

MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, RIBARSTVA I RURALNOG RAZVOJA

173

Na temelju članka 94. stavka 2. i članka 95. stavka 3. Zakona o hrani (»Narodne novine« br. 46/07), ministar poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja donosi

PRAVILNIK

O ULJIMA OD PLODA I KOMINE MASLINA [\[1\]](#)

I. OPĆE ODREDBE

Članak 1.

Ovim se Pravilnikom uređuju opći zahtjevi kakvoće ulja od ploda i komine maslina (u daljnjem tekstu: ulja) koja se stavljaju na tržište radi prodaje krajnjem potrošaču, a odnose se na:

- kategorizaciju, nazivlje i definicije ulja;
- tehnološke postupke koji se primjenjuju u proizvodnji i preradi ulja;
- ambalažu i uvjete pakiranja te dodatne ili specifične podatke koji trebaju biti navedeni kod označavanja ulja;
- fizikalno-kemijska i senzorska svojstva;
- fizikalno-kemijska i senzorska svojstva sirovina, vrstu i količinu sirovina, dodataka i drugih tvari koje se koriste u proizvodnji i preradi;
- metode uzorkovanja i metode analiza fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava ulja;
- uvjete odobravanja objekata za pakiranje ekstra djevičanskih i djevičanskih maslinovih ulja čiji su nazivi registrirani kao oznake izvornosti ili zemljopisnog podrijetla (u daljnjem tekstu: maslinova ulja s registriranom oznakom);
- uvjete i način upisa i brisanja te oblik i sadržaj Upisnika odobrenih objekata za pakiranje maslinovih ulja s registriranom oznakom.

II. POSEBNE ODREDBE

1. STAVLJANJE NA TRŽIŠTE

Kategorije, nazivi i definicije

Članak 2.

(1) Ulja se razvrstavaju u kategorije pod sljedećim nazivima:

1. *Djevičanska maslinova ulja*

a) *Ekstra djevičansko maslinovo ulje* je ulje dobiveno izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima, koje sadrži najviše 0,8 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja i čija svojstva odgovaraju onima navedenim u točki 1. Priloga I ovoga Pravilnika;

b) *Djevičansko maslinovo ulje* je ulje dobiveno izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima, koje sadrži najviše 2 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja i čija svojstva odgovaraju onima navedenim u točki 2. Priloga I ovoga Pravilnika;

c) *Maslinovo ulje lampante* je djevičansko maslinovo ulje neprihvatljivih senzorskih svojstava, koje sadrži više od 2 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja i čija svojstva odgovaraju onima navedenim u točki 3. Priloga I ovoga Pravilnika;

2. *Rafinirano maslinovo ulje* je ulje dobiveno rafinacijom djevičanskog maslinovog ulja, koje ne sadrži više od 0,3 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja i čija svojstva odgovaraju onima navedenim u točki 4. Priloga I ovoga Pravilnika;

3. *Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja* je ulje dobiveno miješanjem rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja osim maslinovog ulja lampante, koji ne sadrži više od 1 grama slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska kiselina na 100 grama ulja i čija svojstva odgovaraju onima navedenim u točki 5. Priloga I ovoga Pravilnika;

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

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

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

(2) Na tržište se radi prodaje krajnjem potrošaču mogu stavljati samo ulja iz stavka 1. točke 1. podtočke a) i b), točke 3. i točke 6. ovoga članka.

(3) Ulja iz stavka 2. ovoga članka mogu se stavljati na tržište radi prodaje krajnjem potrošaču, u neizmijenjenom stanju ili kao sastojak druge hrane.

Tehnološki postupci koji se primjenjuju u proizvodnji

Članak 3.

(1) Ulja iz članka 2. ovoga Pravilnika dobivaju se izravno od ploda masline (*Olea europea L.*) i/ili krutog ostatka (komine) koji ostaje nakon dobivanja ulja izravno iz ploda masline.

(2) Za proizvodnju ekstra djevičanskog maslinovog ulja i djevičanskog maslinovog ulja koriste se plodovi stabla masline (*Olea europea L.*) koji se podvrgavaju isključivo mehaničkim ili drugim fizikalnim postupcima, u uvjetima koji ne dovode do promjena sastojaka ulja te bez dodataka pomoćnih sredstava kemijskog ili biokemijskog djelovanja. Ekstra djevičansko maslinovo ulje i djevičansko maslinovo ulje može se podvrgnuti isključivo postupcima pranja, centrifugiranja, dekantacije i/ili filtracije.

(3) Za proizvodnju maslinovog ulja sastavljenog od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja koristi se ulje dobiveno rafinacijom djevičanskih maslinovih ulja i ekstra djevičanska i djevičanska maslinova ulja.

(4) Za proizvodnju ulja iz stavaka 2. i 3. ovoga članka nije dozvoljeno korištenje ulja dobivenih upotrebom organskih otapala, reesterifikacijom i miješanjem s uljima druge vrste.

(5) Za proizvodnju ulja komine maslina koristi se rafinirano ulje komine maslina te ekstra djevičansko maslinovo ulje i djevičansko maslinovo ulje.

(6) Za proizvodnju ulja iz stavka 5. ovoga članka nije dozvoljeno korištenje ulja dobivenih postupkom reesterifikacije i miješanjem s uljima druge vrste.

Pakiranje i ambalaža

Članak 4.

(1) Ulja iz članka 2. stavka 2. ovoga Pravilnika stavljaju se na tržište radi prodaje krajnjem potrošaču kao pretpakovine čiji je najveći obujam 5 litara.

(2) Iznimno od odredbi stavka 1. ovoga članka, ulja namijenjena opskrbi ugostiteljskih objekata, kantina, bolnica, dječjih vrtića, škola, ustanova socijalne skrbi i drugih subjekata u poslovanju s hranom koji opskrbljuju krajnjeg potrošača s pripremljenom hranom, mogu se pakirati u ambalažu čiji je obujam veći od pet litara.

(3) Ambalaža u koju se pakiraju ulja iz stavka 1. ovoga članka mora imati zatvarač koji se nakon prvog otvaranja ne može dovesti u prvobitno stanje.

Označavanje

Članak 5.

Kod označavanja, reklamiranja i prezentiranja ulja, primjenjuju se odredbe Pravilnika o označavanju, reklamiranju i prezentiranju hrane [\[2\]](#) («Narodne novine» br. 41/08) te odredbe ovoga Pravilnika koje se odnose na označavanje.

Obvezni navodi pri označavanju

Članak 6.

Osim naziva iz članka 2. stavka 2. ovoga Pravilnika pri označavanju ulja jasnim i neizbrisivim slovima moraju biti navedene i sljedeće informacije o kategoriji ulja:

– za ekstra djevičansko maslinovo ulje:

»ulje visoke kakvoće dobiveno izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima«;

– za djevičansko maslinovo ulje:

»ulje dobiveno izravno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima«;

– za maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja:

»ulje dobiveno miješanjem rafiniranog maslinovog ulja i (ekstra) djevičanskog maslinovog ulja«;

– za ulje komine maslina:

»ulje dobiveno miješanjem rafiniranog ulja komine masline i djevičanskog maslinovog ulja« ili

»ulje koje se sastoji isključivo od ulja dobivenog obradom komine maslina i ulja dobivenog izravno iz ploda masline«.

Navodi koji nisu obvezni pri označavanju

Članak 7.

(1) Za ulja iz članka 2. stavka 2. ovoga Pravilnika, pri označavanju se mogu navesti i:

1. podaci o senzorskim svojstvima, samo ako se temelje na rezultatima provedenih analitičkih metoda propisanih u prilogima ovoga Pravilnika.

2. podaci o udjelu slobodnih masnih kiselina ili maksimalnom udjelu slobodnih masnih kiselina uz obavezno navođenje vrijednosti peroksidnog broja, udjela voskova, vrijednosti K232, K270 i ΔK utvrđenih metodama koje su propisane u Prilogima uz ovaj Pravilnik, znakovima iste veličine, u istom vidnom polju;

(2) Navod »prvo hladno prešanje« može se navesti samo za djevičansko ili ekstra djevičansko maslinovo ulje dobiveno pri temperaturi prerade nižoj od 27°C prvim mehaničkim prešanjem maslinovog tijesta hidrauličnom prešom.

(3) Navod »hladni postupak« može se navesti samo za djevičansko ili ekstra djevičansko maslinovo ulje dobiveno pri temperaturi prerade nižoj od 27°C procjeđivanjem ili centrifugiranjem maslinovog tijesta.

Ulja od ploda i komine maslina u mješavinama biljnih ulja ili kao sastojci u drugoj hrani

Članak 8.

(1) Ako se prisutnost ulja iz članka 2. stavka 2. u mješavini s drugim biljnim uljima, pri označavanju naglašava riječima, slikama ili crtežima, na drugom mjestu osim u popisu sastojaka, takva mješavina mora nositi naziv »mješavina biljnih ulja (ili određeni naziv biljnih ulja prema vrsti sirovine) i maslinovog ulja« iza čega neposredno slijedi postotni udio maslinovih ulja u mješavini.

(2) Pri označavanju mješavine iz stavka 1. ovoga članka prisutnost maslinovog ulja može biti naglašena slikama ili crtežima samo ako čine više od 50% mješavine o kojoj se radi.

(3) Ako su maslinova ulja sastojak hrane, a pri označavanju te hrane se osim u popisu sastojaka njihova prisutnost naglašava riječima, slikom ili crtežom, onda neposredno uz naziv hrane mora biti navedena količina izražena u postotku (%) na ukupnu neto masu hrane.

(4) Postotak (%) dodanih maslinovih ulja u odnosu na ukupnu neto masu hrane može se zamijeniti postotkom na ukupnu masu masnoće, uz dodavanje riječi postotak masnoće.

(5) Ako se pri označavanju mješavine ulja ili pri označavanju druge hrane naglašava prisutnost ulja komine maslina iz članka 2. stavak 1. točka 6. ovoga Pravilnika, primjenjuju se stavci 1., 2., 3., i 4. ovoga članka pri čemu se riječi »maslinova ulja« zamjenjuju riječima »ulje komine maslina«.

Označavanje podrijetla

Članak 9.

(1) Za ekstra djevičansko i djevičansko maslinovo ulje iz članka 2. stavka 1. točke 1. podtočke a) i b) ovoga Pravilnika, može se označavati podrijetlo uz uvjete propisane u stavcima 3., 4., 5. i 6. ovoga članka.

(2) Označavanje podrijetla u smislu ovoga Pravilnika podrazumijeva upućivanje na zemljopisno područje označeno na proizvodu.

(3) Označavanje regionalnog podrijetla dozvoljeno je samo za maslinova ulja s registriranom oznakom, sukladno Zakonu o oznakama izvornosti i oznakama zemljopisnog podrijetla i oznakama tradicionalnog ugleda poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda (»Narodne novine« br. 84/08)[3].

(4) U drugim slučajevima označavanje podrijetla sastoji se od upućivanja na zemlju u kojoj je ulje proizvedeno.

(5) Označavanje podrijetla koje upućuje na zemlju podrijetla mora odgovarati zemljopisnom području u kojem su masline ubrane i u kojem se nalazi objekt u kojem su te masline prerađene u ulje.

(6) Ako su masline ubrane u jednoj, a njihova prerada u svrhu dobivanja ulja obavljena u drugoj zemlji, označavanje podrijetla treba sadržavati sljedeći tekst: »(ekstra) djevičansko maslinovo ulje dobiveno u (slijedi naziv zemlje o kojoj se radi) od maslina ubranih u (slijedi naziv zemlje o kojoj se radi)«.

(7) U slučaju miješanja ulja različitog podrijetla unutar iste kategorije, ekstra djevičanskog ili djevičanskog maslinovog ulja, ako 75% ili više tog ulja potječe iz jedne zemlje, kao podrijetlo može se navesti dotična zemlja, uz naznaku minimalnog udjela (75% ili više) tog ulja u mješavini.

Proizvođačka dokumentacija

Članak 10.

(1) Subjekt u poslovanju s hranom, odnosno proizvođač ili onaj koji ulja iz članka 2. stavka 2. ovoga Pravilnika, pakira ili stavlja na tržište, dužan je u slučaju zahtjeva dati na uvid nadležnom tijelu ili osobi ovlaštenoj za službenu kontrolu proizvođačku dokumentaciju.

(2) Proizvođačka dokumentacija je dokument koji, za svaku seriju proizvoda koji se stavlja na tržište sadrži:

1. podatke koji su označeni na proizvodu;
2. podatke o proizvedenim količinama gotovog proizvoda;
3. podatke o vrsti, količini i podrijetlu korištenih sirovina, pomoćnih sredstava te vrsti ambalaže;
4. kratak opis tehnološkog postupka proizvodnje;
5. za proizvode s navodima iz članka 7. stavka 1. točke 2. ovoga Pravilnika, izvješća o provedenim analizama;
6. za proizvode s navodima iz članka 7. stavka 2. i 3. ovoga Pravilnika, zapise ili dokumentaciju kojom se dokazuju uvjeti i način prerade;
7. za proizvode s navodima iz članka 9. stavka 3. ovoga Pravilnika, dokaze o registraciji oznaka izvornosti i oznaka zemljopisnog podrijetla.
8. za proizvode s navodima iz članka 9. stavaka 4., 5., 6. i 7. ovoga Pravilnika, dokumentaciju kojom se dokazuje podrijetlo plodova i/ili mjesto prerade maslina ili podrijetlo ekstra djevičanskog odnosno djevičanskog maslinovog ulja;

2. ANALIZE FIZIKALNO-KEMIJSKIH I SENZORSKIH SVOJSTAVA

Utvrđivanje sukladnosti

Članak 11.

Za utvrđivanje sukladnosti fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava ulja iz članka 2. ovoga Pravilnika s propisanim zahtjevima kakvoće koriste se metode uzorkovanja i analize koje se nalaze u prilogima uz ovaj Pravilnik.

Metode uzorkovanja i analiza fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava

Članak 12.

Svojstva ulja iz članka 2. ovoga Pravilnika, navedena u Prilogu I. ovoga Pravilnika, određuju se sljedećim analitičkim metodama:

- za određivanje udjela slobodnih masnih kiselina izraženih kao udio oleinske kiseline, metoda opisana u Prilogu II. ovoga Pravilnika,
- za određivanje peroksidnog broja, metoda opisana u Prilogu III. ovoga Pravilnika,
- za određivanje udjela voskova, metoda opisana u Prilogu IV. ovoga Pravilnika,
- za određivanje sastava i udjela sterola, metoda opisana u Prilogu V. ovoga Pravilnika,
- za određivanje eritrodiola i uvaola, metoda opisana u Prilogu VI. ovoga Pravilnika,
- za određivanje udjela 2-gliceril monopalmitata, metoda opisana u Prilogu VII. ovoga Pravilnika,
- za spektrofotometrijske analize, metoda opisana u Prilogu VIII. ovoga Pravilnika,
- za određivanje sastava masnih kiselina, metoda opisana u Prilogu IX.a i IX.b ovoga Pravilnika,
- za određivanje udjela hlapljivih halogeniranih otapala u maslinovom ulju, metoda opisana u Prilogu X ovoga Pravilnika,
- za senzorsko ocjenjivanje djevičanskog maslinovog ulja, metoda opisana u Prilogu XI ovoga Pravilnika,
- za određivanje stigmastadiena, metoda opisana u Prilogu XII. ovoga Pravilnika,
- za određivanje triacilglicerola s ECN 42, metoda opisana u Prilogu XIII ovoga Pravilnika,
- za određivanje udjela alifatskih alkohola, metoda opisana u Prilogu XIV. ovoga Pravilnika.

Provjera senzorskih svojstava

Članak 13.

(1) Provjeru senzorskih svojstava ulja iz članka 2. stavka 1. točke 1. ovoga Pravilnika provodi tijelo nadležno za provođenje službene kontrole, posredstvom grupa odabranih i

osposobljenih ocjenjivača senzorskih svojstava djevičanskih maslinovih ulja (u daljnjem tekstu: paneli) koje su ovlaštene od strane Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (u daljnjem tekstu: Ministarstvo).

(2) Smatra se da su senzorska svojstva ulja iz stavka 1. ovoga članka sukladna označenoj kategoriji ako ovlašteni panel potvrdi kategorizaciju.

(3) Ako ovlašteni panel ne potvrdi označenu kategoriju, tijelo nadležno za provođenje službene kontrole dužno je na zahtjev zainteresirane stranke, organizirati dvije zasebne provjere koje će provesti drugi ovlašteni paneli, pri čemu najmanje jednu provjeru treba provesti panel ovlašten u zemlji proizvođača.

(4) Ako obje provjere iz stavka 3. potvrde označenu kategoriju ulja iz stavka 1. ovoga članka smatra se da je ulje ispravno označeno.

(5) U slučaju suprotnom od stavka 4. ovoga članka zainteresirana stranka iz stavka 3. ovoga članka dužna je snositi troškove provjera.

Uzorkovanje i priprema uzoraka za ispitivanje

Članak 14.

(1) Sukladno metodama iz članka 12. ovoga Pravilnika, pri provjeri karakteristika ulja koju provodi tijelo nadležno za provođenje službene kontrole, uzorci trebaju biti uzeti u skladu s hrvatskim normama HRN EN ISO 5555 o uzorkovanju i HRN EN ISO 661 o pripremi uzoraka za ispitivanje. Bez obzira na točku 6.8 norme HRN EN ISO 5555 o uzorkovanju, uzorak ulja u ambalaži koja ne prelazi 100 litara mora biti uzet sukladno Prilogu Ia ovoga Pravilnika.

