатеље квалитета
Видјети Табелу 3 (Показатељ чистоће)

Табела 2.

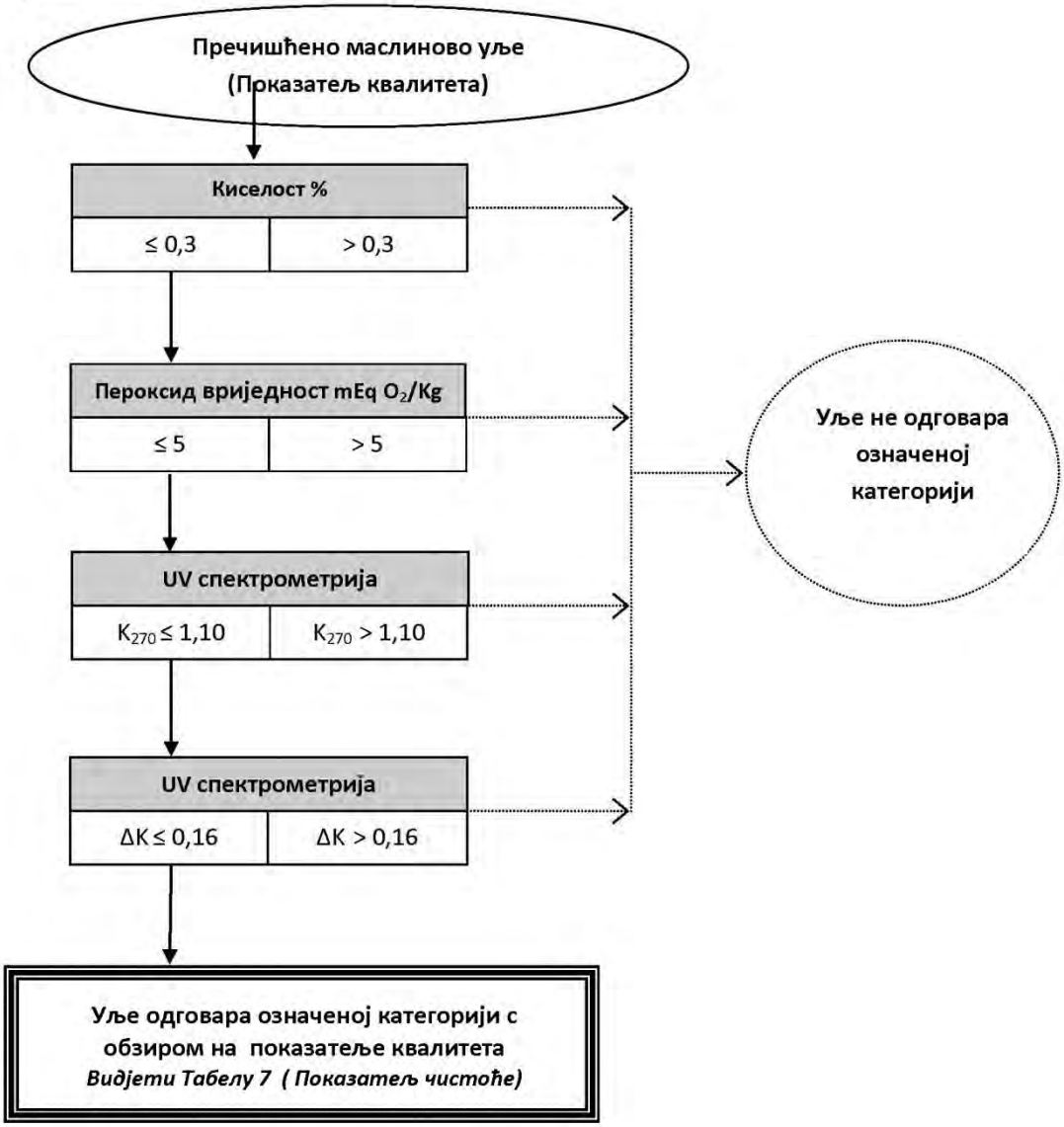

Дјевичанско маслиново уље
(показатељ квалитета)
Киселост %
≤ 2,0
> 2,0
Пероксид вриједност mEq O_2/Kg
≤ 20
> 20
UV спектрометрија
$K_{270} \leq 0,25$
$K_{270} > 0,25$
UV спектрометрија
$\Delta K \leq 0,01$
$\Delta K > 0,01$
UV спектрометрија
$K_{232} \leq 2,60$
$K_{232} > 2,60$
Органолептичко оцјењивање
Медијан воћни > 0 и медијан недостатака ≤ 2,5
Медијан воћни = 0 или Медијан воћни > 0 и медијан недостатака > 2,5
Уље не одговара означеној категорији (а)
Да ли вриједности претходних параметара испуњавају показатељ квалитета екстра дјевичанског маслиновог уља? (Табела 1)
НЕ
ДА
Уље не одговара означеној категорији (б)
Уље одговара означеној категорији с обзиром на показатеље квалитета
Видјети Табелу 3 (Показатељ чистоће)

Табела 3.

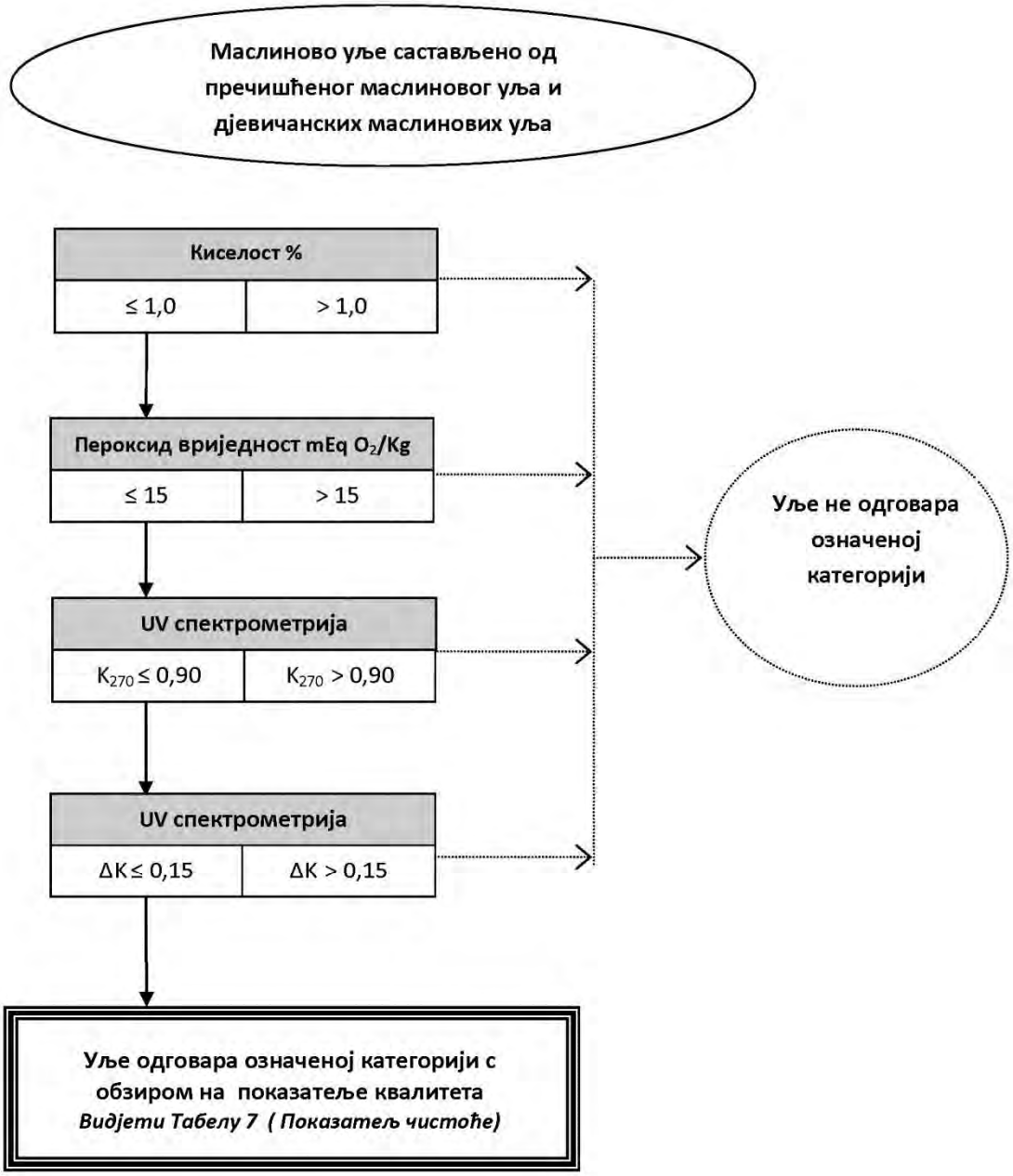

Екстра дјевичанско и дјевичанско маслиново уље (показатељ чистоће)
Показатељ квалитета (табеле 1 i 2)
DA
NE
Уље не одговара означеној категорији
3,5 – стигмастадиенес mg/kg
≤ 0,15
> 0,15
Уље не одговара означеној категорији (а)
Транс-изомери % масних киселина
tC18:1 ≤ 0,05
t(C18:2+C18:3) ≤ 0,05
tC18:1 > 0,05
t(C18:2+C18:3) > 0,05
Садржај масних киселина
ДА
НЕ
ΔECN42
≤ 0,2
> 0,2
Уље не одговара означеној категорији
Састав стерола и укупна вриједност стерола
ДА
НЕ
Erythrodiol + uvaol %
≤ 2,0
2,0 < E+U ≤ 4,5
> 4,5
Воскови mg/kg
≤ 250
> 250
Уље не одговара означеној категорији (б)
Уље одговара означеној категорији


Табела 4.
Маслиново уље лампанте
(Показатељ квалитета и чистоће)
Киселост %
> 2,0
≤ 2,0
Показатељ квалитета (табеле 1 и 2)
НЕ
ДА
Уље не одговара означеној категорији (а)
3,5 –стигмастадиенес mg/kg
≤ 0,50
> 0,50
Транс изомери % масних киселина
tC18:1 ≤ 0,10
t(C18:2+C18:3) ≤ 0,10
tC18:1 > 0,10
t(C18:2+C18:3) > 0,10
Уље не одговара означеној категорији (б)
Садржај масних киселина
ДА
НЕ
ΔECN42
≤ 0,3
> 0,3
Уље не одговара означеној категорији
Састав стерола и укупна вриједност стерола
ДА
НЕ
Erythrodiol + uvaol %
≤ 1,5
1,5 < E+U ≤ 4,5
> 4,5
Воскови mg/kg
≤ 300
300 < voskovi ≤ 350
> 350
Уље не одговара означеној
tC18:1 ≤ 0,05 %
t(C18.2 + C18.3) ≤ 0,05 %
DA
NE
E+U ≤ 3,5% или алкохол ≤ 350
DA
NE
Засићене масне киселине на 2-
≤ 1,5
> 1,5
Уље не одговара означеној категорији (д)
Уље одговара означеној категорији

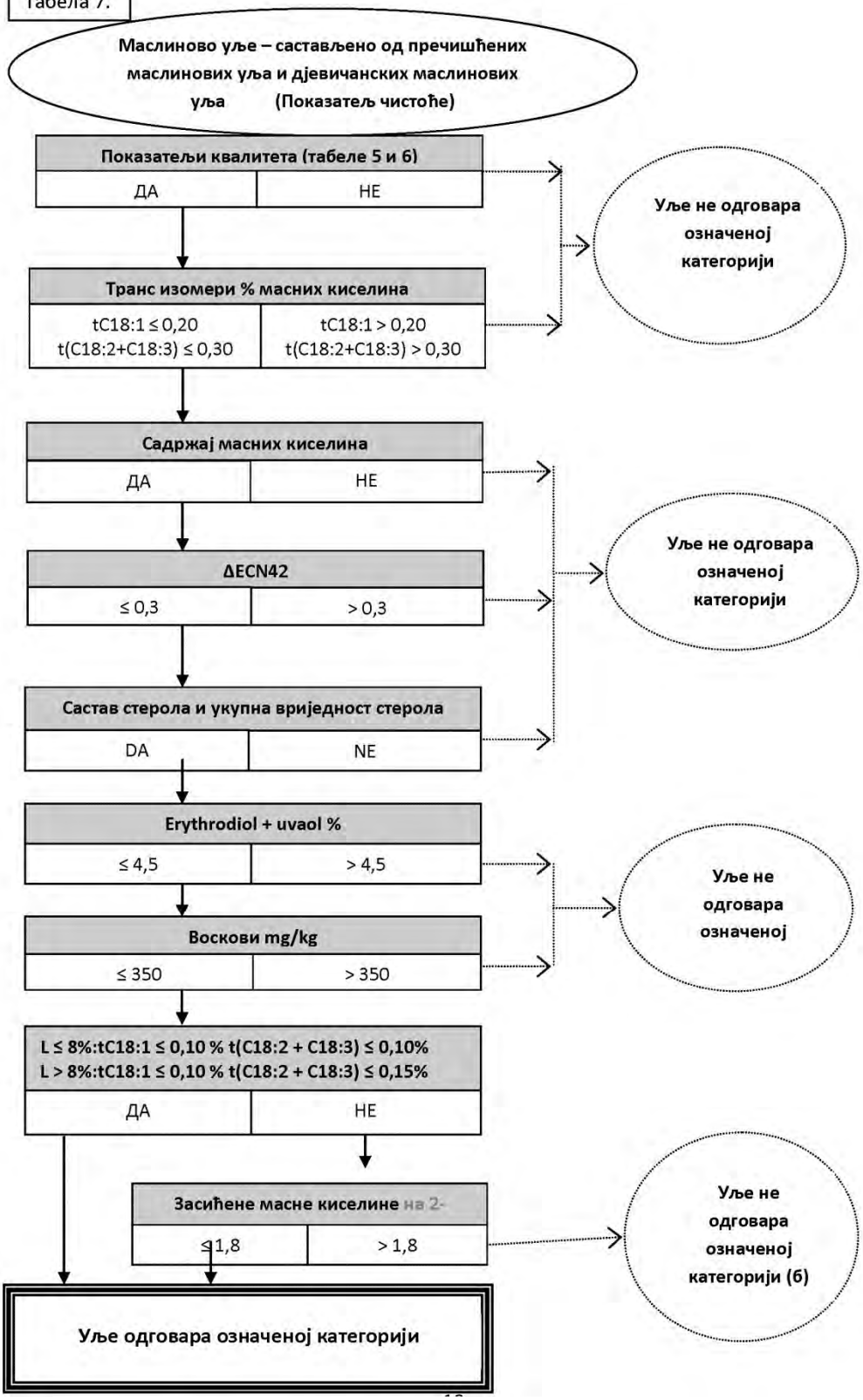
Табела 5.


Пречишћено маслиново уље
(Показатељ квалитета)
Киселост %
≤ 0,3
> 0,3
Пероксид вриједност mEq O_2/Kg
≤ 5
> 5
UV спектрометрија
K_{270} ≤ 1,10
K_{270} > 1,10
UV спектрометрија
ΔK ≤ 0,16
ΔK > 0,16
Уље не одговара означеној категорији
Уље одговара означеној категорији с обзиром на показатеље квалитета
Видјети Табелу 7 (Показатељ чистоће)

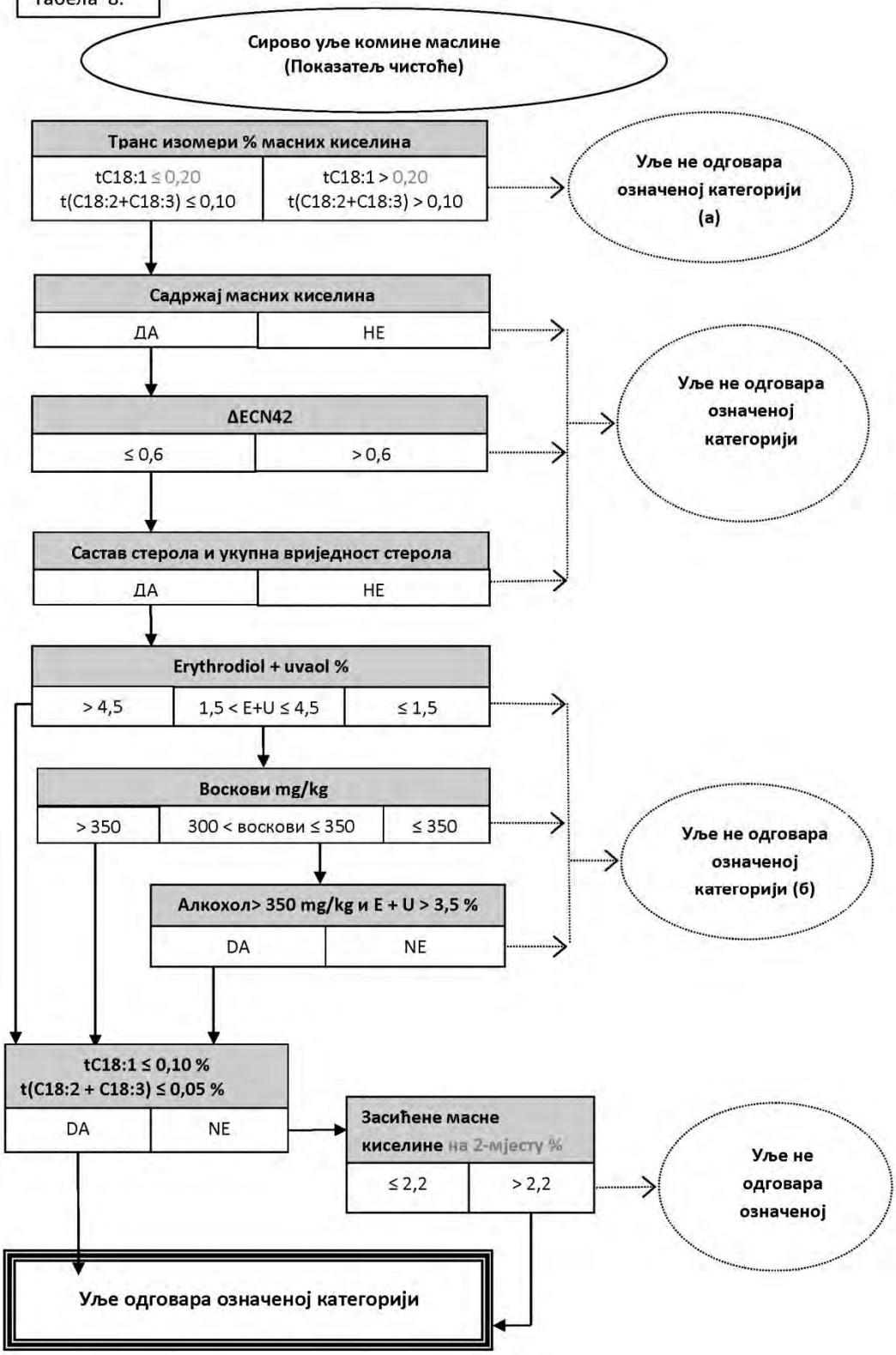
Табела 6.


Маслиново уље састављено од пречишћеног маслиновог уља и дјевичанских маслинових уља
Киселост %
≤ 1,0
> 1,0
Пероксид вриједност mEq O_2/Kg
≤ 15
> 15
UV спектрометрија
$K_{270} \leq 0,90$
$K_{270} > 0,90$
UV спектрометрија
$\Delta K \leq 0,15$
$\Delta K > 0,15$
Уље не одговара означеној категорији
Уље одговара означеној категорији с обзиром на показатеље квалитета
Видјети Табелу 7 (Показатељ чистоће)

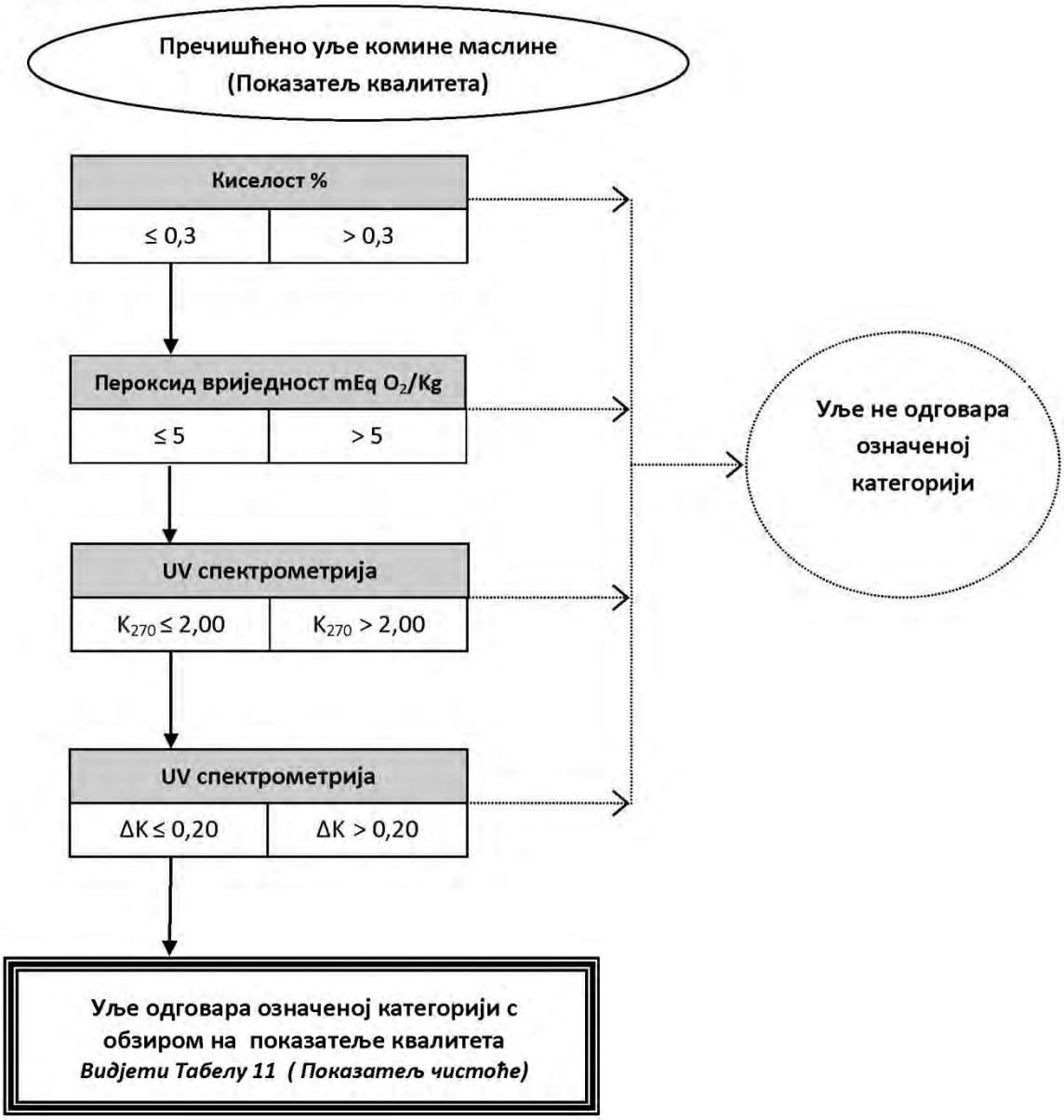
Табела 7.


Маслиново уље – састављено од пречишћених маслинових уља и дјевичанских маслинових уља (Показатељ чистоће)
Показатељи квалитета (табеле 5 и 6)
ДА
НЕ
Уље не одговара означеној категорији
Транс изомери % масних киселина
tC18:1 ≤ 0,20
t(C18:2+C18:3) ≤ 0,30
tC18:1 > 0,20
t(C18:2+C18:3) > 0,30
Садржај масних киселина
ДА
НЕ
Уље не одговара означеној категорији
ΔECN42
≤ 0,3
> 0,3
Састав стерола и укупна вриједност стерола
DA
NE
Erythrodiol + uvaol %
≤ 4,5
> 4,5
Уље не одговара означеној
Воскови mg/kg
≤ 350
> 350
L ≤ 8%:tC18:1 ≤ 0,10 % t(C18:2 + C18:3) ≤ 0,10%
L > 8%:tC18:1 ≤ 0,10 % t(C18:2 + C18:3) ≤ 0,15%
ДА
НЕ
Засићене масне киселине на 2-
≤ 1,8
> 1,8
Уље не одговара означеној категорији (б)
Уље одговара означеној категорији

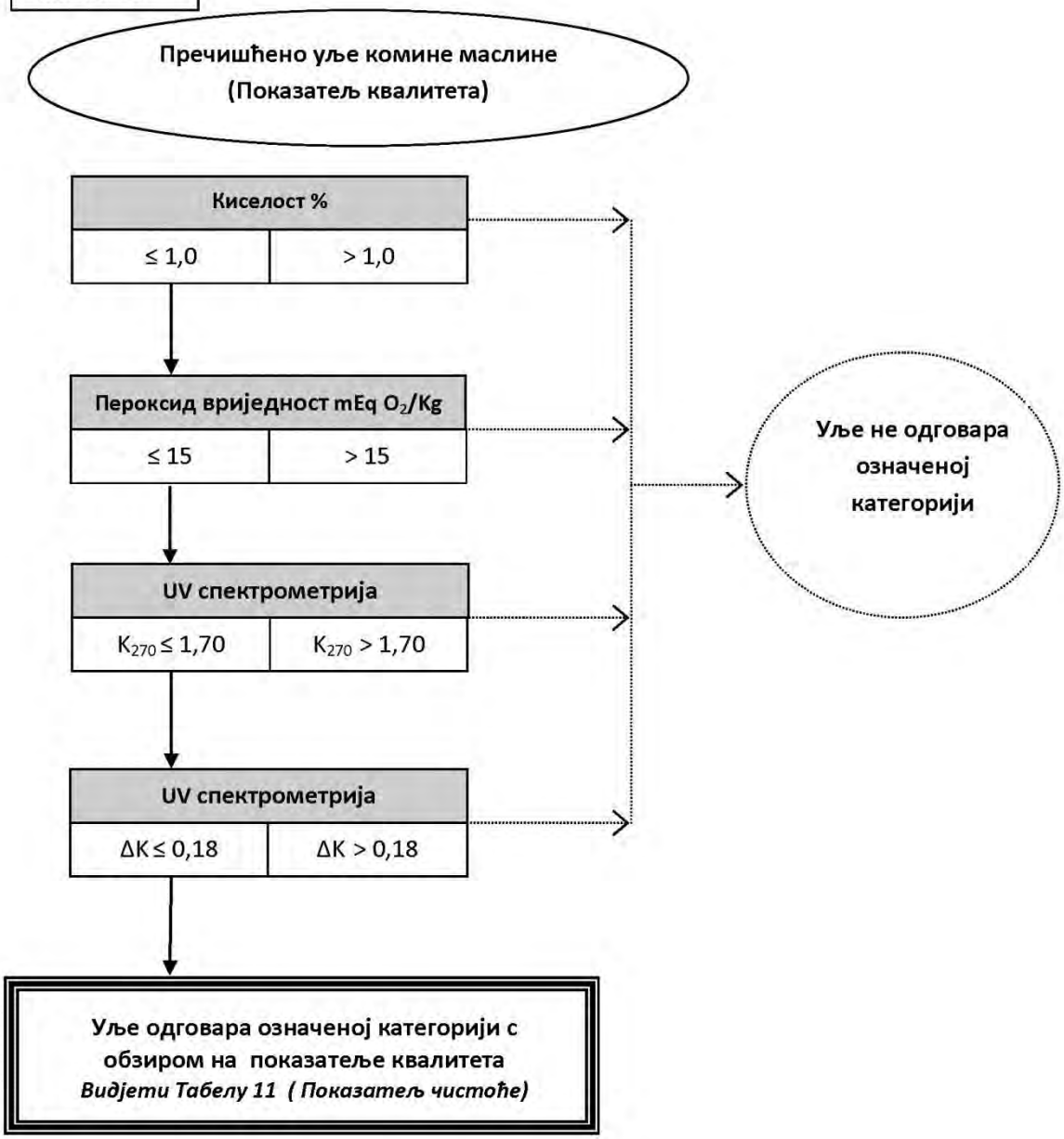
Табела 8.