(2) Ne dovodeći u pitanje normu HRN EN ISO 5555 o uzorkovanju i Poglavlje 6 norme HRN EN ISO 661 o pripremi uzoraka za ispitivanje, uzeti uzorci moraju u što kraćem roku biti smješteni na tamno mjesto zaštićeno od svjetlosti i jakih izvora topline te poslani u laboratorij na analizu ne kasnije od:

- desetog radnog dana nakon uzimanja uzoraka, u razdoblju od listopada do svibnja, i
- petog radnog dana nakon uzimanja uzoraka, u razdoblju od lipnja do rujna.

Vremenska ograničenja

Članak 15.

(1) Za potrebe provjere predviđene člankom 14. ovoga Pravilnika, analize iz Priloga II, III, VIII, IX i XI ovoga Pravilnika, i gdje je primjenljivo bilo koje druge analize propisane posebnim propisima, moraju biti izvršene prije isteka roka trajanja.

(2) Ako je uzorkovanje izvršeno više od četiri mjeseca prije isteka roka trajanja, analize iz stavka 1. ovoga članka moraju biti izvršene najkasnije prije isteka četvrtog mjeseca računajući od mjeseca u kojem je uzorak uzet.

Na druge analize predviđene člankom 12. ovoga Pravilnika ne primjenjuju se vremenska ograničenja.

(3) Ako rezultati analiza ne potvrde svojstva označene kategorije ulja, tijelo nadležno za provođenje službene kontrole obavještava o tome zainteresiranu stranku najkasnije mjesec dana prije kraja razdoblja iz stavka 2. ovoga članka, osim ako je uzorak uzet mjesec dana ili kraće od isteka roka trajanja.

Rezultati analiza

Članak 16.

Za ulja iz članka 2. ovoga Pravilnika smatra se da odgovaraju označenoj kategoriji ako se rezultati analiza dobiveni sukladno metodama iz članka 12. ovoga Pravilnika nalaze unutar granica propisanih u Prilogu I ovoga Pravilnika.

Utvrđivanje označene kategorije

Članak 17.

Proces provjere udovoljavanja uzoraka označenoj kategoriji može se provesti na sljedeće načine:

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

Ovlašćivanje panela

Članak 18.

(1) Ministarstvo ovlašćuje panele kako bi tijelo nadležno za provođenje službene kontrole moglo provjeriti i potvrditi senzorska svojstva ulja iz članka 2. stavka 1. točke 1. ovoga Pravilnika sukladno posebnom propisu o ovlašćivanju panela.

(2) Ako Ministarstvo naiđe na poteškoće pri uspostavljanju panela u Republici Hrvatskoj, može se pozvati na panel koji je ovlašten u nekoj drugoj zemlji Europske unije pod uvjetima ekvivalentnim onima u posebnom propisu iz stavka 1. ovoga članka.

(3) Ministarstvo vodi popis panela ovlaštenih sukladno uvjetima iz stavka 1. i 2. ovoga članka te ga objavljuje u »Narodnim novinama«.

Količina ulja u uljnim pogačama

Članak 19.

(1) Količina ulja u uljnim pogačama i drugim ostacima dobivenim pri ekstrakciji maslinovog ulja (CN oznake 2306 90 11 i 2306 90 19) određuje se metodom iz Priloga XV.

(2) Količina ulja iz stavka 1. ovoga članka izražava se kao udio mase ulja u masi suhe tvari.

Halogenirana otapala

Članak 20.

Maksimalne dozvoljene količine halogeniranih otapala za sve kategorije maslinovog ulja su:

- maksimalna količina svakog pojedinačnog halogeniranog otapala iznosi 0,1 mg/kg,
- ukupna maksimalna količina halogeniranih otapala iznosi 0,2 mg/kg.

3. ODOBRAVANJE OBJEKATA

Odobrovanje objekata za pakiranje ekstra djevičanskih i djevičanskih maslinovih ulja s registriranom oznakom

Članak 21.

U cilju provjere navoda iz članka 9. stavka 3. ovoga Pravilnika, subjekt u poslovanju s hranom, koji pakira ekstra djevičanska i djevičanska maslinova ulja s registriranom oznakom, dužan je od strane Ministarstva ishoditi rješenje o odobrenju objekta za pakiranje ekstra djevičanskih i djevičanskih maslinovih ulja s registriranom oznakom.

Uvjeti koji moraju biti zadovoljeni

Članak 22.

Rješenje iz članka 21. ovoga Pravilnika izdat će se subjektu u poslovanju s hranom koji:

- posjeduje opremu za pakiranje,
- sastavlja i pohranjuje proizvođačku dokumentaciju sukladno članku 10. ovoga Pravilnika i
- posjeduje odgovarajući sustav skladištenja koji omogućuje zasebno skladištenje i provjeru podrijetla ulja s navodima iz članka 9. stavka 3. ovoga Pravilnika.

Postupak za odobrovanje objekata za pakiranje maslinovih ulja s registriranom oznakom

Članak 23.

(1) Postupak za odobrovanje objekta pokreće se podnošenjem zahtjeva za odobrenje objekta za pakiranje maslinovih ulja s registriranom oznakom (u daljnjem tekstu: zahtjev) Ministarstvu. Zahtjev je tiskan u Prilogu XVI ovoga Pravilnika i čini njegov sastavni dio.

(2) Postupak iz stavka 1. ovoga članka provodi Povjerenstvo koje se osniva u Ministarstvu, a imenuje ga ministar poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (u daljnjem tekstu: ministar).

(3) Povjerenstvo je sastavljeno od 3 člana i čine ga dva predstavnika Ministarstva i jedan predstavnik Hrvatskog zavoda za poljoprivrednu savjetodavnu službu.

(4) Povjerenstvo obavlja očevid i sastavlja zapisnik.

Donošenje rješenja i upis u Upisnik odobrenih objekata za pakiranje maslinovih ulja s registriranom oznakom

Članak 24.

(1) Na temelju zapisnika i pozitivnog mišljenja Povjerenstva, ministar donosi rješenje o odobrenju objekta za pakiranje maslinovih ulja s registriranom oznakom koje vrijedi pet godina od dana donošenja.

(2) Temeljem rješenja iz stavka 1. ovoga članka objekt se upisuje u Upisnik odobrenih objekata za pakiranje maslinovih ulja s registriranom oznakom (u daljnjem tekstu: Upisnik) te mu se dodjeljuje alfanumerička identifikacija.

(3) Alfanaumerička identifikacija iz stavka 2. ovoga članka može se, gdje je to primjenjivo, navesti pri označavanju proizvoda.

Upisnik

Članak 25.

Upisnik iz članka 24. stavka 2. ovoga Pravilnika vodi Ministarstvo. Sadržaj Upisnika propisan je Prilogom XVII ovoga Pravilnika.

III. PRIJELAZNE I ZAVRŠNE ODREDBE

Članak 26.

Prilozi od I do XVII tiskani su uz ovaj Pravilnik i čine njegov sastavni dio.

Članak 27.

(1) Pravilnik o ovlašćivanju panela za ocjenjivanje senzorskih svojstava djevičanskih maslinovih ulja donijet će ministar najkasnije do III. kvartala 2009. godine.

(2) Do donošenja Pravilnika iz stavka 1. ovoga članka, ministar može ovlastiti panel iz zemlje članice Europske unije.

Članak 28.

Stupanjem na snagu ovoga Pravilnika prestaje važiti Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina (»Narodne novine« br. 63/06).

Članak 29.

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objave u »Narodnim novinama«.

Klasa: 011-02/08-01/58

Urbroj: 525-2-08-1

Zagreb, 30. prosinca 2008.

Ministar
mr. sc. Božidar
Pankretić, v. r.

PRILOG I

SVOJSTVA POJEDINIH KATEGORIJA MASLINOVOG ULJA

Kategorija	Slobodne masne kiseline (%) (*)	Peroksidni broj mmol O ₂ /kg (*)	Voskovi mg/kg g (**)	2-gliceril monopalmitat (%)	Stigmastadieni mg/kg (1)	Razlika između HPLC ECN4 2 i teoretskog ECN4 2	K2 32 (*)	K2 70 (*)	Delta-K (*)	Senzorska analiza Medijan mana (Mm) (*)	Senzorska analiza Medijan voćnosti (Mv) (*)
1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje	≤ 0,8	≤ 10	≤ 250	≤ 0,9 ako je udio palmitinske kiseline % ≤ 14 ≤ 1,0 ako je udio palmitinske kiseline % > 14	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Mm = 0	Mv > 0
2. Djevičansko maslinovo ulje	≤ 2,0	≤ 10	≤ 250	≤ 0,9 ako je udio palmitinske kiseline	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Mm ≤ 3,5	Mv > 0

				% ≤14 ≤1,0 ako je udio palmitinske kiseline % >14							
3. Maslinovo ulje lampante	> 2,0	—	≤ 300(3)	≤ 0,9 ako je udio palmitinske kiseline % ≤14 ≤1,1 ako je udio palmitinske kiseline % >14	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Mm > 3,5 (2)	
4. Rafinirano maslinovo ulje	≤ 0,3	≤2,5	≤ 350	≤ 0,9 ako je udio palmitinske kiseline % ≤14 ≤1,1 ako je udio palmitinske kiseline % >14	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	
5. Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih	≤ 1,0	≤7,5	≤ 350	≤ 0,9 ako je udio palmitinske kiseline % ≤14 ≤1,0 ako je udio palmitinske	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	

maslinovih ulja				kiseline % >14							
6. Sirovo ulje komine maslina	—	—	> 350 (4)	≤1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	
7. Rafinirano ulje komine maslina	≤ 0,3	≤2,5	> 350	≤1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,0 0	≤ 0,2 0	—	
8. Ulje komine maslina	≤ 1,0	≤7,5	> 350	≤1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,7 0	≤ 0,1 8	—	

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

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

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

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

Kategorija	Sastav masnih kiselina (1)						Suma transoleinskih izomera (%)	Suma translinolnih i translinolenskih izomera (%)	Sastav sterola						Ukupni steroli (mg/kg)	Eritrodiol i uvaol (%) (**)
	Miristinska (%)	Linolinska (%)	Arahidska (%)	Gadolinska (%)	Beheninska (%)	Lignocerinska (%)			Kolesterol (%)	Brasikasterol (%)	Kampesterol (%)	Stigmasterol (%)	Betasitosterol (%) (2)	Delta-7-stigmasterol (%)		
1. Ekstra dječičan sko mas	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kam p.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5

lino vo ulje																
2. Dje viča nsk o mas lino vo ulje	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< kam p.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	≥ 1000	$\leq 4,5$
3. Mas lino vo ulje lam pant e	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	$\leq 0,10$	$\leq 0,10$	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	—	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	≥ 1000	$\leq 4,5$ (3)
4. Rafi nira no mas lino vo ulje	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	$\leq 0,20$	$\leq 0,30$	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< kam p.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	≥ 1000	$\leq 4,5$
5. Mas lino vo ulje sast avlj eno od rafi nira nog mas lino vog ulja i djev ičan skih	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	$\leq 0,20$	$\leq 0,30$	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	< kam p.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	≥ 1000	$\leq 4,5$

mas lino vih ulja																
6. Siro vo ulje ko min e mas lina	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,3$	$\leq 0,2$	$\leq 0,20$	$\leq 0,10$	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	—	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	≥ 2500	$> 4,5$ (4)
7. Rafi nira no ulje ko min e mas lina	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,3$	$\leq 0,2$	$\leq 0,40$	$\leq 0,35$	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	< kam p.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	≥ 1800	$> 4,5$
8. Ulje ko min e mas lina	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,3$	$\leq 0,2$	$\leq 0,40$	$\leq 0,35$	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	< kam p.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	≥ 1600	$> 4,5$

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

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

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

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

Napomene:

(a) Rezultati analiza moraju biti izraženi onim brojem decimalnih mjesta kojim je izražena granična vrijednost za pojedino svojstvo. Zadnja znamenka mora se uvećati za jednu jedinicu ako je znamenka koja slijedi veća od 4.

(b) Ako najmanje jedno od svojstava ne odgovara navedenim vrijednostima, ulje se može ili svrstati u drugu kategoriju ili svrstati u ulje smanjene kakvoće za svrhe ovoga Pravilnika.

(c) Svojstva označena jednom zvjezdicom (*), a odnose se na kakvoću ulja, podrazumijevaju sljedeće:

– kod djevičanskih maslinovih ulja, ako vrijednost najmanje jednog od označenih svojstava ne zadovoljava graničnu vrijednost, ulje se svrstava u drugu odgovarajuću kategoriju unutar djevičanskih maslinovih ulja.

– kod maslinovog ulja lampante, dovoljno je da barem jedno od označenih svojstava odgovara propisanim vrijednostima.

(d) Ako je svojstvo označeno s dvije zvjezdice (**), znači da za sve tipove ulja komine maslina nije nužno da sva označena svojstva istovremeno udovoljavaju propisanim vrijednostima

PRILOG Ia

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

Ova se metoda uzorkovanja primjenjuje na isporuke ulja od ploda ili komine maslina koje ne prelaze 125 000 litara, u pojedinačnim ambalažama koje ne prelaze 100 litara.

Ukoliko isporuka prelazi 125 000 litara, treba se podijeliti u serije od 125 000 litara ili manje. Ukoliko je isporuka manja od 125 000 litara, smatra se jednom serijom. Metoda se tada primjenjuje na svaku seriju.

Minimalni broj primarnih uzoraka koji se trebaju uzeti određen je veličinom serije u skladu s tablicom iz točke 1.

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

Definicije pojmova »isporuka«, »primarni uzorak« i »laboratorijski uzorak« navedene su u normi HRN EN ISO 5555.

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

1. BROJ PRIMARNIH UZORAKA KOJI TREBA UZETI

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

Veličina serije (u litrama) manja od	Minimalni broj primarnih uzoraka
7 500	2
25 000	3
75 000	4
125 000	5

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

U slučaju sumnje, države članice trebaju povećati broj uzetih primarnih uzoraka.

2. SADRŽAJ PRIMARNIH UZORAKA

2.1. Primarni uzorci moraju sadržavati:

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

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

(a) analize iz Priloga II, III, VIII i IX,

(b) analiza iz Priloga XI,

(c) druge analize.

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

3. ANALIZE I REZULTATI

(a) Svaki od primarnih uzoraka iz točke 1 treba se podijeliti u laboratorijske uzorke, u skladu s točkom 2.5. norme HRN EN ISO 5555, i analizirati kako slijedi:

- određivanje slobodnih masnih kiselina, prema prvoj alineji članka 2(1),
- određivanje peroksidnog broja, prema drugoj alineji članka 2(1),
- spektrofotometrijska analiza, prema osmoj alineji članka 2(1),
- određivanje sastava masnih kiselina, prema devetoj alineji članka 2(1).

(b) Ako jedan od rezultata analiza iz (a) za barem jedan od primarnih uzoraka iz iste serije ne odgovara svojstvima označene kategorije ulja, cijela se ta serija smatra neodgovarajućom.

Ako rezultati analiza iz (a) za svaki od primarnih uzoraka uzetih iz iste serije nisu jednaki, uzevši u obzir ponovljivost metoda o kojima je riječ, cijela se serija smatra nehomogenom i svaki se primarni uzorak podvrgava drugim propisanim analizama. U suprotnom, druge propisane analize provode se samo na jednom primarnom uzorku.

(c) Ako jedan od rezultata analiza iz drugog odlomka točke (b) ne odgovara svojstvima označene kategorije ulja, cijela se ta serija smatra neodgovarajućom.

Ako svi rezultati analiza iz drugog odlomka točke (b) odgovaraju svojstvima označene kategorije ulja, cijela se ta serija smatra odgovarajućom.

PRILOG Ib

STABLO ODLUKE ZA UTVRĐIVANJE ODGOVARA LI UZORAK MASLINOVOG ULJA OZNAČENOJ KATEGORIJI

Analize kojima se utvrđuje odgovara li ulje od ploda ili komine maslina označenoj kategoriji mogu se izvršavati provodeći analize predviđene za svrhe utvrđivanja sukladnosti sa svojstvima iz Priloga I:

(a) ili bilo kojim redoslijedom

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

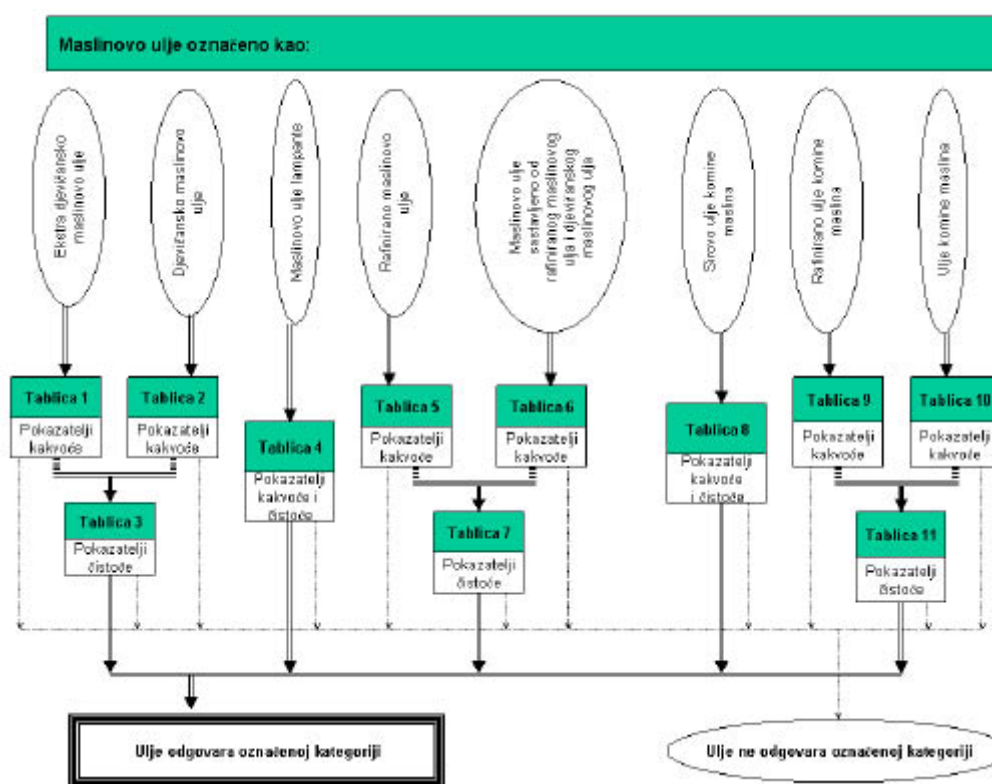
Analize kontaminanata potrebne za utvrđivanje sukladnosti s propisima Europske Zajednice provode se neovisno od utvrđivanja sukladnosti sa svojstvima iz Priloga I.

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

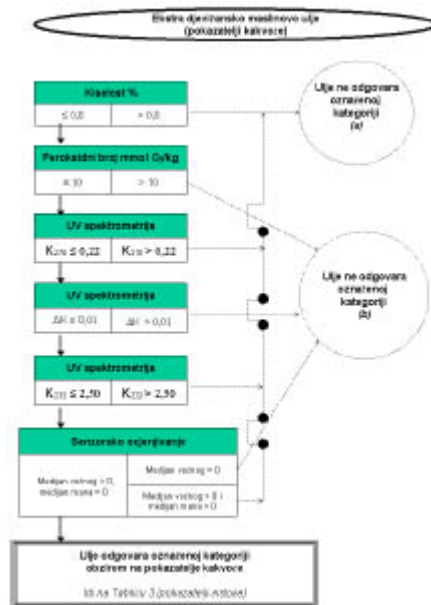
Objašnjenje oznaka korištenih u tablicama:

- dvostruka linija (=) označava smjer koji treba slijediti u slučaju sukladnosti (pozitivan odgovor) s kriterijima iz prethodnog okvira. Točkasta linija (...) upućuje na alternativni smjer koji se treba slijediti u slučaju nesukladnosti,
- naslovi u okvirima u tablicama 1 do 11 odnose se na analize propisane ovim Pravilnikom na temelju tablica ekvivalencije iz Dodatka I ovog Priloga,
- slova u zagradama, koja se pojavljuju u kružnim simbolima (negativne odluke) u tablicama 1 do 11, upućuju na napomene iz Dodatka 2 ovog Priloga. Slova sama po sebi ne obavezuju na izvršavanje analiza, niti znače vjerodostojnost navedenih pretpostavki.

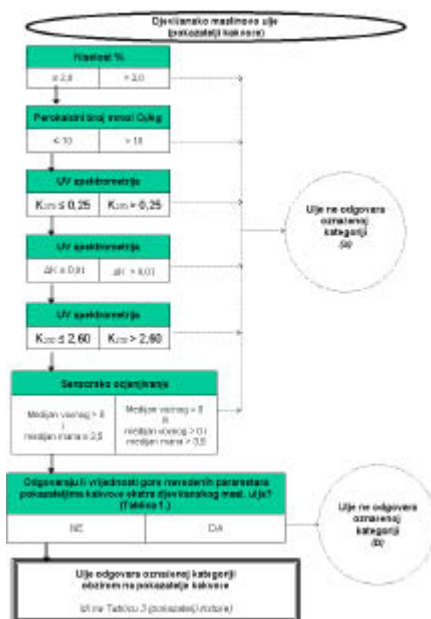
Opća tablica



Tablica 1

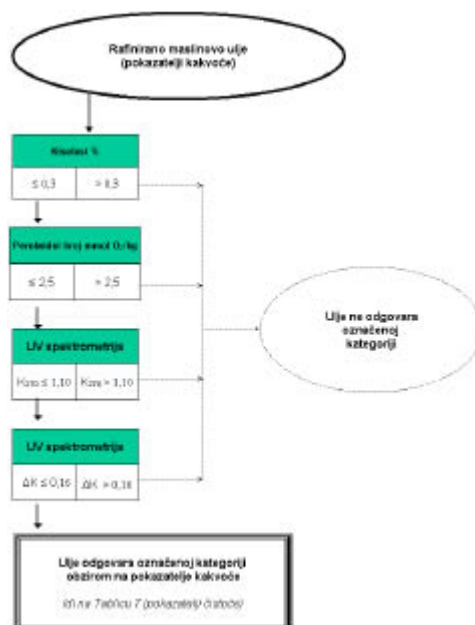


Tablica 2

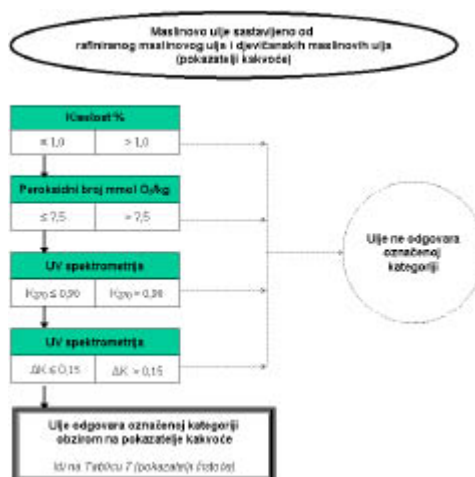


Tablica 3

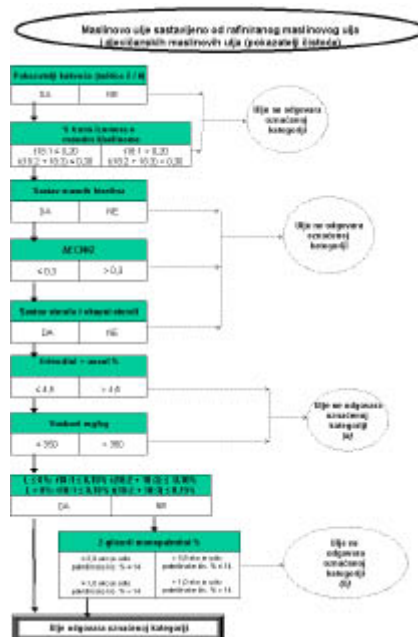




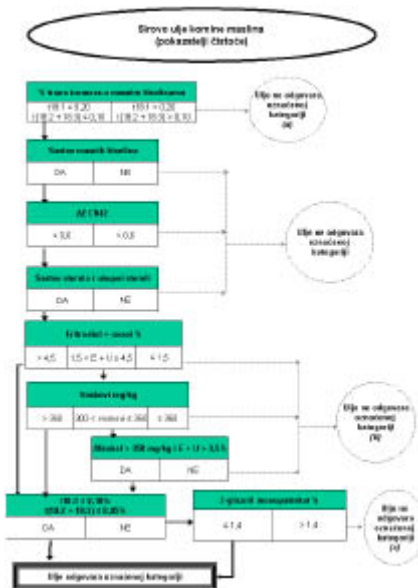
Tablica 6



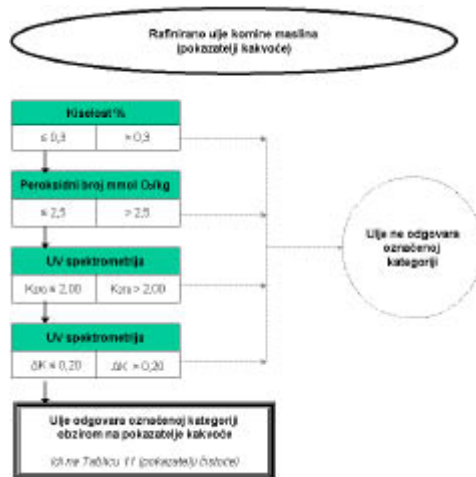
Tablica 7



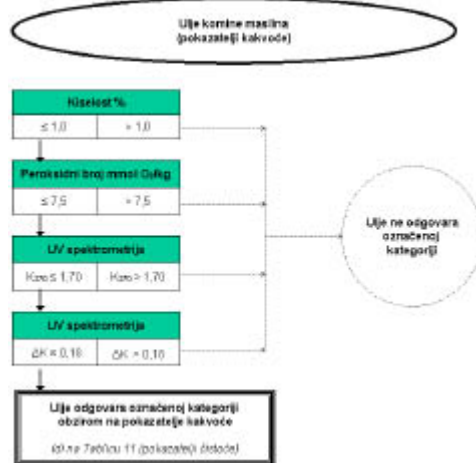
Tablica 8



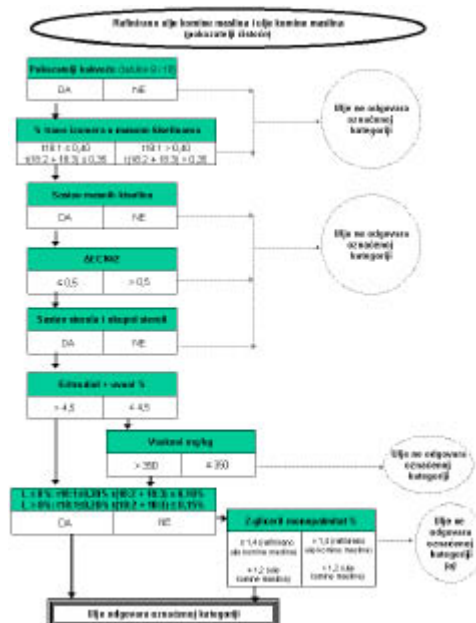
Tablica 9



Tablica 10



Tablica 11



DODATAK 1

TABLICA EKVIVALENCIJE IZMEĐU POJMOVA U STABLU ODLUKE I PRILOGA OVOGA PRAVILNIKA S NAZIVIMA ANALITIČKIH METODA

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

DODATAK 2

Tablica 1

(a) Vidi djevičansko maslinovo ulje ili maslinovo ulje lampante (pokazatelji kakvoće Tablica 2, ili pokazatelji kakvoće i čistoće Tablica 4)

(b) Vidi maslinovo ulje lampante (pokazatelji kakvoće i čistoće Tablica 4)

Tablica 2

(a) Vidi maslinovo ulje lampante (pokazatelji kakvoće i čistoće Tablica 4)

(b) Vidi ekstra djevičansko maslinovo ulje (pokazatelji kakvoće Tablica 1)

Tablica 3

(a) Prisutnost rafiniranih ulja (maslinovog ili drugih)

(b) Prisutnost ulja komine maslina

Tablica 4

(a) Vidi ekstra djevičansko maslinovo ulje i djevičansko maslinovo ulje (pokazatelji kakvoće Tablica 1 i Tablica 2)

(b) Prisutnost rafiniranih ulja (maslinovog ili drugih)

(c) Prisutnost ulja komine maslina

(d) Prisutnost esterificiranih ulja

Tablica 7

(a) Prisutnost ulja komine maslina

(b) Prisutnost esterificiranih ulja

Tablica 8

(a) Prisutnost rafiniranih ulja (maslinovog ili drugih)

(b) Vidi maslinovo ulje lampante (pokazatelji kakvoće i čistoće Tablica 4)

(c) Prisutnost esterificiranih ulja

Tablica 11

(a) Prisutnost esterificiranih ulja

PRILOG II

**ODREĐIVANJE SLOBODNIH MASNIH KISELINA (KISELOSTI),
HLADNA METODA**

1. SVRHA

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

1.1. Princip

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

1.2. Reagensi

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

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

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

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

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

1.2.2. Kalij hidroksid, standardizirana etanolna otopina $c(\text{KOH})$ oko 0,1 mol/l ili, ako je potrebno, $c(\text{KOH})$ oko 0,5 mol/l.

Točna koncentracija etanolne otopine kalij hidroksida mora biti poznata i provjerena neposredno prije upotrebe. Treba se koristiti otopina pripremljena barem 5 dana prije upotrebe i dekantirana u bocu od smeđeg stakla s gumenim čepom. Otopina treba biti bezbojna ili blijedožute boje.

Napomena: Stabilna bezbojna otopina kalij hidroksida može se pripremiti na sljedeći način: zagrije se do vrenja 1000 ml etanola s 8 g kalij hidroksida i 0,5 g strugotina aluminija i nastavi s vrenjem uz povratno hladilo jedan sat. Odmah se destilira. U destilatu se otopi propisana količina kalij hidroksida. Ostavi se nekoliko dana i dekantira bistri supernatant od taloga kalij karbonata.

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

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

1.3. Aparatura

Uobičajena laboratorijska aparatura koja uključuje:

1.3.1. Analitičku vagu;

1.3.2. Erlenmeyerovu tikvicu od 250 ml;

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

1.4. Postupak

1.4.1. Priprema uzorka za analizu

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

1.4.2. Uzorak

Količina uzorka ovisi o očekivanoj kiselosti, prema sljedećoj tablici:

Očekivana kiselost	Masa uzorka (g)	Točnost vaganja (g)
< 0,5	20	0,05
0,5 do 2	10	0,02
2 do 7,5	2,5	0,01
7,5 do 37,5	0,5	0,001
> 37,5	0,1	0,0002

Uzorak se odvaže u Erlenmeyerovu tikvicu (1.3.2.)

1.4.3. Određivanje

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

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

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

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

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

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

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

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

gdje je:

V = volumen standardizirane otopine kalij hidroksida upotrijebljen pri titraciji, u ml;

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

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

m = masa uzorka u g.

Rezultat predstavlja aritmetičku sredinu dva određivanja.

PRILOG III

ODREĐIVANJE PEROKSIDNOG BROJA

1. SVRHA

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

2. PODRUČJE PRIMJENE

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

3. DEFINICIJA

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

4. PRINCIP

Tretiranje uzorka, otopljenog u octenoj kiselini i kloroformu, otopinom kalij jodida. Titracija oslobođenog joda standardnom otopinom natrij tiosulfata.

5. APARATURA

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

Napomena: Brušene površine ne smiju se mastiti.

5.1. Staklena kapsula od 3 ml.

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

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

6. REAGENSI

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

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

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

6.4. Natrij tiosulfat, standardna vodena otopina koncentracije 0,01 mol/l ili 0,002 mol/l, standardizirana neposredno prije upotrebe.

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

7. UZORAK

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

8. POSTUPAK

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

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

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

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

Za svaki uzorak provode se dva određivanja.

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

9. IZRAŽAVANJE REZULTATA

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

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

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

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

gdje je:

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

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

m = masa uzorka u g.

Rezultat predstavlja aritmetičku sredinu dva određivanja.

PRILOG IV

ODREĐIVANJE UDJELA VOSKOVA KAPILARNOM PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

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

2. PRINCIP

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

3. APARATURA

3.1. Erlenmeyerova tikvica od 25 ml.

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

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

3.3.1. Termostatske komore za kolone, opremljene regulatorom temperature.

3.3.2. Hladnog injektora za izravno unošenje uzorka u kolonu.

3.3.3. Plameno-ionizacijskog detektora s pretvaračem – pojačalom.

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

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

3.4. Mikrošprica od 10 μl za izravno unošenje uzorka u kolonu (»on-column«), s čvrsto fiksiranom iglom

3.5. Elektrovibrator

3.6. Rotacijski vakuum-uparivač

3.7. Visokotemperaturna peć (mufolna peć)

3.8. Analitička vaga osjetljivosti od $\pm 0,1$ mg

3.9. Uobičajeno laboratorijsko stakleno suđe.

4. REAGENSI

4.1. Silikagel veličine zrna 60 – 200 μm .

Staviti gel u peć na 500°C najmanje 4 sata. Nakon hlađenja, dodati 2% vode na količinu silikagela. Dobro protresti kako bi se suspenzija homogenizirala. Držati na tamnom mjestu najmanje 12 sati prije upotrebe.

4.2. n-heksan, za kromatografiju,

4.3. etil eter, za kromatografiju,

4.4. n-heptan, za kromatografiju.

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

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

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

4.7. pomoćni plinovi:

– čisti vodik, za plinsku kromatografiju,

– čisti zrak, za plinsku kromatografiju

5. POSTUPAK

5.1. Priprema kromatografske kolone

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

Otapalo ispuštati dok ne dostigne 1 mm iznad gornje razine absorbenta, potom s daljnjih 70 ml n-heksana, ispirati da se uklone prirodno prisutni n-alkani. Potom započeti kromatografsko eluiranje dok se ne sakupi 180 ml mješavine n-heksana/etil etera (omjer 99:1, v/v), pri brzini protoka od oko 15 kapi svakih 10 sekundi na sobnoj temperaturi, $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$.

Napomena:

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

– Za vizualnu provjeru ispravnog eluiranja voskova, uzorku u otopini može se dodati 100 μl 1%-tne otopine sudana u mješavini n-heksana/etil etera (omjer 99:1, v/v). S obzirom da bojilo ima retenciju između voskova i triglicerida, kada obojenje dostigne dno kolone, eluiranje treba obustaviti jer su svi voskovi eluirali.

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

5.2. Analiza plinskom kromatografijom

5.2.1. Pripremni radovi

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

Ako se kolona koristi prvi put, potrebno ju je najprije kondicionirati. Pustiti da kroz kolonu prođe malo plina, potom uključiti plinski kromatograf. Postepeno zagrijavati tako da se za 4

sata postigne temperatura od 350°C. Održavati temperaturu najmanje dva sata, a zatim uređaj podesiti na radne uvjete (postaviti protok plina, zapaliti plamen, povezati na elektronički pisac (3.3.4.), postaviti temperaturu komore za kolonu, regulirati detektor, itd.) i zabilježiti signal pri osjetljivosti koja je najmanje dvostruka od one koju zahtijeva analiza. Bazna linija mora biti linearna, bez pikova ili odstupanja.