Сирово уље комине маслине
(Показатељ чистоће)
Транс изомери % масних киселина
tC18:1 ≤ 0,20
t(C18:2+C18:3) ≤ 0,10
tC18:1 > 0,20
t(C18:2+C18:3) > 0,10
Уље не одговара означеној категорији (а)
Садржај масних киселина
ДА
НЕ
ΔECN42
≤ 0,6
> 0,6
Уље не одговара означеној категорији
Састав стерола и укупна вриједност стерола
ДА
НЕ
Erythrodiol + uvaol %
> 4,5
1,5 < E+U ≤ 4,5
≤ 1,5
Воскови mg/kg
> 350
300 < воскови ≤ 350
≤ 350
Уље не одговара означеној категорији (б)
Алкохол> 350 mg/kg и E + U > 3,5 %
DA
NE
tC18:1 ≤ 0,10 %
t(C18:2 + C18:3) ≤ 0,05 %
DA
NE
Засићене масне киселине на 2-мјесту %
≤ 2,2
> 2,2
Уље не одговара означеној
Уље одговара означеној категорији

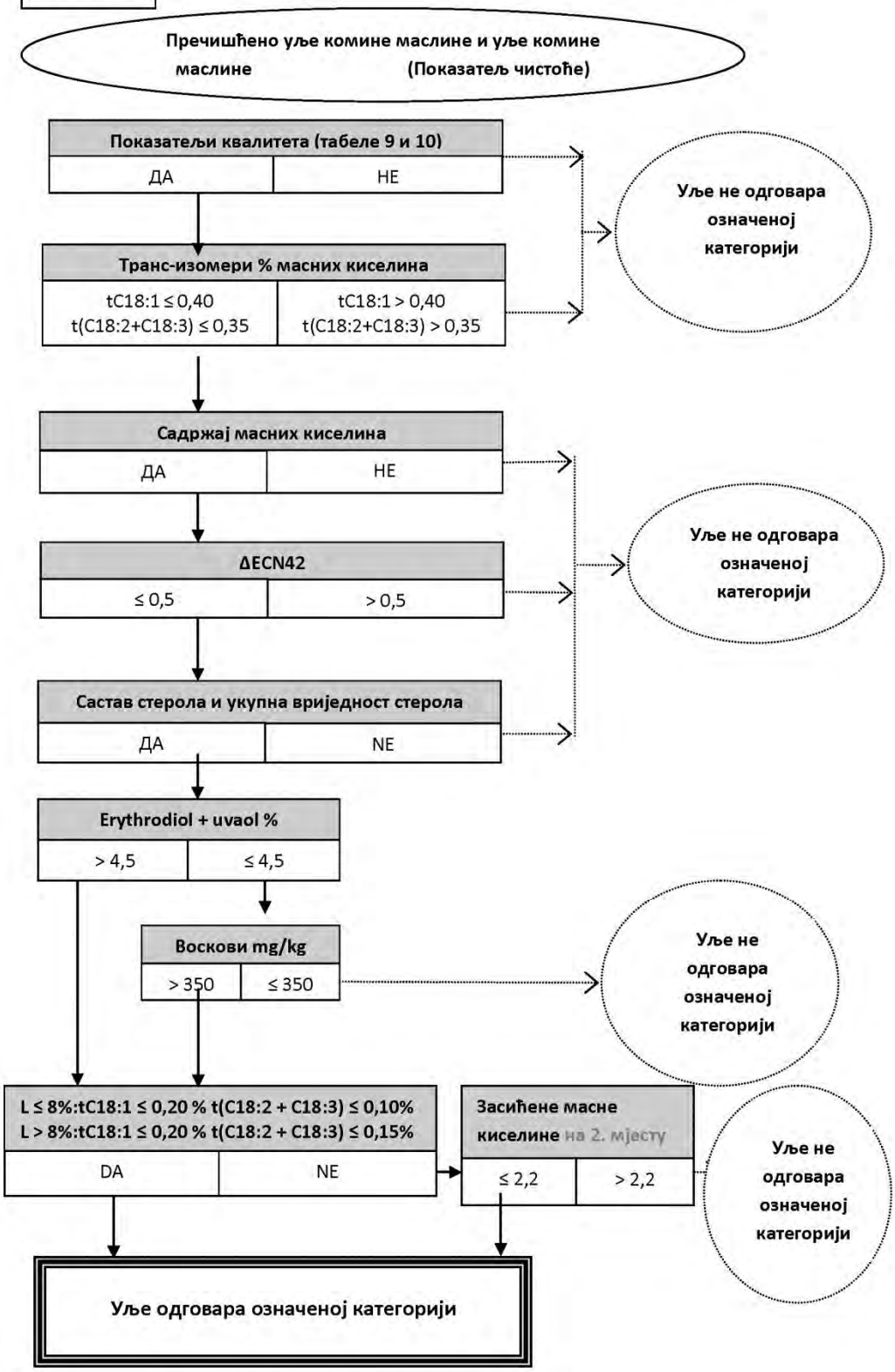
Табела 9.


Пречишћено уље комине маслине
(Показатељ квалитета)
Киселост %
≤ 0,3
> 0,3
Пероксид вриједност mEq O_2/Kg
≤ 5
> 5
UV спектрометрија
K_{270} ≤ 2,00
K_{270} > 2,00
UV спектрометрија
ΔK ≤ 0,20
ΔK > 0,20
Уље не одговара означеној категорији
Уље одговара означеној категорији с обзиром на показатеље квалитета
Видјети Табелу 11 (Показатељ чистоће)

Табела 10.


Пречишћено уље комине маслине
(Показатељ квалитета)
Киселост %
≤ 1,0
> 1,0
Пероксид вриједност mEq O_2/Kg
≤ 15
> 15
UV спектрометрија
$K_{270} \leq 1,70$
$K_{270} > 1,70$
UV спектрометрија
$\Delta K \leq 0,18$
$\Delta K > 0,18$
Уље не одговара означеној категорији
Уље одговара означеној категорији с обзиром на показатеље квалитета
Видјети Табелу 11 (Показатељ чистоће)

Табела 11.


Пречишћено уље комине маслине и уље комине маслине (Показатељ чистоће)
Показатељи квалитета (табеле 9 и 10)
ДА
НЕ
Уље не одговара означеној категорији
Транс-изомери % масних киселина
tC18:1 ≤ 0,40
t(C18:2+C18:3) ≤ 0,35
tC18:1 > 0,40
t(C18:2+C18:3) > 0,35
Садржај масних киселина
ДА
НЕ
ΔECN42
≤ 0,5
> 0,5
Уље не одговара означеној категорији
Састав стерола и укупна вриједност стерола
ДА
NE
Erythrodiol + uvaol %
> 4,5
≤ 4,5
Воскови mg/kg
> 350
≤ 350
Уље не одговара означеној категорији
L ≤ 8%:tC18:1 ≤ 0,20 % t(C18:2 + C18:3) ≤ 0,10%
L > 8%:tC18:1 ≤ 0,20 % t(C18:2 + C18:3) ≤ 0,15%
DA
NE
Засићене масне киселине на 2. мјесту
≤ 2,2
> 2,2
Уље не одговара означеној категорији
Уље одговара означеној категорији

ДОДАТАК 1
ТАБЕЛА ЕКВИВАЛЕНТНОСТИ ИЗМЕЂУ ПОЈМОВА У СТАБЛУ ОДЛУКЕ И АНЕКСА ОВОГ ПРАВИЛНИКА С НАЗИВИМА АНАЛИТИЧКИХ МЕТОДА

Појам из стабла одлуке	Ознака АНЕКСА	Назив методе
– Киселост	АНЕКС II	Одређивање слободних масних киселина, хладна метода
– Пероксидни број	АНЕКС III	Одређивање пероксидног броја
– УВ спектрометрија	АНЕКС VIII	Спектрофотометријска анализа
– Сензорско оцјењивање	АНЕКС XI	Сензорско оцјењивање дјевичанског маслиновог уља
– 3,5-стигмастадиени	АНЕКС XII	Метода одређивања стигмастадиена у биљним уљима
– Транс изомери масних киселина	АНЕКС IXа и АНЕКС IXб	Одређивање метил естера масних киселина гасном хроматографијом Припрема метил естера масних киселина
– Састав масних киселина	АНЕКС IXа и АНЕКС IXб	Одређивање метил естера масних киселина гасном хроматографијом Припрема метил естера масних киселина
– ΔECN42	АНЕКС XIII	Одређивање састава триглицерида с ECN42 (разлика између резултата добијених HPLC-ом и теоретске количине)
– Састав стерола и укупни стероли	АНЕКС V	Одређивање састава и удјела стерола гасном хроматографијом
– Еритродиол и уваол	АНЕКС VI	Одређивање еритродиола и уваола
– Воскови	АНЕКС IV	Одређивање удјела воскова капиларном гасном хроматографијом
– Алифатски алкохоли	АНЕКС XIV	Одређивање удјела алифатских алкохола капиларном гасном хроматографијом
-2-глицерил монопалмитат (%)	АНЕКС VII	Одређивање удјела 2-глицерил монопалмитата
-удјела воскова, метил естара масних киселина и етил естара масних киселина,	АНЕКС XV	одређивање удјела воскова, метил естара масних киселина и етил естара масних киселина, капиларном гасном хроматографијом, метода описана у Анексу XVовог правилника

ДОДАТАК 2

Табела 1
(а) Види дјевичанско маслиново уље или маслиново уље лампанте (показатељи квалитета Табела 2, или показатељи квалитета и чистоће Табела 4)
(б) Види маслиново уље лампанте (показатељи квалитета и чистоће Табела 4)

Табела 2
(а) Види маслиново уље лампанте (показатељи квалитета и чистоће Табела 4)
(б) Види екстра дјевичанско маслиново уље (показатељи квалитета Табела 1)

Табела 3
(а) Присуство рафинисаних уља (маслиновог или других)
(б) Присуство уља комине маслина

Табела 4
(а) Види екстра дјевичанско маслиново уље и дјевичанско маслиново уље (показатељи квалитета Табела 1 и 2 Табела)
(б) Присуство рафинисаних уља (маслиновог или других)
(ц) Присуство уља комине маслина
(д) Присуство естерификованих уља

Табела 7
(а) Присуство уља комине маслина
(б) Присуство естерификованих уља

Табела 8
(а) Присуство рафинисаних уља (маслиновог или других)
(б) Види маслиново уље лампанте (показатељи квалитета и чистоће Табела 4)
(ц) Присуство естерификованих уља

Табела 11
(а) Присуство естерификованих уља

АНЕКС II
ОДРЕЂИВАЊЕ СЛОБОДНИХ МАСНИХ КИСЕЛИНА (КИСЕЛОСТИ), ХЛАДНА МЕТОДА

1. СВРХА

Одређивање слободних масних киселина у маслиновим уљима. Удио слободних масних киселина споразумно се изражава као киселост израчуната на конвенционалан начин.

1.1. Принцип

Узорак се отопи у смјеси растварача, а присутне слободне масне киселине титрирају се етанолним раствором калијум-хидроксида.

1.2. Реагенси

Сви реагенси треба да буду п.а. чистоће, а вода треба да буде дестилована или еквивалентне чистоће.

1.2.1. Диетил етер / 95%-тни етанол (v/v), смјеса у омјеру 1:1 (v/v).

Напомена: Диетил етер је изузетно запаљив и може творити експлозивне пероксиде па при његовој употреби треба бити посебно опрезан.

Смјесу треба неутрализовати непосредно прије употребе раствором калијум-хидроксида (1.2.2.), уз додатак 0,3 ml раствора фенолфталеина (1.2.3.) на 100 ml смјесе.

Напомена: У недостатку диетил етера може се користити смјеса растварача која садржи етанол и толуен. Ако је потребно, етанол се може замијенити 2-пропанолом.

1.2.2. Калијум-хидроксид, стандардизовани етанолни раствор c(KOH) око 0,1 mol/l или, ако је потребно, c(KOH) око 0,5 mol/l.

Тачна концентрација етанолног раствора калијум-хидроксида мора бити позната и провјерена непосредно прије употребе. Треба се користити раствор припремљен барем пет дана прије употребе и декантиран у боцу од смеђег стакла са гуменим чепом. Раствор треба да буде безбојан или блиједожуте боје.

Напомена: Стабилан безбојни раствор калијум-хидроксида може се припремити на сљедећи начин: загрије се до врења 1000 ml етанола са 8 g калијум-хидроксида и 0,5 g струготина алуминијума и настави с врењем уз повратно хладило један сат. Одмах се дестилује. У дестилату се отопи прописана количина калијум-хидроксида. Остави се неколико дана и декантира бистри супернатант од талога калијум-карбоната.

Раствор се може припремити и без дестилације на сљедећи начин: у 1000 ml етанола дода се 4 ml алуминијум-бутилата и смјеса се остави неколико дана. Декантира се супернатант и отопи прописана количина калијум-хидроксида. Раствор је спреман за употребу.

1.2.3. Фенолфталеин, раствор концентрације 10 g/l у 95-96%-тном етанолу (v/v), или (у случају интензивно обојених уља) раствор алкалног плавила концентрације 20 g/l у 95-96%-тном етанолу (v/v).

1.3. Апаратура

Уобичајена лабораторијска апаратура која укључује:

1.3.1. Аналитичку вагу;

1.3.2. Ерленмејерову тиквицу од 250 ml;

1.3.3. Бирету од 10 ml, са подјелом на 0,05 ml.

1.4. Поступак

1.4.1. Припрема узорка за анализу

(За анализу се користи филтрирани узорак. Ако вода и нечистоће заједно чине мање од 1%, узорак се може користити без даље обраде; ако прелазе 1%, потребно је филтрирање.)

1.4.2. Узорак

Количина узорка зависи од очекиване киселости, према сљедећој табели:

Очекивана киселост	Маса узорка (g)	Тачност вагања (g)
< 1	20	0,05
1 до 4	10	0,02
4 до 15	2,5	0,01
15 до 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Узорак се одваже у Ерленмејерову тиквицу (1.3.2)

1.4.3. Одређивање

Узорак (1.4.2) отопи се у 50 до 150 ml претходно неутрализоване смјесе диетил етера и етанола (1.2.1).

Титрира се уз мијешање раствором калијум-хидроксида (1.2.2) концентрације 0,1 mol/l (видјети Напомену 2) до промјене боје индикатора (ружичаста боја фенолфталеина задржава се најмање 10 секунди).

Напомена 1. Стандардизовани етанолни раствор калијум-хидроксида (1.2.2) може се замијенити воденим раствором калијум или натријум-хидроксида, под условом да волумен воде додате приликом титрације не изазове раздвајање фаза.

Напомена 2. Ако потребна количина 0,1 mol/l раствора калијум-хидроксида прелази 10 ml, употријебити раствор концентрације 0,5 mol/l.

Напомена 3. Ако се раствор замути током титрације, додати довољно смјесе раствора (1.2.1) да се добије бистри раствор.

1.5. Удио слободних масних киселина (киселост), изражен као проценат олеинске киселине

Удио слободних масних киселина (киселост), изражен као масени удио, једнак је:

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

гдје је:

V = волумен стандардизованог раствора калијум-хидроксида употријебљен при титрацији, у ml;

c = тачна концентрација стандардизованог раствора калијум-хидроксида, у mol/l;

M = моларна маса, у g/mol, киселине која се користи за изражавање резултата (олеинска = 282);

м = маса узорка у грамима.

Резултат представља аритметичку средину два одређивања.

АНЕКС III
ОДРЕЂИВАЊЕ ПЕРОКСИДНОГ БРОЈА

1. СВРХА

У овом Анексу се описује метода одређивања пероксидног броја уља и масти.

2. ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Ова метода може се примијенити на уља и масти животињског и биљног поријекла.

3. ДЕФИНИЦИЈА

Пероксидни број је количина оних супстанци у узорку, изражена у милимолима активног кисеоника по килограму, које оксидирају калијум-јодид у описаним радним условима. Може се изразити и у милиеквивалентима активног кисеоника по килограму.

4. ПРИНЦИП

Третирање узорка, отопљеног у сирћетној киселини и хлороформу, раствором калијум- јодида. Титрирација ослобођеног јода стандардним раствором натријум-тиосулфата.

5. АПАРАТУРА

Сва употријебљена опрема мора бити без присутних редуцирајућих или оксидирајућих супстанци.

Напомена: Брушене површине не смију се мастити.

5.1. Стаклена капсула од 3 ml.

5.2. Тиквице од око 250 ml, са брушеним грлом и чепом, осушене прије употребе и напуњене чистим, сувим инертним гасом (азотом или, још боље, угљен-диоксидом).

5.3. Бирета од 25 или 50 ml, са подјелом на 0,1 ml.

6. РЕАГЕНСИ

6.1. Хлороформ, аналитичке чистоће, из којег је претходно уклоњен кисеоник пропуштањем струје чистог, сувог инертног гаса.

6.2. Ледена сирћетна киселина, аналитичке чистоће, из које је претходно уклоњен кисеоник пропуштањем струје чистог, сувог инертног гаса.

6.3. Калијум-јодид, засићен водени раствор, свјеже припремљен, без присутног јода и јодата.

6.4. Натријум-тиосулфат, стандардни водени раствор концентрације 0,01 mol/l или 0,002 mol/l, прецизно стандардизовани водени раствор, стандардизован непосредно прије употребе.

6.5. Раствор скроба, концентрације 10 g/l, свјеже припремљена од природног растворљивог скроба.

7. УЗОРАК

Узорак се узима и складишти заштићено од извора свјетлости и топлоте, у стакленим посудама напуњеним до

врха и херметички затвореним чеповима од брушеног стакла или плуте.

8. ПОСТУПАК

Испитивање треба вршити под дифузним дневним или вјештачким свјетлом. У стаклену капсулу (5.1) или, у недостатку капсуле, у тиквицу (5.2.), одваже се уз тачност од 0,001 g масе узорка према сљедећој табели, зависно од очекиваног пероксидног броја:

Очекивани пероксидни број		Маса узорка (g)
(mmол O2/kg)	(meq O2/kg)	
0 до 6	0 до 12	5,0 до 2,0
6 до 10	12 до 20	2,0 до 1,2
10 до 15	20 до 30	1,2 до 0,8
15 до 25	30 до 50	0,8 до 0,5
25 до 45	50 до 90	0,5 до 0,3

Очепи се тиквица (5.2) и убаци стаклена капсула која садржи узорак. Дода се 10 ml хлороформа (6.1), брзо отопи узорак мијешањем и дода 15 ml сирћетне киселине (6.2), а затим 1 ml раствора калијум-јодида (6.3). Тиквица се брзо зачепи, тресе једну минуту и остави тачно пет минута у тами при температури 15-25 ºC.

Дода се око 75 ml дестиловане воде. Ослобођени јод титрира се раствором натријум- тиосулфата (6.4), (концентрација 0,002 mol/l за очекиване вриједности мање од 6 mmол O_2/kg или 12 meq O_2/kg, односно концентрација 0,01 mol/l за очекиване вриједности веће од 6 mmол O_2/kg или 12 meq O_2/kg) уз снажно мућкање, користећи раствор скроба (6.5) као индикатор.

За сваки узорак изводе се два одређивања.

Истовремено се изводи слијепа проба. Ако волумен утрошен за титрацију слијепе пробе прелази 0,05 ml раствора натријум-тиосулфата концентрације 0,01 mol/l (6.4.), потребно је замијенити нечисте реагенсе.

9. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

Пероксидни број (PV), изражен у милимолима активног кисеоника по килограму, дат је изразом:

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

Пероксидни број изражен у милиеквивалентима активног кисеоника по килограму, дат је изразом:

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

гдје је:

V = волумен стандардизованог раствора натријум-тиосулфата у ml (6.4), коригован за вриједност слијепе пробе;

T = тачна моларност употријебљеног раствора натријум-тиосулфата (6.4);

m = маса узорка у грамима.

Резултат представља аритметичку средину два одређивања.

АНЕКС IV
ОДРЕЂИВАЊЕ УДЈЕЛА ВОСКОВА КАПИЛАРНОМ ГАСНОМ ХРОМАТОГРАФИЈОМ

1. ОБИМ И ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Ова метода описује поступак одређивања удјела воскова у маслиновим уљима. Воскови се раздвајају према броју атома угљеника. Посебно се може користити за разликовање маслиновог уља добијеног пресовањем од уља добијеног екстракцијом (уља комине маслина).

2. ПРИНЦИП

Маст или уље, којима је додат одговарајући интерни стандард, фракционира се помоћу хроматографске колоне пуњене хидратизованим силикагелом. Фракција која је прва елуирана у условима прописаним овом методом (поларност нижа од поларности триглицерида), потом се анализира капиларном гасном хроматографијом.

3. АПАРАТУРА

3.1. Ерленмејерова тиквица од 25 ml.

3.2. Стаклена колона за гасну хроматографију, унутрашњег промјера 15,0 mm и дужине 30-40 cm са славином.

3.3. Гасни хроматограф са капиларном колоном, опремљен системом за директно инјектирање узорка у колону, који се састоји од:

3.3.1. Термостатске коморе за колоне, опремљене регулатором температуре.

3.3.2. Хладни инјектора за директно уношење узорка у колону.

3.3.3. Пламено-јонизациони детектор са претварачем – појачалом.

3.3.4. Писач-интегратор који се може повезати са претварачем-појачалом (3.3.3), са временом одзива мањим од једним секунде, са промјењивом брзином папира. (Такође је могуће користити компјуторизоване системе који омогућавају добијање података о гасној хроматографији путем личног рачунара.)

3.3.5. Капиларне стаклене или силикатне колоне дужине 8 до 12 mm, унутрашњег промјера 0,25-0,32 mm, са течном фазом, са равномјерном дебљином слоја од 0,10 до 0,30 μm. (На тржишту постоје течне фазе погодне за употребу типа SE-52 или SE-54.)

3.4. Микрошприца од 10 μl за директно уношење узорка у колону, са чврсто фиксираном иглом.

3.5. Електровибратор

3.6. Ротациони вакуум-упаривач

3.7. Високотемпературна пећ (муфолна пећ)

3.8. Аналитичка вага осјетљивости од ± 0,1 mg

3.9. Уобичајено лабораторијско стаклено суђе.

4. РЕАГЕНСИ

4.1. Силикагел величине зрна 60 – 200 μm.

Ставити гел у пећ на 500°C најмање четири сата. Након хлађења, додати 2% воде на количину силикагела. Добро протрести како би се суспензија хомогенизовала. Држати на тамном мјесту најмање 12 сати прије употребе.

4.2. н-хексан, за хроматографију,

4.3. етил етер, за хроматографију,

4.4. н-хептан, за хроматографију.

4.5. Стандардна раствор лаурил арахидата, 0,1% (m/v) у хексану (интерни стандард) (Могуће је користити палмитил палмитат или миристил стеарат.)

4.5.1. Судан 1 (1- фенил-азо-2-нафтол).

4.6. Гас носилац: водоник или хелијум, чистоће за гасну хроматографију,

4.7. помоћни гасови:

- чисти водоник, за гасну громатографију,
- чисти ваздух, за гасну хроматографију.

5. ПОСТУПАК

5.1. Припрема хроматографске колоне

Отопити 15 g силикагела (4.1) у н-хексану (4.2) и унијети у колону (3.2). Оставити да се исталожи. Довршити таложење помоћу електровибратора (3.5) да се добије

уједначенији хроматографски слој. Пропустити 30 ml н-хексана да се уклоне све нечистоће. На ваги (3.8) одвагати тачно 500 mg узорка у Ерленмејерову тиквицу запремине 25 ml (3.1), додати одговарајући удио интерног стандарда (4.5) према претпостављеном удјелу воска. На примјер, за маслиново уље додати 0,1 mg лаурил арахидата, а за уље од комине маслине 0,25 до 0,5 mg. Приправљени узорак пренијети у хроматографску колону помоћу два пута по 2 ml н-хексана (4.2).

Растварач испуштати док не достигне 1 mm изнад горњег нивоа апсорбента, потом с даљих 70 ml н-хексана, испирати да се уклоне природно присутни н-алкани. Потом започети хроматографско елуирање док се не сакупи 180 ml мјешавине н-хексана/етил етера (омјер 99:1, v/v), при брзини протока од око 15 капи сваких 10 секунди на собној температури, 22 ± 4°C.

Напомена:

- Мјешавина н-хексана/етил етера (99:1) мора се приредити свакодневно.
- За визуелну провјеру исправног елуирања воскова, узорку у раствору може се додати 100 µl 1%-тног раствора судана у мјешавини н-хексана/етил етера (омјер 99:1, v/v). С обзиром да бојило има ретенцију између воскова и триглицерида, када обојеност достигне дно колоне, елуирање треба обуставити јер су сви воскови елуирали.

Тако добијену фракцију осушити у ротационом вакуум-упаривачу (3.6) док се не уклони готово сав раствор. Преостала 2 ml раствора треба одстранити помоћу слабе струје азота, а затим додати 2-4 ml н-хептана.

5.2. Анализа гасном хроматографијом

5.2.1. Припремни радови

Поставити колону на гасни хроматограф (3.3) повезивањем улазног отвора на систем непосредно на колони и излазног отвора на детектор. Обавити провјеру гасног хроматографа (проток гаса, рад детектора и писача, итд.).

Ако се колона користи први пут, потребно ју је најприје кондиционирати. Пустити да кроз колону прође мало гаса, потом укључити гасни хроматограф. Постепено загријавати тако да се за четири сата постигне температура од 350°C. Одржавати температуру најмање два сата, а затим уређај подесити на радне услове (поставити проток гаса, запалити пламен, повезати на електронски писач (3.3.4), поставити температуру коморе за колону, регулисати детектор, итд.) и забиљежити сигнал при осјетљивости која је најмање двострука од оне коју захтијева анализа. Базна линија мора бити линеарна, без пикова или одступања.

Негативно одступање указује да колона није чврсто спојена; позитивно одступање да колона није довољно кондиционирана.

5.2.2. Избор радних услова

Уопштено, радни услови су сљедећи:

- температура колоне:

	20°C/минути		5°C/минути		20°C/минути	
Почетно 80°C (1 мин)	→	240°C	→	325°C (6 мин)	→	340°C (10 мин)

- температура детектора: 350°C;
- количина инјектираног узорка: 1 µl раствора у н-хептан (2 – 4 ml);
- гас носилац: хелијум или водоник при оптималној линеарној брзини за одабрани гас (види Додатак);
- осјетљивост инструмента: погодно за сљедеће услове:

Услов се може промијенити према карактеристикама колоне и гасног хроматографа како би се постигло раздвајање свих воскова и задовољавајуће раздвајање пикова (види слику); вријеме задржавања интерног стандарда C_{32} мора бити 18 ± 3 минуте. Главни пик који припада восковима мора достизати најмање 60% пуне скале.

Интеграциони параметри пикова морају бити утврђени тако да се добије исправна оцјена површина пикова.

НАПОМЕНА: Због високе коначне температуре, дозвољено је позитивно одступање од највише 10% пуне скале.

5.3. Спровођење анализе

Микрошприцом од 10 µl узети 1µl раствора; повући клип шприце тако да игла буде празна. Ставити иглу у инјектор и након 1-2 секунде брзо убризгати; након пет секунди полагано извући иглу. Регистровати хроматограм док воскови потпуно не елуирају. Базна линија мора стално испуњавати тражене услове.

5.4. Идентификација пикова

Идентификација појединачних пикова мора се заснивати на времену задржавања, поређењем с временима задржавања познатих мјешавина воскова анализираних под истим условима.

На слици је хроматограм воскова дјевичанског маслиновог уља.

5.5. Одређивање удјела

Помоћу интегратора израчунати површине пикова интерног стандарда и алифатских естера C_{40} до C_{46}.

Израчунати удио сваког алифатског естера у mg/kg уља коришћењем израза:

$$\text{Естер(mg/kg)} = \frac{A_x \times м_c \times 1000}{A_c \times м}$$

гдје је:

Ах= површина пика појединог естера у квадратним милиметрима;

Ас = површина пика интерног стандарда у квадратним милиметрима;

Мс = маса доданог интерног стандарда, у милиграмима;

М = маса узорка за анализу, у грамима.

6. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

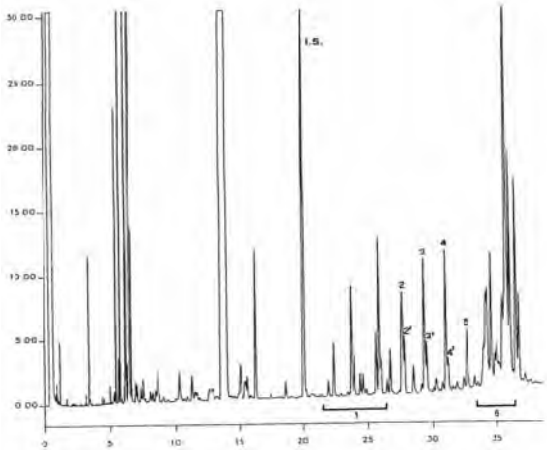
Укупан удио различитих воскова тј. алифатских естера C_{40} до C_{46} изражава се у mg/kg (ppm).

НАПОМЕНА: Компоненте које треба квантификовати односе се на пикове са парним бројевима угљеника између алифатских естера C_{40} и C_{46}; као примјер може се користити хроматограм воскова маслиновог уља приказан на доњој слици. Уколико се C_{46} естер појави два пута, препоручује се да се за његову идентификацију анализира фракција воскова уља комине маслине гдје је пик C_{46} једноставно идентификовати јер је очигледно највећи.

Резултати треба да буду изражени на једну децималу.

Слика

Хроматограм воскова маслиновог уља(1)



Легенда:

I.S. = лаурил арахидат

1. = дитерпенски естсер

2 + 2' = естери C_{40}

3 + 3' = естери C_{42}

4 + 4' = естери C_{44}

5. = естери C_{46}

6. = стеролни естери и тритерпенски алкохол

(1) Након елуирања стеролних естера, кроматограм не смије показивати сигнификантне пикове (триглицериди)

ДОДАТАК

ОДРЕЂИВАЊЕ ЛИНЕАРНЕ БРЗИНЕ ГАСА

У гасни хроматограф подешен на нормалне радне услове инјектира се 1 до 3 µl метана (или пропана). Мјери се вријеме које је потребно гасу да прође кроз колону, од тренутка инјектирања до појаве пика (t_M).

Линеарна брзина, у cm/c, дана је формулом L/t_M, гдје је L дужина колоне у cm, а t_M вријеме измјерено у секундама.

АНЕКС V

ОДРЕЂИВАЊЕ САСТАВА И УДЈЕЛА СТЕРОЛА КАПИЛАРНОМ ГАСНОМ ХРОМАТОГРАФИЈОМ

1. ОБИМ И ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Ова метода описује поступак одређивања удјела појединачних и укупних стерола у мастима.

2. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Маст којој је додан α-колестанол као интерни стандард, сапонификује се раствором калијум-хидроксида у етанолу, а неосапуњиве супстанце се затим екстрахују диетил- етером.

Из неосапуњивог екстракта издваја се стеролна фракција танкослојном хроматографијом на силикагелу. Стероли, екстраховани из силикагела, преводе се у триметилсилил етере и анализирају капиларном гасном хроматографијом.

3. АПАРАТУРА

3.1. Тиквица од 250 ml са повратним хладилом, са прикључцима од брушеног стакла.