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

5.2.2. Izbor radnih uvjeta

Radni uvjeti su općenito sljedeći:

– temperatura kolone:

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

– temperatura detektora: 350°C;

– količina injektiranog uzorka: 1 µl otopine u n-heptan (2 – 4 ml);

– plin nositelj: helij ili vodik pri optimalnoj linearnoj brzini za odabrani plin (vidi Dodatak);

– osjetljivost instrumenta: pogodno za sljedeće uvjete:

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

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

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

5.3. Provođenje analize

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

5.4. Identifikacija pikova

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

Na slici je kromatogram voskova djevičanskog maslinovog ulja.

5.5. Određivanje udjela

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

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

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

gdje je:

A_x = površina pika pojedinog estera u kvadratnim milimetrima;

A_s = površina pika internog standarda u kvadratnim milimetrima;

m_s = masa dodanog internog standarda, u miligramima;

m = masa uzorka za analizu, u gramima.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

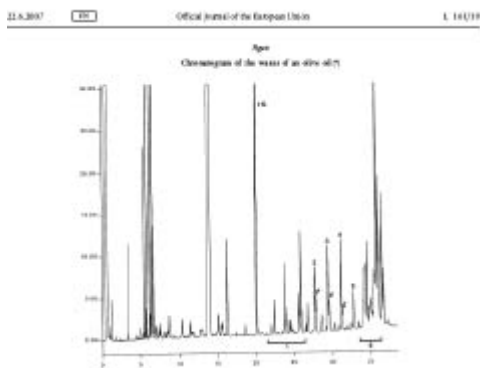
Ukupan udio različitih voskova tj. alifatskih estera C40 do C46 izražava se u mg/kg (ppm).

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

Rezultati trebaju biti izraženi na jednu decimalu.

Slika

Kromatogram voskova maslinovog ulja⁽¹⁾



Legenda:

I.S. = lauril arahidat

1. = diterpenski estser

2 + 2' = esteri C40

3 + 3' = esteri C42

4 + 4' = esteri C44

5. = esteri C46

6. = sterolni esteri i triterpenski alkohol

Nakon eluiranja sterolnih estera, kromatogram ne smije pokazivati signifikantne pikove (trigliceridi)

DODATAK

ODREĐIVANJE LINEARNE BRZINE PLINA

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

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

PRILOG V

ODREĐIVANJE SASTAVA I UDJELA STEROLA KAPILARNOM PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

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

2. PRINCIP METODE

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

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

3. APARATURA

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

3.2. Lijeveći za odjeljivanje od 500 ml.

3.3. Tikvice od 250 ml.

3.4. Kompletna oprema za analizu tankoslojnom kromatografijom sa staklenim pločama dimenzija 20×20 cm

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

3.6. Mikrošprica od 100 μ l i 500 μ l.

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

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

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

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

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

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

3.10.3. Plameno-ionizacijski detektor i pretvarač s pojačalom;

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

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

3.12. Mikrošprica za plinsku kromatografiju od 10 μ l, s čvrsto fiksiранom iglom.

4. REAGENSI

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

4.2. Dietil eter, analitičke čistoće.

4.3. Bezvodni natrij sulfat, analitičke čistoće.

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

4.5. Kalij hidroksid, etanolna otopina koncentracije 0,2 mol/l. Otopi se 13 g kalij hidroksida u 20 ml destilirane vode i nadopuni etanolom do jedne litre.

4.6. Benzen, za kromatografiju. (Vidjeti 5.2.2.)

4.7. Aceton, za kromatografiju. (Vidjeti 5.2.2.)

4.8. Heksan, za kromatografiju. (Vidjeti 5.2.2.)

4.9. Dietil eter, za kromatografiju (Vidjeti 5.2.2.)

4.10. Kloroform, analitičke čistoće (Vidjeti 5.2.2.)

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

4.12. 2,7-diklorfluorescein, 0,2%-na otopina u etanolu. Doda se nekoliko kapi etanolne otopine kalij hidroksida koncentracije 2 mol/l, radi postizanja bazične reakcije.

4.13. Bezvodni piridin, za kromatografiju.

4.14. Heksametil disilazan.

4.15. Trimetilklorosilan.

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

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

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

4.19. Pomoćni plinovi:

– vodik, plinsko-kromatografske čistoće,

– zrak, plinsko-kromatografske čistoće.

5. POSTUPAK

5.1. Priprema neosapunjivog.

5.1.1. Pomoću mikrošprice od 500 μ l u tikvicu od 250 ml prenese se volumen 0,2%- tne otopine α -kolestanola u kloroformu (4.17), koji sadrži udio kolestanola koji odgovara približno 10% udjela sterola u alikvotu uzorka uzetog za određivanje. Na primjer, na 5 g uzorka treba dodati 500 μ l 0,2%-tne otopine α -kolestanola za maslinova ulja, odnosno 1500 μ l za ulja komine maslina.

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

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

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

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

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

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

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

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

5.1.5. Eter se ukloni destilacijom do nekoliko ml, a zatim osuši u laganom vakuumu ili struji dušika, dovršavajući sušenje u peći na 100°C približno četvrt sata te izvaže nakon hlađenja u eksikatoru.

5.2. Odjeljivanje sterolne frakcije.

5.2.1. Priprema bazičnih ploča. Cijele ploče sa silikagelom (4.4.) urone se u etanolnu otopinu kalij hidroksida koncentracije 0,2 mol/l (4.5.) u trajanju od 10 sekundi, zatim suše 2 sata u digestoru i na kraju 1 sat u peć na 100°C.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ostatak u epruveti sastoji se od sterolne frakcije.

5.3. Priprema trimetilsilil etera.

5.3.1. U epruvetu koja sadrži sterolnu frakciju po svakom miligramu sterola doda se 50 μ l reagensa za silaniziranje, koji predstavlja mješavinu piridina, heksametildisilazana i trimetilklorosilana u omjeru 9:3:1 (v/v/v) (Napomena 4), izbjegavajući pritom vezanje vlage (Napomena 5).

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

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

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

5.4. Plinsko-kromatografska analiza.

5.4.1. Priprema kolone.

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

Izvrše se opće provjere plinskog kromatografa (dovod plina, učinkovitost detektora, učinkovitost sistema odijeljivanja i pisača itd.).

5.4.1.2. Ako se kolona koristi prvi put, preporučuje se njezino kondicioniranje. Lagani tok plina se propusti kroz kapilarnu kolonu, plinski kromatograf se uključi i započne postupno zagrijavanje do temperature najmanje 20°C iznad radne temperature (Napomena 6). Ta se temperatura održava najmanje 2 sata, a zatim se cijeli uređaj namjesti na radne uvjete (podešavanje protoka plina i dijeljenja, paljenje plamena, priključak na elektronički pisač, podešavanje peći za kolonu, temperature detektora i injektora) i potom snimi signal s osjetljivošću najmanje dvostruko većom od one koja će se koristiti za analizu. Bazna linija mora biti linearna, bez ikakvih pikova ili otklona.

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

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

5.4.2. Izbor radnih uvjeta.

5.4.2.1. Opći radni uvjeti su sljedeći:

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

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

- vrijeme zadržavanja β -sitosterola treba biti 20 ± 5 minuta,
- visina pika kampesterola treba biti: za maslinovo ulje (prosječna količina 3%) $15 \pm 5\%$ pune skale; za sojino ulje (prosječna količina 20%) $80 \pm 10\%$ pune skale,
- svi prisutni steroli moraju biti razdvojeni. Pored toga, pikovi također moraju biti potpuno razdvojeni, tj. prethodni pik mora se vratiti na baznu liniju prije početka sljedećeg pika. Međutim, nepotpuna se rezolucija tolerira uz uvjet da se pik pri relativnom vremenu zadržavanja od 1,02 može kvantificirati pomoću okomice.

3.3.3. Postupak analize

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

2.2.2.2. Nastavi se sa snimanjem dok se TMSE prisutnih sterola u potpunosti ne eluiraju. Bazna linija mora čitavo vrijeme udovoljavati uvjetima (5.4.1.2.).

5.4.4. Identifikacija pikova.

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

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

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

Slike 1 i 2 prikazuju tipične kromatograme nekih ulja.

5.4.5. Kvantitativno određivanje.

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

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

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

Gdje je:

A_x = površina pika sterola x;

A_s = površina pika α -kolestanola;

m_s = masa dodanog α -kolestanola, u mg;

m = masa uzorka upotrijebljena za analizu, u g.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

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

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

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

gdje je:

A_x = površina pika za x;

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

DODATAK

ODREĐIVANJE LINEARNE BRZINE PLINA

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

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

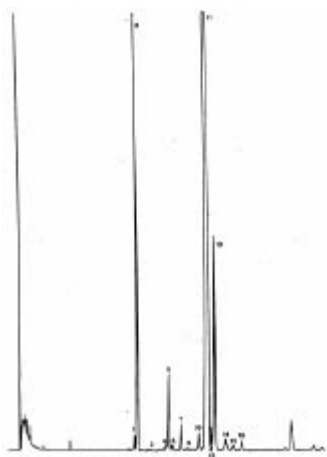
Tablica I.

Relativna vremena zadržavanja sterola

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

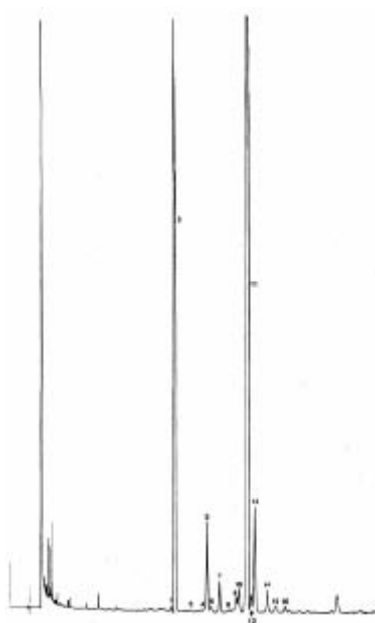
Slika 1

Plinski kromatogram sterolne frakcije nerafiniranog maslinovog ulja



Slika 2

Plinski kromatogram sterolne frakcije rafiniranog maslinovog ulja



PRILOG VI

ODREĐIVANJE ERITRODIOLA I UVAOLA

UVOD

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

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

Ova metoda opisuje postupak određivanja eritrodiola u mastima.

2. PRINCIP METODE

Mast se saponificira etanolnom otopinom kalij hidroksida. Neosapunjiva frakcija se ekstrahira dietil eterom i pročisti propuštanjem kroz kolonu napunjenu aluminij oksidom.

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

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

3. APARATURA

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

4. REAGENSI

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

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

5. POSTUPAK

5.1. Priprema neosapunjivog

Kako je opisano u točki 5.1.2. Priloga V.

5.2. Izdvajanje eritrodiola i sterola.

5.2.1. Vidi točku 5.2.1. Priloga V.

5.2.2. Vidi točku 5.2.2. Priloga V.

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

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

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

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

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

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

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

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

5.3. Priprema trimetilsilil etera

Kako je opisano u točki 5.3. Priloga V.

5.4. Analiza plinskom kromatografijom

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

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

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

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

Gdje je:

A1 = površina pika eritrodiola;

A2 = površina pika uvaola;

Σ Asterola = ukupna površina pikova sterola.

Rezultat se izražava na jedno decimalno mjesto.

PRILOG VII

ODREĐIVANJE UDJELA 2 – GLICERIL MONOPALMITATA

1. OPSEG I PODRUČJE PRIMJENE

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

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

2. PRINCIP

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

3. APARATURA I PRIBOR

3.1. Erlenmeyerova tikvica od 25 ml

3.2. Čaše od 100, 250 i 300 ml

3.3. Staklena kromatografska kolona unutarnjeg promjera 21-23 mm, duljine 400 mm, s pločicom od sinter stakla i pipcem

3.4. Mjerni cilindari (menzure) 10, 50, 100 i 200 ml

3.5. Tikvice od 100 i 250 ml

3.6. Rotacioni uparivač

3.7. Epruveta za centrifugiranje s koničnim dnom od 10 ml i brušenim staklenim čepom

3.8. Centrifuga za epruvete od 10 i 100 ml

3.9. Termostat koji omogućava održavanje temperature od $40 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

3.10. Pipete 1 i 2 ml

3.11. Šprica od 1 ml, s tankom iglom

3.12. Mikrošprica od 100 μl

3.13. Lijevak od 1000 ml

3.14. Kapilarni plinski kromatograf opremljen za hladno injektiranje i za (direktno) izravno unošenje uzorka i peći s mogućnosti održavanja odabrane temperature na $\pm 1^{\circ}\text{C}$

3.15. Hladni injektor za izravno (direktno) unošenje uzorka u kolonu

3.16. Plameno ionizacijski detektor i mjerni pretvarač (elektrometar)

3.17. Pisač-integrator povezan s mjernim pretvaračem s vremenom odaziva manjim od 1 sekunde i promjenjivom brzinom papira

3.18. Staklena ili silikatna kapilarna kolona duljine 8 – 12 metara, unutarnjeg promjera 0,25 – 0,32 mm, prekrivena / obložena 5% metilpolisiloksanom ili fenilmetilsiloksanom, debljine 0,10 – 0,30 μm , koja se može koristiti na 370°C

3.19. Mikrošprica od 10 µl s čvrsto fiksiranom iglom, duljine najmanje 7,5 cm za direktno unošenje uzorka u kolonu.

4. REAGENSI

4.1. Slikagel veličine zrnaca od 0,063 – 0,200 mm (70/280 mesha) pripremljen na sljedeći način:

staviti silikagel u porculansku posudu i sušiti u sušioniku na 160°C, 4 sata, ohladiti u eksikatoru na sobnoj temperaturi. Dodati 5% vode na masu silikagela kako slijedi: odvagati 152 g silikagela u tikvicu i dodati 8 g destilirane vode, čep i lagano protresti da se voda jednakomjerno rasporedi.

Ostaviti da stoji najmanje 12 sati prije upotrebe.

4.2. n-heksan (za kromatografiju)

4.3. Isopropanol

4.4. Vodena otopina isopropanola, 1/1 (v/v)

4.5. Pankreasna lipaza. Mora imati aktivnost između 2,0 i 10 lipaznih jedinica po mg. (Pankreasna lipaza, s aktivnošću od 2,0 – 10 lipaznih jedinica po mg enzima su dostupne na tržištu)

4.6. Puferska otopina tris-hidroksimetilaminometana; 1 M vodena otopina, podešena s konc. HCl (1/1 v/v) na pH 8 (provjeriti potencijometrom)

4.7. Natrij holat, enzimske kvalitete, 0,1% vodena otopina (otopina se mora uoptrijebiti u roku od dva tjedna od izrade)

4.8. Kalcijev klorid, 22%-tna vodena otopina

4.9. Dietil eter za kromatografiju

4.10. Otopina za razvijanje: mješavina n-heksana/dietil etera (87:13 v/v)

4.11. Natrijev hidroksid, 12% otopina

4.12. Fenolftalein, 1% otopina u etanolu

4.13. Plin nositelj: vodik ili helij, za plinsku kromatografiju

4.14. Pomoćni plinovi: vodik, čistoće najmanje 99%, bez vlage i organskih tvari, i zrak, za plinsku kromatografiju, isto čisto

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

4.16. Referentni uzorci: čisti monogliceridi ili mješavine monoglicerida s poznatim postotnim udjelima sličnim uzorku.

5. METODA

5.1. Priprema uzorka

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

5.1.1.1. Staviti 50 g ulja i 200 ml n-heksana u lijevak zapremnine 1 000 ml (3.13.). Dodati 100 ml izopropanola i količinu otopine 12% natrijevog nitroksida (4.11) koja odgovara udjelu SMK u ulju uvećanom za 5%. Jednu minute snažno tresti. Dodati 100 ml destilirane vode, ponovo protresti i ostaviti da stoji.

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

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

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

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

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

5.1.3. Priprema kromatografska kolone

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

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

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

5.1.4. Kolonska kromatografija

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

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

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

Eluat sakupiti u prethodno izvaganu tikvicu od 205 ml. Otapalo upariti pod vakuumom, tragove otapala ukloniti u struji dušika.

Izvagati i izračunati dobiveni ekstrakt.

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

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

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

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

5.2. Hidroliza pankreasnom lipazom

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

5.2.2. Dodati 20 mg lipaze, pažljivo protresti (izbjeći vađenje čepa) i staviti epruvetu u termostatski pri točno dvije minute. Potom izvaditi, dobro tresti jednu minutu i ostaviti da se hladi.

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

5.3. Priprema silaniziranih derivata i plinska kromatografija

5.3.1. Mikrošpicom prenijeti 100 µl otopine (5.2.3.) u epruvetu s konusnim dnom zapremnine 10 ml.

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

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

5.4. Plinska kromatografija

Radni uvjeti:

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

5.4.1. Identifikacija pikova

Pojedini monogliceridi se identificiraju prema retencijonom vremenu i usporedbom s dobivenim vremenom za standardne monogliceridne smjese pod istim uvjetima.

5.4.2. Kvantitativna ocjena

Površina svakog pika se izračunava korištenjem elektroničkog integratora.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

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

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

gdje je:

A_x = površina pika koja odgovara gliceril monopalmitatu

$\sum A$ = zbroj površina pikova svih monoglicerida

Rezultat mora biti izražen na jednu decimalu.