3.2. Лијевци за одјељивање од 500 ml.

3.3. Тиквице од 250 ml.

3.4. Комплетна опрема за анализу танкослојном хроматографијом са стакленим плочама димензија 20 × 20 cm

3.5. Ултраљубичаста свјетиљка са таласним дужинама од 366 или 254 nm.

3.6. Микрошприца од 100 µl и 500 µl.

3.7. Цилиндрични лијевак за филтрирање са G3 порама филтера (порозност 15-40 µm), промјера приближно 2 cm и дубине приближно 5 cm, са наставком прикладним за вакуум филтрацију и прикључком 12/21 са спољним брушеним стаклом.

3.8. Боца сисаљка од 50 ml, са прикључком 12/21 са унутрашњим брушеним стаклом, прикладна за прикључак на лијевак за филтрирање (3.7),

3.9. Епрувета од 10 ml са конусним дном и непропусним чепом.

3.10. Гасни хроматограф са капиларном колоном, са системом за раздвајање протока (*splitting*), који чине:

3.10.1. термостатирана пећ за колоне, са могућношћу одржавања жељене температуре уз тачност ± 1°C;

3.10.2. Инјектор с могућношћу подешавања температуре, с елементом за испаравање од персиланизираног стакла;

3.10.3. Пламено јонизациони детектор и претварач са појачалом;

3.10.4. Писач-интегратор који се може повезати са претварачем са појачалом (3.10.3), с временом одзива од највише једне секунде и промјењивом брзином папира.

3.11. Стаклена или силикатна капиларна колона дужине 20 до 30 m, унутрашњег промјера 0,25 до 0,32 mm, потпуно прекривена SE-52, SE-54 или другом еквивалентном течном стационарном фазом, равномјерне дебљине слоја између 0,10 и 0,30 µm.

3.12. Микрошприца за гасну хроматографију од 10 µl, са чврсто фиксираном иглом.

4. РЕАГЕНСИ

4.1. Калијум-хидроксид, етанолни раствор концентрације приближно 2 mol/l. Уз хлађење раствори се 130 g калијум-хидроксида (минималне чистоће 85%) у 200 ml дестиловане воде те надопуни етанолом до једног литра. Раствор се чува у добро затвореним боцама од тамног стакла.

4.2. Диетил етер, аналитичке чистоће.

4.3. Безводни натријум-сулфат, аналитичке чистоће.

4.4. Стаклене плоче са слојем силикагела, без индикатора флуоресценције, дебљине 0,25 mm (на тржишту су доступне плоче спремне за употребу).

4.5. Калијум-хидроксид, етанолни раствор концентрације 0,2 mol/l. Раствори се 13 g калијум-хидроксида у 20 ml дестиловане воде и надопуни етанолом до једног литра.

4.6. Бензен, за хроматографију (Видјети 5.2.2)

4.7. Ацетон, за хроматографију (Видјети 5.2.2)

4.8. Хексан, за хроматографију. (Видјети 5.2.2)

4.9. Диетил етер, за хроматографију (Видјети 5.2.2)

4.10. Хлороформ, аналитичке чистоће (Видјети 5.2.2)

4.11. Референтна раствор за танкослојну хроматографију: холестерол или фитостероли, 2%-тни раствор у хлороформу.

4.12. 2,7-диклорфлуоресцеин, 0,2%-ни раствор у етанолу. Дода се неколико капи етанолног раствора калијум-хидроксида концентрације 2 mol/l, ради постизања базичне реакције.

4.13. Безводни пиридин, за хроматографију.

4.14. Хексаметил дисилазан.

4.15. Триметилклоросилан.

4.16. Референтни раствор стерол триметилсилил етера. Припрема се непосредно прије употребе од чистих стерола или мјешавина стерола добијених из уља која их садрже.

4.17. α – колестанол, 0,2%-тни раствор (m/V) у хлороформу (интерни стандард).

4.18. Гас носилац: водоник или хелијум, гасно-хроматографске чистоће.

4.19. Помоћни гасови:

- водоник, гасно-хроматографске чистоће,
- ваздух, гасно-хроматографске чистоће.

5. ПОСТУПАК

5.1. Припрема неосапуњивог.

5.1.1. Помоћу микрошприце од 500 µl у тиквицу од 250 ml пренесе се волумен 0,2%-тног раствора α-колестанола у хлороформу (4.17), који садржи удио колестанола који одговара приближно 10% удјела стерола у аликвоту узорка узетог за одређивање. На примјер, на 5 g узорка треба додати 500 µl 0,2%-тног раствора α-колестанола за маслинова уља, и 1500 µl за уља комине маслина.

Стандард се отпари у струји азота до сувог те се у исту тиквицу одваже тачно 5 g сувог и филтрираног узорка.

Уља која садрже знатне удјеле холестерола могу давати пик чије је вријеме задржавања идентично колестанолу. У том случају морају се спровести двије анализе стеролне фракције, с интерним стандардом и без њега, или се умјесто колестанола мора користити бетулинол.

5.1.2. Дода се 50 ml етанолног раствора калијум-хидроксида концентрације 2 mol/l, тиквица се споји на повратно хладило те се загријава у воденом купатилу до лаганог врења уз стално снажно мијешање, до појаве осапуњења (раствор постаје бистар). Након тога настави се са загријавањем још 20 минута, а затим се дода 50 ml дестиловане воде кроз хладило, одвоје хладило и тиквица, охлади на приближно 30°C.

5.1.3. Садржај тиквице квантитативно се пренесе у лијевак за одјељивање од 500 ml испирући тиквицу неколико пута са укупно око 50 ml дестиловане воде. Дода се приближно 80 ml диетил етера, снажно тресе приближно 30 секунди и остави да стоји (видјети напомену 1).

Доњи водени слој се одијели испуштањем у други лијевак за одјељивање. Водена фаза се на исти начин екстрахује још два пута, сваки пут са 60 до 70 ml диетил етера.

Напомена 1: Ако се створи емулзија, може се уклонити додавањем малих количина етанола или метанола.

5.1.4. Етерски екстракти се сакупе у један лијевак за одјељивање те се исперу дестилованом водом (у оброцима од 50 ml) до неутралне реакције воде за испирање.

Након уклањања воде за испирање, осуши се додатком безводног натријум-сулфата и филтрира кроз безводни натријум-сулфат у претходно извагану тиквицу од 250 ml, испирући лијевак и филтер малим количинама диетил етера.

5.1.5. Етер се уклони дестилацијом до неколико ml, а затим осуши у лаганом вакууму или струји азота, довршавајући сушење у пећи на 100°C приближно четврт сата те изваже након хлађења у ексикатору.

5.2. Одјељивање стеролне фракције.

5.2.1. Припрема базичних плоча. Цијеле плоче са силикагелом (4.4) уроне се у етанолни раствор калијум-хидроксида концентрације 0,2 mol/l (4.5) у трајању од 10 секунди, затим суше 2 сата у дигестору и на крају 1 сат у пећи на 100°C.

Изваде се из пећи и до употребе чувају у ексикатору напуњеном калцијум-хлоридом (плоче обрађене на овај начин морају се употријебити у року од 15 дана).

Напомена 2: Када се базичне плоче са силикагелом користе за одвајање стеролне фракције нема потребе третирати неосапуњиво алуминијум-оксидом. На тај начин се све компоненте које дају киселу реакцију (масне киселине и друго) задржавају на стартној линији, а трака стерола је јасно одијељена од траке алифатских и тритерпенских алкохола.

5.2.2. У комору за развијање плоча стави се смјеса бензена и ацетона у омјеру 95:5 (v/v), дубине око 1 cm. Алтернативно се може користити смјеса хексана и диетил етера у омјеру 65:35 (v/v). Комора се затвори одговарајућим поклопцем и остави приближно 30 минута како би се успоставила равнотежа течно-гасовито. На унутрашње стијенке коморе могу се ставити траке филтар папира умочене у елуент. Тиме се скраћује вријеме развијања за приближно једну трећину и омогућава равномјерније и правилније елуирање компонената.

Напомена 3: Смјесу за развијање треба мијењати за сваку анализу, како би се постигли савршено поновљиви услови елуирања.

5.2.3. Припреми се приближно 5%-тни раствор неосапуњивог (5.1.5) у хлороформу и, помоћу микрошприце од 100 µl, нанесе 300 µl на хроматографску плочу (5.2.1), приближно 2 cm од руба плоче, у што тањој и равномјернијој линији. На истој висини с овом линијом нанесе се 2-3 µl референтног раствора стерола (4.11) на једном крају плоче, како би се по завршетку развијања могла идентификовати трака стерола.

5.2.4. Плоча се постави у комору за развијање припремљену како је описано у 5.2.2. Температуру треба одржавати између 15 и 20°C. Комора се одмах затвори поклопцем и остави да елуира док фронта отапала не досегне приближно 1 cm од горњег руба плоче. Плоча се уклони из коморе за развијање те се раствор отпари у струји врућег ваздуха или остављањем плоче кратко вријеме у дигестору.

5.2.5. Плоча се лагано и равномјерно попрска раствором 2,7-диклорофлуоресцеина. Када се плоча посматра под ултраљубичастим свјетлом, може се идентификовати трака стерола поређењем са мрљом референтног раствора. Рубови траке уздуж руба флуоресценције означе се црном оловком.

5.2.6. Помоћу металне лопатице саструже се силикагел унутар означеног подручја. Фино уситњен саструган материјал пребаци се у лијевак за филтрирање (3.7). Дода се 10 ml врућег хлороформа, пажљиво измијеша металном лопатицом и филтрира под вакуумом, сакупљајући филтрат у Ерленмејерову тиквицу (3.8) спојену на лијевак за филтрирање.

Остатак у лијевку се трипут испере диетил етером (сваки пут са приближно 10 ml), сакупљајући филтрат у исту тиквицу спојену на лијевак. Филтрат се упари до волумена од 4 до 5 ml, остатак раствора пренесе у претходно извагану епрувету од 10 ml (3.9), упари до сувог лаганим загријавањем у лаганој струји азота, дода неколико капи ацетона, поново упари до сувог, стави у пећ на 105°C приближно 10 минута, затим остави да се охлади у ексикатору и изваже.

Остатак у епрувети састоји се од стеролне фракције.

5.3. Припрема триметилсилил етера.

5.3.1. У епрувету која садржи стеролну фракцију по сваком милиграму стерола дода се 50 µl реагенса за силанизирање, који представља мјешавину пиридина, хексаметилдисилазана и триметилклоросилана у омјеру 9:3:1 (v/v/v) (Напомена 4), избјегавајући притом везање влаге (Напомена 5).

Напомена 4: На тржишту су доступни раствори спремни за употребу. Такође су доступни и други реагенси за силанизирање, као нпр. бис-триметилсилилтрифлуорацетамид + 1% триметил хлоросилан, који треба разриједити једнаким волуменом безводног пиридина.

5.3.2. Епрувета се зачепи и пажљиво протресе (без преокретања) до потпуног растварања стерола. Остави се барем 15 минута при собној температури те затим центрифугира неколико минута. Бистар раствор спреман је за анализу гасном хроматографијом.

Напомена 5: Лагано замућење које се може појавити нормална је појава и не изазива сметње. Стварање бијелог флокулата или појава ружичасте боје упућују на присуство воде или нечисте реагенсе. У том случају, анализа се мора поновити.

5.4. Гасно-хроматографска анализа.

5.4.1. Припрема колоне.

5.4.1.1. Колона се учврсти на гасни хроматограф, прикључујући почетак колоне на испаривач са системом за одјељивање, а крај колоне на детектор.

Изврше се опште провјере гасног хроматографа (довод гаса, ефикасност детектора, ефикасност система одјељивања и писача итд.).

5.4.1.2. Ако се колона користи први пут, препоручује се њено кондиционирање. Лагани ток гаса се пропусти кроз капиларну колону, гасни хроматограф се укључи и започне поступно загријавање до температуре најмање 20°C изнад радне температуре (Напомена 6). Та температура се одржава најмање 2 сата, а затим се цијели уређај намјести на радне услове (подешавање протока гаса и дијељења, паљење пламена, прикључак на електронички писач, подешавање пећи за колону, температуре детектора и инјектора) и потом сними сигнал са осјетљивошћу најмање двоструко већом од оне која ће се користити за анализу. Базна линија мора бити линеарна, без икаквих пикова или отклона.

Негативни отклон базне линије упућује на неисправно прикључену колону; позитивни отклон упућује на неправилно кондиционирање колоне.

Напомена 6: Температура кондиционирања мора увијек бити најмање 20°C нижа од максималне температуре одређене за употријебљену стационарну фазу.

5.4.2. Избор радних услова.

5.4.2.1. Општи радни услови су сљедећи:

- температура колоне: 260 ± 5°C,
- температура испаривача: 280°C,
- температура детектора: 290°C,
- линеарна брзина гаса носиоца: хелијум 20-35 cm/s, водоник 30-50 cm/s,
- омјер раздвајања протока: од 1:50 до 1:100,
- осјетљивост уређаја: од 4 до 16 пута већа од најмањег пригушења,
- осјетљивост детектора: 1 до 2 mV пуне скале,
- брзина папира: 30 до 60 cm/h,
- количина инјектиране супстанце: 0,5-1 µl раствора триметилсилил етера (TMSE).

Ови услови се могу прилагођавати својствима колоне и гасног хроматографа тако да се добију хроматограми који испуњавају сљедеће захтјеве:

- вријеме задржавања β-ситостерола треба да буде 20 ± 5 минута,
- висина пика кампестерола треба да буде: за маслиново уље (просјечна количина 3%) 15 ± 5% пуне скале; за сојино уље (просјечна количина 20%) 80 ± 10% пуне скале,
- сви присутни стероли морају бити раздвојени. Поред тога, пикови такође морају бити потпуно раздвојени, тј. претходни пик мора се вратити на базну линију прије почетка сљедећег пика. Међутим, непотпуна резолуција се толерише уз услов да се пик при релативном времену задржавања од 1,02 може квантификовати помоћу окомице.

3.3.3. Поступак анализе

5.4.3.1. Помоћу микролитарске шприце од 10 µl повуче се 1 µl хексана, усиса 0,5 µl ваздуха и затим 0,5-1 µl раствора узорка. Притом се клип шприце повуче тако да се игла испразни. Игла се уведе кроз мембрану инјектора те се након 1-2 секунде брзо инјектира, а након приближно пет секунди игла лагано извуче.

2.2.2.2. Настави се са снимањем док се TMSE присутних стерола у потпуности не елуирају. Базна линија мора читаво вријеме испуњавати услове (5.4.1.2).

5.4.4. Идентификација пикова.

Појединачни пикови се идентификују на основу њихових времена задржавања и поређењем са смјесама стеролних TMSE анализираних у истим условима.

Стероли се елуирају сљедећим редослиједом: холестерол, брасикастерол, 24-метиленколестерол, кампестерол, кампестанол, стигмастерол, Δ7-кампестерол, Δ5,23-стигмастадиенол, клеростерол, β-ситостерол, ситостанол, Δ5-авенастерол, Δ5,24-стигмастадиенол, Δ7-стигмастенол, Δ7-авенастерол.

У Табели 1 приказана су времена задржавања за ситостерол и колоне SE-52 и SE-54.

Слике 1 и 2 приказују типичне хроматограме неких уља.

5.4.5. Квантитативно одређивање.

5.4.5.1. Површине пикова α-колестанола и стерола израчунају се помоћу интегратора. Пикови компонената које нису наведене у Табели 1 не узимају се у обзир. Коефицијент одзива α-колестанола мора бити једнак 1.

5.4.5.2. Израчуна се концентрација сваког појединог стерола у mg/100 g уља према сљедећем изразу:

$$\text{Стерол x} = \frac{A_x \times м_c \times 100}{A_c \times м}$$

Гдје је:

Ax = површина пика стерола x;

Ac = површина пика α-колестанола;

мc = маса доданог α-колестанола, у mg;

м = маса узорка употријебљена за анализу, у g.

6. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

6.1. Забиљежи се концентрација појединачних стерола у mg/100 g уља те њихов збир као "укупни стероли".

6.2. Израчуна се проценат сваког појединог стерола из омјера одговарајућих површина пикова и укупне површине пикова стерола, према изразу:

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

гдје је:

Ax = површина пика за x;

ΣA = укупна површина пикова за стероле.

ДОДАТАК
ОДРЕЂИВАЊЕ ЛИНЕАРНЕ БРЗИНЕ ГАСА

У гасни хроматограф подешен на нормалне радне услове инјектира се 1 до 3 µl метана (или пропана) и мјери вријеме потребно гасу да прође кроз колону од тренутка инјектирања до тренутка појаве пика (tM).

Линеарна брзина у cm/s дана је s L/tM, гдје је L дужина колоне у cm, а tM измјерено вријеме у секундама.

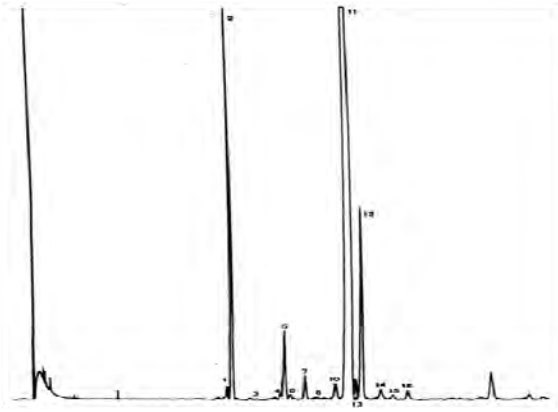
Табела I

Релативна времена задржавања стерола

Пик	Идентификација		Релативно вријеме задржавања	
			Колона SE-54	Колона SE-52
1	холестерол	Δ-5-колестен-3β-ол	0,67	0,63
2	колестанол	5α-колестан-3β-ол	0,68	0,64
3	брасикастерол	[24C]-24-метил-Δ-5,22-колестадиен-3β-ол	0,73	0,71
4	24-метиленколестерол	24-метилен-Δ-5,24-колестен-3β-ол	0,82	0,80
5	кампестерол	[24P]-24-метил-Δ-5-колестен-3β-ол	0,83	0,81
6	кампестанол	[24P]-24-метил-колестан-3β-ол	0,85	0,82
7	стигмастерол	[24C]-24-етил-Δ-5,22-колестадиен-3β-ол	0,88	0,87
8	Δ-7-кампестерол	[24P]-24-метил-Δ-7-колестен-3β-ол	0,93	0,92
9	Δ-5,23-стигмастадиенол	[24P,C]-24-етил-Δ5,23-колестадиен-3β-ол	0,95	0,95
10	клеростерол	[24C]-24-етил-Δ-5,25-колестадиен-3β-ол	0,96	0,96
11	β-ситостерол	[24P]-24-етил-Δ-5-колестан-3β-ол	1,00	1,00
12	ситостанол	24-етил-колестан-3β-ол	1,02	1,02
13	Δ-5-авенастерол	[243]-24-етилиден-5-колестен-3β-ол	1,03	1,03
14	Δ-5,24-стигмастадиенол	[24P,C]-24-етил-Δ-5,24-колестадиен-3β-ол	1,08	1,08
15	Δ-7-стигмастенол	[24P,C]-24-етил-Δ-7,24-колестадиен-3β-ол	1,12	1,12
16	Δ-7-авенастерол	[243]-24-етилиден-Δ-7-колестен-3β-ол	1,16	1,16

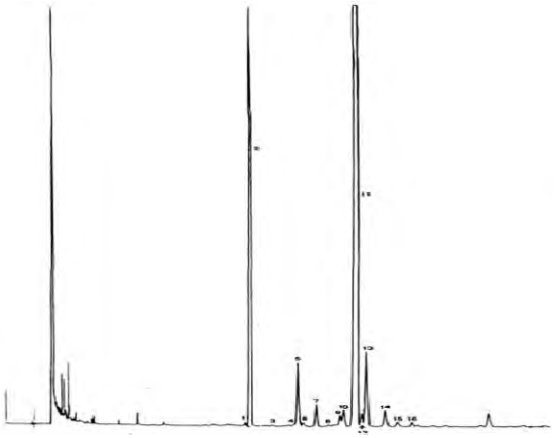
Слика 1

Гасни хроматограм стеролне фракције нерафинисаног маслиновог уља



Слика 2

Гасни хроматограм стеролне фракције рафинисаног маслиновог уља



АНЕКС VI
ОДРЕЂИВАЊЕ ЕРИТРОДИОЛА И УВАОЛА

УВОД

Еритродиол (под чиме се уобичајено подразумијевају гликоли еритродиол и уваол заједно) јесте састојак неосапуњиве фракције, карактеристичан за неке врсте масти. У маслиновом уљу екстрахованом растварачима налази се у знатно већим концентрацијама него у другим уљима, као што је пресовано маслиново уље или уље грожђаних сјеменки, која га такође садрже, тако да његово присуство може потврдити присуство маслиновог уља екстрахованог растварачима.

1. ОБИМ И ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Ова метода описује поступак одређивања еритродиола у мастима.

2. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Маст се сапонификује етанолном раствором калијум-хидроксида. Неосапуњива фракција се екстрахује диетил етером и прочисти пропуштањем кроз колону напуњену алуминијум- оксидом.

Неосапуњиво се подвргава танкослојној хроматографији на плочи са силикагелом док се не издвоје траке које одговарају фракцијама стерола и еритродиола. Добијени стероли и еритродиол преводе се у триметилсилил етере (TMSE) те се смјеса анализира гасном хроматографијом.

Резултат се изражава као постотак еритродиола у смјеси еритродиола и стерола.

3. АПАРАТУРА

3.1. Апаратура описана у Анексу V (Одређивање удјела стерола).

4. РЕАГЕНСИ

4.1. Реагенси описани у Анексу V (Одређивање удјела стерола).

4.2. Референтни раствор еритродиола, 0,5%-тни раствор у хлороформу.

5. ПОСТУПАК

5.1. Припрема неосапуњивог

Како је описано у тачки 5.1.2. Анекса V.

5.2. Издвајање еритродиола и стерола.

5.2.1. Види тачку 5.2.1. АнексаV.

5.2.2. Види тачку 5.2.2. Анекса V.

5.2.3. Припрема 5%-тног раствора неосапуњивог у хлороформу.

Микрошприцом од 0,1 ml нанесе се на хроматографску плочу 0,3 ml раствор приближно 1,5 cm од доњег руба, у што тањој и равномјернијој линији.

На једном крају плоче нанесе се неколико микролитара раствор холестерола и еритродиола, које служе као референтне мрље.

5.2.4. Плоча се постави у комору за развијање припремљену како је описано у тачки 5.2.1.

Температура треба да буде око 20°C. Комора се одмах затвори поклопцем и остави да елуира док фронта раствора не досегне приближно 1 cm од горњег руба плоче. Плоча се уклони из коморе за развијање, а раствор се отпари у струји врућег ваздуха.

5.2.5. Плоча се лагано и равномјерно попрска алкохолним раствором 2,7-диклорофлуоресцеина.

Посматрањем плоче под ултраљубичастим свјетлом и поређењем са референтним мрљама могу се идентификовати траке стерола и еритродиола, које се означе тачком мало изван подручја флуоресценције.

5.2.6. Помоћу металне лопатице саструже се силикагел унутар означених подручја. Материјал са плоче пренесе се у тиквицу од 50 ml. Дода се 15 ml врућег хлороформа, добро протресе и филтрира кроз лијевак са диском од синтер стакла тако да се силикагел пренесе на филтер. Трипут се испере врућим хлороформом (10 ml сваки пут), сакупљајући филтрат у тиквицу од 100 ml. Филтрат се упари до волумена од 4-5 ml, пренесе у претходно извагану епрувету за центрифугирање са конусним дном, уз благо загријавање осуши у струји азота и изваже.

5.3. Припрема триметилсилил етера

Како је описано у тачки 5.3. Анекса V.

5.4. Анализа гасном хроматографијом

Како је описано у тачки 5.4. горе наведене методе, радни улови гасно-хроматографске анализе морају бити подешени тако да се поред раздвајања стерола одвоје и TMSE еритродиола и уваола.

Кад се узорак инјектира, континуирано се врши снимање док се не елуирају присутни стероли, еритродиол и уваол. Затим се идентификују пикови (времена задржавања еритродиола и уваола у односу на β-ситостерол су око 1,45 односно 1,55) и израчунају површине као за стероле.

6. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

$$\text{Еритродиол } \% = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{стерола}}} \times 100$$

Гдје је: A_1 = површина пика еритродиола; A_2 = површина пика уваола; ΣАстерола = укупна површина пикова стерола. Резултат се изражава на једно децимално мјесто.

АНЕКС VII
ОДРЕЂИВАЊЕ УДЈЕЛА 2 – ГЛИЦЕРИЛ МОНОПАЛМИТАТА

1. ОБИМ И ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Ова метода описује поступак одређивања удјела палмитинске киселине на положају 2 триглицерида одређивањем удјела 2-глицерил монопалмитата.

Ова метода се може примијенити на биљна уља која су текућа на собној температури (20°C).

2. ПРИНЦИП

Након припреме, узорак уља се подвргава дјеловању панкреасне липазе: парцијална и специфична хидролиза у положајима 1 и 3 молекуле триглицерида узрокује појаву моноглицерида у положају 2. Постотак 2-глицерил монопалмитата у фракцији моноглицерида се одређује након силанизирања капиларном гасном хроматографијом.

3. АПАРАТУРА И ПРИБОР

3.1. Ерленмејерова тиквица од 25 ml

3.2. Чаше од 100, 250 и 300 ml

3.3. Стаклена хроматографска колона унутрашњег промјера 21-23 mm, дужине 400 mm, с плочицом од синтер стакла и славином

3.4. Мјерни цилиндари (мензуре) 10, 50, 100 и 200 ml

3.5. Тиквице од 100 и 250 ml

3.6. Ротациони упаривач

3.7. Епрувета за центрифугирање са конусним дном од 10 ml и брушеним стакленим чепом

3.8. Центрифуга за епрувете од 10 и 100 ml

3.9. Термостат који омогућава одржавање стабилне температуре од 40 ± 0,5°C

3.10. Пипете 1 и 2 ml

3.11. Шприца од 1 ml, с танком иглом

3.12. Микрошприца од 100 µl

3.13. Лијевак од 1000 ml

3.14. Капиларни гасни хроматограф опремљен за хладно инјектирање и за директно уношење узорка и пећи са могућношћу одржавања одабране температуре око 1°C.

3.15. Хладни инјектор за директно уношење узорка у колону

3.16. Пламено-јонизациони детектор и мјерни претварач (електрометар)

3.17. Писач-интегратор повезан са мјерним претварачем са временом одазива мањим од 1 секунде и промјењивом брзином папира

3.18. Стаклена или силикатна капиларна колона дужине 8 – 12 метара, унутрашњег промјера 0,25 – 0,32 mm, прекривена/обложена 5% метилполисилоханом или фенилметилсилоксаном, дебљине 0,10 – 0,30 µm, која се може користити на 370°C.

3.19. Микрошприца од 10 µl са чврсто фиксираном иглом, дужине најмање 7,5 cm за директно уношење узорка у колону.

4. РЕАГЕНСИ

4.1. Сликагел величине зрнаца од 0,063 – 0,200 mm (70/280 mesha) припремљен на сљедећи начин:

ставити силикагел у порцуланску посуду и сушити у сушионику на 160°C, четири сата, охладити у ексикатору на собној температури. Додати 5% воде на масу силикагела како слиједи: одвагати 152 g силикагела у тиквицу и додати 8 g дестиловане воде, чеп и лагано протрести да се вода једнакомјерно распореди.

Оставити да стоји најмање 12 сати прије употребе.

4.2. н-хексан (за хроматографију)

4.3. Исопропанол

4.4. Водени раствор исопропанола, 1/1 (v/v)

4.5. Панкреасна липаза. Мора имати активност између 2,0 и 10 липазних јединица по mg. (панкреасна липаза, с активношћу од 2,0 до 10 липазних јединица по mg ензима доступна је на тржишту)

4.6. Пуферски раствор трис-хидроксиметиламинометана; 1 M водени раствор, подешен с конц. HCl (1/1 v/v) на pH 8 (провјерити потенциометром)

4.7. Натријум-холат, 0,1% водени раствор ензимског квалитета (раствор се мора употријебити у року од двије седмице од израде)

4.8. Калцијев клорид, 22%-тна водена раствор

4.9. Диетил етер за хроматографију

4.10. Раствор за развијање: мјешавина н-хексана/диетил етера (87:13 v/v)

4.11. Натријум-хидроксид, 12% масеног раствора

4.12. Фенолфталеин, 1% раствор у етанолу

4.13. Гас носилац: водоник или хелијум, за гасну хроматографију

4.14. Помоћни гасови: водоник, чистоће најмање 99%, без влаге и органских материја, и ваздух, за гасну хроматографију, такође чисто

4.15. Реагенс за силанизирање: мјешавина пиридина/хексаметилсилазане, триметилклоросилан 9/3/1 (v/v/v). (Раствори припремљени за употребу су доступни на тржишту. Могу се употребљавати и други реагенси за силанизирање, посебно бистри метилсилил трифлорацетамид + 1% триметилклорсилан, разријеђен једнаким волуменом безводног пиридина.)

4.16. Референтни узорци: чисти моноглицериди или мјешавине моноглицерида са познатим процентним удјелима сличним узорку.

5. МЕТОДА

5.1. Припрема узорка

5.1.1. Уље са слободним масним киселинама мањим од 3% прије хроматографије није потребно неутралисати на силикагел колони. Уље са слободним масним киселинама већим од 3% мора се неутралисати као у тачки 5.1.1.1.

5.1.1.1. Ставити 50 g уља и 200 ml н-хексана у лијевак запремнине 1 000 ml (3.13.). Додати 100 ml изопропанола и количину раствора 12% натријум-нитроксида (4.11) која одговара удјелу слободним масним киселинама (СМК) у уљу увећаном за 5%. Једну минуту снажно трести. Додати 100 ml дестиловане воде, поново протрести и оставити да стоји.

Након раздвајања слојева, уклони се доњи слој сапуна, као и међуслојеви (слуз, нерастворљиве супстанце). Хексански раствор неутралисаног уља испирати додавањем раствора 1/1 (v/v) изопропанол/вода (4.4.) у оброцима од 50-60 ml до нестанка љубичасте боје фенолфталеина.

Највећи дио хексана уклонити вакуум дестилацијом (користећи се ротирајућем вакуум упаривачем, на примјер) и уље пренијети у тиквицу од 100 ml (3.5.). Сушити уље у вакууму док се растварач потпуно не уклони.

Након окончања поступка, киселост уља треба да буде мања од 0,5%.

5.1.2. Ставити 1,0 g уља припремљеног као што је горе наведено у Ерленмејерову тиквицу запремине 25 ml (3.1.) и отопити у 10 ml раствора за развијање (4.10). Оставити раствор да стоји најмање 15 минута прије колонске хроматографије са силикагелом.

Ако је раствор мутан, центрифугирати га како би се обезбиједили оптимални услови за хроматографију. (Могу се користити готова паковања 500 mg силикагела SPE припремљена за употребу).

5.1.3. Припрема хроматографске колоне

Ставити око 30 ml раствора за развијање (4.10) у колону (3.3), у доњи дио колоне ставити комад вате и стакленим штапићем истиснути ваздух.

У чаши припремити раствор 25 g силикагела (4.1.) у око 80 ml раствора за развијање и помоћу лијевка налити у колону.

Провјерити да ли је сав силикагел пренесен у колону; испрати раствором за развијање (4.10), отворити славину и испустити течност до нивоа око 2 mm изнад силикагела.

5.1.4. Колонска хроматографија

У Ерленмејерову тиквицу запремине 25 ml (3.1) тачно одвагати 1,0 g узорка припремљеног као у тачки 5.1.

Отопити узорак у 10 ml раствора за развијање (4.10). Налити раствор у хроматографску колону припремљену као у тачки 5.1.3. Избјегавати "узбуркавање" површине колоне.

Отворити славину и пустити раствор узорка кроз колону док не достигне ниво силикагела. Елуирати с 150 ml раствора за развијање. Подесити брзину протока на 2 ml/min (тако да 150 ml прође кроз колону за око 60-70 минута).

Елуат сакупити у претходно извагану тиквицу од 250 ml. Раствор упарити под вакуумом, трагове раствора уклонити у струји азота.

Извагати и израчунати добијени екстракт.

(Ако се користи комерцијални силикагел SPE припремљен за употребу, примијенити сљедећу методу: ставити 1 ml раствора (5.1.2) у припремљене патроне са 3 ml н-хексана).

Након филтрирања раствора, развити са 4 ml н-хексана/диетл етера 9/1(v/v).

Сакупити елуат у епрувету запремине 10 ml и упарити до сувог у струји азота.

Изложити суви остатак панкреасној липази (5.2) (битно је провјерити састав масних киселина прије и након проласка преко силикагела SPE).

5.2. Хидролиза панкреасном липазом

5.2.1. У епрувету за центрифугирање одвагати 0,1 g уља припремљеног као у тачки 5.1. Додати 2 ml пуферског раствора (4.6), 0,5 ml раствора натријум-холата (4.7) и 0,2 ml раствора калцијум-хлорида, добро промућкати након сваког додавања. Затворити епрувету чепом од брушеног стакла и ставити у термостат при 40 + 0,5°C.

5.2.2. Додати 20 mg липазе, пажљиво протрести (избјећи влажење чепа) и ставити епрувету у термостат тачно двије минуте. Потом извадити, добро трести једну минуту и оставити да се хлади.

5.2.3. Додати 1 ml диетил етера, зачепити и снажно протрести, затим центрифугирати и пренијети раствор етера помоћу микрошприце у чисту, суву епрувету.

5.3. Припрема силанизираних деривата и гасна хроматографија.

5.3.1. Микрошприцом пренијети 100 µl раствора (5.2.3) у епрувету са конусним дном запремине 10 ml.

5.3.2. Уклонити раствор увођењем благе струје азота, додати 200 µl реагенса за силанизирање (4.15), зачепити епрувету и оставити да стоји 20 минута.

5.3.3. Након 20 минута додати 1 до 5 ml н-хексана (зависно од хроматографских услова): добијени раствор је спреман за гасну хроматографију.

5.4. Гасна хроматографија

Радни услови:

- температура инјектора (инјектор непосредно на колони) нижа од тачке кључања раствора (68°C);
- температура детектора: 350°C
- температура колоне; програмирање температуре пећи: 60°C у трајању од 1 минуте, повећање за 15ºC по минути до 180°C, затим 5°C по минути до 340ºC, потом 13 минута на 340ºC;
- гас носилац: водоник или хелијум, постављен на линеарну брзину довољну да се добије резолуција назначена на слици 1. Вријеме задржавања триглицерида C54 мора бити 40 ± 5 минута (види слику 2). (Горе назначени радни услови су

индикативни. Оператери ће их морати оптимизирати за добијање жељене резолуције. Пик који одговара 2-глицерил монопалмитату мора имати минималну висину једнаку 10% скале писача.)

- количина инјектиране материје: 0,5-1 µm раствора н-хексана (5 ml) (5.3.3).

5.4.1. Идентификација пикова

Поједини моноглицериди се идентификују према ретенционом времену и поређењем с добијеним временом за стандардне моноглицеридне смјесе под истим условима.

5.4.2. Квантитативна оцјена

Површина сваког пика се израчунава коришћењем електронског интегратора.

6. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

Проценат глицерил-монопалмитата израчунава се из омјера између површине одговарајућег пика и површина пикова свих моноглицерида (види слику 2) коришћењем формуле:

$$\text{глицерил монопалмитат (\%)}: \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

гдје је:

Ах = површина пика која одговара глицерил монопалмитату

ΣА = збројповршина пикова свих моноглицерида

Резултат мора бити изражен на једну децималу.

7. ИЗВЈЕШТАЈ О АНАЛИЗИ

Извјештај о анализи мора наводити:

- позивање на ову методу,
- све информације потребне за идентификацију узорка,
- резултат анализе,
- свако одступање од методе, било да је посљедица одлуке односних странака или другог разлога,
- појединости за идентификацију лабораторије, датум анализе и потпис оних који су одговорни за анализу.

Слика 1.

Хроматограм продуката силанизирања спроведеног на рафинисаном маслиновом уљу с додатком 20% естерификованог уља подвргнутом дјеловању липазе (100%)

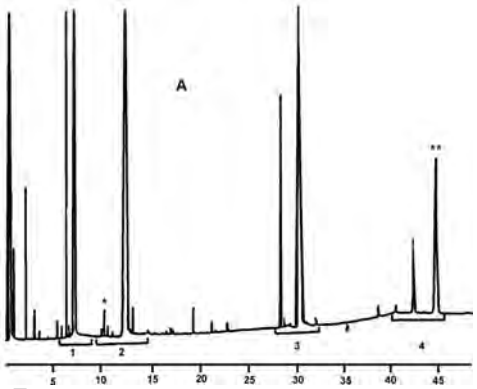
Легенда: "acides gras libres" = слободне масне киселине; "Huile d'olive raffinée + 20% huile estérifiée" = рафинисано маслиново уље + 20% естерификовано уље; "1-2 монопалмитолéине" = 1-2 монопалмитолеин; "1 2 моно C18 инсат." = незасићени 1-2 моно C18

Слика 2.

Хроматограм:

(А) неестерификовано маслиново уље, након дјеловања липазе; након силанизирања; под условима описаним у тачки 5.4. (капиларна колона 8-12 м), фракција воска се елуира истовремено као и фракција диглицерида или мало послије.

Након дјеловања липазе, садржај триглицерида не смије прећи 15%.



Легенда:

1 = Слободне масне киселине

2 = Моноглицериди

3 = Диглицериди

4 =Триглицериди

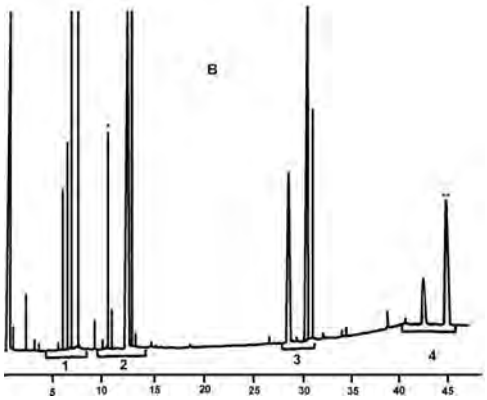
* = 2-монопалмитин

** = Триглицерид C_{54}

Кроматограм:

(Б) неестерификовано уље након дјеловања липазе; након силанизирања; под условима описанима у тачки 5.4. (капиларна колона 8-12 м), фракција воска се елуира истовремено када и фракција диглицерида или одмах потом.

Након дјеловања липазе, садржај триглицерида не смије прелазити 15%.



Легенда:

1 = Слободне масне киселине

2 = Моноглицериди

3 = Диглицериди

4 = Триглицериди

* = 2-монопалмитин

** = Триглицерид C_{54}

8. БИЉЕШКЕ

Биљешка 1. ПРИПРЕМА ЛИПАЗЕ

Комерцијално доступне липазе имају задовољавајућу активност. Такође се могу припремити у лабораторији на сљедећи начин:

На температури од 0°C охладити 5 kg свјеже свињске гуштераче. Скинути околну чврсту маст и везно ткиво и у мијешалици са ножевима самљети у кашасту течност. Кашу мијешати 4 – 6 сати са 2,5 литра безводног ацетона, потом центрифугирати. Остатак још три пута екстраховати са истим волуменом безводног ацетона, потом два пута са мјешавином ацетона/диетил етера (1/1 v/v) и два пута са диетил етером.

Остатак сушити у вакууму 48 сати како би се добијао стабилан прах који се може дуготрајно чувати у фрижидеру, заштићен од влаге.

Биљешка 2. ПРАЋЕЊЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЕ

Приправити емулзију маслиновог уља како слиједи:

У миксеру мијешати 10 минута 165 ml раствора који садржи 100 g/l гума арбикума, 15 g здробљеног леда и 20 ml претходно неутралисаног маслиновог уља.

У чашу запремине 50 ml ставити 10 ml емулзије, 0,3 ml раствора 0,2 g/ml натријум-холата и 20 ml дестиловане воде.

Чашу ставити у термостат намјештен на 37˚C; намјестити електроде pH метра и спиралну мијешалицу.

Биретом додавати раствор 0,1 mol/l натријум-хидроксида, кап по кап, док се не добије pH 8,3.

Додати аликвот раствора праха липазе у воду (0,1 g/ml липазе) чим pH метар очита 8,3, покренути хронометар и додавати раствор натријум-хидроксида кап по кап брзином којом се одржава pH на 8,3. Очитавати сваке минуте потрошену запремину раствора.

Забиљежити податке на x/y дијаграму, с временом на оси x и милилитрима потрошеног 0,1 mol/l раствора натријум-хидроксида за одржавање константаног pH на оси y. Добија се линеарни дијаграм.

Активност липазе, изражена у јединицама липазе по mg, дата је у сљедећој формули:

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

гдје је:

A активност у јединицама липазе /mg

V милилитри раствора натријум-хидроксида концентрације 0,1 mol/l у минути (израчунато на основу дијаграма)

N титар раствора натријум-хидроксида

m маса у mg испитне липазе.

A јединица липазе се дефинише као удио ензима која ослобађа 10 микроеквивалената киселине у минути.

АНЕКС VIII
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЈСКА АНАЛИЗА У УЛТРАЉУБИЧАСТОМ ПОДРУЧЈУ

ПРЕДГОВОР

Спектрофотометријско одређивање у ултраљубичастом подручју може пружити податке о квалитету масти, њеном стању очуваности и промјенама проузрокованим технолошким процесима.

До апсорбанције на таласним дужинама наведеним у методи долази због присуства конјугованих диенских и триенских система. Те апсорбанције изражене су као специфичне екстинкције E1% 1 cm (екстинкција 1%-тног раствора масти у спецификованом раствору, дебљине 1 cm) и договорно се означавају с K (такође и као "коефицијент екстинкције").

1. ОБИМ

Метода описује поступак спровођења спектрофотометријске анализе маслиновог уља у ултраљубичастом подручју.

2. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Маст се отопи у предвиђеном раствору те се измјери екстинкција раствора на одређеним таласним дужинама у односу на чисти раствор. Из спектрофотометријских очитања рачунају се специфичне екстинкције.

3. ОПРЕМА

3.1. Спектрофотометар за мјерење екстинкције у ултраљубичастом подручју између 220 и 360 nm, с могућношћу очитавања појединачних нанометријских јединица.

3.2. Правоугаоне кварцне кивете са поклопцима, с оптичком дебљином од 1 cm. Кивете напуњене водом или другим одговарајућим раствором не смију показивати међусобне разлике у екстинкцији веће од 0,01 екстинкцијских јединица.

3.3. Одмјерне тиквице од 25 ml.

3.4. Хроматографска колона са горњим дијелом дужине 270 mm и промјера 35 mm и доњим дијелом дужине 270 mm и промјера приближно 10 mm.

4. РЕАГЕНСИ

4.1. Изо-октан, спектрофотометријске чистоће (2,2,4-триметилпентан). У односу на дестиловану воду, пропусност емитованог зрачења треба да буде најмање 60% при 220 nm те најмање 95% при 250 nm, или:

- циклохексан, спектрофотометријске чистоће: у односу на дестиловану воду пропусност емитованог зрачења треба да буде најмање 40% при 220 nm те најмање 95% при 250 nm.

4.2. Базични алуминијум-оксид за хроматографију на колони, припремљен и провјерен како је описано у Додатку 1.

4.3. н-хексан, за хроматографију.

5. ПОСТУПАК

5.1. Узорак треба да буде потпуно хомоген и без потенцијалних нечистоћа. Уља која су течна при собној температури морају се филтрирати преко папира при температури од око 30°C, а чврсте масти морају се хомогенизовати и филтрирати при температури од највише 10°C изнад тачке топљења.

5.2. Од тако припремљеног узорка тачно се одваже око 0,25 g у одмјерну тиквицу од 25 ml, надопуни до ознаке спецификованим раствором и хомогенизује. Добијени раствор треба да буде савршено бистар. У случају да се уочи опалесценција или мутноћа, потребно је раствор брзо филтрирати преко филтер папира.

5.3. Кивета се напуни приређеним раствором те се мјере екстинкције при одговарајућим таласним дужинама између 232 и 276 nm, користећи употријебљени раствор као референцу.

Очитане вриједности екстинкција треба да се налазе унутар интервала од 0,1 до 0,8. У супротном треба поновити мјерења радећи према потреби са концентрисанијим или разрјеђенијим растворима.

5.4. Када се одређивање специфичне екстинкције изводи након извођења преко алуминијум-оксида, поступа се како слиједи: 30 g базичног алуминијум-оксида и хексан помијешају се у суспензију и унесу у хроматографску колону. Након слијегања адсорбенса испусти се вишак

хексана, до приближно 1 cm изнад нивоа алуминијум-оксида.

10 g масти, хомогенизоване и филтриране како је описано у 5.1, раствори се у 100 ml хексана и пренесе у колону. Елуент се сакупља те се цјелокупни раствор отпари под вакуумом при температури испод 25°C.

С тако добијеном масти, одмах се настави са поступком описаним у 5.2.

6. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

6.1. Забиљеже се специфичне екстинкције (коефицијенти екстинкције) при различитим таласним дужинама, израчунате како слиједи:

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

гдје је:

Kλ = специфична екстинкција при таласној дужини λ;

Eλ = измјерена екстинкција при таласној дужини λ;

c = концентрација раствора у g/100 ml;

s = дебљина кивете у cm.

Резултати се изражавају са два децимална мјеста.

6.2. Спектрофотометријска анализа маслиновог уља у складу са службеном методом уважећим прописима спецификује одређивање специфичне екстинкције у раствору изо-октана при таласним дужинама 232 и 270 nm и одређивање K према сљедећем изразу:

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

гдје је Km специфична екстинкција при таласној дужини м, тј. таласној дужини око 270 nm на којој је забиљежена максимална апсорбанција.

ДОДАТАК I
ПРИПРЕМА АЛУМИНИЈУМ-ОКСИДА И ПРОВЈЕРА ЊЕГОВЕ АКТИВНОСТИ

А.1.1. Припрема алуминијум-оксида

Алуминијум-оксид, претходно осушен у пећи при температури 380-400°C у трајању од 3 сата, пренесе се у посуду која се може херметички затворити, дода дестилована вода у количини од 5 ml на 100 g алуминијум-оксида. Посуда се одмах затвори, више пута протресе те остави да мирује најмање 12 сати прије употребе.

А.1.2. Провјера активности алуминиум-оксида

Припреми се хроматографска колона с 30 g алуминијум-оксида. Радећи како је описано у тачки 5.4, кроз колону се пропусти смјеса која се састоји од:

- 95% дјевичанског маслиновог уља, специфичне екстинкције мање од 0,18 при 268 nm,
- 5% уља кикирикија, третираног активном земљом у процесу рафинације, специфичне екстинкције не мање од 4 при 268 nm.

Уколико након проласка кроз колону смјеса има специфичну екстинкцију већу од 0,11 при 268 нм, алуминијум-оксид је прихватљив; ако не, треба повећати ниво дехидрације.

ДОДАТАК II
КАЛИБРАЦИЈА СПЕКТРОФОТОМЕТРА

А.2. Редовно се мора провјеравати подешавање таласне дужине и тачност одзива уређаја (најмање сваких шест мјесеци).

А.2.1. Таласна дужина може се провјеравати помоћу живине вакуум свјетиљке или прикладним филтерима.

А.2.2. Како би се провјерио одзив фотоћелије и фотомултипликатора, поступи се на сљедећи начин: изваже се 0,2000 g чистог калијум-хромата за спектрометрију и отопи у раствору калијум-хидроксида, концентрације 0,05 mol/l у одмјерној тиквици од 1000 ml те надопуни до ознаке. Узме се тачно 25 ml добијеног раствора, пренесе у одмјерну тиквицу од 500 ml и разриједи до ознаке истим раствором калијум-хидроксида.

Мјери се екстинкција тако добијеног раствора при 275 nm, користећи раствор калијум- хидроксида као референцу. Екстинкција измјерена уз коришћење кивете од 1 cm треба да буде 0,200 ± 0,005.

АНЕКС IXа
ОДРЕЂИВАЊЕ МЕТИЛ ЕСТЕРА МАСНИХ КИСЕЛИНА ГАСНОМ ХРОМАТОГРАФИЈОМ

1. ОБИМ

Овом методом дају се опште упуте за примјену гасне хроматографије, уз употребу пуњених или капиларних колона, за одређивање квалитативног и квантитативног састава смјесе метил естера масних киселина добијених у складу са методом описаном у Анексу IXб.

Ова метода се не може примијенити на полимеризоване масне киселине.

2. РЕАГЕНСИ

2.1. Гас носилац

Инертни гас (азот, хелијум, аргон, водоник итд.), темељно осушен и са садржајем кисеоника мањим од 10 mg/kg.

Напомена 1. Водоник, који се користи као гас носилац само у капиларним колонама, може удвостручити брзину анализе, али је опасан. Потребно је предузети одговарајуће мјере безбједности.

2.2. Помоћни гасови

2.2.1. Водоник (чистоће ≥ 99,9%), без органских нечистоћа.

2.2.2. Ваздух или кисеоник, без органских нечистоћа.

2.3. Референтни стандард

Смјеса метил естера чистих масних киселина, или метил естера масти познатог састава, по могућности сличног саставу масти која се анализира.

Потребно је предузети мјере да се спријечи оксидација полинезасићених масних киселина.

3. АПАРАТУРА

Дате упуте односе се на уобичајену опрему која се користи за гасну хроматографију, уз употребу пуњених и/или капиларних колона и пламено-јонизационог детектора. Погодна је свака апаратура којом се постижу тачност и резолуција у складу са тачком 4.1.2.

3.1. Гасни хроматограф

Гасни хроматограф треба да садржи сљедеће елементе:

3.1.1. Систем за инјектирање

Користи се систем за инјектирање:

(а) или са пуњеним колонама, са најмањим могућим мртвим простором (*deadspace*); у овом случају, систем за инјектирање треба да буде такав да се може загријавати на температури од 20 до 50°C више од температуре колоне; или

(б) са капиларним колонама; у том случају, систем за инјектирање треба да буде посебно обликован за употребу са таквим колонама. Може бити са раздвајањем протока (типа "split") или без раздвајања протока (типа "splitless") за директно уношење у колону (on-column).

Напомена 2. У одсуству масних киселина са мање од 16 С-атома, може се користити инјектор са покретним гасом.

3.1.2. Пећница

Пећница мора бити таква да омогући загријавање колоне на температуру од најмање 260°C и задржавање жељене температуре у границама ± 1°C у случају пуњене колоне, односно 0,1°C у случају капиларне колоне. Овај посљедњи услов је нарочито важан када се користи кварцна капилара.

Препоручује се употреба температурно програмираног загријавања у свим случајевима, а посебно за масне киселине са мање од 16 С-атома.

3.1.3. Пуњена колона

3.1.3.1. Колона, од материјала инертног према супстанцама које се анализирају (тј. од стакла или нерђајућег челика), сљедећих димензија:

(а) дужина: 1 до 3 m. Када су присутне дуголанчане масне киселине (изнад С20), морају се користити релативно кратке колоне. Када се анализирају киселине са 4 или 6 С атома, препоручује се употреба колона дуљжне 2 m;

(б) унутрашњи промјер: 2 до 4 mm.

Напомена 3. Ако су присутне полинезасићене компоненте с више од три двоструке везе, у колони од нерђајућег челика може доћи до њихове разградње.

Напомена 4. Може се користити систем са двоструким колонама.

3.1.3.2. Пуњење, које садржи сљедеће елементе:

(а) чврсти носач: дијатомејска земља, испрана киселином и силанизирана или други прикладни инертни чврсти носач са уским распоном величине честица (распон од 25 µm унутар граница од 125 до 200 µm), при чему просјечна величина честица зависи од унутрашњег промјера и дужине колоне;

(б) стационарна фаза: полиестерни тип поларне течности (нпр. диетиленгликол полисукцинат, бутандиол полисукцинат, етиленгликол полиадипат итд.), цијаносиликони или било која друга течност која омогућава тражено хроматографско раздвајање (видјети тачку 4.). Стационарна фаза треба да чини од 5 до 20% (m/m) пуњења. За нека раздвајања може се користити неполарна стационарна фаза.

3.1.3.3. Кондиционирање колоне

Уз колону, по могућности одвојену од детектора, постепено се загријава пећница до 185°C и пропушта струја инертног гаса кроз свјеже припремљену колону брзином од 20 до 60 ml/min најмање 16 сати при тој температури те сљедећа 2 сата при 195°C.

3.1.4. Капиларна колона

3.1.4.1. Капилара, од материјала инертног према супстанцама које се анализирају (обично се користи стаклена или кварцна капилара). Унутрашњи промјер треба да буде између 0,2 и 0,8 mm. Унутрашња површина треба да буде одговарајуће обрађена (нпр. припрема површине, инактивација) прије наношења слоја стационарне фазе. У већини случајева довољна је дужина од 25 mm.

3.1.4.2. Стационарна фаза, обично типа полигликол (полиетиленгликол 20 000), полиестер (бутандиол полисукцинат) или поларни полисилоксан (цијаносиликони). Прикладне су и везане односно умрежене стационарне фазе.

Напомена 5. Постоји опасност да поларни полисилоксани изазову тешкоће у идентификацији и раздвајању линоленске киселине и С20 киселина.

Слој треба да буде танак, тј. од 0,1 до 0,2 µm.

3.1.4.3. Уметање и подешавање колоне

Потребно је придржавати се уобичајених мјера опреза при уметању капиларних колона – смјештај колоне у пећници (носач), избор и прикључивање спојева (непропусност), постављање крајева колоне у инјектор и детектор (смањење мртвог простора). Колону треба поставити под струјом гаса носача (нпр. 0,3 бар (30 kPa) за колону дужине 25 mm и унутрашњег промјера 0,3 mm).

Колона се кондиционира програмирањем температуре пећнице на 3°C/min, од собне температуре до температуре 10°C ниже од граничне температуре распадања стационарне фазе. Пећница се одржава на тој температури један сат до стабилизовања базне линије. Врати се на 180°C за рад у изотермалним условима.

Напомена 6. На тржишту су доступне прикладне унапријед кондициониране колоне.

3.1.5. Детектор, по могућности такав да се може загријавати на температуру вишу од температуре колоне.

3.2. Шприца

Шприца с иглом треба да има максимални капацитет од 10 µl и подјелу на 0,1 µl.

3.3. Писач

Ако се користи кривуља писача за израчунавање састава анализиране смјесе, потребан је електронски писач високе прецизности, компатибилан с коришћеним уређајем. Писач мора имати сљедеће карактеристике:

(а) вријеме одзива краће од 1,5 s, по могућности 1 s (вријеме одзива је вријеме потребно да игла писача пређе пут од 0 до 90% након тренутног увођења сигнала од 100%);

(б) ширина папира минимално 20 cm;

(ц) брзина папира подесива на вриједности између 0,4 и 2,5 cm/min.

3.4. Интегратор

Брзо и тачно израчунавање могуће је уз помоћ електронског интегратора. На овај начин добија се линеарни одзив одговарајуће осјетљивости, а корекција на девијацију стартне линије мора бити задовољавајућа.

4. ПОСТУПАК

Поступци описани у тачкама од 4.1. до 4.3. односе се на употребу пламено-јонизационог детектора.

Алтернативно се може користити гасни хроматограф са катарометром (детектором топлотне проводљивости). Радни услови морају се у том случају измијенити како је описано у тачки 6.

4.1. Услови анализе

4.1.1. Одабир оптималних радних услова

4.1.1.1. Пуњена колона

При избору радних услова потребно је узети у обзир:

(а) дужину и промјер колоне;

(б) врсту и количину стационарне фазе;

(ц) температуру колоне;

(д) проток гаса носиоца;

(е) тражену резолуцију;

(ф) величину узорка, која мора бити одабрана тако да детектор и електрометар дају линеаран одзив;

(г) трајање анализе.

Генерално, вриједности наведене у Табели 1 и Табели 2 довешће до жељених резултата, тј. најмање 2000 теоретских тавана по метру дужине колоне за метил стеарат и његово елуирање за приближно 15 минута.

Ако уређај то дозвољава, инјектор треба да буде на температури од око 200°C, а детектор на температури једнакој или вишој од температуре колоне.

У правилу, однос протока водоника у пламено-јонизационом детектору према протоку гаса носача варира од 1:2 до 1:1, зависно од промјера колоне. Проток кисеоника је 5 – 10 пута већи од протока водоника.

Табела 1

Унутрашњи промјер колоне mm	Проток гаса носача ml/min
2	15 до 25
3	20 до 40
4	41 до 60

Таблица 2

Концентрација стационарне фазе % (m/m)	Температура колоне °C
5	175
10	180
15	185
20	185

4.1.1.2. Капиларна колона

Својства капиларних колона (учинковитост и пропустљивост) значе да раздвајање спојева и трајање анализе у великој мјери зависе од протока гаса носача у колони. Стога је неопходно оптимизирати радне услове подешавањем овог параметра (или једноставније промјене притиска), зависно од тога да ли се жели побољшати раздвајање или постићи већа брзина анализе.

4.1.2. Одређивање броја теоретских учинковитости и резолуције

(види Слику 1).

Изврши се анализа смјесе метил стеарата и метил олеата у приближно једнаким удјелима (на примјер, метил естери из какао маслаца).

Температура колоне и проток гаса носача одаберу се тако да максимум пика метил стеарата буде забиљежен око 15 минута након пика раствор. Употријеби се довољна количина смјесе метил естера, тако да пик метил стеарата досеже око ¾ пуне скале.

Израчуна се број теоретских тавана, n (учинковитост), помоћу израза:

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

и резолуција, R, користећи израз:

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

гдје је:

dr_1 задржавање удаљености у милиметрима од почетка кроматограма до максимума пика метил стеарата;

ω_1 и ω_2 су ширине, у милиметрима, пикова метил стеарата односно метил олеата, мјерено између пресјека тангенти у тачкама инфлексије кривуље са базном линијом;

Δ је удаљеност, у милиметрима, између максимума пикова метил стеарата односно метил олеата;

и индекс резолуције, лр, према изразу

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

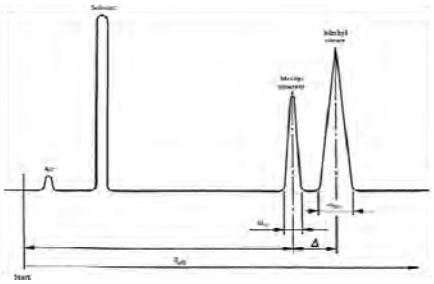
гдје је:

a = висина најмањег пика, мјерена од базне линије;

b = висина најниже тачке дола између два сусједна пика, мјерено од базне линије.

Слика 1

Хроматограм за одређивање броја теоретских тавана (учинковитости) и резолуције



Радни услови морају бити одабрани тако да омогуће најмање 2.000 теоретских тавана по метру дужине колоне за метил стеарат и резолуцију од најмање 1,25.

4.2. Количина узорка за испитивање

Помоћу шприце са иглом (3.2) узме се 0,1 до 2 µl раствора метил естера, припремљене у складу с Анексом IXб и инјектира у колону.

У случају естера који нису отопљени, припреми се раствор од приближно 100 mg/ml у хептану хроматографскг квалитета, и инјектира 0,1 до 1 ml тог раствора.