7. IZVJEŠĆE O ANALIZI

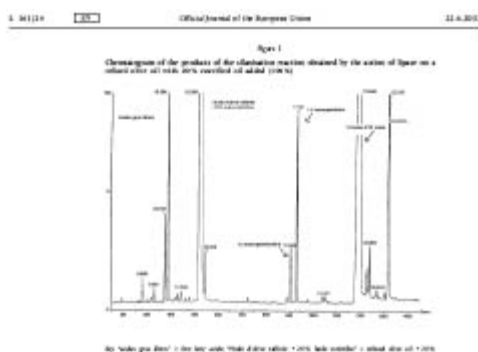
Izvješće o analizi mora navoditi:

- pozivanje na ovu metodu,
- sve informacije potrebne za identifikaciju uzorka,
- rezultat analize,

- pojediniosti za identifikaciju laboratorija, datum analize i potpis onih koji su odgovorni za analizu.

Slika 1.

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



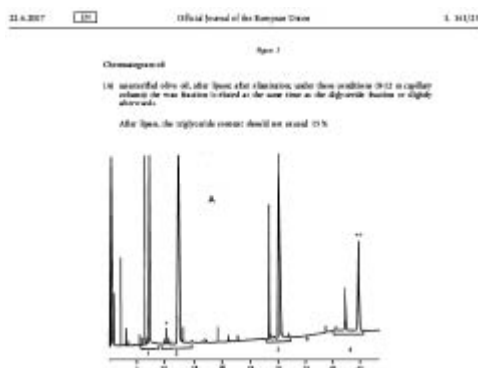
Legenda: »acides gras libres« = slobodne masne kiseline; »Huile d'olive raffinée + 20% huile estérifiée« = rafinirano maslinovo ulje + 20% esterificirano ulje; »1-2 monopalmitoléine« = 1-2 monopalmitolein; »1 2 mono C18 insat.« = nezasićeni 1-2 mono C18

Slika 2.

Kromatogram:

(A) neesterificirano maslinovo ulje, nakon djelovanja lipaze; nakon silaniziranja; pod ovim uvjetima opisanima u točki 5.4. (kapilarna kolona 8-12 m), frakcija voska se eluira istovremeno kao i frakcija diglicerida ili malo poslije.

Nakon djelovanja lipaze, sadržaj triglicerida ne smije prijeći 15%.



Legenda:

1 = Slobodne masne kiseline

2 = Monogliceridi

3 = Digliceridi

4 = Trigliceridi

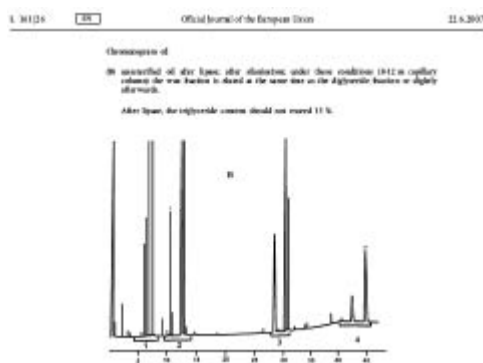
* = 2-monopalmitin

** = Triglicerid C54

Kromatogram:

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

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



Legenda:

1 = Slobodne masne kiseline

2 = Monogliceridi

3 = Digliceridi

4 = Trigliceridi

* = 2-monopalmitin

** = Triglicerid C54

8. BILJEŠKE

Bilješka 1. PRIPREMA LIPAZE

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

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

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

Bilješka 2. PRAĆENJE AKTIVNOSTI LIPAZE

Pripraviti emulziju maslinovog ulja kako slijedi:

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

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

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

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

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

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

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

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

gdje je:

A aktivnost u jedinicama lipaze /mg

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

N titar otopine natrijevog hidroksida

m masa u mg ispitne lipaze.

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

PRILOG VIII

SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA U ULTRALJUBIČASTOM PODRUČJU

PREDGOVOR

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

Do apsorbancije na valnim duljinama navedenim u metodi dolazi zbog prisutnosti konjugiranih dienskih i trienskih sustava. Te apsorbancije izražene su kao specifične ekstinkcije $E_{1\%}^{1\text{ cm}}$ (ekstinkcija 1%-tne otopine masti u specificiranom otapalu, s duljinom puta od 1 cm) i dogovorno se označavaju s K (također i kao »koeficijent ekstinkcije«).

1. OPSEG

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

2. PRINCIP METODE

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

3. OPREMA

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

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

3.3. Odmjerne tikvice od 25 ml.

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

4. REAGENSI

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

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

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

4.3. n-heksan, za kromatografiju.

5. POSTUPAK

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

5.2. Od tako pripremljenog uzorka točno se odvaže oko 0,25 g u odmjernu tikvicu od 25 ml, nadopuni do oznake specifičiranim otapalom i homogenizira. Dobivena otopina treba biti savršeno bistra. U slučaju da se uoči opalescencija ili mutnoća, potrebno je otopinu brzo filtrirati preko filter papira.

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

Očitane vrijednosti ekstinkcija trebaju se nalaziti unutar intervala od 0,1 do 0,8. U suprotnom treba ponoviti mjerenja radeći prema potrebi sa koncentriranijim ili razrijeđenijim otopinama.

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

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

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

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

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

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

gdje je:

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

E_{λ} = izmjerena ekstinkcija pri valnoj duljini λ ;

c = koncentracija otopine u g/100 ml;

s = debljina kivete u cm.

Rezultati se izražavaju s dva decimalna mjesta.

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

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-1} + K_{m+1}}{2}$$

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

DODATAK I

PRIPREMA ALUMINIJ OKSIDA I PROVJERA NJEGOVE AKTIVNOSTI

A.1.1. Priprema aluminij oksida

Aluminij oksid, prethodno osušen u peći pri temperaturi 380-400°C u trajanju od 3 sata, prenese se u posudu koja se može hermetički zatvoriti, doda destilirana voda u količini od 5 ml na 100 g aluminij oksida. Posuda se odmah zatvori, više puta protrese te ostavi da miruje najmanje 12 sati prije upotrebe.

A.1.2. Provjera aktivnosti aluminij oksida

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

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

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

DODATAK II

KALIBRACIJA SPEKTROFOTOMETRA

A.2. Redovito se mora provjeravati podešenje valne duljine i točnost odziva uređaja (najmanje svakih 6 mjeseci).

A.2.1. Valna duljina može se provjeravati pomoću živine vakuum svjetiljke ili prikladnim filtrima.

A.2.2. Kako bi se provjerio odziv fotoćelije i fotomultiplikatora postupi se na sljedeći način: izvaže se 0,2000 g čistog kalij kromata za spektrometriju i otopi u otopini kalij hidroksida,

koncentracije 0,05 mol/l u odmjernej tikvici od 1000 ml te nadopuni do oznake. Uzme se točno 25 ml dobivene otopine, prenese u odmjernu tikvicu od 500 ml i razrijedi do oznake istom otopinom kalij hidroksida.

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

PRILOG IX A

ODREĐIVANJE METIL ESTERA MASNIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. OPSEG

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

Ova se metoda ne može primijeniti na polimerizirane masne kiseline.

2. REAGENSI

2.1. Plin nositelj

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

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

2.2. Pomoćni plinovi

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

2.2.2. Zrak ili kisik, bez organskih nečistoća.

2.3. Referentni standard

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

Potrebno je poduzeti mjere da se spriječi oksidacija polinezasićenih masnih kiselina.

3. APARATURA

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

3.1. Plinski kromatograf

Plinski kromatograf treba sadržavati sljedeće elemente:

3.1.1. Sustav za injektiranje

Koristi se sustav za injektiranje:

(a) ili s punjenim kolonama, s najmanjim mogućim mrtvim prostorom (deadspace); u ovom slučaju, sustav za injektiranje treba biti takav da se može zagrijavati na temperaturu 20 do 50°C višu od temperature kolone; ili

(b) s kapilarnim kolonama; u tom slučaju, sustav za injektiranje treba biti posebno oblikovan za upotrebu s takvim kolonama. Može biti s razdvajanjem protoka (tipa »split«) ili bez razdvajanja protoka (tipa »splitless«) za izravno unošenje u kolonu (on-column).

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

3.1.2. Pećnica

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

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

3.1.3. Punjena kolona

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

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

(b) unutarnji promjer: 2 do 4 mm.

Napomena 3. Ako su prisutne polinezasićene komponente s više od tri dvostruke veze, u koloni od nehrđajućeg čelika može doći do njihove razgradnje.

Napomena 4. Može se koristiti sistem s dvostrukim kolonama.

3.1.3.2. Punjenje, koje sadrži sljedeće elemente:

(a) *čvrsti nosač*: dijatomejska zemlja, isprana kiselinom i silanizirana ili drugi prikladni inertni čvrsti nosač s uskim rasponom veličine čestica (raspon od 25 µm unutar granica od

125 do 200 μm), pri čemu prosječna veličina čestica ovisi o unutarnjem promjeru i duljini kolone;

(b) *stacionarna faza*: poliesterni tip polarne tekućine (npr. dietilenglikol polisukcinat, butandiol polisukcinat, etilenglikol poliadipat itd.), cijanosilikoni ili bilo koja druga tekućina koja omogućuje traženo kromatografsko razdvajanje (vidjeti točku 4.). Stacionarna faza treba činiti 5 do 20% (m/m) punjenja. Za neka razdvajanja može se koristiti nepolarna stacionarna faza.

3.1.3.3. Kondicioniranje kolone

Uz kolonu, po mogućnosti odvojenu od detektora, postupno se zagrijava pećnica do 185°C i propušta struja inertnog plina kroz svježe pripremljenu kolonu brzinom od 20 do 60 ml/min najmanje 16 sati pri toj temperaturi te sljedeća 2 sata pri 195°C.

3.1.4. Kapilarna kolona

3.1.4.1. Kapilara, od materijala inertnog prema tvarima koje se analiziraju (obično se koristi staklena ili kvarcna kapilara). Unutarnji promjer treba biti između 0,2 i 0,8 mm. Unutarnja površina treba biti odgovarajuće obrađena (npr. priprema površine, inaktivacija) prije nanošenja sloja stacionarne faze. U većini slučajeva dovoljna je duljina od 25 mm.

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

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

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

3.1.4.3. Umetanje i podešavanje kolone

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

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

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

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

3.2. Šprica s iglom

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

3.3. Pisač

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

(a) vrijeme odziva kraće od 1,5 s, po mogućnosti 1 s (vrijeme odziva je vrijeme potrebno da igla pisača prijeđe put od 0 do 90% nakon trenutnog uvođenja signala od 100%);

(b) širina papira minimalno 20 cm;

(c) brzina papira podesiva na vrijednosti između 0,4 i 2,5 cm/min.

3.4. Integrator

Brzo i točno izračunavanje moguće je uz pomoć elektroničkog integratora. Na ovaj način dobiva se linearni odziv odgovarajuće osjetljivosti, a korekcija na devijaciju startne linije mora biti zadovoljavajuća.

4. POSTUPAK

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

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

4.1. Uvjeti analize

4.1.1. Odabir optimalnih radnih uvjeta

4.1.1.1. Punjena kolona

Pri izboru radnih uvjeta potrebno je uzeti u obzir:

(a) duljinu i promjer kolone;

(b) vrstu i količinu stacionarne faze;

(c) temperaturu kolone;

(d) protok plina nositelja;

(e) traženu rezoluciju;

(f) veličinu uzorka, koja mora biti odabrana tako da detektor i elektrometar daju linearan odziv;

(g) trajanje analize.

Općenito, vrijednosti navedene u Tablici 1 i Tablici 2 dovest će do željenih rezultata, tj. najmanje 2000 teoretskih tavana po metru duljine kolone za metil stearat i njegovo eluiranje za približno 15 minuta.

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

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

Tablica 1

Unutarnji promjer kolone mm	Protok plina nositelja ml/min
2	15 do 25
3	20 do 40
4	41 do 60

Tablica 2

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

4.1.1.2. Kapilarna kolona

Svojstva kapilarnih kolona (učinkovitost i propusnost) znače da razdvajanje spojeva i trajanje analize u velikoj mjeri ovise o protoku plina nositelja u koloni. Stoga je nužno optimizirati radne uvjete podešavanjem ovog parametra (ili jednostavnije promjene tlaka), ovisno o tome želi li se poboljšati razdvajanje ili postići veća brzina analize.

4.1.2. Određivanje broja teoretskih tavana (učinkovitost) i rezolucije

(vidi Sliku 1).

Izvrši se analiza smjese metil stearata i metil oleata u približno jednakim udjelima (na primjer, metil esteri iz kakao maslaca).

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

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

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

i rezolucija, R , koristeći izraz:

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

gdje je:

dr_1 udaljenost u milimetrima od početka kromatograma do maksimuma pika metil stearata;

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

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

i indeks rezolucije, I_r , prema izrazu

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

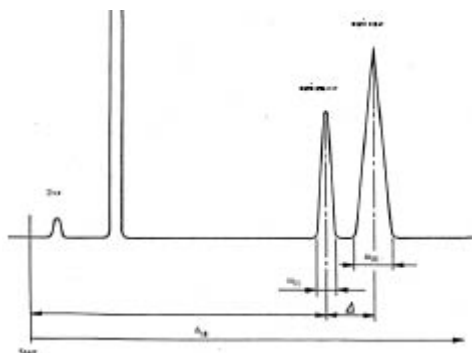
gdje je:

a = visina najmanjeg pika, mjerena od bazne linije;

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

Slika 1

Kromatogram za određivanje broja teoretskih tavana (učinkovitosti) i rezolucije



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

4.2. Količina uzorka za ispitivanje

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

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

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

4.3. Analiza

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

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

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

Ako je potrebno, preporučuje se da se analiza izvrši na dvije faze različitih polarnosti kako bi se potvrdila odsutnost maskiranih pikova, na primjer u slučaju istovremene prisutnosti C18:3 i C20:0, ili konjugiranih C18:3 i C18:2.

4.4. Priprema referentnog kromatograma i referentnih grafova

Analizira se referentni standard (2.3) u istim radnim uvjetima kao i za uzorak, i izmjeri se vrijeme zadržavanja ili udaljenosti zadržavanja za masne kiseline u standardu. Na polulogaritamskom papiru konstruiraju se, za svaki stupanj nezasićenosti posebno, grafovi koji prikazuju ovisnost logaritma vremena ili udaljenosti zadržavanja kao funkcije broja C-atoma. U izotermalnim uvjetima, grafovi za ravnolančane kiseline istog stupnja nezasićenosti trebaju biti ravne linije. Ove linije trebaju biti približno paralelne.

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

5. IZRAŽAVANJE REZULTATA

5.1. Kvalitativna analiza

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

5.2. Kvantitativna analiza

5.2.1. Određivanje sastava

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

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

5.2.2. Način izračunavanja

5.2.2.1. Opći slučaj

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

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

gdje je:

A_i površina ispod pika koji odgovara komponenti i ;

ΣA suma površina ispod svih pikova.

Rezultat se izražava na jedno decimalno mjesto.

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

5.2.2.2. Upotreba faktora korekcije

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

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

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

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

gdje je:

m_i masa komponente i u referentnoj smjesi;

Σm zbroj masa različitih komponenata referentne smjese.

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

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

gdje je:

A_i površina ispod pika koji odgovara komponenti i ;

ΣA suma površina ispod svih pikova.

Faktor korekcije tada se računa kao:

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

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

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

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

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

Rezultati se izražavaju na jedno decimalno mjesto.

5.2.2.3. Upotreba internog standarda

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

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

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

gdje je:

A_i površina ispod pika koji odgovara komponenti i ;

As površina ispod pika koji odgovara internom standardu;

Ki' je faktor korekcije za komponentu i (u odnosu na KC1);

Ks' je faktor korekcije za interni standard (u odnosu na KC16);

m je masa uzorka u mg;

ms je masa internog standarda u mg.

Rezultati se izražavaju na jedno decimalno mjesto.

6. POSEBAN SLUČAJ – ODREĐIVANJE TRANS IZOMERA

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

6.1. Silikatna kapilarna kolona, unutarnjeg promjera između 0,25 i 0,32 mm i duljine 50 m, obložena cijanopropilsilikonom, debljine sloja između 0,1 i 0,3 μm (tip SP 2380, C.P. sil 88, silor 10 i slični tipovi).

6.2. Metil esteri pripremaju se prema postupku opisanom u Prilogu IX B. Kao mjera predostrožnosti, masne tvari s više od 3% slobodnih masnih kiselina moraju se neutralizirati u skladu s točkom 6.1 Priloga VII.

6.3. Radni uvjeti za plinsku kromatografiju općenito su sljedeći:

- temperatura kolone postavljena između 150°C i 230°C (na primjer 15 minuta pri 165°C, povećavajući nakon toga za 5°C u minuti do 200°C);

- temperatura injektora: 250°C ako se koristi sistem s razdvajanjem protoka, ili početna temperatura kolone ako se koristi on-column sistem;

- temperatura detektora: 260°C;

- brzina protoka plina nositelja (helija ili vodika): 1,2 ml u minuti.

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

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

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

Slika 2:

Plinski kromatogram *trans* izomera masnih kiselina uz upotrebu kapilarne kolone.

Varijabla	Vrijednost/uvjet
Kolona	Duljina: 2 do 4 m
	Unutarnji promjer: 4 mm
Čvrsti nosač	Veličina zrna punila između 160 i 200 μm

Koncentracija stacionarne faze	15 do 25% (m/m)
Plin nositelj	Helij ili, ako nije dostupan, vodik, sa što je manje mogućim udjelom kisika
Pomoćni plinovi	Ne
Temperatura injektora	Od 40 do 60°C iznad temperature kolone
Temperatura kolone	180 do 200°C
Protok plina nositelja	Obično između 60 i 80 ml/min
Veličina injektiranog uzorka	Obično između 0,5 i 2 µl

8. ANALITIČKO IZVJEŠĆE

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

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

PRILOG IX B

PRIPREMA METIL ESTERA MASNIH KISELINA IZ ULJA OD PLODA I KOMINE MASLINA

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

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

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

(a) određivanje razlike između stvarnog i teoretskog udjela triglicerida s ECN42 (Δ ECN42):

– metoda A primjenjuje se na uzorke svih kategorija ulja nakon pročišćavanja ulja prolaskom kroz kolonu silikagela;

(b) određivanje sastava masnih kiselina:

– metoda A primjenjuje se izravno na uzorke sljedećih kategorija ulja:

- djevičansko maslinovo ulje s manje od 3,3% slobodnih masnih kiselina,
- rafinirano maslinovo ulje,
- maslinovo ulje (mješavina djevičanskih maslinovih ulja i rafiniranog maslinovog ulja),
- rafinirano ulje komine maslina,
- ulje komine maslina (mješavina djevičanskih maslinovih ulja i rafiniranog ulja komine maslina),
- metoda B primjenjuje se izravno na uzorke sljedećih kategorija ulja:
- djevičansko maslinovo ulje s više od 3,3% slobodnih masnih kiselina,
- sirovo ulje komine maslina;

(c) određivanje trans izomera masnih kiselina:

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

PROČIŠĆAVANJE UZORAKA ULJA

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

Druga mogućnost je ekstrakcija na čvrstoj fazi uz upotrebu SPE silikagel kolona. SPE silikagel kolona (1 g, 6 ml) smjesti se u uređaj za eluiranje pod vakuumom i ispere sa 6 ml heksana. Vakuum se isključi kako se kolona ne bi isušila, a zatim se u kolonu stavi otopina ulja (oko 0,12 g) u 0,5 ml heksana i uključi vakuum tako da otopina proдре u silikagel. Eluira se pod vakuumom s 10 ml smjese heksan/dietileter (87:13 v/v). Ukupni eluat se homogenizira i podjeli na dva po volumenu približno jednaka dijela. Prvi dio se upari do suha u rotacijskom

vakuum uparivaču na sobnoj temperaturi. Ostatak se otopi u 1 ml heptana. Otopina je spremna za analizu masnih kiselina plinskom kromatografijom. Drugi dio se upari, a ostatak otopi u 1 ml acetona za analizu triglicerida HPLC metodom, ukoliko je potrebno.

METODE PRIPREME METIL ESTERA MASNIH KISELINA

1. Metoda A: Transesterifikacija hladnom metanolnom otopinom kalij hidroksida

1.1. Svrha

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

1.2. Princip

Metil esteri formiraju se transesterifikacijom s metanolnom otopinom kalij hidroksida, kao međuprodukti prije nego što nastupi saponifikacija (naslov 5 u ISO-5509:2000, naslov 5 u IUPAC metodi 2.301).

1.3. Reagensi

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

Heptan, kromatografske čistoće.

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

1.4. Aparatura

Epruvete od 5 ml s navojnim čepom s PTFE spojem

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

1.5. Postupak

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

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

2.1. Svrha

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

2.2. Princip

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

2.3. Reagensi

- Heptan, kromatografske čistoće.
- Metanol koji ne sadrži više od 0,05% (m/m) vode.
- 0,2 mol/l metanolna otopina natrij metilata: otopi se 5 g natrija u 1000 ml metanola (može se pripremiti od otopina dostupnih na tržištu),
- Fenolftalein, 0,2%-tna metanolna otopina,
- Sulfatna kiselina, 0,5 mol/l u metanolnoj otopini: u 100 ml metanola doda se 3 ml 96%-tne sulfatne kiseline,
- Zasićena otopina natrij klorida u vodi.

2.4. Aparatura

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

2.5. Postupak

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

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

Upozorenje: Metilacija metodom B mora se raditi u digestoru.

2.6. Alternative metilaciji prema Metodi B

2.6.1. Metoda C

2.6.1.1. Princip

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

2.6.1.2. Aparatura

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

2.6.1.3. Reagensi

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

Heksan, kromatografske čistoće.

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

2.6.1.4. Postupak

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

2.6.2. Metoda D

2.6.2.1. Princip

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

2.6.2.2. Aparatura

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

2.6.2.3. Reagensi

- Reagens za metilaciju: bezvodna smjesa metanola, heksana i koncentrirane sulfatne kiseline ($\rho = 1,84$) u omjeru 75:25:1 (v/v/v).
- Petroleter, 40 do 60°C.
- Bezvodni natrij sulfat.

2.6.2.4. Postupak

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

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

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

Otapalo se ispari u vodenoj kupelji u struji dušika.

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

3. Parametri preciznosti

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

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

1. Postupak

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

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

2. Izračunavanje

2.1. Za izračunavanje sastava masnih kiselina i ΔECN_{42} , u obzir se uzimaju sve navedene masne kiseline:

Miristinska (14:0).

Palmitinska (16:0). Suma površina pikova koji odgovaraju metil i etil esterima.

Palmitoleinska (16:1). Suma površina pikova koji odgovaraju ω_9 i ω_7 izomerima metil estera.

Heptadekanska/Margarinska (17:0).

Heptadecenska/Margaroleinska (17:1).

Stearinska (18:0).

Oleinska (18:1). Suma površina pikova koji odgovaraju ω_9 i ω_7 izomerima metil estera, etil esterima i *trans* izomerima metil estera.

Linolna (18:2). Suma površina pikova koji odgovaraju metil i etil esterima i *trans* izomerima metil estera.

Arahinska (20:0).

Linolenska (18:3). Suma površina pikova metil estera i *trans* izomera metil estera.

Gadoleinska (20:1).

Behenska (22:0).

Lignocerinska (24:0).

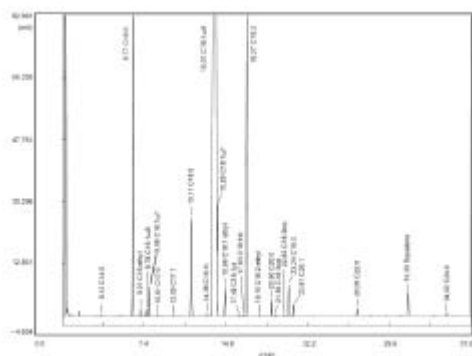
Skvalen se ne uzima u obzir za izračunavanje ukupne površine.

2.2. Za izračunavanje postotka *trans*-18:1 koristi se pik koji odgovara metil esterima ove masne kiseline. Za sumu [*trans*-18:2 + *trans*-18:3], zbrajaju se svi pikovi koji odgovaraju

trans izomerima ovih dviju masnih kiselina. Za izračunavanje ukupne površine, uzimaju se u obzir svi pikovi navedeni u 2.1. (vidjeti COI/T.20/Doc. Br. 17).

Izračunavanje postotka svake masne kiseline vrši se prema formuli:

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



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

PRILOG X

ODREĐIVANJE UDJELA HLAPLJIVIH HALOGENIRANIH OTAPALA U MASLINOVOM ULJU

1. METODA

Analiza plinskom kromatografijom i primjenom »head space« tehnike (tehnike nadprostora).

2. OPREMA

2.1. Plinski kromatograf s detektorom elektronskog zahvata (ECD).

2.2. Oprema za »head space« tehniku.

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

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

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

2.6. Kliješta za hermetičko zatvaranje.

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

3. REAGENSI

Standard: halogenirana otapala čistoće prikladne za plinsku kromatografiju.

4. POSTUPAK

4.1. Točno se odvažuje oko 3 g ulja u staklenu tikvicu (koja se ne može ponovno upotrijebiti) koja se hermetički zatvori. Tikvica se ostavi u termostatu 1 sat pri 70°C. Pomoću šprice se iz parne faze koja je u ravnoteži s tekućinom (head space) usiše između 0,2 i 0,5 ml te se injektira u kolonu plinskog kromatografa koji je podešen na sljedeće uvjete:

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

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

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

4.3. Kvantitativno određivanje: uspostavi se korelacija između površina ili visina pikova uzorka i površina/visina pikova standardne otopine čija je koncentracija najbliža očekivanoj koncentraciji. Ukoliko je odstupanje veće od 10%, potrebno je ponoviti analizu usporedbom s drugom standardnom otopinom dok se ne postigne odstupanje manje od 10%. Udio se određuje na temelju prosjeka pojedinačnih injektiranja.

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

PRILOG XI

METODA MEĐUNARODNOG VIJEĆA ZA MASLINU ZA SENZORSKO OCJENJIVANJE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

1. SVRHA I PRIMJENA

Ovim se Prilogom propisuje postupak ocjene organoleptičkih svojstava djevičanskih maslinovih ulja u smislu Priloga XVI, točka 1 Uredbe EU n. 1234/2007 te postupak njihove klasifikacije na temelju tih svojstava. Ovaj Prilog sadrži i upute za neobavezno označavanje proizvoda.

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

2. OPĆENITO

U pogledu definicija osnovnih pojmova, prostorija za ocjenjivanje, čaša za kušanje te bilo kojeg drugog pitanja vezanog uz ovu metodu, preporučuje se sukladnost s odredbama Međunarodnog vijeća za maslinu, u prvom redu s Odlukom n. DEC-21/95-V/2007 od 16.11.2007. o reviziji metode za senzorsko ocjenjivanje djevičanskih maslinovih ulja.

3. SPECIFIČNI RJEČNIK

3.1. Pozitivna svojstva

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

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

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

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

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

3.2. Negativna svojstva

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

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

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

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

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

Kuhano ili prekuhano: prepoznatljiv okus i miris uzrokovan pretjeranim i/ili predugim zagrijavanjem tijekom prerade, a osobito miješenjem maslinovog tijesta u termički nepovoljnim uvjetima.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.3. Neobavezna terminologija kod označavanja proizvoda

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

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

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

ii) pojam »srednje« može se koristiti kad je medijan svojstva između 3 i 6;

iii) pojam »blago« može se koristiti kad je medijan svojstva manji od 3;

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

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

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

4. PANEL

Panel čine voditelj panela i 8 – 12 ocjenjivača.

Voditelj panela treba biti izvježbani stručnjak s dobrim poznavanjem različitih vrsti ulja. Voditelj je odgovoran za organizaciju i djelovanje panela, uključujući pripremu, šifriranje i dostavljanje uzoraka ocjenjivačima te za prikupljanje i statističku obradu podataka.

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

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

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

5. POSTUPAK SENZORSKE ANALIZE I KLASIFICIRANJE

5.1. Upotreba ocjenjivačkog listića od strane ocjenjivača

Listić koji koriste ocjenjivači prikazan je u Dodatku A.

Svaki ocjenjivač mora pomirisati, a zatim i kušati ([4]) ulje koje se nalazi u čaši za ocjenjivanje te na linijskoj skali od 10 cm na obrascu za ocjenjivanje označiti intenzitet svakog negativnog i pozitivnog svojstva. Ako ocjenjivač raspozna *zeleni* ili *zreli* tip *voćnog* mirisa i okusa, tada to treba označiti u odgovarajućem kvadratiću na obrascu za ocjenjivanje.

Ako ocjenjivač zamijeti negativna svojstva koja nisu navedena na listiću, ona se moraju navesti pod »Ostalo«, koristeći izraze navedene pod 3.2. koji ih najbolje opisuju.

5.2. Obrada podataka od strane voditelja panela

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

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

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

Voditelj panela može izdati potvrdu o sukladnosti ulja s zahtjevima iz točke 3.3., a za korištenje pojmova *zeleno* ili *zrelo* samo ako je najmanje 50% članova panela označilo da ulje ima dotični tip *voćnog* mirisa i okusa.

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

5.3. Klasificiranje uzoraka ulja

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

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

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

(b) *djevičansko maslinovo ulje*: medijan negativnih svojstava veći od nule i manji ili jednak 3,5 a medijan voćnog mirisa veći od nule;

(c) *maslinovo ulje lampante*: medijan negativnih svojstava veći od 3,5; ili medijan negativnih svojstava manji ili jednak 3,5 a medijan voćnog mirisa jednak nuli.

5.4. Poseban slučaj

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

DODATAK A

OBRAZAC ZA OCJENJIVANJE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

ZAMIJEĆENA NEGATIVNA SVOJSTVA	INTENZITET	
Upaljen plod/uljni	→	talog
Pljesnivo/vlažno	→	
Vinski-octikavo/kiselo	→	

Metalno	→	
Užeglo	→	
Ostalo (navesti)	→	
ZAMIJEĆENA POZITIVNA SVOJSTVA		
Voćno	→	
zeleno ≤	zrelo ≤	
Gorko	→	
Pikantno	→	
Ime ocjenjivača:		
Šifra uzorka:		
Datum:		
Komentari:		

DODATAK B

METODA IZRAČUNAVANJA MEDIJANA I INTERVALA POUZDANOSTI

Medijan

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

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

Gruba standardna devijacija

U cilju pouzdanog procjenjivanja varijabilnosti oko medijana koristi se procjena grube standardne devijacije prema Stuartu i Kendallu. Sljedeća jednadžba prikazuje asimptotsku standardnu devijaciju tj. grubu procjenu varijabilnosti promatranih podataka, gdje N predstavlja broj podataka a IQR je međukvartilni interval. IQR obuhvaća točno 50% slučajeva u bilo kojoj distribuciji vjerojatnosti.

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

Izračunavanje međukvartilnog intervala provodi se računanjem razlike između 75-tog i 25-tog postotnika.

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

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

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

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

Grubi koeficijent varijacije (%)

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

$$CVR = \frac{S}{Me} 100$$

Interval pouzdanosti od 95% u odnosu na medijan

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

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

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

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

PRILOG XII

ODREĐIVANJE STIGMASTADIENA U BILJNIM ULJIMA

1. SVRHA

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

2. PRIMJENA

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

3. PRINCIP

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

4. APARATURA

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

4.2. Lijeenci za odjeljivanje od 500 ml.

4.3. Tikvice s okruglim dnom od 100 ml.

4.4. Rotirajući vakuum-uparivač.

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

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

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

Napomena 1:

Mogu se upotrijebiti i druge kolone slične ili niže polarnosti.

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

4.9. Mikrolitarska šprica za plinsku kromatografiju od 5 do 10 μl sa čvrsto fiksiranom iglom.

4.10. Električni grijaći plašt ili ploča.

5. REAGENSI

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

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

Napomena 2:

Otapalo se mora destilirati kako bi se uklonile nečistoće.

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

5.3. Bezvodni natrij sulfat.

5.4. Alkoholna otopina kalij hidroksida, 10%-tna. 10 ml vode doda se u 50 g kalij hidroksida, promiješa i nadopuni do 500 ml etanolom.

Napomena 3:

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

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

Napomena 4:

U pravilu, može se koristiti silikagel iz originalnog pakovanja bez bilo kakve obrade. Međutim, neke proizvodne serije silikagela pokazuju nižu aktivnost, što dovodi do lošeg kromatografskog razdvajanja. U tom slučaju, silikagel se obrađuje na sljedeći način: aktivira se zagrijavanjem na 550°C najmanje 4 sata. Nakon zagrijavanja, silikagel se smjesti u eksikator gdje se hladi te zatim prebaci u tikvicu sa čepom. Doda se 2% vode i trese do nestanka grudica i postizanja sipkosti.

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

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

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

Napomena 5:

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

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

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

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

6. POSTUPAK

6.1. Priprema neosapunjivih tvari

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

Napomena 6:

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

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

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

6.2. Izdvajanje frakcije steroidnih ugljikovodika

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

Napomena 7:

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

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

Napomena 8:

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

6.3. Plinska kromatografija

6.3.1. Uvjeti rada za sustav injektiranja s razdvajanjem protoka:

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

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

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

6.3.2. Identifikacija pikova

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

Napomena 9:

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

6.3.3. Kvantitativna analiza

Udio stigmastadiena određuje se pomoću sljedećeg izraza:

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

gdje je:

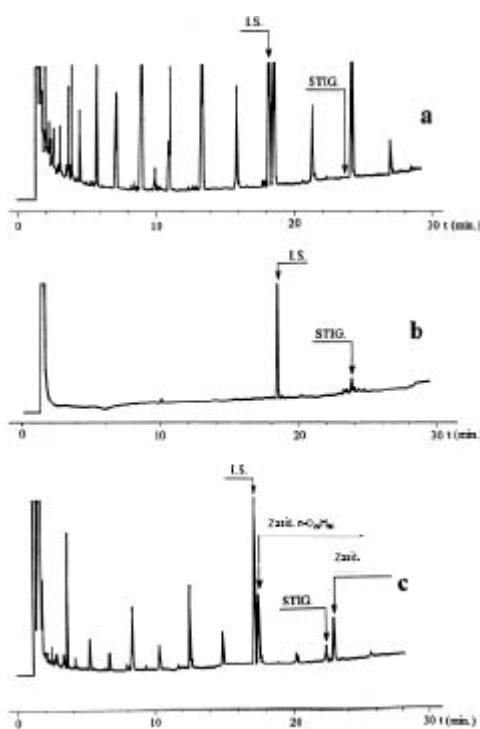
A_s = površina pika stigmastadiena (u slučaju dva izomera, zbroj površina dvaju pikova)

A_c = površina internog standarda (kolestadien)

M_c = masa dodanog standarda, u mikrogramima

M_o = masa ulja, u gramima

Granica detekcije: oko 0,01 mg/kg.