Ако се анализирају супстанце присутне само у траговима, величина узорка може се повећати (до 10 x).

4.3. Анализа

Генерално, радни услови треба да буду они дефинисани у тачки 4.1.1.

Међутим, могуће је радити уз ниже температуре колоне ако се тражи одређивање масних киселина са мање од 12 C-атома, или уз више температуре ако се одређују масне киселине са више од 20 C-атома. У оба случаја могуће је употријебити температурно програмирање. На примјер, ако узорак садржи метил естере масних киселина с мање од 12 C-атома, узорак се инјектира при 100°C (или при 50 до 60°C ако је присутна маслачна киселина) и одмах повиси температура брзином од 4 до 8°C/min до оптимума. У одређеним случајевима ова два поступка се могу комбиновати.

Након програмираног загријавања, настави се елуирање при константној температури док све компоненте нису елуиране. Ако уређај нема програмирано загријавање, ради се на двије сталне температуре између 100 и 195°C.

Ако је потребно, препоручује се да се анализа изврши на двије фазе различитих поларности како би се потврдило одсуство маскираних пикова, на примјер у случају истовременог присуства $C_{18:3}$ и $C_{20:0}$, или конјугованих $C_{18:3}$ и $C_{18:2}$.

4.4. Припрема референтног хроматограма и референтних графова

Анализира се референтни стандард мјешавине (2.3) у истим радним условима као и за узорак, и измјери се вријеме задржавања удаљености за масне киселине у стандарду. На полулогаритамском папиру конструишу се, за сваки степен незасићености посебно, графови који приказују зависност логаритма времена или задржавања удаљености као функције броја C-атома. У изотермалним условима, графови за равноланчане киселине истог степена незасићености треба да буду равне линије. Ове линије треба да буду приближно паралелне.

Потребно је избјегавати услове који би могли довести до "маскираних пикова", тј. гдје је резолуција недовољна за раздвајање двије компоненте.

5. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

5.1. Квалитативна анализа

Идентификују се пикови метил естера за узорак из графова припремљених у тачки 4.4, ако је потребно интерполацијом.

5.2. Квантитативна анализа

5.2.1. Одређивање састава

Осим у изузетним случајевима, користи се метода унутрашње нормализације, тј. претпостави се да су све компоненте узорка присутне на хроматограму, тако да укупна површина испод пикова представља 100% састојака (потпуно елуирање).

Ако опрема укључује интегратор, користе се на тај начин добијене нумеричке вриједности. Ако не, одреди се површина испод сваког пика множењем висине пика са његовом ширином на половини висине и, ако је потребно, узме у обзир различито пригушење током исписа.

5.2.2. Начин израчунавања

5.2.2.1. Општи случај

Израчуна се количина дате компоненте *i*, изражена као масени проценат метил естера, одређивањем процента који представља површина одговарајућег пика у односу на суму површина свих пикова, према изразу:

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

гдје је:

Ai површина испод пика који одговара компоненти *i*;

ΣA сума површина испод свих пикова.

Резултат се изражава на једно децимално мјесто.

Напомена 7: У овом општем случају, сматра се да резултат израчунавања на основу релативних површина представља масени удио. За случајеве у којима ова претпоставка није прихватљива, видјети тачку 5.2.2.2.

5.2.2.2. Употреба фактора корекције

У одређеним случајевима, на примјер у присуству масних киселина с мање од осам С-атома или масних киселина са секундарним групама, када се користе детектори термалне проводљивости или када се захтијева највећи степен тачности, морају се користити фактори корекције за претварање процената површине пика у масене удјеле компонената.

Фактори корекције одреде се уз помоћ хроматограма добијеног анализом референтне смјесе метил естера познатог састава, извршеном у идентичним радним условима као при анализи узорка.

За ову референтну смјесу, масени удио компоненте *i* дат је изразом:

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

гдје је:

mi маса компоненте *i* у референтној смјеси;

Σm зброј маса различитих компонената референтне смјесе.

Из хроматограма референтне смјесе (4.4) израчуна се проценат (површина/површина) за компоненту *i*, према изразу:

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

гдје је:

Ai површина испод пика који одговара компоненти *i*;

ΣA сума површина испод свих пикова.

Фактор корекције тада се рачуна као:

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

Уобичајено, фактори корекције изражавају се у односу на KC16, тако да релативни фактори постају:

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

За узорак, количина сваке компоненте *i*, изражена као масени удио метил естера, јесте:

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

Резултати се изражавају на једно децимално мјесто.

5.2.2.3. Употреба интерног стандарда

У одређеним анализама (на примјер када се не одређују количине свих масних киселина, као нпр. кад су уз киселине са 16 и 18 С-атома присутне киселине са 4 и 6 С-атома, или када је нужно одредити апсолутну количину масне киселине у узорку) нужно је примијенити интерни стандард. Обично се користе масне киселине са 5, 15 или 17 С-атома. Потребно је одредити фактор корекције (ако постоји) за интерни стандард.

Масени удио компоненте *i*, изражене као метил естер, дат је изразом:

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

гдје је:

Ai површина испод пика који одговара компоненти *i*;

As површина испод пика који одговара интерном стандарду;

Ki' је фактор корекције за компоненту *i* (у односу на Kc_1);

Kc' је фактор корекције за интерни стандард (у односу на K_{c16});

m је маса узорка у mg;

ms је маса интерног стандарда у mg.

Резултати се изражавају на једно децимално мјесто.

6. ПОСЕБАН СЛУЧАЈ - ОДРЕЂИВАЊЕ ТРАНС-ИЗОМЕРА

Могуће је одредити удио *транс*-изомера у масним киселинама са 10-24 С атома, раздвајањем метил естера гаснохроматографским капиларним колонама специфичне поларности.

6.1. Силикатна капиларна колона, унутрашњег промјера између 0,25 и 0,32 mm и дужине 50 m, обложена

цијанопропилсиликоном, дебљине слоја између 0,1 и 0,3 μm (тип SP 2380, C.P. сил 88, силор 10 и слични типови).

6.2. Метил естери припремају се према поступку Б описаном у Анексу IXб. Као мјера предострожности, масне материје са више од 3% слободних масних киселина морају се неутрализовати у складу са тачком 5.1.1 Анекса VII.

6.3. Радни услови за гасну хроматографију су сљедећи:

- температура колоне постављена између 150°C и 230°C (на примјер 15 минута при 165°C, повећавајући након тога за 5°C у минути до 200°C);
- температура инјектора: 250°C ако се користи систем са раздвајањем протока, или почетна температура колоне ако се користи систем колона;
- температура детектора: 260°C;
- брзина протока гаса носача (хелијума и водоника): 1,2 ml у минути.

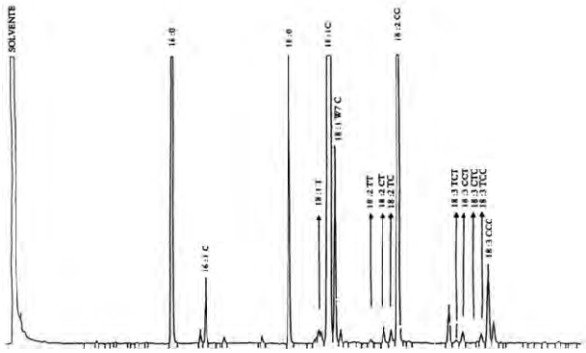
Инјектирана количина мора бити таква да је у датим условима осјетљивости висина пика који одговара метил естеру арахидонске киселине једнака или већа од 20 % на дну скале.

6.4. Идентификација различитих метил естера постиже се на основу времена задржавања, која се упоређују с онима за референтну смјесу (како је наведено у тачки 2.3).

Естери транс масних киселина елуирају се прије одговарајућих цис изомера. Примјер хроматограма дат је на слици 2.

Слика 2:

Гасни хроматограм транс-изомера масних киселина уз употребу капиларне колоне.



6.5. Ефикасност колоне, одређена у складу са тачком 4.1.2, мора бити таква да омогући сепарацију одређених критичних парова, на примјер формираног пара спајањем пикова транс-изоолеинске киселине и олеинске киселине (транс C18:1/cis C18:1), уз индекс резолуције већи од 2.

6.6. Проценат различитих *транс* масних киселина рачуна се на основу односа између површине појединог пика и суме површина свих присутних пикова.

У обзир се узимају проценти:

- *транс*-октадеценске киселине (T 18:1) наведене у Анексу I овог правилника као сума транс-изомера олеинске киселине;
- *цис-транс и транс-цис* октадекадиенске киселине [(CT/TC) 18:2], наведених у Анексу I овог правилника као сума транс-изомера линолне киселине;
- *транс-цис-транс*, *цис-цис-транс*, *цис-транс-цис*, *транс-цис-цис*-октадекатриенске киселине [(TCT + CCT + CTC + TCC) 18:3], наведених у Анексу I овог правилника као сума транс-изомера линоленске киселине.

Напомена 8: Узимајући у обзир посебна својства ове методе, резултат се изражава на два децимална мјеста.

7. ПОСЕБАН СЛУЧАЈ УПОТРЕБА КАТАРОМЕТРА (ДЕТЕКТОРА ПРОВОДЉИВОСТИ)

Гасни хроматограф са детектором који ради на принципу промјена термалне проводљивости (катарометар) такође се може користити за одређивање квалитативног и квантитативног састава смјесе метил естера масних киселина. Када се користи, услови из тачака 3 и 4 морају се модификовати како је приказано у Табели 3.

За квантитативну анализу користе се фактори корекције дефинисани у тачки 5.2.2.2.

Табела 3

Варијабла	Вриједност/услов
Колона	Дужина: од 2 до 4 m Унутрашњи промјер: 4 mm
Чврсти носач	Величина зрна пунила између 160 и 200 μm
Концентрација стационарне фазе	15 до 25% (m/m)
Гас носач	Хелијум или, ако није доступан, водоник, са што је могућим мање удјелом кисеоника
Помоћни гасови	Не
Температура инјектора	Од 40 до 60°C изнад температуре колоне
Температура колоне	180 до 200°C
Проток гаса носача	Обично између 60 и 80 ml/min
Величина инјектираног узорка	Обично између 0,5 и 2 μl

8. АНАЛИТИЧКИ ИЗВЈЕШТАЈ

У аналитичком извјештају треба да буду наведене методе припреме метил естера и гасно- хроматографске анализе те добијени резултати. Такође треба навести све радне услове који нису спецификовани у овом правилнику, или су наведени као необавезни, заједно са детаљима о било каквим непредвиђеним догађајима који би могли утицати на резултате.

Аналитички извјештај треба да укључује све потребне податке за потпуну идентификацију узорка.

АНЕКС IXб

1. ПРИПРЕМА МЕТИЛ ЕСТЕРА МАСНИХ КИСЕЛИНА ИЗ УЉА ОД ПЛОДА И КОМИНЕ МАСЛИНА

Сљедеће двије методе препоручују се за припрему метил естера масних киселина из уља од плода и комине маслина:

Метода А:	Трансестерификација хладним метанолним раствором калијум-хидроксида
Метода Б:	Метилација загријавањем са натријум-метилатом у метанолу, иза чега слиједи естерификација у киселом медију

Избор методе зависи од аналитичког параметра који се одређује и категорије уља, како је наведено:

(а) одређивање разлике између стварног и теоретског удјела триглицерида са ECN42 (ΔECN42):
- метода А примјењује се на узорке свих категорија уља након пречишћавања уља проласком кроз колону силикагела;

(б) одређивање састава масних киселина:
- метода А примјењује се директно на узорке сљедећих категорија уља:
- дјевичанско маслиново уље са киселошћу вишом од 3,3%,
- рафинисано маслиново уље,

- маслиново уље (мјешавина дјевичанских маслинових уља и рафинисаног маслиновог уља),
- рафинисано уље комине маслина,
- уље комине маслина (мјешавина дјевичанских маслинових уља и рафинисаног уља комине маслина),
- метода Б примјењује се директно на узорке сљедећих категорија уља:
- дјевичанско маслиново уље са више од 3,3% слободних масних киселина,
- сирово уље комине маслина;

(ц) одређивање транс-изомера масних киселина:
- метода А примјењује се директно на узорке сљедећих категорија уља:
- дјевичанско маслиново уље са мање од 3,3% слободних масних киселина,
- рафинисано маслиново уље,
- маслиново уље (мјешавина дјевичанских маслинових уља и рафинисаног маслиновог уља),
- рафинисано уље комине маслина,
- уље комине маслина (мјешавина дјевичанских маслинових уља и рафинисаног уља комине маслина),
- метода А примјењује се на сљедеће категорије уља након прочишћавања уља проласком кроз колону силикагела:
- дјевичанско маслиново уље са више од 3,3% слободних масних киселина,
- сирово уље комине маслина.

2. ПРЕЧИШЋАВАЊЕ УЗОРАКА УЉА

Када је потребно, узорци уља пречишћавају се проласком кроз колону силикагела, елуирањем смјесом хексана и диетилетера (87:13, v/v) како је описано у IUPAC методи 2.507.

Друга могућност је екстракција на чврстој фази уз употребу SPE силикагел колона. SPE силикагел колона (1 g, 6 ml) смјести се у уређај за елуирање под вакуумом и испере са 6 ml хексана. Вакуум се искључи да се колона не би исушила, а затим се у колону стави раствор уља (око 0,12 g) у 0,5 ml хексана и укључи вакуум тако да раствор продре у силикагел. Елуира се под вакуумом са 10 ml смјесе хексан/диетилетер (87:13 v/v). Укупни елуат се хомогенизира и подијели на два по волумену приближно једнака дијела. Први дио се упари до сувог у ротационом вакуум упаривачу на собној температури. Остатак се отопи у 1 ml хептана. Раствор је спреман за анализу масних киселина гасном хроматографијом. Други дио се упари, а остатак отопи у 1 ml ацетона за анализу триглицерида HPLC методом, ако је потребно.

3. МЕТОДЕ ПРИПРЕМЕ МЕТИЛ ЕСТЕРА МАСНИХ КИСЕЛИНА

1. Метода А: Трансестерификација хладном метанолном раствором калијум-хидроксида

1.1. Сврха

Ова брза метода примјењива је на уља од плода и комине маслина са мање од 3,3% слободних масних киселина. Слободне масне киселине не естерификују се калијум- хидроксидом. Етил естери масних киселина трансестерификују се спорије од глицеридних естера и могу се само дјелимично метилирати.

1.2. Принцип

Метил естери формирају се трансестерификацијом са метанолном раствором калијум- хидроксида, као међуфаза прије него што наступи сапонификација (наслов 5 у BAS EN ISO 12966-2 , наслов 5 у IUPAC методи 2.301).

1.3. Реагенси

Метанол који не садржи више од 0,5% (m/m) воде.

Хептан, хроматографског квалитета.

Калијум-хидроксид, метанолни раствор концентрације око 2 mol/l: раствори се 11,2 g калијум-хидроксида у 100 ml метанола.

1.4. Апаратура

Епрувете од 5 ml са навојним чепом са PTFE спојем

Градуиране или аутоматске пипете од 2 ml и 0,2 ml.

1.5. Поступак

У епрувету са навојним чепом од 5 ml одваже се око 0,1 g узорка уља. Дода се 2 ml хептана и протресе. Дода се 0,2 ml 2 mol/l метанолног раствора калијум-хидроксида, чврсто затвори и јако тресе 30 секунди. Остави се да се слегне док се горњи раствор не разбистри. Декантира се горњи слој који садржи метил естере. Хептански раствор погодан је за инјектирање у гасни хроматограф. Препоручује се чување раствора у хладњаку до гаснохроматографске анализе, и не дуже од 12 сати.

2. Метода Б: Метилација загријавањем са метанолним раствором натријум-метилата, иза чега слиједи естерификација у киселом медију

2.1. Сврха

Ова метода примјењива је на уља од плода и комине маслина са више од 3,3% слободних масних киселина.

2.2. Принцип

Неутрализација слободних масних киселина и алкална метанолиза глицерида, иза чега слиједи естерификација масних киселина у киселом медију (наслов 4.2. у IUPAC методи 2.301).

2.3. Реагенси

- Хептан, хроматографског квалитета.
- Метанол који не садржи више од 0,05% (m/m) воде.
- 0,2 mol/l метанолни раствор натријум-метилата: раствори се 5 g натријума у 1000 ml метанола (може се припремити од раствора доступних на тржишту),
- Фенолфталеин, 0,2%-тни метанолни раствор,
- Сулфатна киселина, 0,5 mol/l у метанолном раствору: у 100 ml метанола дода се 3 ml 96%-тне сулфатне киселине,
- Засићена раствор натријум-хлорида у води.

2.4. Апаратура

- волуметријске тиквице равног дна од 50 ml са дугим, уским вратом од брушеног стакла,
- повратно хладило: ваздушно хладило (дуго 1 m) са брушеним спојевима прикладним за грло тиквице,
- куглице за врење,
- стаклени лијевак.

2.5. Поступак

Око 0,25 g узорка уља пренесе се у волуметријску тиквицу са брушеним грлом од 50 ml. Уз помоћ лијевка дода се 10 ml 0,2 mol/l раствора натријум-метилата у метанолу и куглице за врење. Споји се повратно хладило, протресе и

загрије до кључања. Раствор треба постати бистар, што се обично догоди за око 10 минута. Реакција је завршена након 15 минута. Тиквица се уклони са извора топлоте, причека да престане враћање кондензата, уклони хладило и дода двије капи раствора фенолфталеина. Дода се неколико ml 0,5 mol/l метанолног раствора сулфатне киселине, све док раствор не постане безбојан, а затим дода 1 ml у сувишку. Споји се хладило и стави да поново ври 20 минута. Уклони се са извора топлоте и тиквица охлади под млазом текуће воде. Уклони се хладило, дода 20 ml засићеног раствора натријум-хлорида и протресе. Дода се 5 ml хептана. Тиквица се зачепи и снажно тресе 15 секунди.

Остави се да се слегне док се фазе не раздвоје. Поново се додаје засићени раствор натријум-хлорида док водени слој не досегне доњи руб грла тиквице. Горњи слој који садржи метил естере испуњава грло тиквице. Овај раствор је спреман за инјектирање у гасни громатограф.

Упозорење: Метилација методом Б мора се радити у дигестору.

2.6. Алтернативе метилацији према Методи Б

2.6.1. Метода Ц

2.6.1.1. Принцип

Масна материја која се анализира третира се метанолним раствором хлоридне киселине, у затвореној капсули, при 100°C.

2.6.1.2. Апаратура

- чврста стаклена капсула од око 5 ml (висине 40 до 45 mm, промјера 14 до 16 mm).
- Градуиране пипете од 1 и 2 ml.

2.6.1.3. Реагенси

Раствор хлоридне киселине у 2%-тном метанолу. Припрема се од гасовите хлоридне киселине и безводног метанола (Напомена 1).

Хексан, хроматографског квалитета.

Напомена 1: Могу се користити раствори хлороводоника у метанолу доступни на тржишту. Мале количине гасовите хлоридне киселине могу се лако припремити у лабораторији из комерцијалног раствора (ρ = 1,18), додавањем неколико капи концентрисане сулфатне киселине. Будући да метанол врло брзо апсорбује хлоридну киселину, препоручују се уобичајене мјере опреза при отапању, нпр. гас се уводи кроз мали наопако окренути лијевак чији руб додирује површину течности. Могуће је унапријед припремити велике количине метанолног раствора хлоридне киселине, јер се може добро чувати на тамном мјесту у стакленим боцама са стакленим чепом. Као друга могућност, овај реагенс се може припремити отапањем ацетил-хлорида у безводном метанолу.

2.6.1.4. Поступак

- У стаклену капсулу стави се 0,2 g масне материје, претходно осушене натријум-сулфатом и филтриране, и 2 ml метанолног раствора хлоридне киселине. Капсула се затвори пламеном.
- Капсула се урони на 100°C на 40 минута.
- Капсула се охлади под млазом текуће воде, отвори, дода 2 ml дестиловане воде и 1 ml хексана.
- Центрифугирањем се одвоји хексанска фаза, која је спремна за употребу.

2.6.2. Метода Д

2.6.2.1. Принцип

Масна материја која се анализира загријава се уз поврат са смјесом метанола, хексана и сулфатне киселине. Добијени метил естери екстрахују се петролетером.

2.6.2.2. Апаратура

- Епрувете од око 20 ml, са ваздушним повратним хладилом дужине око 1 м, са спојевима од брушеног стакла.
- Градуиране пипете од 5 ml.
- Лијевак за одјељивање од 50 ml.
- Чаше од 10 ml и 25 ml.
- Епрувете од 15 ml са конусним дном.

2.6.2.3. Реагенси

- Реагенс за метилацију: безводна смјеса метанола, хексана и концентрисане сулфатне киселине (ρ = 1,84) у омјеру 75:25:1 (v/v/v).
- Петролетер, 40 до 60°C.
- Безводни натријум-сулфат.

2.6.2.4. Поступак

У епрувету од 20 ml стави се 0,1 g уља и дода 5 ml реагенса за метилацију.

Споји се повратно хладило и загријава 30 минута у кипућем воденом купатилу (Напомена 2).

Смјеса се квантитативно пренесе у лијевак за одјељивање од 50 ml, уз помоћ 10 ml дестиловане воде и 10 ml петролетера. Снажно се протресе и остави да се раздвоје фазе, уклони водена фаза и двапут испере етерски слој са по 20 ml дестиловане воде. У лијевак за одјељивање дода се мала количина безводног натријум-сулфата, протресе, остави да се слегне неколико минута и филтрира, скупљајући филтрат у епрувету од 15 ml са конусним дном.

Раствор се испари у воденом купатилу у струји азота.

Напомена 2: Како би врење било контролисано, у епрувету се стави стаклени штапић, а температура воденог купатила не смије прећи 90°C.

3. Параметри прецизности

Статистичку оцјену прецизности метода А и Б објавио је Међународни савјет за маслиново уље у својој методи COI/T.20/CO. Бр. 24.

4. ПРЕПОРУКЕ ЗА ГАСНОХРОМАТОГРАФСКУ АНАЛИЗУ ЕСТЕРА МАСНИХ КИСЕЛИНА ИЗ УЉА ОД ПЛОДА И КОМИНЕ МАСЛИНА

1. Поступак

Гаснохроматографска анализа раствора масних естера у хептану врши се у складу са стандардом BAS EN ISO 5508 уз употребу капиларне колоне (дужине 50 m, унутрашњег промјера 0,25 или 0,32 mm) импрегниране цијанопропилсиликонском фазом како је наведено за одређивање *транс*-изомера масних киселина (COI/T.20/Доц. Бр. 17).

На Слици 1 приказан је типични гаснохроматографски профил уља комине маслина са метил и етил естерима масних киселина те *транс*-изомерима метил естера.

2. Израчунавање

2.1. За израчунавање састава масних киселина и ΔECN42, у обзир се узимају све наведене масне киселине:

Миристинска (C14:0).

Палмитинска (C16:0). Сума површина пикова који одговарају метил и етил естерима.

Палмитолеинска (C16:1). Сума површина пикова који одговарају ω9 и ω7 изомерима метил естера.

Хептадеканска/Маргаринска (C17:0).

Хептадеценска/Маргаролеинска (C17:1).

Стеаринска (C18:0).

Олеинска (C18:1). Сума површина пикова који одговарају ω9 и ω7 изомерима метил естера, етил естерима и транс изомерима метил естера.

Линолна (C18:2). Сума површина пикова који одговарају метил и етил естерима и *транс*- изомерима метил естера.

Арахинска (C20:0).

Линоленска (C18:3). Сума површина пикова метил естера и *транс*-изомера метил естера.

Гадолеинска (C20:1).

Бехенска (C22:0).

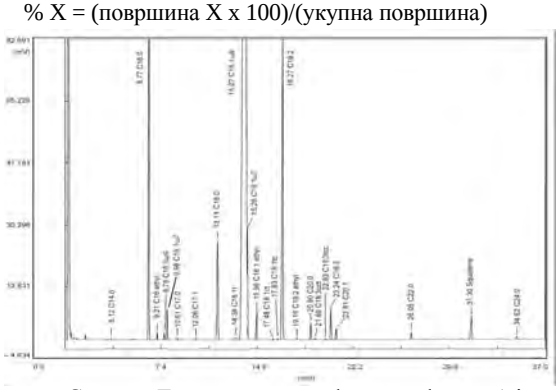
Лигноцеринска (C24:0).

Сквален се не узима у обзир за израчунавање укупне површине.

2.2. За израчунавање процента *транс*-C18:1 користи се пик који одговара метил естерима ове масне киселине. За суму [*транс*-C18:2 + *транс*-C18:3] сабирају се сви пикови који одговарају *транс*-изомерима ове двије масне киселине. За израчунавање укупне површине, узимају се у обзир сви пикови наведени у 2.1. (видјети. Бр. 17).

Израчунавање процента сваке масне киселине врши се према формули: COI/T.20/Doc

% X = (површина X x 100)/(укупна површина)



Слика 1: Гаснохроматографски профил добијен методом хладне метилације из уља комине маслина. Хроматографски пикови одговарају метил и етил естерима, ако није другачије назначено.

АНЕКС X
ОДРЕЂИВАЊЕ УДЈЕЛА ИСПАРЉИВИХ ХАЛОГЕНИРАНИХ РАСТВОРА У МАСЛИНОВОМ УЉУ

1. МЕТОДА

Анализа гасном хроматографијом и примјеном технике натпростора ("head space").

2. ОПРЕМА

2.1. Гасни хроматограф са детектором електронског захвата (ECD).

2.2. Опрема за "head space" технику.

2.3. Стаклена хроматографска колона за гасну хроматографију дужине 2 m и промјера 2 mm. Стационарна фаза: 10% OV 101 или еквивалентна, импрегнирана на калцифицирану диатомејску земљу, испрана киселином и силанизирана; величине честица 80-100 mesh.

2.4. Гас носач и помоћни гас: азот за гасну хроматографију, прикладан за ECD детектор.

2.5. Стаклене тиквице од 10 до 15 ml, са тефлонском превлаком и алуминијумским прстеном, што омогућава затварање тиквице и узимање узорка иглом шприце.

2.6. Клијешта за херметичко затварање.

2.7. Шприца са иглом за гас од 0,5 до 2 ml.

3. РЕАГЕНСИ

Стандард: халогенирани раствори чистоће прикладни за гасну хроматографију.

4. ПОСТУПАК

4.1. Тачно се одваже око 3 g уља у стаклену тиквицу (која се не може поново употријебити) која се херметички затвори. Тиквица се остави у термостату 1 сат при 70°C. Помоћу шприце се из парне фазе која је у равнотежи са течности (head space) усиса између 0,2 и 0,5 ml те се инјектира у колону гасног хроматографа који је подешен на сљедеће услове:

- температура инјектора: 150°C
- температура колоне: 70 – 80°C
- температура детектора: 200 – 250°C.

Може се радити и на другим температурама уз услов да резултати остану еквивалентни.

4.2. Референтни раствори: стандардни раствори припремају се користећи рафинисано маслиново уље без трагова раствора, у концентрацијама између 0,05 и 1 ppm (mg/kg), зависно од предвиђеног удјела халогенираних раствора у узорку. Халогенирани раствори могу се по потреби разриједити пентаном.

4.3. Квантитативно одређивање: успостави се корелација између површина или висина пикова узорка и површина/висина пикова стандардног раствора чија је концентрација најближа очекиваној концентрацији. Ако је одступање веће од 10%, потребно је поновити анализу поређењем са другим стандардним раствором док се не постигне одступање мање од 10%. Удио се одређује на освову просјека појединачних инјектирања.

4.4. Изражавање резултата: у ppm (mg/kg). Граница осјетљивости методе је 0,01 mg/kg.

АНЕКС XI
МЕТОДА МЕЂУНАРОДНОГ САВЈЕТА ЗА МАСЛИНУ ЗА ОРГАНОЛЕПТИЧКО ОЦЈЕЊИВАЊЕ ДЈЕВИЧАНСКОГ МАСЛИНОВОГ УЉА

1. СВРХА И ПРИМЈЕНА

Овим анексом се прописује поступак оцјене органолептичких својстава дјевичанских маслинових уља у смислу члана 2. став (2) тачке а) овог правилника, те поступак њихове класификације на основу тих својстава. Овај анекс садржи и упутства за необавезно означавање производа.

Ова метода се може примјењивати само за класификацију и означавање дјевичанских маслинових уља на основу интензитета утврђених негативних својстава, интензитета воћног мириса и укуса те осталих позитивних својстава, што обавља група одабраних, увјежбаних и провјерених оцјењивача, који сачињавају панел.

2. УОПШТЕНО

У погледу дефиниција основних појмова, просторија за оцјењивање, чаша за дегустацију те било којег другог питања везаног уз ову методу, препоручује се усклађеност с одредбама посебног прописа о ревизији методе за органолептичко оцјењивање дјевичанских маслинових уља.

3. СПЕЦИФИЧНИ РЈЕЧНИК

3.1. Позитивна својства

Воћно: укупност мирисних својстава (зависно од сорте) карактеристичних за уље од здравих и свјежих плодова, било зелених или зрелих, запажених директно или индиректно (ретроназално).

Својство воћно дефинише се зеленим ако мирисна својства подсјећају на зелене плодове тј. карактеристична су за уље добијено од зелених плодова.

Својство воћно дефинише се зрелим ако мирисна својства подсјећају на зреле плодове, тј. карактеристична су за уље добијено од зелених и зрелих плодова.

Горко: карактеристичан окус уља добијеног од зелених или дјелимично обојених маслина, који се перципира путем окружених папила, поређаних на језику у облику слова В.

Пикантно: тактилни осјећај пецкања својствен уљима произведеним на почетку сезоне, углавном од још недозрелих маслина, који се може распознати по цијелој усној шупљини, а нарочито у грлу.

3.2. Негативна својства

Буђав плод/уљни талог: препознатљив окус и мирис уља добијеног од сабијених маслина код којих је дошло до високог степена анаеробне ферментације или уља које је остало у додиру с уљним талогом који је ферментирао у анаеробним условима.

Пљесниво/влажно: препознатљив укус и мирис уља од маслина на којима је дошло до значајног развоја плијесни и квасаца као посљедица чувања у влажним условима више дана.

Вински-сирћетно/кисело: препознатљив укус и мирис неких уља који подсјећа на вино или сирће. Узрокован је првенствено аеробном ферментацијом маслина или остатака маслиновог тијеста на неодговарајуће очишћеним слојницама, што доводи до стварања сирћетне киселине, етил-ацетата и етанола. Метално: укус и мирис који подсјећа на метал. Својствен је уљима која су дуже вријеме била у додиру са металним површинама током мљевења, мијешења, пресовања или складиштења.

Ужегло: препознатљив укус и мирис уља која су била изложена интензивним оксидационим процесима.

Кувано или прекувано: препознатљив укус и мирис узрокован претјераним и/или предугим загријавањем током прераде, а нарочито мијешењем маслиновог тијеста у термички неповољним условима.

Сијено/дрво: препознатљив укус и мирис неких уља која потичу од сасушених плодова маслина.

Тешко (грубо): осјећај густине и пастозности у устима који дају поједина стара уља.

Средство за подмазивање: окус и мирис уља који подсјећа на нафту, односно на минерално уље или маст за подмазивање.

Биљна вода: окус и мирис који попримају уља која су била у дужем додиру са ферментираном биљном водом.

Саламура: укус и мирис уља добијеног од маслина које су прије прераде чуване у раствору соли.

Слојнице: укус и мирис карактеристичан за уља добијена од маслина пресованих на новим слојницама од биљних влакана, а различит је зависно од тога да ли су слојнице сачињене од зелених или сувих влакана.

Земља: укус и мирис уља добијеног од маслина сакупљених са земљом или блатњавих и неопраних маслина.

Црвљиво: укус и мирис уља добијеног од маслина јако нападнутих ларвама маслинове мушице (*Bactrocera oleae*).

Краставац: укус и мирис карактеристичан за уља предуго чувана у херметички затвореним посудама, нарочито лименим, а потиче од стварања 2,6-нонадиенала.

Влажно дрво: укус и мирис карактеристичан за уља добијена од маслина које су биле смрзнуте на стаблу.

3.3. Необавезна терминологија при означавању производа

На захтјев, водитељ панела може издати потврду о усклађености уља са тврдњама и интервалима који, у погледу интензитета и перцепције својстава, одговарају сљедећим придјевима:

а) за свако од позитивних својстава из тачке 3.1. (воћно, евентуално дефинисано као недозрело или зрело, те пикантно и горко):
   i) појам "интензивно" може се користити кад је медијан својства већи од 6;
   ii) појам "средње" може се користити кад је медијан својства између 3 и 6;
   iii) појам "благо" може се користити кад је медијан својства мањи од 3;
   iv) поједина својства могу се означити на производу и без појмова под i), ii) и iii) кад је медијан дотичног својства већи или једнак 3;

б) појам »складно« може се користити за уље које није неуравнотежено. Под неуравнотеженим се подразумијевају окусно-мирисна и тактилна својства уља чији је медијан интензитета за горко и/или пикантно за двије и више тачки већи од медијана интензитета воћног.

ц) појам "благо уље" може се користити за уље чији су медијани интензитета за горко и пикантно мањи или једнаки 2.

4. ПАНЕЛ

Панел чине водитељ панела и 8 – 12 оцјењивача.

Водитељ панела треба да буде извјежбани стручњак са добрим познавањем различитих врсти уља. Водитељ је одговоран за организацију и дјеловање панела, укључујући припрему, шифрирање и достављање узорака оцјењивачима те за прикупљање и статистичку обраду података.

Водитељ бира оцјењиваче, брине се за њихову обуку и провјерава њихову способност оцјењивања с циљем одржавања на прикладном нивоу.

Оцјењивачи морају бити одабрани и обучени на основу својих способности разликовања сличних узорака, у складу са приручником Међународног савјета за маслину о одабиру, обуци и надзору квалификованих оцјењивача маслиновог уља.

Панел мора учествовати у сензорским анализама на националном, међународном и нивоу ЕУ, организованим у сврху редовног надзора и усклађивања критеријума опажања. Такође мора сваке године доставити држави чланици потпуне информације о саставу панела и броју анализа обављених у својству одобреног панела.

5. ПОСТУПАК СЕНЗОРСКЕ АНАЛИЗЕ И КЛАСИФИКОВАЊЕ

5.1. Коришћење оцјењивачког листића од стране оцјењивача

Листић који користе оцјењивачи приказан је у Додатку А.

Сваки оцјењивач мора помирисати, а затим и пробати[(1)] уље које се налази у чаши за оцјењивање те на линијској скали од 10 cm на обрасцу за оцјењивање означити интензитет сваког негативног и позитивног својства. Ако оцјењивач распозна зелени или зрели тип воћног мириса и укуса, тада то треба означити у одговарајућем квадратићу на обрасцу за оцјењивање.

Ако оцјењивач примијети негативна својства која нису наведена на листићу, она се морају навести под "Остало", користећи горе наведене изразе или појмове који их најбоље описују.

[(1)]Оцјењивач се може уздржати од дегустације ако се осјете неке врло интензивне негативне карактеристике када мирише уље. Утом случају мора навести ову ванредну околност и опис стања.

5.2. Обрада података од стране водитеља панела

Водитељ панела скупља испуњене листиће и провјерава интензитете означене за поједина својства. У случају уочене неправилности, водитељ треба да затражи оцјењиваче да прегледају своје листиће и, уколико је потребно, понове анализу.

Водитељ панела може унијети податке сваког оцјењивача у рачунарски програм за израчунавање медијана према методи која је наведена у Додатку Б. Подаци за сваки узорак уносе се у табелу од 9 колона за 9 органолептичких својстава и по једног реда за сваког оцјењивача.

Ако више од 50% чланова панела наведе негативно својство под "Остало", водитељ мора и за то својство израчунати медијан те у складу с тим класификовати уље.

Водитељ панела може издати потврду о усклађености уља са захтјевима из тачке 3.3.а) за коришћење појмова недозрело или зрело само ако је најмање 50% чланова панела означило да уље има дотични тип воћног мириса и укуса.

У случају анализе у сврху надзора усклађености са стандардима, оцјењивање узорка спроводи се једанпут. За потребе друге анализе, оцјењивање узорка спроводи се у два понављања. За потребе коначне одлуке, оцјењивање узорка спроводи се у три понављања. Медијани својстава у тим се случајевима рачунају као средње вриједности медијана сваког појединог поновљеног оцјењивања. Свако од поновљених оцјењивања морају се обавити у одвојеним сједницама.

5.3. Класификовање узорака уља

Уље се класификује у ниже наведене категорије, према медијану негативних својстава и медијану воћног мириса. Под медијаном негативних својстава подразумијева се медијан негативног својства са највећим интензитетом. Медијан негативног својства и медијан воћног мириса изражавају се са једним децималним мјестом, а вриједност грубог коефицијента варијације за дотична својства мора бити мања или једнако од 20%.

Класификовање узорка уља спроводи се упоређивањем вриједности медијана негативних својстава и медијана воћног мириса са ниже наведеним распонима. Распони су одређени узевши у обзир грешку методе, па се сматрају апсолутним. Помоћу рачунарског програма класификацију је могуће предочити у форми табеле те у форми графичког приказа.

(а) екстра дјевичанско маслиново уље: медијан негативних својстава једнак нули, а медијан воћног мириса већи од нуле;

(б) дјевичанско маслиново уље: медијан негативних својстава већи од нуле и мањи или једнак 3,5 а медијан воћног мириса већи од нуле;

(ц) маслиново уље лампанте: медијан негативних својстава већи од 3,5; или медијан негативних својстава мање или једнак 3,5 а медијан воћног мириса једнак нули.

5.4. Посебан случај

Ако је медијан позитивног својства, изузев воћног мириса, већи од 5,0, водитељ панела то мора назначити на аналитичком извјештају.

ДОДАТАК А

ОБРАЗАЦ ЗА ОЦЈЕЊИВАЊЕ ДЈЕВИЧАНСКОГ МАСЛИНОВОГ УЉА

ПРИМИЈЕЋЕНА НЕГАТИВНА СВОЈСТВА	ИНТЕНЗИТЕТ	
Упаљен плод/уљни	→	
Пљесниво/влажно	→	
Вински-сирћетно/кисело	→	
Метално	→	
Ужегло	→	
Остало (навести)	→	
ПРИМИЈЕЋЕНА ПОЗИТИВНА СВОЈСТВА		
Воћно	→	
≤ недозрело	≤зрело	
Горко	→	
Пикантно	→	
Име оцјењивача:		
Шифра узорка:		
Датум:		
Коментари:		

ДОДАТАК Б

МЕТОДА ИЗРАЧУНАВАЊА МЕДИЈАНА И ИНТЕРВАЛА ПОУЗДАНОСТИ

Медијан

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

Медијан је реални број Xm за који вриједи да је вјероватност (P) да вриједности дистрибуције (X) буду ниже од тог броја, мања или једнако 0,5 те да је истовремено вјероватност (P) да вриједности дистрибуције (X) буду мање или једнаке Xm већа или једнако 0,5. Према другој дефиницији, медијан је 50-ти постотник унутар дистрибуције бројева у растућем низу. Другим ријечима, медијан представља средњу вриједност серије са непарним бројем елемената или средњу вриједност два средња елемента у серији са парним бројем елемената.

Груба стандардна девијација

С циљем поузданог процјењивања варијабилности око медијана користи се процјена грубе стандардне девијације према Стјуарту и Кендалу. Сљедећа једнаџина приказује асимптотску стандардну девијацију, тј. грубу процјену варијабилности посматраних података, при чему N представља број података а IQR је међуквартилни интервал. IQR обухвата тачно 50% случајева у било којој дистрибуцији вјероватноће.

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

Израчунавање међуквартилног интервала спроводи се рачунањем разлике између 75-тог и 25-тог постотника.

IQR = 75. постотник – 25. постотник

Постотник је она вриједност Хрс за коју вриједи да је вјероватноћа (P) да вриједности дистрибуције буду мање од Хрс нижа или једнака одређеном проценту, те да је истовремено вјероватноћа (P) да вриједности дистрибуције

буду мање или једнаке Xpc већа или једнака том проценту. Проценат указује на одабрани дио дистрибуције. У случају медијана овај одабрани дио је 50/100.

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

Другим ријечима, постотник је она вриједност дистрибуције која одговара одређеној површини испод кривуље дистрибуције или густине. На примјер, 25. постотник представља вриједност дистрибуције која одговара површини од 0,25 или 25/100.

Груби коефицијент варијације (%)

Груби коефицијент варијације (rVC) представља чисти број, тј. бездимензијску величину, која указује на проценат варијабилности анализиране серије бројева; из тог разлога, овај је коефицијент посебно користан за испитивање поузданости оцјењивача у панелу.

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

Интервал поузданости од 95% у односу на медијан

Интервал поузданости (I.C.) од 95% (вриједност грешке прве врсте износи 0,05 или 5%) јесте интервал унутар којег би вриједност медијана могла варирати када би било могуће оцјењивање поновити безброј пута. Практично представља интервал варијабилности оцјењивања у датим условима рада, у случају да се оно понавља више пута. Интервал помаже у процјени поузданости оцјењивања, као и у случају (rVC%) грубог коефицијента варијације.

I.C. горњи = Me + (c.S*)

I.C. доњи = Me − (c.S*)

гдје *c* у случају поузданости од 0,95 има вриједност 1,96.

АНЕКС XII
ОДРЕЂИВАЊЕ СТИГМАСТАДИЕНА У БИЉНИМ УЉИМА

1. СВРХА

Одређивање стигмастадиена у биљним уљима, која садрже те угљиководонике у малим количинама, а посебно у дјевичанском маслиновом уљу и сировом уљу из комине маслина.

2. ПРИМЈЕНА

Метода се може примијенити на сва биљна уља, али је поуздана само кад се количина ових угљоводоника креће од 0,01 до 4,0 mg/kg. Метода је посебно погодна за утврђивање присуства рафинисаних биљних уља (маслиновог, комине маслина, сунцокретовог, палминог, итд.) у дјевичанском маслиновом уљу, јер рафинисана уља за разлику од дјевичанских садрже стигмастадиене.

3. ПРИНЦИП

Издвајање неосапуњивог. Одјељивање стероидне угљоводоничне фракције хроматографијом на колони са силикагелом те анализа капиларном гасном хроматографијом.

4. АПАРАТУРА

4.1. Тиквице са округлим дном од 250 ml, прикладне за употребу са повратним хладилом.

4.2. Лијевци за одјељивање од 500 ml.

4.3. Тиквице са округлим дном од 100 ml.

4.4. Ротирајући вакуум упаривач.

4.5. Стаклена хроматографска колона (унутрашњег промјера 1,5-2,0 cm, дужине 50 cm), са тефлонском славином те чепом од стаклене вуне или плочицом од синтер стакла на дну. Колона се припрема уливањем хексана до висине од око 5 cm те доливањем суспензије 15 g силикагела у 40 ml хексана, уз помоћ малих количина хексана. Равномјерно пуњење колоне постиже се лаганим потресањима. Дода се безводни натријум-сулфат до висине слоја од око 0,5 cm. Вишак хексана се елуира.

4.6. Гасни хроматограф са пламено-јонизационим детектором, инјектором са раздвајањем протока ("split" типа) или "splitless" типа за директно уношење у колону (cold on-column) те пећи с могућношћу програмирања температуре уз максимално одступање од ± 1°C.

4.7. Капиларна силикатна колона за гасну хроматографију (унутрашњег промјера 0,25 или 0,32 mm, дужине 25 m) са стационарном фазом која садржи 5% фенилметилсиликона, дебљине слоја 0,25 mm.

Напомена 1:

Могу се употријебити и друге колоне сличне или ниже поларности.

4.8. Писач-интегратор са могућношћу интегрисања између два минимума ("valley-valley").

4.9. Микролитарска шприца за гасну хроматографију од 5 до 10 ml са чврсто фиксираном иглом.

4.10. Електрични гријаћи плашт или плоча.

5. РЕАГЕНСИ

Ако није другачије назначено, сви реагенси треба да буду п.а. чистоће. Вода треба да буде дестилована или еквивалентне чистоће.

5.1. Хексан или мјешавина алкана са распоном кључања од 65 до 70°C, дестилован на колони за ректификацију.

Напомена 2:

Растварач се мора дестиловати како би се уклониле нечистоће.

5.2. 96%-тни етанол (v/v).

5.3. Безводни натријум-сулфат.

5.4. Алкохолни раствор калијум-хидроксида, 10%-тни. 10 ml воде дода се у 50 g калијум- хидроксида, промијеша и надопуни до 500 ml етанолом.

Напомена 3:

Овај раствор током стајања мијења боју у смеђу па је треба свјеже припремати сваког дана и чувати у добро зачепљеним боцама од тамног стакла.

5.5. Силикагел 60 за хроматографију на колони, 70-230 mesh (Merck, реф. 7734 или други одговарајући).

Напомена 4:

У правилу, може се користити силикагел из оригиналног паковања без било какве обраде. Међутим, неке производне серије силикагела показују нижу активност, што доводи до лошег хроматографског раздвајања. У том случају, силикагел се обрађује на сљедећи начин: активира се загријавањем на 550°C најмање четири сата. Након загријавања, силикагел се смјести у ексикатор гдје се хлади те затим пребаци у тиквицу са чепом. Дода се 2% воде и тресе до нестанка грудвица и постизања сипкости.

Серије силикагела које доводе до интерференције пикова хроматограма морају се обрадити како је горе описано. Као алтернатива, може се употријебити екстра чисти силикагел 60 (Merck, реф. 7754).

5.6. Почетни раствор (200 ппм) колеста-3,5-диена (Сигма, чистоће 99%) у хексану (10 mg у 50 ml).

5.7. Стандардни раствор колеста-3,5-диена у хексану концентрације 20 ppm, припремљен разрјеђивањем почетног раствора.

Напомена 5:

Раствори под 5.6. и 5.7. остају стабилни барем четири мјесеца ако се чувају на температури испод 4°C.

5.8. Раствор н-нонакосана у хексану, концентрације приближно 100 ppm..

5.9. Гас носач за гасну хроматографију: водоник или хелијум чистоће 99,9990%.

5.10. Помоћни гасови за пламено-јонизациони детектор: водоник чистоће 99,9990% и пречишћени ваздух.

6. ПОСТУПАК

6.1. Припрема неосапуњивих супстанци

6.1.1. Одваже се 20 ± 0,1 g уља у тиквицу од 250 ml (4.1), дода 1 ml стандардног раствора колеста-3,5-диена (20 µg) и 75 ml 10%-тног алкохолног раствора калиум-хидроксида. Прикључи се повратно хладило и 30 минута лагано кува. Тиквица са узорком се охлади (не сасвим, јер се тада садржај очврсне) те се дода 100 ml воде и пребаци у лијевак за одјељивање (4.2) помоћу 100 ml хексана. Садржај се снажно мијеша 30 секунди и затим остави да мирује ради раздвајања фаза.

Напомена 6:

У случају стварања врло стабилне емулзије, додају се мале количине етанола.

6.1.2. Доњи водени слој пренесе се у сљедећи лијевак за одјељивање и поновно екстрахује са 100 ml хексана. Након одбацивања доњег воденог слоја, хексански екстракти (спојени у другом лијевку за одјељивање) исперу се три пута са по 100 ml смјесе етанол-вода (1:1), до неутралног pH.

6.1.3. Испрани хексански слојеви пропусте се преко безводног натријум-сулфата (50 g), исперу са 20 ml хексана и упаре до сувог помоћу ротационог вакуум-упаривача на 30°C.

6.2. Издвајање фракције стероидних угљоводоника.

6.2.1. Након испаравања остатак се пренесе у колону помоћу два пута по 1 ml хексана. Узорак се пропусти кроз колону тако да се ниво раствора спусти до површине натријум- сулфата. Елуира се хексаном уз брзину протока од око 1 ml/мин. Одбаци се првих 25-30 ml, а сљедећих 40 ml сакупи и пребаци у тиквицу са округлим дном од 100 ml (4.3).

Напомена 7:

Прва фракција садржи засићене угљоводонике (Слика 1а), а друга стероидне угљоводонике. Даљим елуирањем добија се сквален и сродни спојеви. С циљем задовољавајућег раздвајања између засићених и стероидних угљоводоника, потребно је оптимирати волумене фракција. Волумен прве фракције треба подесити тако да при анализи друге фракције пикови који припадају засићеним угљоводоницима буду ниски (Слика 1ц). У случају да се ови пикови не појаве, а да је истовремено пик интерног стандарда низак, неопходно је смањити волумен. У сваком случају, потпуно раздвајање компонената прве и друге фракције није неопходно, будући да приликом анализе гасном хроматографијом у условима описаним у тачки 6.3.1. не долази до преклапања припадајућих пикова. Оптимирање волумена друге фракције углавном није потребно, јер долази до доброг раздвајања даљих компонената. Међутим, појава великог пика који припада сквалену, с временом задржавања око једну и по минуту краћим у односу на интерни стандард, указује на лоше раздвајање фракција.

6.2.2. Друга фракција отпарава се до сувог помоћу ротационог вакуум-упаривача при 30°C, а остатак се одмах раствори у 0,2 ml хексана. У овом облику, раствор се до анализе може чувати у хладњаку.

Напомена 8:

Остаци из тачака 6.1.3. и 6.2.2. не смију се чувати суви нити на собној температури. Чим се добију, треба додати растварач и чувати растворе у хладњаку.

6.3. Гасна хроматографија

6.3.1. Услови рада за систем инјектирања са раздвајањем протока:

- температура инјектора: 300°C,
- температура детектора: 320°C,
- писач-интегратор: параметри интегрисања треба да буду подешени тако да омогуће исправну процјену површина. Препоручује се начин интегрисања између два минимума ("valley-valley"),
- осјетљивост: око 16 пута већа у односу на најмање пригушење,
- количина инјектираног узорка: 1 µl,
- програмирање температуре пећи: почетно 235°C/6 мин, затим повећавати за 2°C/min. до 285°C,
- инјектор са раздвајањем протока (split) у омјеру 1:15,
- гас носач: хелијум или водоник под притиском од око 120 kPa.

Ови услови се могу прилагодити својствима гасног хроматографа и колоне тако да се добију хроматограми који испуњавају сљедеће захтјеве: пик интерног стандарда мора се појавити уз одступање од приближно 5 минута у односу на вријеме наведено у тачки 6.3.2; висина пика интерног стандарда мора досезати најмање 80% пуне скале хрома-тограма.

Хроматографски систем треба провјерити инјектирањем смјесе почетног раствора колестадиена (5.6) и раствора н-нонакосана (5.8.). Пик колеста-3,5-диена треба се на хроматограму појавити прије н-нонакосана (Слика 1с); у супротном, потребно је снизити температуру пећи и/или примијенити колону ниже поларности.

6.3.2. Идентификација пикова

Пик интерног стандарда јавља се након приближно 19 минута, док пик 3,5-стигмастадиена има релативно вријеме задржавања од око 1,29 (Слика 1б.). 3,5-стигмастадиен се јавља с малим количинама изомера, а обично оба елуирају заједно дајући јединствени пик. Међутим, у случају превисоке поларности колоне или високе моћи раздвајања, изомер се може појавити као мали пик непосредно испред пика 3,5-стигмастадиена (Слика 2). Како би се обезбиједило да се оба изомера појаве заједно као јединствен пик, препоручује се употреба мање поларне колоне или колоне већег унутрашњег промјера.

Напомена 9:

Референтни хроматограм стигмастадиена може се добити анализом рафинисаног биљног уља уз коришћење мањих количина узорка (1-2 g). Стигмастадиени дају уочљив и лако препознатљив пик.

6.3.3. Квантитативна анализа

Удио стигмастадиена одређује се помоћу сљедећег израза:

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

гдје је:

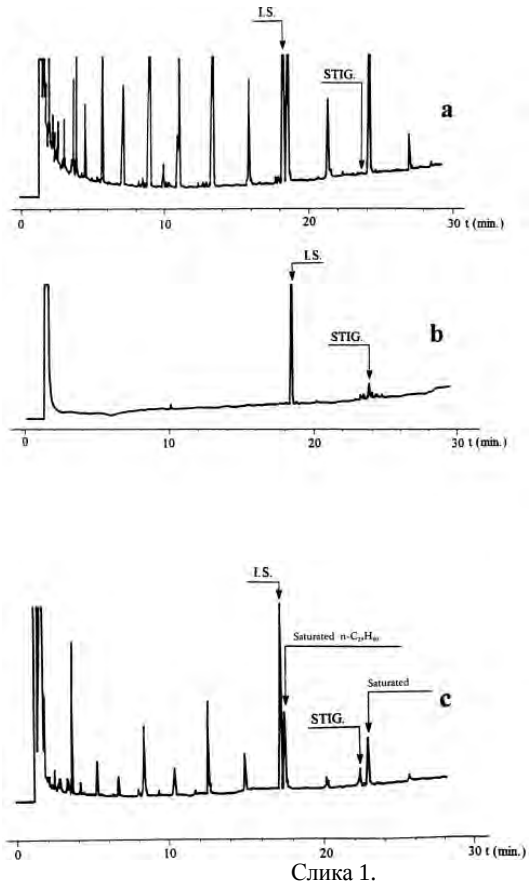
As = површина пика стигмастадиена (у случају два изомера, збир површина два пика)

Ac = површина интерног стандарда (колестадиен)

Mc = маса додатог стандарда, у микрограмима

Mo = маса уља, у грамима

Граница детекције: око 0,01 mg/kg.



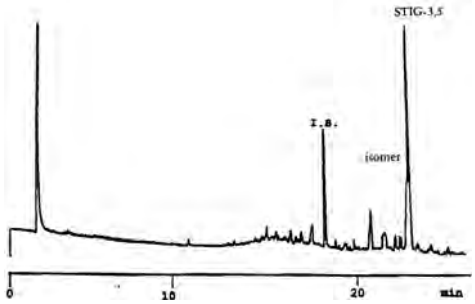
Слика 1.

Гасни хроматограми узорака маслиновог уља анализирани капиларном силикатном колоном (унутрашњег промјера 0,25 mm, пречника 25 м) са 5% фенилметилсиликона дебљине слоја 0,25 µm:

(а) Прва фракција (30 ml) дјевичанског маслиновог уља, са додатим стандардом.

(б) Друга фракција (40 ml) маслиновог уља које садржи 0,10 mg/kg стигмастадиена.

(ц) Друга фракција (40 ml) која садржи малу количину прве фракције.



Слика 2.

Гасни хроматограм узорка рафинисаног маслиновог уља анализираног колоном ДБ-5 на којем се види изомер 3,5-стигмастадиена.

АНЕКС XIII
ОДРЕЂИВАЊЕ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛА С ECN 42 (РАЗЛИКА ИЗМЕЂУ ПОДАТАКА ДОБИЈЕНИХ HPLC-ом И ТЕОРЕТСКЕ КОЛИЧИНЕ)

1. ОБИМ

Одређивање састава триацилглицерола (TAG) у маслиновом уљу с обзиром на њихов еквивалентни број угљеника (ECN), као разлике између аналитичких резултата добијених високодјелотворном течном хроматографијом (HPLC) и теоретске количине, израчунате на основу састава масних киселина.

2. ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Метода се примјењује за доказивање присуства малих количина сјеменских уља (богатих линолном киселином) у свим категоријама маслинових уља.

3. ПРИНЦИП

Удио триацилглицерола с ECN 42 одређен HPLC методом и теоретски удио триацилглицерола с ECN 42 (израчунато на основу састава масних киселина који је утврђен гасном хроматографијом) подударају се унутар одређених граница за чиста уља. Разлика већа од вриједности утврђених овим правилником за поједине врсте уља указује да уље садржи сјеменска уља.

4. МЕТОДА

Метода израчунавања теоретског удјела триацилглицерола са ECN 42 те разлике између теоретског удјела и резултата добијених HPLC методом у основи представља упоређивање аналитичких података добијених помоћу других метода. Могуће је разликовати три фазе: одређивање састава масних киселина капиларном гасном хромато-графијом, израчунавање теоретског састава триацилгли-церола са ECN 42 те одређивање триацилглицерола са ECN 42 HPLC методом.

4.1. Апаратура

4.1.1. Тиквице ас округлим дном од 250 и 500 ml.

4.1.2. Лабораторијске чаше од 100 ml.

4.1.3. Стаклена хроматографска колона унутрашњег промјера 21 mm, дужине 450 mm, са славином и конусним наставком од брушеног стакла (са унутрашње стране) при врху.

4.1.4. Лијевци за одјељивање од 250 ml, са наставком од брушеног стакла (са спољашње стране) на дну, прикладни за спајање на врх колоне.

4.1.5.Стаклени штапић дужине 600 mm.

4.1.6. Стаклени лијевак промјера 80 mm.

4.1.7. Одмјерне тиквице од 50 ml.

4.1.8. Одмјерне тиквице од 20 ml.

4.1.9. Ротирајући вакуум упаривач.

4.1.10. Течни хроматограф високе учинковитости (HPLC), са могућношћу термостатске контроле температуре колоне.

4.1.11. Јединица за инјектирање волумена 10 µl.

4.1.12. Детектор: диференцијални рефрактометар. Осјетљивост на пуној скали треба да буде најмање 10^{-4} јединица индекса рефракције.

4.1.13. Колона: колона од нерђајућег челика дужине 250 mm и унутрашњег промјера 4,5 mm, пуњена зрнцима силикагела промјера 5 µm, са 22 до 23% угљеника у облику октадецилсилана (видјети Напомену 2).

4.1.14. Писач и/или интегратор.

4.2. Реагенси

Реагенси треба да буду аналитичке чистоће. Из раствора за елуирање треба да буде уклоњен гас, а могу се рециклирати неколико пута без утицаја на раздвајање.

4.2.1. Петролетер (40 до 60°C), хроматографске чистоће.

4.2.2. Диетил етер, без трагова пероксида, дестилован непосредно прије употребе.

4.2.3. Раствор за елуирање за хроматографију на колони: смјеса петролетера и диетил етера у омјеру 87:13 (v/v).

4.2.4.Силикагел, 70-230 mesha, тип Merck 7734, са стандардизованим удјелом воде од 5% (v/v).

4.2.5. Стаклена вуна.

4.2.6. Ацетон.

4.2.7. Ацетонитрил.

4.2.8. Раствор за елуирање за HPLC: ацетонитрил + ацетон (омјер треба прилагодити тако да се постигне жељени степен раздвајања; започиње се са смјесом 50:50).

4.2.9. Растварач: ацетон.

4.2.10. Референтни триглицериди: могуће је користити триглицериде доступне на тржишту (трипалмитин, триолеин и др.) па се у том случају времена задржавања приказују графички у односу на еквивалентни број угљеника. Друга могућност су референтни хроматограми сојина уља, смјесе сојиног и маслиновог уља у омјеру 30:70 те чистог маслиновог уља (видјети напомене 3 и 4 и слике 1, 2, 3, 4).

4.3. Припрема узорка

Будући да низ супстанци може довести до лажних позитивних резултата, узорак се сваки пут мора прочистити према IUPAC методи 2.507, која се користи за одређивање поларних супстанци у оксидираним уљима.

4.3.1. Припрема хроматографске колоне

Колона (4.1.3) напуни се са око 30 ml раствора за елуирање (4.2.3), а затим се у колону унесе нешто стаклене вуне (4.2.5), гурајући је до дна колоне стакленим штапићем (4.1.5).