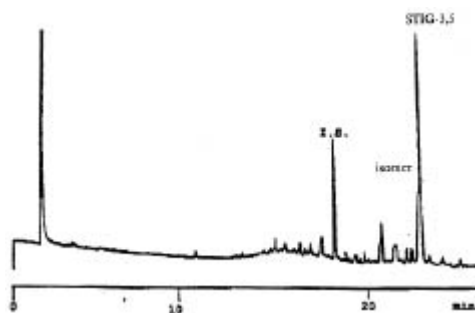
Slika 1.

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

(a) Prva frakcija (30 ml) djevičanskog maslinovog ulja, s dodanim standardom.

(b) Druga frakcija (40 ml) maslinovog ulja koje sadrži 0,10 mg/kg stigmastadiena.

(c) Druga frakcija (40 ml) koja sadrži malu količinu prve frakcije.



Slika 2.

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

PRILOG XIII

ODREĐIVANJE TRIACILGLICEROLA S ECN 42 (RAZLIKA IZMEĐU PODATAKA DOBIVENIH HPLC-om I TEORETSKE KOLIČINE)

1. Opseg

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

2. Područje primjene

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

3. Princip

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

4. Metoda

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

4.1. Aparatura

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

4.1.2. Laboratorijske čaše od 100 ml.

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

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

4.1.5. Stakleni štapić duljine 600 mm.

4.1.6. Stakleni lijevak promjera 80 mm.

4.1.7. Odmjerne tikvice od 50 ml.

4.1.8. Odmjerne tikvice od 20 ml.

4.1.9. Rotirajući vakuum uparivač.

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

4.1.11. Jedinica za injektiranje volumena 10 µl.

4.1.12. Detektor: diferencijalni refraktometar. Osjetljivost na punoj skali treba biti najmanje 10⁻⁴ jedinica indeksa refrakcije.

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

4.1.14. Pisač i/ili integrator.

4.2. Reagensi

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

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

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

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

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

4.2.5. Staklena vuna.

4.2.6. Aceton.

4.2.7. Acetonitril.

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

4.2.9. Otapalo: aceton.

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

4.3. Priprema uzorka

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

4.3.1. Priprema kromatografske kolone

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

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

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

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

4.3.2. Kromatografija na koloni

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

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

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

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

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

4.4. Analiza HPLC metodom

4.4.1. Priprema uzoraka za kromatografiju

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

4.4.2. Postupak

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

4.4.3. Izračunavanje i izražavanje rezultata

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

% triglicerida = površina pika x 100/ zbroj površina pikova.

Rezultati se izražavaju na najmanje dva decimalna mjesta.

Napomena 1: Redoslijed eluiranja može se odrediti izračunavanjem ekvivalentnog broja ugljika, koji se često definira izrazom $ECN = CN - 2n$, gdje je CN broj atoma ugljika, a n broj dvostrukih veza. ECN se može preciznije izračunati uzimajući u obzir porijeklo dvostruke veze. Ako su no, nl i nln brojevi dvostrukih veza oleinske, linolne odnosno linolenske kiseline, ekvivalentni broj ugljika može se izračunati pomoću izraza:

$$ECN = CN - do - dl - dln - dlnln$$

gdje se koeficijenti do, dl i dln mogu izračunati na osnovi referentnih triglicerida. U uvjetima propisanim ovom metodom, približno vrijedi sljedeći odnos:

$$ECN = CN - (2,60 no) - (2,35 nl) - (2,17 nln),$$

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

Lichrosphere (Merck) 100 CH18 Art. 50377 ili ekvivalentni materijal.

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

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

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

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

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

4.5. Izračunavanje udjela triacilglicerola

4.5.1. Određivanje sastava masnih kiselina

Sastav masnih kiselina određuje se plinskom kromatografijom prema metodi opisanoj u Prilogu X A Uredbe (EEC) br. 2568/91, uz upotrebu kapilarne kolone. Metil esteri masnih kiselina pripremaju se prema Prilogu X B ovoga Pravilnika (alkoholna otopina natrij metilata).

4.5.2. Masne kiseline koje se uzimaju u obzir za izračunavanje

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

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

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

$$\left. \begin{array}{l} \text{Mol } P = \frac{\% \text{ površina } P}{\text{Mm } P} \quad \text{Mol } S = \frac{\% \text{ površina } S}{\text{Mm } S} \quad \text{Mol } Po = \frac{\% \text{ površina } Po}{\text{Mm } Po} \\ \text{Mol } O = \frac{\% \text{ površina } O}{\text{Mm } O} \quad \text{Mol } L = \frac{\% \text{ površina } L}{\text{Mm } L} \quad \text{Mol } Ln = \frac{\% \text{ površina } Ln}{\text{Mm } Ln} \end{array} \right\} (1)$$

4.5.4. Normalizacija masnih kiselina na 100%

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

(2)

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

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

$$\text{Mol \% ZMK} = \text{Mol \% P} + \text{Mol \% S} \quad (3)$$

$$\text{Mol \% NMK} = 100 - \text{Mol \% ZMK}$$

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

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

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

$$\text{Mol \% P(2)} = \text{Mol \% P (1,2,3)} \times 0,06 \quad (4)$$

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

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

$$\begin{aligned}\text{Mol \% P(2)} &= \frac{\text{Mol \% P(1,2,3)}}{\text{Mol \% NMK}} \times (100 - \text{Mol \% P(2)} - \text{Mol \% S(2)}) \\ \text{Mol \% O(2)} &= \frac{\text{Mol \% O(1,2,3)}}{\text{Mol \% NMK}} \times (100 - \text{Mol \% P(2)} - \text{Mol \% S(2)}) \\ \text{Mol \% L(2)} &= \frac{\text{Mol \% L(1,2,3)}}{\text{Mol \% NMK}} \times (100 - \text{Mol \% P(2)} - \text{Mol \% S(2)}) \\ \text{Mol \% Ln(2)} &= \frac{\text{Mol \% Ln(1,2,3)}}{\text{Mol \% NMK}} \times (100 - \text{Mol \% P(2)} - \text{Mol \% S(2)})\end{aligned} \quad (5)$$

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

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

(6)

4.5.6. Izračunavanje triacilglicerola

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

$$\text{Mol \% AAA} = \frac{\text{Mol \% A(1,3)} + \text{Mol \% A(2)} + \text{Mol \% A(1,3)}}{10000} \quad (7)$$

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

$$\begin{aligned}
\text{Mol \% AAB} &= \frac{\text{Mol \% A(1,3)} + \text{Mol \% A(2)} + \text{Mol \% B(1,3)} + 2}{10000} \\
\text{Mol \% ABA} &= \frac{\text{Mol \% A(1,3)} + \text{Mol \% B(2)} + \text{Mol \% A(1,3)}}{10000}
\end{aligned}$$

(8)

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

$$\begin{aligned}
\text{Mol \% ABC} &= \frac{\text{Mol \% A(1,3)} + \text{Mol \% B(2)} + \text{Mol \% C(1,3)} + 2}{10000} \\
\text{Mol \% BCA} &= \frac{\text{Mol \% B(1,3)} + \text{Mol \% C(2)} + \text{Mol \% A(1,3)} + 2}{10000} \\
\text{Mol \% CAB} &= \frac{\text{Mol \% C(1,3)} + \text{Mol \% A(2)} + \text{Mol \% B(1,3)} + 2}{10000}
\end{aligned}$$

(9)

4.5.6.4. Triacilgliceroli s ECN 42

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

LLL

PoLL i pozicijski izomer LPoL

OLLn i pozicijski izomeri OLnL i LnOL

PoPoL i pozicijski izomer PoLPo

PoOLn i pozicijski izomeri OPoLn i OLnPo

PLLn i pozicijski izomeri LLnP i LnPL

PoPoPo

SLnLn i pozicijski izomer LnSLn

PPoLn i pozicijski izomeri PLnPo i PoPLn

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

5. Ocjenjivanje rezultata

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

Napomena: Rezultati se izražavaju na jedno decimalno mjesto.

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

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

Plinskom kromatografijom dobivaju se sljedeći podaci o sastavu masnih kiselina:

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

4.5.3. Preračunavanje % površina u molove za sve masne kiseline

$$\text{Mol } P = \frac{10}{256,4} = 0,03900... \text{mola } P$$

$$\text{Mol } S = \frac{3}{284,5} = 0,01054... \text{mola } S$$

$$\text{Mol } Po = \frac{1}{254,4} = 0,00393... \text{mola } Po$$

$$\text{Mol } O = \frac{75}{282,5} = 0,26549... \text{mola } O$$

$$\text{Mol } L = \frac{10}{280,4} = 0,03566... \text{mola } L$$

$$\text{Mol } Ln = \frac{1}{278,4} = 0,003594... \text{mola } Ln$$

Vidjeti jednadžbu (1)

Ukupno = 0,35822 Mol TAG

4.5.4. Normalizacija masnih kiselina na 100%

$$\text{Mol \% } P(1,2,3) = \frac{0,03900 \text{mola } P \times 100}{0,35822 \text{mola}} = 10,888\%$$

$$\text{Mol \% } S(1,2,3) = \frac{0,01054 \text{mola } S \times 100}{0,35822 \text{mola}} = 2,944\%$$

$$\text{Mol \% } Po(1,2,3) = \frac{0,00393 \text{mola } Po \times 100}{0,35822 \text{mola}} = 1,097\%$$

$$\text{Mol \% } O(1,2,3) = \frac{0,26549 \text{mola } O \times 100}{0,35822 \text{mola}} = 74,113\%$$

$$\text{Mol \% } L(1,2,3) = \frac{0,03566 \text{mola } L \times 100}{0,35822 \text{mola}} = 9,956\%$$

Vidjeti jednadžbu (2)

$$\text{Mol \% } Ln(1,2,3) = \frac{0,00359 \text{mola } Ln \times 100}{0,35822 \text{mola}} = 1,003\%$$

Ukupno Mol % = 100,0 %

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

Mol % ZMK = 10,888 % + 2,944 % = 13,831 % Vidjeti jednadžbu (3)

Mol % NMK = 100,00 % – 13,831 % = 86,169 % Vidjeti jednadžbu (3)

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

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

Mol % P(2) = 10,888 % x 0,06 = 0,653 Mol % Vidjeti jednadžbu (4)

Mol % S(2) = 2,944 % x 0,06 = 0,177 Mol % Vidjeti jednadžbu (4)

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

$$\begin{aligned}\text{Mol \% Po(2)} &= \frac{1,097 \%}{86,169 \%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 1,263 \% \text{ Mol} \\ \text{Mol \% O(2)} &= \frac{74,113 \%}{86,169 \%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 85,295 \% \text{ Mol} \\ \text{Mol \% L(2)} &= \frac{9,956 \%}{86,169 \%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 11,458 \% \text{ Mol} \\ \text{Mol \% Ln(2)} &= \frac{1,003 \%}{86,169 \%} * (100 - 0,659 - 0,177) = 1,154 \% \text{ Mol}\end{aligned}$$

Vidjeti jednadžbu (5)

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

$$\begin{aligned}\text{Mol \% P(1,3)} &= \frac{10,888 - 0,659}{2} = 10,888 = 16,005 \text{ mola\%} \\ \text{Mol \% S(1,3)} &= \frac{2,944 - 0,177}{2} = 2,944 = 4,327 \text{ mola\%} \\ \text{Mol \% Po(1,3)} &= \frac{1,097 - 1,263}{2} = 1,097 = 1,015 \text{ mola\%}\end{aligned}$$

$$\text{Mol \% O(1,3)} = \frac{74,113 - 85,296}{2} = 74,113 = 68,522 \text{ mola\%}$$

$$\text{Mol \% L(1,3)} = \frac{9,956 - 11,458}{2} = 9,956 = 9,205 \text{ mola\%}$$

$$\text{Mol \% Ln(1,3)} = \frac{1,003 - 1,154}{2} = 1,003 = 0,927 \text{ mola\%}$$

Vidjeti jednadžbu (6)

4.5.6. Izračunavanje triacilglicerola:

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

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

Ukupno	100,0 %	100,0 %
--------	---------	---------

Izračunavaju se sljedeći triacilgliceroli:

LLL

PoPoPo

PoLL s jednim pozicijskim izomerom

SLLn s jednim pozicijskim izomerom

PoPoL s jednim pozicijskim izomerom

PPoLn s dva pozicijska izomera

OLLn s dva pozicijska izomera

PLLn s dva pozicijska izomera

PoOLn s dva pozicijska izomera

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

$$\text{Mol \% LLL} = \frac{9,205 \% + 11,458 \% + 9,205 \%}{10.000} = 0,00708 \text{ Mol LLL}$$

$$\text{Mol \% PoPoPo} = \frac{1,015 \% + 1,263 \% + 1,015 \%}{10.000} = 0,00013 \text{ Mol PoPoPo}$$

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

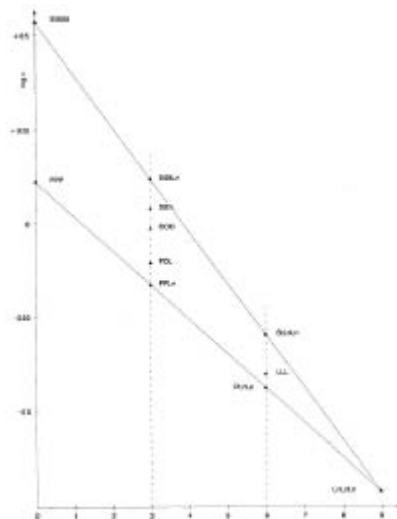
$$\begin{aligned} \text{Mol \% PoLL + LLPo} &= \frac{1,015 \% + 11,458 \% + 9,205 \% + 2}{10.000} = 0,02141 \\ \text{Mol \% LLPo} &= \frac{9,205 \% + 1,263 \% + 9,205 \%}{10.000} = 0,001070 \\ &= 0,03211 \text{ Mol PoLL} \\ \text{Mol \% SLLn + LLLnS} &= \frac{4,327 \% + 1,154 \% + 0,927 \% + 2}{10.000} = 0,00095 \\ \text{Mol \% LrSLn} &= \frac{9,927 \% + 0,177 \% + 0,927 \%}{10.000} = 0,00002 \\ &= 0,00095 \text{ Mol SLLn} \\ \text{Mol \% PoPoL + LLPo} &= \frac{1,015 \% + 1,263 \% + 9,205 \% + 2}{10.000} = 0,00216 \\ \text{Mol \% PoLPo} &= \frac{1,015 \% + 11,458 \% + 1,015 \%}{10.000} = 0,00118 \\ &= 0,00354 \text{ Mol PoPoL} \end{aligned}$$

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

Vidjeti jednadžbu (9)

$\text{Mol \% FeV}_{0.1} = \frac{16,903 \% + 1,263 \% + 0,927 \% + 2}{10000}$	= 0.00375
$\text{Mol \% LaFeP} = \frac{0,927 \% + 8,653 \% + 1,015 \% + 2}{10000}$	= 0.00012
$\text{Mol \% FeLaP} = \frac{1,015 \% + 1,154 \% + 16,405 \% + 2}{10000}$	= 0.00375
	0.00762 Mol $\text{FeV}_{0.1}$
$\text{Mol \% GdLa} = \frac{68,522 \% + 11,458 \% + 0,927 \% + 2}{10000}$	= 0.14577
$\text{Mol \% LaFe} = \frac{0,927 \% + 85,295 \% + 9,205 \% + 2}{10000}$	= 0.14577
$\text{Mol \% LaLaP} = \frac{9,205 \% + 1,154 \% + 68,522 \% + 2}{10000}$	= 0.14577
	0.43671 Mol GdLa
$\text{Mol \% PLiLa} = \frac{18,005 \% + 11,458 \% + 0,927 \% + 2}{10000}$	= 0.0340
$\text{Mol \% LaPL} = \frac{0,927 \% + 0,653 \% + 9,205 \% + 2}{10000}$	= 0.00111
$\text{Mol \% LiLaP} = \frac{9,205 \% + 1,154 \% + 18,005 \% + 2}{10000}$	= 0.0340
	0.06411 Mol PLiLa
$\text{Mol \% FeOLi} = \frac{1,015 \% + 35,265 \% + 0,927 \% + 2}{10000}$	= 0.0168
$\text{Mol \% LaFeOL} = \frac{0,927 \% + 1,263 \% + 68,522 \% + 2}{10000}$	= 0.0168
$\text{Mol \% GdLaOL} = \frac{68,522 \% + 1,154 \% + 1,015 \% + 2}{10000}$	= 0.0168
	0.04815 Mol FeOLi
	0.06549 Mol LaOL

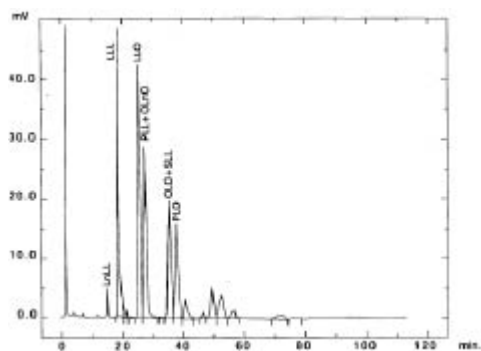
Slika 1: Graf ovisnosti $\log \alpha$ o f (broj dvostrukih veza)



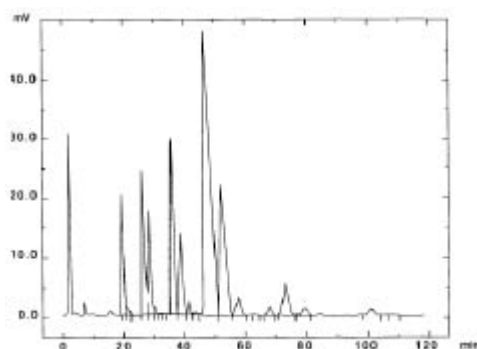
Broj dvostrukih veza (n)

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

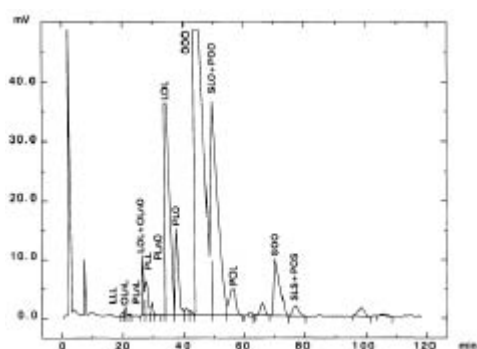
Slika 2: Sojino ulje



Slika 3: Sojino ulje / maslinovo ulje 30/70



Slika 4: Maslinovo ulje



PRILOG XIV

ODREĐIVANJE UDJELA ALIFATSKIH ALKOHOLA KAPILARNOM PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. PODRUČJE PRIMJENE

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

2. PRINCIP METODE

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

3. OPREMA

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

3.2. Lijevak za odjeljivanje od 500 ml.

3.3. Tikvice sa zaobljenim dnom od 250 ml.

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

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

3.6. Mikrolitarske šprice od 100 μ l i 500 μ l.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. REAGENSI

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

4.2. Etil eter, analitičke čistoće.

4.3. Bezvodni natrij sulfat, analitičke čistoće.

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

4.5. Kalij hidroksid, približno 0,2 mol/l etanolna otopina: 13 g kalij hidroksida otopi se u 20 ml destilirane vode i zatim nadopuni etanolom do jedne litre.