У чаши од 100 ml припреми се суспензија 25 g силикагела (4.2.4) у 80 ml смјесе раствора (4.2.3) те пребаци у колону помоћу стакленог лијевка (4.1.6).

Како би се обезбиједило да је силикагел у потпуности пренесен у колону, чаша се неколико пута испере смјесом раствора за елуирање, пребацујући и то у колону.

Отварањем славине при дну колоне, раствор се испусти до висине од 1 cm изнад површине силикагела.

4.3.2. Хроматографија на колони

С тачношћу од 0,001 g одваже се 2,5 ± 0,1 g претходно филтрираног, хомогенизованог и, ако је потребно, осушеног уља у одмјерну тиквицу од 50 ml (4.1.7). Раствори се у око 20 ml раствора за елуирање (4.2.3), по потреби уз лагано загријавање ради лакшег растварања. Охлади се на собну температуру и надопуни до ознаке раствором за елуирање.

Трбушастом пипетом унесе се 20 ml раствора у колону припремљену како је описано у тачки 4.3.1, отвори славина и раствор пропусти до површине силикагела.

Елуира се са 150 ml раствора за елуирање (4.2.3.), подешавајући брзину протока на око 2 ml/мин (150 ml отапала треба проћи кроз колону у 60 – 70 минута).

Елуат се сакупља у тиквици од 250 ml (4.1.1), претходно тарираној у пећи и тачно изваганој. Растварач се уклони на ротирајућем вакуум упаривачу те затим изваже остатак у тиквици који ће се користити за припрему раствора за HPLC анализу и за припрему метил естера.

Удио сакупљеног узорка из колоне мора бити најмање 90% за екстра дјевичанско, дјевичанско, обично рафинисано и маслиново уље те најмање 80% за лампанте и уље комине маслина.

4.4. Анализа HPLC методом

4.4.1. Припрема узорака за хроматографију

5%-тни раствор узорка припрема се вагањем 0,5 ± 0,001 g узорка у одмјерну тиквицу од 10 ml те надопуњавањем до ознаке растварачем (4.2.9).

4.4.2. Поступак

Укључи се хроматограф. Растварач за елуирање (4.2.8) пумпа се кроз колону протоком од 1,5 ml/min, с циљем испирања читавог система. Причека се да базна линија постане стабилна. Инјектира се 10 µl узорка припремљеног према тачки 4.3.

4.4.3. Израчунавање и изражавање резултата

Користи се метода нормализације површине, тј. претпостави да је збир површина пикова који одговарају TAG од ECN 42 до ECN 52 једнак 100%. Израчуна се релативни удио сваког појединог триглицерида помоћу израза:

% триглицерида = површина пика x 100/ збир површина пикова.

Резултати се изражавају на најмање два децимална мјеста.

Напомена 1: Редослијед елуирања може се одредити израчунавањем еквивалентног броја угљеника, који се често дефинише изразом ECN = CN – 2n, гдје је CN број атома угљеника, а n број двоструких веза. ECN се може прецизније израчунати узимајући у обзир поријекло двоструке везе. Ако су n_o, n_l и n_{ln} бројеви двоструких веза олеинске, линолне односно линоленске киселине, еквивалентни број угљеника може се израчунати помоћу израза:

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

гдје се коефицијенти d_o, d_l i d_{ln} могу израчунати на основу референтних триглицерида. У условима прописаним овом методом, приближно вриједи сљедећи однос:

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

Напомена 2: Примјери: Lichrosorb (Merck) RP18 Арт. 50333

Lichrosphere (Merck) 100 CH18 Арт. 50377.

Напомена 3: Помоћу неких референтних триглицерида могуће је израчунати резолуцију у односу на триолеин уз примјену коригованог (смањеног) времена задржавања RT' = RT – RT растварача:

α = RT' / RT триолеин

Граф лог α у зависности од f (број двоструких веза) омогућава одређивање времена задржавања за све триглицериде масних киселина који су присутни у референтним триглицеридима – видјети слику 2.

Напомена 4: Ефикасност колоне мора омогућити јасно одвајање пика трилинолеина од пикова триглицерида сличног времена задржавања. Елуирање се спроводи до пика ECN 52.

Напомена 5: Директно одређивање површина свих пикова важних за анализу обезбијеђено је ако други пик који одговара ECN 50 достиже 50% пуне скале писача.

4.5. Израчунавање удјела триацилглицерола

4.5.1. Одређивање састава масних киселина

Састав масних киселина одређује се гасном хроматографијом према методи описаној у Анексу IXa овог правилника, уз употребу капиларне колоне. Метил естери масних киселина припремају се према Анексу Хб овог правилника (алкохолни раствор натријум- метилата).

4.5.2. Масне киселине које се узимају у обзир за израчунавање

Триглицериди се групишу према њиховом еквивалентном броју угљеника (ECN), узимајући у обзир сљедеће еквивалентности између ECN и масних киселина. У обзир се узимају само масне киселине са 16 и 18 атома угљеника, јер су само оне битне за маслиново уље.

Масна киселина (МК)	Скраћеница	Молекулска маса (ММ)	ECN
палмитинска киселина	P	256,4	16
палмитолеинска киселина	Po	254,4	14
стеаринска киселина	S	284,5	18
олеинска киселина	O	282,5	16
линолна киселина	L	280,4	14
линоленска киселина	Ln	278,4	12

4.5.3. Прерачунавање површина (%) у молове за све масне киселине

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

4.5.4. Нормализација масних киселина на 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)

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

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

Као резултат се добија удио поједине масне киселине у молним процентима с обзиром на све положаје у триглицеридима (1,2,3-).

Затим се израчунава број засићених масних киселина P и S (ZMK) те незасићених масних киселина Po, O, L и Ln (NMK):

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

4.5. Израчунавање састава масних киселина на 2- и 1,3- положају TAG

Масне киселине распоређују се у три групе на сљедећи начин: двије исте групе за 1- и 3-положај те једна за 2-положај, са различитим коефицијентима за засићене (P и S) односно незасићене масне киселине (Po, O, L и Ln).

4.5.5.1. Засићене масне киселине на 2-положају [P(2) и S(2)]:

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

4.5.5.2. Незасићене масне киселине на 2-положају [Po (2), O (2), L (2) и Ln (2)]:

(5)

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

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

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

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

4.5.5.3. Масне киселине у 1,3- положајима [P (1,3), S (1,3), Po (1,3), O(1,3), L (1,3) и 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. Израчунавање триацилглицерола

4.5.6.1. TAG са само једном масном киселином (AAA, тј. LLL и PoPoPo)

(7)

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

4.5.6.2. TAG с двије масне киселине (ААБ, тј. PoPoL и PoLL)

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

$$mol\ \%\ ABA = \frac{mol\ \%\ A(1,3) \times mol\ \%\ B(2) \times mol\%\ A(1,3)}{10000} \quad (8)$$

4.5.6.3. TAG са три различите масне киселине (A, B, C, тј. OLLn, PLLn, PoOLn, PPoLn)

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

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

$$mol\ \%\ CAB = \frac{mol\ \%\ C(1,3) \times mol\ \%\ A(2) \times mol\ \%\ B(1,3) \times 2}{10000} \quad (9)$$

4.5.6.4. Триацилглицероли с ECN 42

Сљедећи триацилглицероли с ECN 42 узимају су у обзир према једначинама 7, 8 и 9, редослиједом очекиваног елуирања при анализи HPLC методом (обично само три пика):

LLL

PoLL и позициони изомер LPoL

OLLn и позициони изомери OLnL и LnOL

PoPoL и позициони изомер PoLPo

PoOLn и позициони изомери OPoLn и OLnPo

PLLn и позициони изомери LLnP и LnPL

PoPoPo

SLnLn и позициони изомер LnSLn

PPoLn и позициони изомери PLnPo и PoPLn

Триацилглицероли с ECN 42 изражени су као збир ових девет триацилглицерола укључујући њихове позиционе изомере, а резултати се изражавају на најмање два децимална мјеста.

5. ОЦЈЕЊИВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

Израчунати теоретски удио наведених триацилглицерола упоређује се са удјелом који је утврђен HPLC методом. Ако је разлика између ова два податка већа од вриједности прописане уредбом за ту категорију уља, узорак садржи сјеменска уља.

Напомена: Резултати се изражавају на једно децимално мјесто.

6. Примјер (бројеви се односе на одломке у тексту методе)

4.5.1. Израчунавање моларних % масних киселина из података добијених гасном хроматографијом (% површине)

Гасном хроматографијом добијају се сљедећи подаци о саставу масних киселина:

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

4.5.3. Прерачунавање % површина у молове за све масне киселине

$$mol\ P = \frac{10}{256{,}4} = 0{,}03900\ mol\ P$$ *Vidjeti jednačinu* (1)

$$mol\ S = \frac{3}{284{,}5} = 0{,}01054\ mol\ S$$ *Vidjeti jednačinu* (1)

$$mol\ Po = \frac{1}{254{,}4} = 0{,}00393\ mol\ Po$$ *Vidjeti jednačinu* (1)

$$mol\ O = \frac{75}{282{,}5} = 0{,}26549\ mol\ O$$ *Vidjeti jednačinu* (1)

$$mol\ L = \frac{10}{280{,}4} = 0{,}03566\ mol\ L$$ *Vidjeti jednačinu* (1)

$$mol\ Ln = \frac{1}{278{,}4} = 0{,}003594\ mol\ Ln$$ *Vidjeti jednačinu* (1)

Укупно = 0,35822 mol TAG

4.5.4. Нормализација масних киселина на 100%

$$mol\ \%\ P(1,2,3) = \frac{0{,}03900\ mol\ P\ \times 100}{0.35822\ mol} = 10{,}888\ \%$$ *Vidjeti jednačinu* (2)

$$mol\ \%\ S(1,2,3) = \frac{0{,}01054\ mol\ S\ \times 100}{0.35822\ mol} = 2{,}944\ \%$$ *Vidjeti jednačinu* (2)

$$mol\ \%\ Po(1,2,3) = \frac{0{,}00393\ mol\ Po\ \times 100}{0.35822\ mol} = 1{,}097\ \%$$ *Vidjeti jednačinu* (2)

$$mol\ \%\ O(1,2,3) = \frac{0{,}26549\ mol\ O\ \times 100}{0.35822\ mol} = 74{,}113\ \%$$ *Vidjeti jednačinu* (2)

$$mol\ \%\ L(1,2,3) = \frac{0{,}03566\ mol\ L * 100}{0.35822\ mol} = 9{,}956\ \%$$ *Vidjeti jednačinu* (2)

$$mol\ \%\ Ln(1,2,3) = \frac{0{,}00359\ mol\ Ln\ \times 100}{0.35822\ mol} = 1{,}003\ \%$$ *Vidjeti jednačinu* (2)

Укупно Mol % = 100,0 %

Сума засићених и незасићених масних киселина на 1,2,3-положају TAG:

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

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

4.5.5. Израчунавање састава масних киселина на 2- и 1,3- положају TAG

4.5.5.1. Засићене масне киселине на 2-положају [P(2) и S(2)]:

$$mol\ \%\ P(2) = 10{,}888\% * 0{,}06 = 0{,}653\ mol\ \%$$ *Vidjeti jednačinu* (4)

$$mol\ \%\ S(2) = 2{,}944\% * 0{,}06 = 0{,}177\ mol\ \%$$ *Vidjeti jednačinu* (4)

4.5.5.2. Незасићене масне киселине на 1,3-положају [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) и Ln(1,3)]:

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

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

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

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

Vidjeti jednačinu (5)

4.5.5.3. Масне киселине на 1,3- положајима [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) и Ln(1,3)]:

$$mol\ \%\ P(1{,}3) = \frac{10{,}888 - 0{,}659}{2} 10{,}888$$
$$= 16{,}005\ mol$$ *Vidjeti jednačinu* (6)

$$mol\ \%\ S(1{,}3) = \frac{2{,}944 - 0{,}177}{2} 2{,}944$$
$$= 4{,}327\ mol\ \%$$ *Vidjeti jednačinu* (6)

$$mol\ \%\ Po(1{,}3) = \frac{1.097 - 1{,}263}{2} 1.097$$
$$= 1{,}015\ mol\ \%$$ *Vidjeti jednačinu* (6)

$$mol\ \%\ O(1{,}3) = \frac{74{,}113 - 85{,}295}{2} 74{,}113$$
$$= 68{,}522\ mol\ \%$$ *Vidjeti jednačinu* (6)

$$mol\ \%\ L(1{,}3) = \frac{9{,}956 - 11{,}458}{2} 9{,}956$$
$$= 9{,}205\ mol\ \%$$ *Vidjeti jednačinu* (6)

$$mol\ \%\ Ln(1{,}3) = \frac{1.003 - 1{,}154}{2} 1{,}003$$
$$= 0{,}927\ mol\ \%$$ *Vidjeti jednačinu* (6)

Видјети једначину (6)

4.5.6. Израчунавање триацилглицерола:

Из израчунатог састава масних киселина на сн-2- и сн-1,3-положајима (видјети горе):

МК у:	1,3-положају	2-положају
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 %
Укупно	100,0 %	100,0 %

Израчунавају се сљедећи триацилглицероли:

LLL

PoPoPo

PoLL с једним позиционим изомером

SLnLn с једним позиционим изомером

PoPoL с једним позиционим изомером

PPoLn са два позициона изомера

OLLn са два позициона изомера

PLLn са два позициона изомера

PoOLn са два позициона изомера

4.5.6.1. TAG са само једном масном киселином (LLL и PoPoPo) Видјети једначину (7)

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

$$mol\ \%\ PoPoPo = \frac{1{,}015\ \% \times 1{,}263\ \% \times 1.015\ \%}{10000} = 0{,}00013\ mol\ PoPoPo$$

4.5.6.2. TAG са двије масне киселине (PoLL, SLnLn, PoPoL) Видјети једначину (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 са три различите масне киселине (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn)

Видјети једначину (9)

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

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

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

0,00762 mol PPoLn

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

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

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

0,43671 mol OLLn

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

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

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

0,06911 mol $PLLn$

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

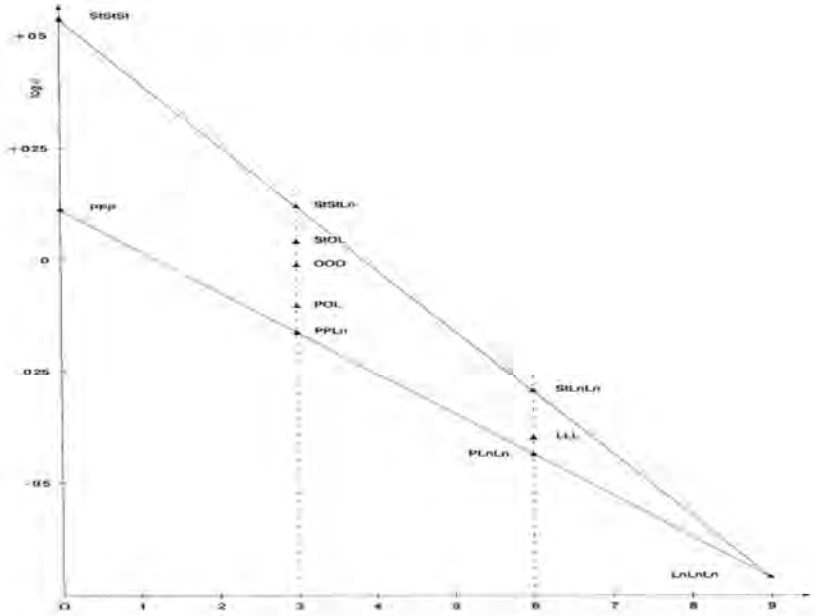
$$mol\ \%\ LnPoO = \frac{0{,}927\ \% \times 1{,}263\ \% \times 68{,}522\ \% \times 2}{10000} =$$ 0,01605

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

0,04815 mol PoOLN

ECN = 0,69540 mol TAG

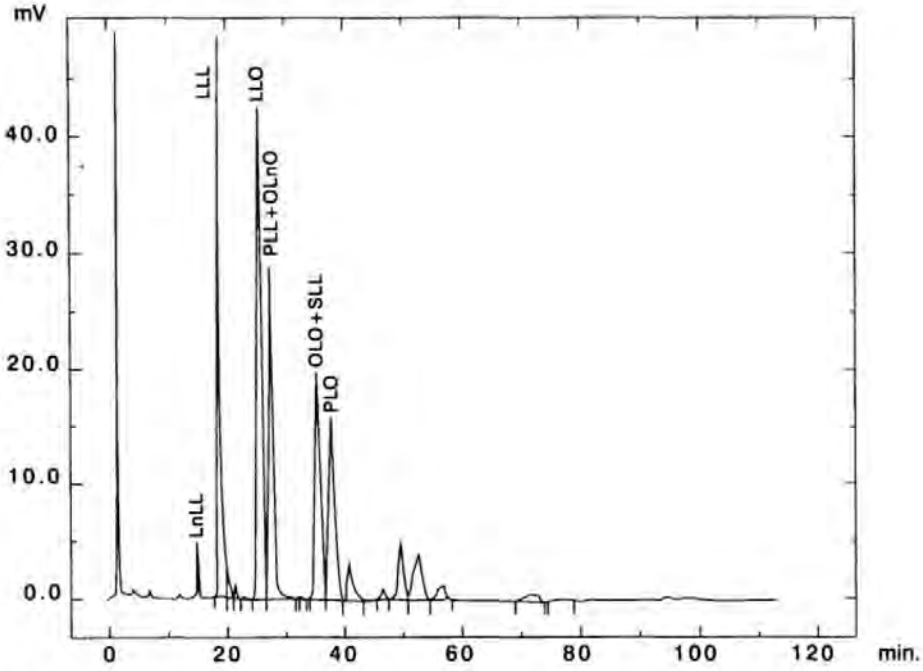
Слика 1: Граф зависности лог α од f (број двоструких веза)



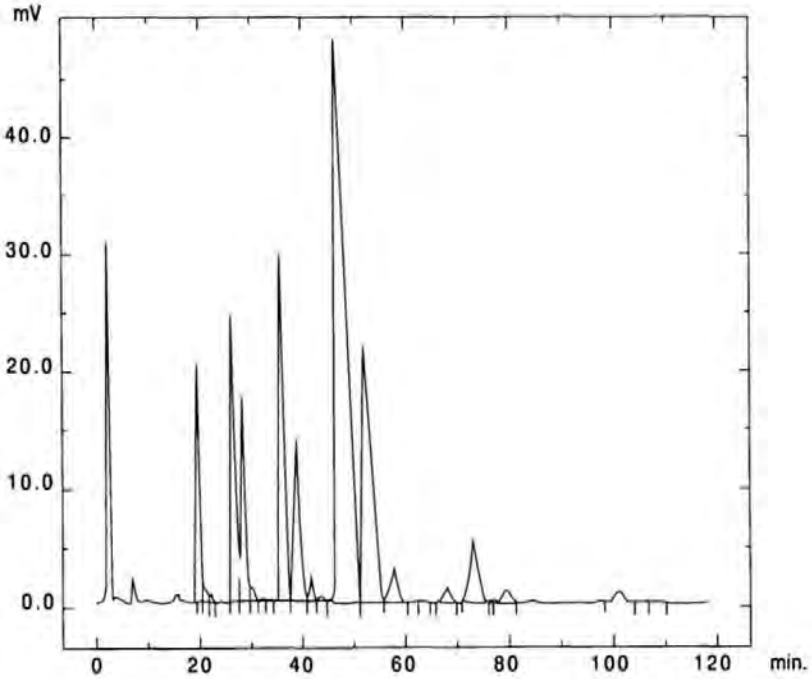
Број двоструких веза (н)

Напомена: La = лауринска киселина; My = миристинска киселина; P = палмитинска киселина; St = стеаринска киселина; O = олеинска киселина; L = линолна киселина; Ln = линоленска киселина

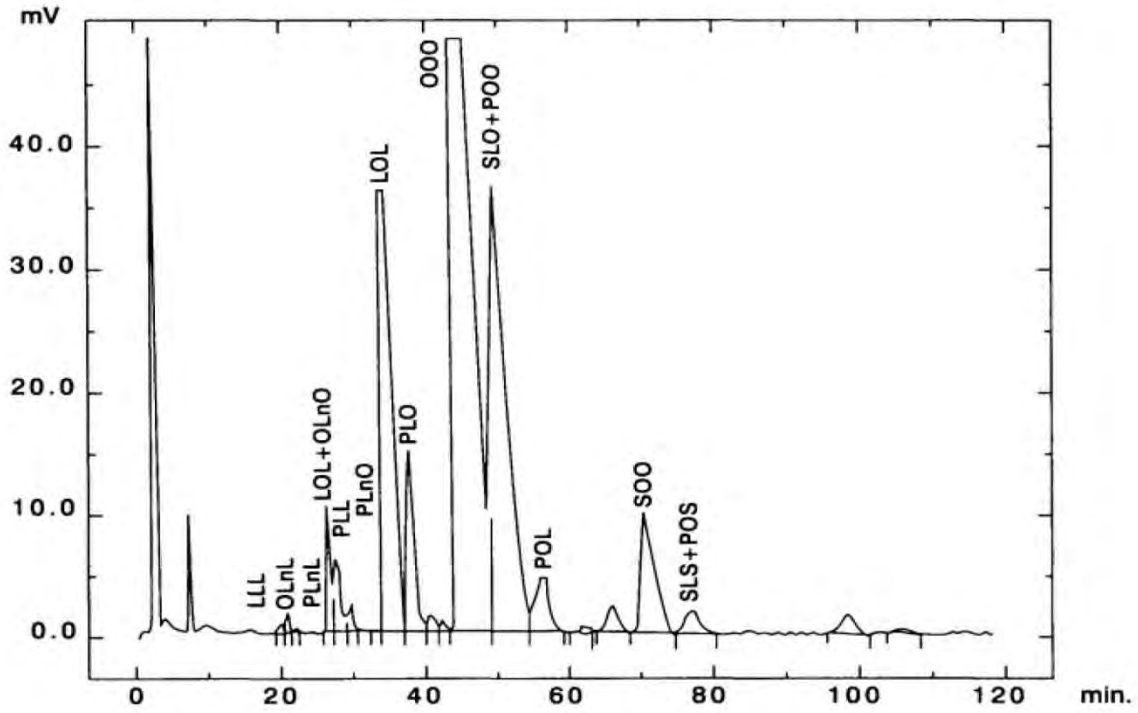
Слика 2: Сојино уље



Слика 3: Сојино уље/маслиново уље 30/70



Слика 4: Маслиново уље



АНЕКС XIV
ОДРЕЂИВАЊЕ УДЈЕЛА АЛИФАТСКИХ АЛКОХОЛА КАПИЛАРНОМ ГАСНОМ ХРОМАТОГРАФИЈОМ

1. ОБЛАСТ ПРИМЈЕНЕ

Овом методом се описује поступак одређивања удјела алифатских алкохола у уљима и мастима.

2. ПРИНЦИП МЕТОДЕ

Масна материја, са додатим 1-еикосанолом као интерним стандардом, сапонификује се етанолним раствором калијум-хидроксида, након чега се неосапуњива супстанца екстрахује етил етером. Алкохолна фракција се одјељује од неосапуњиве супстанце танкослојном хроматографијом на базичној силикагел плочи. Алкохоли задржани на силикагелу преводе се у у триметилсилил етере и анализирају капиларном гасном хроматографијом.

3. ОПРЕМА

3.1. Тиквица са заобљеним дном од 250 ml, са повратним хладилом са брушеним спојевима.

3.2. Лијевак за одјељивање од 500 ml.

3.3. Тиквице са заобљеним дном од 250 ml.

3.4. Стаклена када за развијање плоча за танкослојну хроматографију, за стаклене плоче димензија 20 x 20 cm.

3.5. Ултраљубичаста свјетиљка са таласним дужинама од 366 или 254 nm.

3.6. Микрошприце од 100 µl и 500 µl.

3.7. Цилиндрични лијевак за филтрирање са G3 порама филтера (порозност 15-40 µm), промјера приближно 2 cm и дубине приближно 5 cm, са наставком прикладним за вакуум филтрацију и прикључком 12/21 са спољашњим брушеним стаклом.

3.8. Боца сисаљка од 50 ml, са прикључком 12/21 са унутрашњим брушеним стаклом, прикладна за прикључак на лијевак за филтрирање (3.7).

3.9. Епрувета од 10 ml са конусним дном и непропусним чепом.

3.10. Гасни хроматограф са капиларном колоном и "split" системом раздвајања протока, који чине:

3.10.1. Термостатирана комора за колоне (пећ за колоне), са могућношћу одржавања жељене температуре уз тачност ± 1°C;

3.10.2. Јединица за инјектирање са могућношћу подешавања температуре, с елементом за испаравање од персиланизованог стакла;

3.10.3. Пламено-јонизациони детектор и мјерни претварач са појачалом;

3.10.4. Писач-интегратор који се може повезати са претварачем са појачалом (3.10.3), с временом одзива од највише једне секунде и промјењивом брзином папира.

3.11. Стаклена или силикатна капиларна колона дужине 20 до 30 m, унутрашњег промјера 0,25 до 0,32 mm, потпуно прекривена SE-52, SE-54 или другом еквивалентном течном стационарном фазом, равномјерне дебљине слоја између 0,10 и 0,30 µm.

3.12. Микролитарска шприца за гасну хроматографију од 10 µl, са чврсто фиксираном иглом.

3.13. Аналитичка вага осјетљивости 1 mg (са подјелом од 0,1 mg).

4. РЕАГЕНСИ

4.1. Калијум-хидроксид, приближно 2 mol/l етанолни раствор: 130 g калијум-хидроксида (минималне концентрације 85%) раствори се уз хлађење у 200 ml дестиловане воде и затим надопуни етанолом до једног литра. Раствор треба чувати у добро зачепљеној боци од млијечног стакла.

4.2. Етил етер, аналитичке чистоће.

4.3. Безводни натријум-сулфат, аналитичке чистоће.

4.4. Стаклене плоче са слојем силикагела, без индикатора флуоресценције, дебљине 0,25 ml (на тржишту су доступне плоче спремне за употребу).

4.5. Калијум-хидроксид, приближно 0,2 mol/l етанолни раствор: 13 g калијум-хидроксида раствори се у 20 ml дестиловане воде и затим надопуни етанолом до једног литра.

4.6. Бензен, за хроматографију (видјети 5.2.2).

4.7. Ацетон, за хроматографију (видјети 5.2.2).

4.8. Хексан, за хроматографију (видјети 5.2.2).

4.9. Етил етер, за хроматографију (видјети 5.2.2).

4.10. Хлороформ, за хроматографију.

4.11. Референтни раствор за танкослојну хроматографију: холестерол или фитостероли, 5%-тни раствор у хлороформу.

4.12. 0,2%-тни раствор 2’,7’-диклорфлуоресцеина у етанолу. Додаје јој се неколико капи 2 mol/l етанолног раствора калијум-хидроксида како би се добила базична реакција.

4.13. Безводни пиридин, за хроматографију.

4.14. Хексаметил дисилазан.

4.15. Триметилклоросилан.

4.16. Стандардни раствори триметилсилил етера алифатских алкохола од C_{20} до C_{28}. Могу се припремити из смјеса чистих алкохола, непосредно прије употребе.

4.17. 0,1%-тни (m/v) раствор 1-еикосанола у хлороформу (интерни стандард).

4.18. Гас носач: водоник или хелијум, хроматографске чистоће.

4.19. Помоћни гас: азот, хроматографске чистоће.

5. ПОСТУПАК

5.1. Припрема неосапуњивог

5.1.1. Помоћу микролитарске шприце од 500 µl у тиквицу округлог дна од 250 ml пренесе се онај волумен 0,1%-тног раствора 1-еикосанола у хлороформу (4.17), који садржи удио 1-еикосанола приближно једнак 10% удјелу алифатских алкохола у узорку који се узима за анализу. На примјер, за 5 g узорка маслиновог уља узима се 250 µl 0,1%-тног раствора 1-еикосанола, а за уље од комине маслина 1500 µl.

Упари се до сувог у струји азота и затим изваже тачно 5 g сувог филтрираног узорка у исту тиквицу.

5.1.2. Дода се 50 ml 2 mol/l етанолног раствора калијум-хидроксида, причврсти повратно хладило и загријава на парном купатилу до лаганог врења, уз стално мијешање током загријавања док не наступи сапонификација (раствор постаје бистар). Настави се са загријавањем током сљедећих 20 минута и затим кроз хладило дода 50 ml дестиловане воде. Хладило се затим одвоји и тиквица охлади на приближно 30°C.

5.1.3. Садржај тиквице квантитативно се пренесе у лијевак за одјељивање од 500 ml додајући дестиловану воду неколико пута, тако да се укупно дода приближно 50 ml дестиловане воде. Дода се приближно 80 ml етил етера, снажно тресе приближно 30 секунди и остави да се слегне (Напомена 1).

Одвоји се доња водена фаза, која се скупља у другом лијевку за одјељивање. На воденој фази на исти начин се спроведу даље двије екстракције, користећи сваки пут од 60 до 70 ml етил етера.

Напомена 1: Ако се створи емулзија, може се уклонити прскањем малим количинама етанола или метанола.

5.1.4. Екстракти у етил етеру сакупљају се у лијевку за одјељивање и испиру дестилованом водом (по 50 ml) до неутралне реакције воде од испирања.

Вода од испирања се одбаци, етерска фаза осуши безводним натријум-сулфатом и филтрира у претходно извагану тиквицу од 250 ml, уз испирање лијевка и филтера малим количинама етил етера које се додају укупном волумену.

5.1.5. Етер се дестилује до волумена од неколико ml те затим суши у лаганом вакууму или у струји азота, довршавајући сушење у пећи при 100°C приближно четврт сата те затим важе након хлађења у ексикатору.

5.2. Одјељивање алкохолних фракција

5.2.1. Припрема базичних плоча за танкослојну хроматографију: плоче са слојем силикагела (4.4) потпуно се урањају у раствор калијум-хидроксида, концентрације 0,2 mol/l (4.5) на 10 секунди те затим оставе да се суше два сата у дигестору и коначно ставе у пећ на 100°C један сат.

Изваде се из пећи и чувају у ексикатору са калцијум-хлоридом до употребе (плоче обрађене на овај начин морају се употријебити у року од 15 дана).

Напомена 2: Када се користе базичне плоче са силикагелом за одвајање алкохолне фракције, није потребно третирати неосапуњиве супстанце алуминијум-оксидом. На тај начин се све киселе компоненте (масне киселине и друге) задржавају на стартној линији, чиме се добијају траке алифатских алкохола и траке терпенских алкохола које су јасно одвојене од трака стерола.

5.2.2. У комору за развијање плоча стави се смјеса хексана и етил етера у омјеру 65/35 (v/v), до нивоа од приближно 1 cm [(1)].

Комора се затвори одговарајућим поклопцем и остави пола сата како би се успоставила равнотежа између паре и течности. На унутрашње плохе посуде могу се причврстити траке од филтер папира урођене у елуент, чиме се скраћује вријеме развијања за приближно једну трећину и постиже равномјерно елуирање компонената.

Напомена 3: Раствор за развијање мора се замијенити за сваку анализу како би се постигли поновљиви услови развијања.

5.2.3. Припреми се приближно 5%-тни раствор неосапуњивих супстанци (5.1.5) у хлороформу и, помоћу микролитарске шприце од 100 µl, нанесе 0,3 ml тог раствора у што тањој и равномјернијој линији, на TSK плочу приближно 2 cm од доњег руба TSK плоче. У равнини оригиналне мрље, нанесе се 2 до 3 µl референтног раствора алифатских алкохола (4.11) како би се могле идентификовати траке алифатских алкохола по завршетку развијања.

5.2.4. Плоча се смјести у комору за развијање припремљену како је описано у 5.2.2. Температуру околине треба одржавати између 15 и 20°C. Комора се одмах затвори поклопцем и остави да елуира док фронта раствора не достигне приближно 1 cm од горњег руба плоче.

Плоча се затим извади из коморе за развијање, а растварач испари у струји врућег ваздуха или се плоча остави неко вријеме у дигестору.

5.2.5. Плоча се лагано и равномјерно попрска раствором 2’,7’-диклорфлуоресцеина те посматра под ултраљубичастим свјетлом. Трака алифатских алкохола

може се идентификовати поређењем са мрљом добијеном од референтног раствора: рубови траке означе се црном оловком, означавајући заједно траку алифатских алкохола и траку терпенских алкохола непосредно изнад ње.

(1) У овим специфичним случајевима мора се користити елуент од мјешавине бензен/ацетон по обиму 95/5 како би се добиле изразито одвојене групе (подручја).

Напомена 4: Врпце Траке алифатских алкохола и терпенских алкохола узимају се заједно због могућих миграција неких алифатских алкохола у врпцу траку тритерпенских алкохола.

5.2.6. Помоћу металне шпатуле сагребе се силикагел из означеног подручја. Тако добијени фино уситњени материјал стави се у лијевак за филтрирање (3.7). Дода се 10 ml врућег хлороформа, пажљиво измијеша металном шпатулом и филтрира под вакуумом, скупљајући филтрат у боцу сисаљку (3.8) спојену на лијевак за филтрирање.

Остатак у боци испере се три пута етил етером (око 10 ml сваки пут), скупљајући филтрат у исту боцу спојену на лијевак. Филтрат се упари до волумена од 4 до 5 ml, преостали раствор се пренесе у претходно извагану епрувету од 10 ml (3.9), упари до сувог лаганим загријавањем у лаганој струји азота, дода неколико капи ацетона, поново упари до сувог, смјести у пећ на 105°C приближно 10 минута, остави да се охлади у ексикатору и важе.

Остатак у епрувети чини алкохолна фракција.

5.3. Припрема триметилсилил етера

Реагенс за силанизирање, који се састоји од смјесе пиридина, хексаметилдисилазана и триметилклоросилана у омјеру 9:3:1 (v/v/v) (Напомена 5), дода се у епрувету која садржи алкохолну фракцију у количини од 50 µl за сваки милиграм алифатских алкохола, избјегавајући апсорпцију влаге (Напомена 6).

Напомена 5: На тржишту су доступни раствори спремни за употребу. Такође су доступни други реагенси за силанизирање као што су нпр. бис-триметилсилилтрифлуорацетамид + 1% триметил хлоросилан, који се мора разриједити једнаким волуменом безводног пиридина.

Напомена 6: Лагано замућење које се може појавити нормално је и не узрокује сметње. Стварање бијелог флокулата или појава ружичасте боје упућују на присуство воде или нечисте реагенсе. У том случају, анализа се мора поновити.

5.3.2. Епрувета се зачепи, пажљиво протресе (без преокретања) док се алифатски алкохоли потпуно не раствори. Остави се да стоји најмање 15 минута на собној температури и затим центрифугира неколико минута. Бистри раствор спреман је за гаснохроматографску анализу.

5.4. Гаснохроматографска анализа

5.4.1. Прелиминарни поступци, пуњење колоне

5.4.1.1. Колона се учврсти у гасни хроматограф, прикључујући почетак колоне на инјектор са системом раздвајања, а крај колоне на детектор. Изврше се опште провјере плинског хроматографа (довод гаса, ефикасност детектора, ефикасност система раздвајања и писача итд.).

5.4.1.2. Ако се колона користи први пут, препоручује се њено кондиционирање. Лагани ток гаса се пропусти кроз капиларну колону, а затим укључи гасни хроматограф и започне поступно загријавање до температуре најмање 20°C више од радне температуре (видјети Напомену 7). Та се температура одржава најмање два сата, а затим се цијели уређај намјести на радне услове (подешавање протока гаса и раздвајања, паљење пламена, прикључивање на електронски рекордер, подешавање пећи за колону, температуре детектора и инјектора) и потом сними сигнал са осјетљивошћу најмање двоструко већом од оне која ће се користити за анализу. Базна линија мора бити линеарна, без било каквих пикова, и не смије имати отклон. Негативни отклон базне линије упућује на неисправно прикључену колону; позитивни отклон упућује на неправилно кондиционирање колоне.

Напомена 7: Температура кондиционирања мора бити најмање 20°C нижа од максималне температуре одређене за употријебљену стационарну фазу.

5.4.2. Избор радних услова

5.4.2.1. Оквирни радни услови су сљедећи:

- температура колоне: почетно 180°C осам минута, а затим се програмира на повећање од 5°C/мин до 260°C те коначно 15 минута при 260°C,
- температура испаривача: 280°C
- температура детектора: 290°C
- линеарна брзина гаса носача: хелијум 20 до 35 cm/s, водоник 30 до 50 cm/s,
- омјер раздвајања протока: 1:50 до 1:100,
- осјетљивост уређаја: од 4 до 16 пута већа од најмањег пригушења,
- осјетљивост снимања: од 1 до 2 mV пуне скале,
- брзина папира: од 30 до 60 cm/h,
- количина инјектиране супстанце: 0,5 до 1 µl TMSE раствора,

Горе наведени услови могу се модификовати према карактеристикама колоне и гасног хроматографа како би се добили хроматограми који испуњавају сљедеће услове:

- вријеме задржавања алкохола C26 треба да буде 18 ± 5 минута,
- пик алкохола C22 треба да буде 80 ± 20 % пуне вриједности скале за маслиново уље, односно 40 ± 20 % за уље из сјеменки.

5.4.2.2. Горе наведени захтјеви провјеравају се понављеним инјектирањем стандардне смјесе TMSE алкохола те се радни услови подешавају како би се постигли најбољи могући резултати.

5.4.2.3. Параметри интеграције пикова морају бити постављени тако да се омогући исправна оцјена површина пикова.

5.4.3. Поступак анализе

5.4.3.1. Помоћу микролитарске шприце од 10 µl увуче се 1 µl хексана, затим 0,5 µl ваздуха те потом од 0,5 до 1 µl раствора узорка. Притом се клип шприце повуче тако да се игла испразни. Игла се уведе кроз мембрану инјектора те се након 1-2 секунде брзо инјектира, а након приближно пет секунди игла лагано извуче.

5.4.3.2. Настави се са снимањем док се TMSE присутних алифатских алкохола у потпуности не елуира. Базна линија мора све вријеме испуњавати услове 5.4.1.2.

5.4.4. Идентификација пикова

Идентификација појединачних пикова врши се на основу времена задржавања и поређењем са стандардном смјесом TMSE анализираном у истим условима.

Хроматограм алкохолне фракције дјевичанског маслиновог уља приказан је на слици 1.

5.4.5. Квантитативна оцјена

5.4.5.1. Површине пикова 1-еикосанола и алифатских алкохола C_{22}, C_{24}, C_{26} и C_{28} рачунају се електронском интеграцијом.

5.4.5.2. Количина појединог алифатског алкохола, изражена у mg/1000 g масне материје, израчунава се на сљедећи начин:

$$\text{алкохол x} = \frac{A_x \times м_c \times 1000}{A_c \times м}$$

гдје је:
Ax = површина пика алкохола x
As= површина 1-еикосанола
m_s = маса 1-еикосанола у милиграмима
m = маса узорка у грамима

6. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

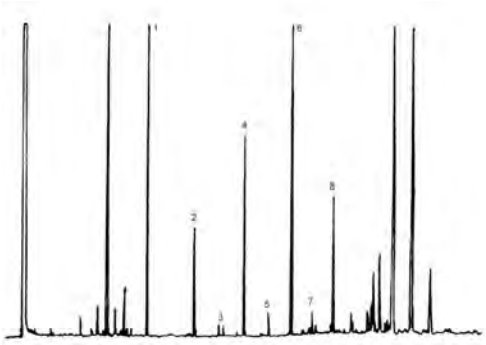
Изражава се податак о удјелу појединих алифатских алкохола у mg/1000 g масне материје. Њиховим сабирањем добијају се "укупни алифатски алкохоли".

ДОДАТАК

Одређивање линеарне брзине гаса

У гасни хроматограф подешен на нормалне радне услове инјектира се од 1 до 3 µl метана или пропана и помоћу запорног сата мјери вријеме потребно гасу да прође кроз колону од тренутка инјектирања до тренутка појаве пика (tM).

Линеарна брзина у cm/s дата је s L/tM, гдје је L дужина колоне у cm, а tM измјерено вријеме у секундама.



Слика 1 – Хроматограм алкохолне фракције дјевичанског уља
1= еикосанол
2 = декосанол
3 = трикосанол
4 = тетракосанол
5 = пентакосанол
6 = хексакосанол
7 = хептакосанол
8 = октакосанол

АНЕКС XV

МЕТОДА УТВРЂИВАЊА САДРЖАЈА ВОСКОВА, МЕТИЛ ЕСТЕРА МАСНИХ КИСЕЛИНА И ЕТИЛ ЕСТЕРА МАСНИХ КИСЕЛИНА ПОМОЋУ КАПИЛАРНЕ ГАСНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ

1. СВРХА

Ова метода служи за утврђивање садржаја воскова, метил естера масних киселина и етил естера масних киселина у разним врстама маслиновог уља. Поједини воскови и алкил естери су издвојени у складу са бројем атома угљеника. Метода се препоручује као алат за разликовање између маслиновог уља и уља комине маслина, те као параметар квалитета за екстра дјевичанско маслиново уље који омогућава откривање неовлашћеног мијешања екстра дјевичанског маслиновог уља с уљима нижег квалитета било да се ради о дјевичанском уљу, уљу лампанте или дезодорираним уљима.

2. ПОСТУПАК

Додавање одговарајућих интерних стандарда уљу те фракционирање помоћу хроматографије на колони хидрираног силикагела. Опоравак фракције излучене у тестним условима (са нижим поларитетом од поларитета триацилглицерола) и директна анализа помоћу капиларне гасне хроматографије.

3. АПАРАТУРА

3.1. Ерленмејерова тиквица, 25 ml

3.2. Саклена колона за течну хроматографију, унутрашњег промјера 15 mm, дужине 30 - 40 cm, опскрбљена одговарајућом славином.

3.3. Гасни хроматограф погодан за употребу са капиларном колоном, опремљен системом за директно уштрцавање на колону.

3.3.1. Термостатски конролисана пећ са температурним програмирањем

3.3.2. Хладни инјектор са директним уштрцавањем на колону

3.3.3. Детектор јонизације пламена и претварач-појачивач

3.3.4. Писач-интегратор (Напомена 1) за употребу са претварачем-појачивачем (тачка 3.3.3) са временом одговора не дужим од 1 секунде и варијабилном брзином папира.

Напомена: Компјутеризовани системи се такође могу користити тамо гдје су подаци гасне хроматографије унесени помоћу рачунара.

3.3.5. Капиларна колона, сраштени силицијум (за анализу воскова и метил и етил естера) дужине 8 – 12 m, унутрашњег промјера 0.25 – 0.32 mm, интерно пресвучен течном фазом (Напомена 2) до униформне дебљине 0.10 – 0.30 µm.

Напомена 2: Одговарајуће комерцијалне течне фазе су доступне за ове сврхе, попут SE_{52}, SE_{54} ирд.

3.4. Микрошприца 10 µl, са чврстом иглом, за директно уштрцавање на колону.

3.5. Електровибратор

3.6. Ротациони евапоратор

3.7. Омотана пећ

3.8. Аналитичка вага за вагање до тачности од ± 0.1 mg.

3.9. Стандардни лабораторијски стаклени предмети

4. РЕАГЕНСИ

4.1. Силикагел, 60 – 200 µm мрежа. Поставите силикагел у омотану пећ на 500 °C најмање четири сата. Пустите да се охлади па додајте 2% воде у односу на употријебљену количину силикагела. Добро протресите како би се емулзија хомогенизовала те држите у ексикатору најмање 12 сати прије употребе

4.2. н-хексан, хроматорграфског разреда или разреда остатка (чистоћа се мора провјерити).

УПОЗОРЕЊЕ: Дим се може запалити. Држите се подаље од топлоте, искри и пламена. Побринте се да су боце увијек затворене. Обезбиједите одговарајућу вентилацију током употребе. Избјегавајте наслаге дима те уклоните све могуће ризике од ватре, као што су гријалице или електричне апарате који нису произведени од незапаљивог материјала. Ако се удахне, дим може бити погубан, јер може оштетити живчане станице. Избјегавајте удисање дима. Користите одговарајућу респираторну апаратуру ако је потребно. Избјегавајте контакт са кожом и очима.

4.3. Етил етер, хроматографског разреда

УПОЗОРЕЊЕ: Јако запаљиво и умјерено отровно. Иритира кожу. Погубно ако се удахне. Може оштетити очи. Може доћи до закашњелих учинака. Може формирати експлозивне пероксиде. Дим се може запалити. Држите се подаље од топлоте, искри и пламена. Побрините се да су боце увијек затворене. Обезбиједите одговарајућу вентилацију током употребе. Избјегавајте наслаге дима те уклоните све могуће ризике од ватре, као што су гријалице или електричне апарате који нису произведени од незапаљивог материјала. Не евапорирајте до сувоће. Додавање воде или одговарајућег реагенса редуковања може редуковати формирање пероксида. Немојте пити. Избјегавајте удисање дима. Избјегавајте дужи или понављани контакт са кожом.

4.4. н-хептан, хроматографског разреда или изо-октан

УПОЗОРЕЊЕ: Запаљиво. Погубно ако се удахне. Држите се подаље од топлоте, искри и пламена. Побрините се да су боце увијек затворене. Обезбиједите одговарајућу вентилацију током употребе. Избјегавајте удисање дима. Избјегавајте дужи или понављани контакт са кожом.

4.5. Стандардни раствор лаурил – арахидат (Напомена 3) на 0.05 % (m/V) у хептану (интерни стандард за воскове).

Напомена 3: Могу се користити и палмитил палмитат, миристил стеарат и арахидат лауреат.

4.6. Стандардни раствор метил хептадеканоат на 0.02 % (m/V) у хептану (интерни стандард за метил и етил естере)

4.7. Судан 1 (1-фенилазо-2-нафтол)

4.8. Гас носач: водоник или хелијум, чисти гас хроматографског разреда.

УПОЗОРЕЊЕ:

Водоник. Под притиском јако запаљив. Држите се подаље од топлоте, искри и пламена, те уклоните све могуће ризике од ватре, као што су гријалице или електрични апарати који нису произведени од незапаљивог материјала. Побрините се да су боце увијек затворене, ако се не користе. Прије отварања вентила боце, отпустите напетост еластичног подешивача. Немојте стајати испред отвора боце приликом отварања вентила. Обезбиједите одговарајућу вентилацију током употребе. Немојте премјештати водоник из једне у другу боцу. Не мијешајте гас у боци. Обезбиједите да се боце не могу преврнути. Држите их подаље од сунчеве свјетлости и извора топлоте. Складиштите у некорзивном окружењу. Немојте користити оштећене или неозначене боце.

Хелијум. Компримиран гас под високим притиском. Смањује доступну количину кисеоника. Боцу држите затвореном. Обезбиједите одговарајућу вентилацију током употребе. Увијек користите са смањивачем притиска. Прије отварања вентила боце, отпустите напетост еластичног подешивача. Не премјештајте гас из једне боце у другу. Обезбиједите да се боцу не могу преврнути. Немојте стајати испред отвора боце приликом отварања вентила. Држите их подаље од сунчеве свјетлости и извора топлоте. Складиштите у некорзивном окружењу. Немојте користити оштећене или неозначене боце. Не удишите. Користите само за техничке сврхе.

4.9. Помоћни гасови:

- Водоник, чисти гас хроматографског разреда
- Ваздух, чисти гас хроматографског разреда

УПОЗОРЕЊЕ:

Ваздух. Компримиран гас под високим притиском. Опрезно рукујте у присуству запаљивих супстанци, јер је температура самозапаљивости већине органских материја у ваздуху значајно нижа под притиском. Побрините се да је вентил боце затворен када се боца не користи. Увијек користите са смањивачем притиска. Прије отварања вентила боце, отпустите напетост еластичног подешивача. Немојте стајати испред отвора боце приликом отварања вентила. Не премјештајте гас из једне боце у другу. Немојте мијешати гас у боци. Обезбиједите да се боце не могу преврнути. Држите их подаље од сунчеве свјетлости и извора топлоте. Складиштите у некорзивном окружењу. Немојте користити оштећене или неозначене боце. Ваздух намијењен за техничке сврхе не смије се користити за удисање или за респиративне апарате.

5. ПОСТУПАК

5.1. Припрема хроматографске колоне

Растворите 15 g силика гела (тачка 4.1) у н-хексану (тачка 4.2) и унесите у колону (3.2). Оставите да се исталожи. Довршите таложење помоћу електровибратора да се добије уједначенији хроматографски слој. Пропустите 30 ml н-хексана да се уклоне све нечистоће. На ваги одвагати тачно 500 mg узорка у тиквицу запремине 25 ml, додати одговарајући удио интерног стандарда (тачка 4.5) према претпостављеном удјелу воска. На примјер, за маслиново уље додати 0.1 mg лаурил арахидата, а за уље комине маслине 0.25 до 0.5 mg.

Припремљени узорак пренијети у хроматографску колону помоћу два пута по 2 ml н-хексана (4.2).

Раствор испуштати док не стигне 1 mm изнад горње границе апсорбента. Потом започети хроматографско елуирање док се не скупи 180 ml мјешавине н-хексана/етил етера (омјер 99:1 v/v) при брзини протока од око 15 капи сваких 10 секунди (Ова фракција садржи метил и етил естере и воскове). (Напомена 4 и 5).

Напомена 4: Мјешавина н-хексана/етил етера (99:1) мора се припремити свакодневно.

Напомена 5: За визуалну провјеру исправног елуирања воскова, узорку у раствору може се додати 100 µm 1% раствора судана у мјешавини н-хексана/етил етера.

С обзиром да бојило има ретенцију између воскова и триглицерида, када бојење достигне дно колоне елуирање треба обуставити, јер су сви воскови елуирали.

Тако добијену фракцију осушити у ротационом евапоратору, док се готово сав раствор не уклони. Преостала 2 ml растварача треба одстранити помоћу слабе струје азота, те додати 2-4 ml н-хептана или изо-октана.

5.2. Анализа гасном хроматрографијом

5.2.1. Припремни поступак

Поставити колону на гасни хроматограф (3.3) повезивањем улазног отвора на систем непосредно на колону и излазног отвора на детектор. Обавити провјеру гасног хроматографа (проток гаса, рад детектора, рад писача итд.).

Ако се колона користи први пут, потребно је прво кондиционирати. Пустите да кроз колону прође мало гаса, затим укључите гасни хроматограф. Постепено загријавати тако да се за четири сата постигне температура од 350°C. Одржавати температуру најмање два сата, а затим уређај подесити на радне услове (поставити проток гаса, запалити пламен, повезати на електронски писач (тачка 3.3.4), поставити температуру коморе за колону, регулисати детектор итд.) и забиљежити сигнал при осјетљивости која је најмање двострука од оне коју захтијева анализа. Базна линија мора бити линеарна, без пикова и одступања.

Негативно одступање указује да колона није исправно спојена, док позитивно одступање указује да колона није довољно кондиционирана.

5.2.2. Избор радних услова за воскове и метил и етил естере (Напомена 6).

Општи радни услови су сљедећи:

- Температура колоне:

20°C /мин 5°C /мин

Почетно 80 °C (1мин) ---------- 140°C ---------- 335°C (20)

- Температура детектора: 350°C
- Количина инјектираног узорка: 1 µl раствора н-хектана (2-4 ml)
- Гас носач: хелијум или водоник при оптималној линеарној брзини за одабрани гас (види Додатак А)

- Осјетљивост инструмената: погодно испуњавање горе набројаних услова.

Напомена 6: Због високе коначне температуре, дозвољено је позитивно одступање од највише 10% пуне скале.

Ови услови се могу промијенити према карактеристикама колоне и гасног хроматографа како би се постигло раздвајање свих воскова и задовољавајуће раздвајање гасова (види тачке 2,3 и 4). Вријеме задржавања интерног стандарда C_{32} мора бити 18 ± 3 минуте. Главни пик који припада восковима мора достизати најмање 60% пуне скале.

5.3. Спровођење анализе

Микрошприцом од µl узети 1µl раствора. Повући клип шприце тако да игла буде празна. Ставити иглу у инјектор и након 1-2 секунде брзо убризгати. Након пет секунди полагано извући иглу.

Регистровати хроматограф док воскови потпуно не елуирају.

Базна линија мора стално задовољавати тражене услове.

5.4. Идентификација пикова

Идентификација појединачних пикова мора се заснивати на времену задржавања, поређењем с временима задржавања познатих мјешавина воскова анализираних под истим условима. Алкил естери су идентификовани из смјесе метил и етил естера главних масних киселина у маслиновом уљу (палминска и олеинска).

Слика 1 приказује хроматограф воскова у дјевичанском маслиновом уљу. Слике 2 и 3 приказују хроматограф два малопродајна екстра дјевичанска малинова уља, једно са метил и етил естерима, а друго без њих. Слика 4 приказује хроматограф екстра дјевичанског маслиновог уља највеће квалитете те исто уље попрскано са 20% дезодорираног уља.

5.5. Квантитативна анализа воскова

Израчунајте подручја пикова лаурил арахидата интерног стандарда и алифатских естера из C_{40} до C_{46} помоћу интегратора.

Израчунајте укупни садржај воскова додавањем сваког појединог воска у mg/kg уља, користећи израз:

Воскови, $$mg/kg = \frac{(\Sigma A_x) \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

гдје је:

Ax = површина пика појединог естера у квадратним милиметрима

As = површина пика лаурил арахидата и интерног стандарда у квадратним милиметрима

ms = маса додатног лаурил арахидата и интерног стандарда у милиграмима

m = маса узорка за анализу у грамима

5.5.1. Квантитативна анализа метил и етил естера

Помоћу интегратора, израчунајте подручја пикова метил хептадеканоата интерног стандарда, метил естере C_{16} и C_{18} масних киселина, те етил естере C_{16} и C_{18} масних киселина.

Израчунајте садржај сваког алкил естера у mg/kg уља користећи израз:

Естер $$mg/kg = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

гдје је:

Ax = површина пика појединих C_{16} и C_{18} естера у квадратним милиметрима

As = површина пика метил хептадеканоата интерног стандарда у квадратним милиметрима

ms = маса метил хептадеканоата интерног стандарда у милиграмима

m = маса узорка за анализу у грамима

6. ИЗРАЖАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

Укупан удио различитих воскова од C_{40} до C_{46} (*Напомена 7*) изражава се у милиграмима по килограму уља.

Изразите укупан удио метил естера и етил естера од C_{16} до C_{18} и суму оба.

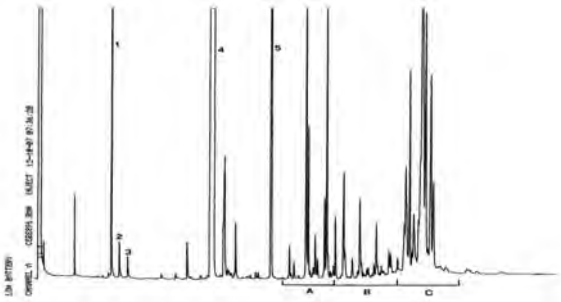
Резултати се изражавају најближе до mg/kg.

Напомена 7: Компоненте које треба квантификовати односе се на пикове у парним бројевима угљеника између алифатских естера C_{40} и C_{60}. Као примјер може се користити хроматограм воскова приказан на доњој слици. Ако се C_{46} појави два пута, препоручује се да се за његову идентификацију анализира фракција воскова уља комине маслине гдје је пик C_{46} једноставно идентификовати јер је очигледно највећи.

Изразите омјер етил естера и метил естера.

Слика 1

Примјер гасног хроматограма фракције воскова маслиновог уља (*)



Пикови с временом задржавања од 5 до 8 минута масних киселина метил и етил естера

Легенда:

IS = лаурил арахидат

1 = дитерпетски естер

2 + 2' = естери C_{40}

3 + 3' = естери C_{42}

4 + 4' = естери C_{44}

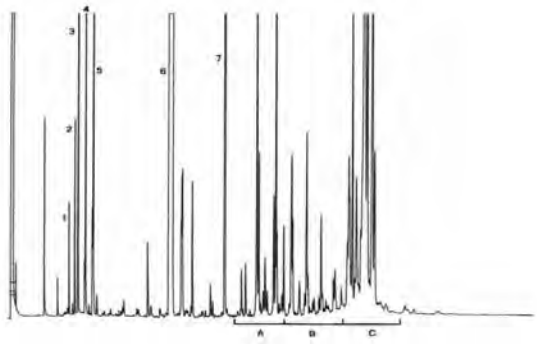
5 = естери C_{46}

6 = стеролни естери и тритерпенски алкохол

(*) = након елуирања стеролних естера хроматограм не смије показивати сигнификантне пикове (триглицериди)

Слика 2

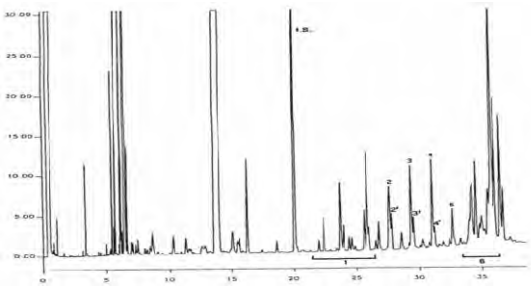
Метил естери, етил естери и воскови у дјевичанском маслиновом уљу



Легенда:
1 – метил C_{16}
2 – етил C_{16}
3 – метил хептадеканоат IS
4 – метил C_{18}
5 – етил C_{18}
6 – *squalen*
7 – лаурил арахидат
А - дитерпетски естер
Б – воскови
Ц - стеролни естери и тритерпенски естери

Слика 3

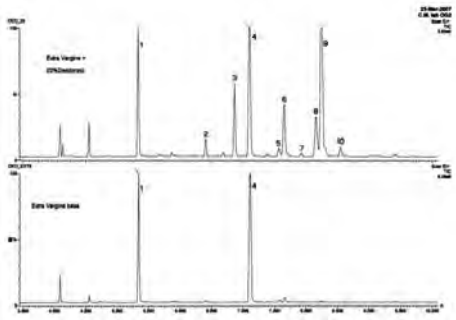
Метил естери, етил естери и воскови у екстра дјевичанском маслиновом уљу



Ознаке:
1. Метил хептадеканоат I.S.
2. Метил C_{18}
3. Етил C_{18}
4. Сквален
5. Лаурил арахидрат I.S.
А. Дитерпенични естри
В. Воскови
С. Естри стерола и тритерпенични естри

Слика 4.

Дио хроматограма екстра дјевичанског маслиновог уља и истог уља којем је додато базмирисно уље



Легенда:
1 – метил миристат IS
2 – метил палмитат
3 – етил палмитат
4 – метил хептадеканоат IS
5 - метил лимолеат
6 - метил олеат
7 – метил стеарат
8 – етил линолеат
9 – етил олеат
10 – етил стеарат

Додатак А

Одређивање линеарне брзине гаса

У гасни кроматрограф подешен на нормалне радне услове инјектира се 1 до 3 µl метана (или пропана) и мјери вријеме потребно гасу да прође кроз колону од тренутка инјектирања до тренутка појаве пика (tM).

Линеарна брзина у cm/c дана је с L/tM, гдје је L дужина колоне у cm, а tM измјерено вријеме у секундама.