4.6. Benzen, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).

4.7. Aceton, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).

4.8. Heksan, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).

4.9. Etil eter, za kromatografiju (vidjeti 5.2.2.).

4.10. Kloroform, za kromatografiju.

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

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

4.13. Bezvodni piridin, za kromatografiju.

4.14. Heksametil disilazan.

4.15. Trimetilklorosilan.

4.16. Standardne otopine trimetilsilil etera alifatskih alkohola od C₂₀ do C₂₈. Mogu se pripremiti iz smjese čistih alkohola, neposredno prije upotrebe.

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

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

4.19. Pomoćni plin: dušik, kromatografske čistoće.

5. POSTUPAK

5.1. Priprava neosapunjivog

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

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

5.1.2. Doda se 50 ml 2 mol/l etanolne otopine kalij hidroksida, pričvrsti povratno hladilo i zagrijava na parnoj kupelji do laganog vrenja, uz stalno miješanje tijekom zagrijavanja dok ne nastupi saponifikacija (otopina postaje bistra). Nastavi se sa zagrijavanjem tijekom sljedećih

20 minuta i zatim kroz hladilo doda 50 ml destilirane vode. Hladilo se zatim odvoji i tikvica ohladi na približno 30°C.

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

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

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

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

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

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

5.2. Odjeljivanje alkoholnih frakcija

5.2.1. Priprema bazičnih ploča za tankoslojnu kromatografiju: ploče sa slojem silikagela (4.4) potpuno se uranjaju u otopinu kalij hidroksida, koncentracije 0,2 mol/l (4.5.) na 10 sekundi te zatim ostave da se suše dva sata u digestoru i konačno stave u peć na 100°C 1 sat.

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

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

5.2.2. U komoru za razvijanje ploča stavi se smjesa heksana i etil etera u omjeru 65/35 (v/v), do razine od približno 1 cm ([5]*).

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

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

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

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

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

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

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

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

Ostatak u boci ispere se tri puta etil eterom (oko 10 ml svaki put), skupljajući filtrat u istu bocu spojenu na lijevak. Filtrat se upari do volumena od 4 do 5 ml, preostala se otopina prenese u prethodno izvaganu epruvetu od 10 ml (3.9.), upari do suha laganim zagrijavanjem u laganoj struji dušika, doda nekoliko kapi acetona, ponovo upari do suha, smjesti u peć na 105°C približno 10 minuta, ostavi da se ohladi u eksikatoru i važe.

Ostatak u epruveti čini alkoholna frakcija.

5.3. Priprava trimetilsilil etera

Reagens za silaniziranje, koji se sastoji od smjese piridina, heksametildisilazana i trimetilklorosilana u omjeru 9:3:1 (v/v/v) (Napomena 5), doda se u epruvetu koja sadrži alkoholnu frakciju u količini od 50 µl za svaki milligram alifatskih alkohola, izbjegavajući apsorpciju vlage (Napomena 6).

Napomena 5: Na tržištu su dostupne otopine spremne za upotrebu. Također su dostupni drugi reagensi za silaniziranje kao što su npr. bis-trimetilsililtrifluoracetamid + 1% trimetil klorosilan, koji se mora razrijediti jednakim volumenom bezvodnog piridina.

Napomena 6: Lagano zamućenje koje se može pojaviti normalno je i ne uzrokuje smetnje. Stvaranje bijelog flokulata ili pojava ružičaste boje upućuju na prisutnost vode ili nečiste reagense. U tom slučaju, analiza se mora ponoviti.

5.3.2. Epruveta se začepi, pažljivo protrese (bez preokretanja) dok se alifatski alkoholi potpuno ne otope. Ostavi se da stoji najmanje 15 minuta na sobnoj temperaturi i zatim centrifugira nekoliko minuta. Bistra otopina spremna je za plinsko-kromatografsku analizu.

5.4. Plinsko-kromatografska analiza

5.4.1. Preliminarni postupci, punjenje kolone

5.4.1.1. Kolona se učvrsti u plinski kromatograf, priključujući početak kolone na injektor sa sustavom razdvajanja, a kraj kolone na detektor. Izvrše se opće provjere plinskog kromatografa (dovod plina, učinkovitost detektora, učinkovitost sustava razdvajanja i pisača itd.).

5.4.1.2. Ako se kolona koristi prvi put, preporučuje se njezino kondicioniranje. Lagani tok plina se propusti kroz kapilarnu kolonu, a zatim uključi plinski kromatograf i započne postupno zagrijavanje do temperature najmanje 20°C više od radne temperature (vidjeti Napomenu 7). Ta se temperatura održava najmanje 2 sata, a zatim se cijeli uređaj namjesti na radne uvjete (podešavanje protoka plina i razdvajanja, paljenje plamena, priključivanje na elektronički rekorder, podešavanje peći za kolonu, temperature detektora i injektora) i potom snimi signal s osjetljivošću najmanje dvostruko većom od one koja će se koristiti za analizu. Bazna linija mora biti linearna, bez bilo kakvih pikova, i ne smije imati otklon. Negativni otklon bazne linije upućuje na neispravno priključenu kolonu; pozitivni otklon upućuje na nepravilno kondicioniranje kolone.

Napomena 7: Temperatura kondicioniranja mora biti najmanje 20°C niža od maksimalne temperature određene za upotrijebljenu stacionarnu fazu.

5.4.2. Izbor radnih uvjeta

5.4.2.1. Okvirni radni uvjeti su sljedeći:

- temperatura kolone: početno 180°C osam minuta, a zatim se programira na povećanje od 5°C/min do 260°C te konačno 15 minuta pri 260°C,
- temperatura isparivača: 280°C
- temperatura detektora: 290°C
- linearna brzina plina nositelja: helij 20 do 35 cm/s, vodik 30 do 50 cm/s,
- omjer razdvajanja protoka: 1:50 do 1:100,
- osjetljivost uređaja: 4 do 16 x veća od najmanjeg prigušenja,
- osjetljivost snimanja: 1 do 2 mV pune skale,
- brzina papira: 30 do 60 cm/h,
- količina injektirane tvari: 0,5 do 1 µl TMSE otopine,

Gore navedeni uvjeti mogu se modificirati prema karakteristikama kolone i plinskog kromatografa kako bi se dobili kromatogrami koji udovoljavaju sljedećim uvjetima:

- vrijeme zadržavanja alkohola C26 treba biti 18 ± 5 minuta,
- pik alkohola C22 treba biti 80 ± 20 % pune vrijednosti skale za maslinovo ulje, odnosno 40 ± 20 % za ulje iz sjemenki.

5.4.2.2. Gore navedeni zahtjevi provjeravaju se ponovljenim injektiranjem standardne smjese TMSE alkohola te se radni uvjeti podešavaju kako bi se postigli najbolji mogući rezultati.

5.4.2.3. Parametri integracije pikova moraju biti postavljeni tako da se omogući ispravna ocjena površina pikova.

5.4.3. Postupak analize

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

5.4.3.2. Nastavi se sa snimanjem dok se TMSE prisutnih alifatskih alkohola u potpunosti ne eluira. Bazna linija mora čitavo vrijeme udovoljavati uvjetima 5.4.1.2.

5.4.4. Identifikacija pikova

Identifikacija pojedinačnih pikova vrši se na temelju vremena zadržavanja i usporedbom sa standardnom smjesom TMSE analiziranom u istim uvjetima.

Kromatogram alkoholne frakcije djevičanskog maslinovog ulja prikazan je na slici 1.

5.4.5. Kvantitativna ocjena

5.4.5.1. Površine pikova 1-eikosanola i alifatskih alkohola C22, C24, C26 i C28 računaju se elektroničkom integracijom.

5.4.5.2. Količina pojedinog alifatskog alkohola, izražena u mg/1000 g masne tvari, izračunava se na sljedeći način:

$$\text{alkohol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

gdje je:

A_x = površina pika alkohola x

A_s = površina 1-eikosanola

m_s = masa 1-eikosanola u miligramima

m = masa uzorka u gramima

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

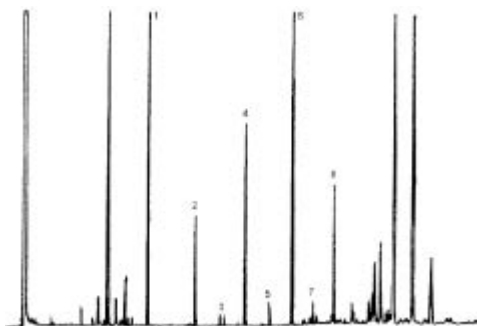
Izražava se podatak o udjelu pojedinih alifatskih alkohola u mg/1000 g masne tvari. Njihovim zbrajanjem dobivaju se “ukupni alifatski alkoholi”.

DODATAK

Određivanje linearne brzine plina

U plinski kromatograf podešen na normalne radne uvjete injektira se 1 do 3 μ l metana ili propana i pomoću zapornog sata mjeri vrijeme potrebno plinu da prođe kroz kolonu od trenutka injiciranja do trenutka pojave pika (tM).

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



Slika 1 – Kromatogram alkoholne frakcije djevičanskog ulja

1 = eikosanol

2 = dekosanol

3 = trikosanol

4 = tetrakosanol

5 = pentakosanol

6 = heksakosanol

7 = heptakosanol

8 = oktakosanol

PRILOG XV

1. UDIO ULJA U KRUTOM OSTATKU NAKON PREŠANJA (KOMINI)

1.1. Aparatura

- prikladna aparatura za ekstrakciju, s tikvicom okrugla dna od 200-250 ml,
- električki zagrijavana kupelj (npr. pješčana kupelj, vodena kupelj) ili grijaća ploča,
- analitička vaga,
- peć podešena na maksimum od 80°C,
- električki zagrijavana peć s termostatom, podešena na $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$, s mogućnošću propuhivanja struje zraka ili rada uz sniženi tlak,
- mehanički mlin, koji se lako može čistiti te koji omogućuje mljevenje komine maslina bez porasta temperature ili znatne promjene u količini vlage, hlapljivih tvari ili tvari koje se mogu ekstrahirati heksanom,
- čahura za ekstrakciju i vata ili filter papir iz kojih su prethodno uklonjene tvari koje se mogu ekstrahirati heksanom,
- eksikator,
- sito s rupicama promjera 1 mm,
- komadići prethodno osušenog plovućca.

1.2. Reagens

Normalni heksan, tehničke čistoće, koji pri potpunom isparavanju mora ostavljati ostatak manji od 0,002 g na 100 ml.

2. POSTUPAK

2.1. Priprema uzorka za analizu

Ako je potrebno, upotrijebi se prethodno dobro očišćeni mehanički mlin za mljevenje laboratorijskog uzorka, kako bi ga se usitnilo do djelića koji mogu potpuno proći kroz sito.

Oko 1/20 uzorka upotrijebi se za dovršenje postupka čišćenja mlina, odbaci samljeveni materijal, samelje ostatak i sakupi, pažljivo izmiješa i odmah analizira.

2.2. Uzorak za analizu

Čim je završen postupak mljevenja, odvaži se oko 10 g uzorka za analizu, s točnošću od 0,01 g.

2.3. Priprema čahure za ekstrakciju

Uzorak za analizu stavi se u čahuru koja se začepi vatom. Ako se koristi filter papir, uzorak se omota njime.

2.4. Preliminarno sušenje

Ako je komina maslina vrlo vlažna (tj. udio vlage i hlapljivih tvari veći od 10 %), izvrši se preliminarno sušenje stavljajući napunjenu čahuru (odnosno filter papir) u peć koja se zagrijava određeno vrijeme na najviše od 80°C, kako bi se udio vlage i hlapljivih tvari smanjio na manje od 10%.

2.5. Priprema tikvice s okruglim dnom

Tikvica s 1 ili 2 komadića plovuća, prethodno osušena u peći pri $103 \pm 2^\circ\text{C}$ i zatim ohlađena u eksikatoru najkraće jedan sat, izvaže se s točnošću od 1 mg.

2.6. Prva ekstrakcija

Čahura (odnosno filter papir) s uzorkom stavi se u aparaturu za ekstrakciju. U tikvicu se ulije potrebna količina heksana. Tikvica se spoji na aparaturu za ekstrakciju te se sve smjesti na električki zagrijavanu kupelj. Brzina zagrijavanja podesi se tako da brzina povrata kondenzata nije manja od 3 kapi u sekundi (umjereno, a ne snažno vrenje). Nakon 4 sata ekstrakcije, ostavi se da se ohladi. Čahura se ukloni iz aparature za ekstrakciju i smjesti u struju zraka kako bi se uklonio veći dio otapala.

2.7. Druga ekstrakcija

Sadržaj čahure prenese se u mikro-mlin i samelje što je sitnije moguće. Samljevena smjesa vrati se bez gubitaka u čahuru i vrati u aparaturu za ekstrakciju.

Nastavi se sa ekstrakcijom sljedeća 2 sata, uz upotrebu iste tikvice okrugla dna koja sadrži početni ekstrakt.

Dobivena otopina u tikvici za ekstrakciju mora biti bistra. Ako nije, filtrira se kroz filter papir uz ispiranje originalne tikvice i filter papira heksanom nekoliko puta. Sakupi se filtrat i otapalo za ispiranje u drugu tikvicu okruglog dna, prethodno osušenu i tariranu s točnošću od 1 mg.

2.8. Uklanjanje otapala i vaganje ekstrakta

Veći dio otapala ukloni se destilacijom na električki zagrijavanoj kupelji. Posljednji tragovi otapala uklone se zagrijavanjem tikvice u peći 20 minuta na $103 \pm 2^\circ\text{C}$. Proces eliminacije može se potpomoći povremenim upuhivanjem zraka ili još bolje inertnog plina, ili upotrebom sniženog tlaka.

Tikvica se ostavi da se ohladi u eksikatoru najmanje 1 sat i izvaže s točnošću od 1 mg.

Ponovo se grije 10 minuta u istim uvjetima, ohladi u eksikatoru i ponovo izvaže.

Razlika između dva vaganja ne smije prelaziti 10 mg. Ako prelazi, ponavlja se zagrijavanje na 10 minuta iza čega slijedi hlađenje i vaganje, sve dok razlika u masama ne bude 10 mg ili manja. Zabilježi se rezultat zadnjeg vaganja tikvice.

Provodi se dvostruko određivanje uzorka.

3. IZRAŽAVANJE REZULTATA

3.1. Način izračunavanja i formula

(a) Ekstrakt, izražen kao maseni udio zaprimljenog proizvoda, jednak je:

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

gdje je:

S = maseni udio ekstrakta u zaprimljenom proizvodu,

m₀ = masa uzorka u g,

m₁ = masa ekstrakta nakon sušenja u g.

Rezultat predstavlja aritmetičku sredinu dva određivanja, uz uvjet da su ispunjeni zahtjevi ponovljivosti.

Rezultat se izražava na jedno decimalno mjesto.

(b) Ekstrakt se izražava na suhu tvar pomoću formule:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{postotak ekstrakta u s.tv.}$$

gdje je:

S = postotak ekstrakta u zaprimljenom proizvodu (vidjeti (a)),

U = količina vlage i hlapljivih tvari

3.2. Ponovljivost

Razlika između dva određivanja koja je isti analitičar izvršio istovremeno ili neposredno jedno za drugim ne smije prelaziti 0,2 g ekstrakta dobivenog heksanom na 100 g uzorka.

Ako ovaj uvjet nije zadovoljen, analiza se ponavlja na druga dva uzorka za analizu.

Ako i u ovom slučaju razlika prelazi 0,2 g, rezultat predstavlja aritmetičku sredinu 4 određivanja.

PRILOG XVI

	MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, RIBARSTVA I RURALNOG RAZVOJA	
---	---	---

ZAHTJEV ZA UPIS U UPISNIK ODOBRENIH OBJEKATA ZA PAKIRANJE MASLINOVIH ULJA S REGISTRIRANOM OZNAKOM

A) PODACI O PODNOSITELJU ZAHTJEVA

Ime i prezime	
Telefon	
Mobitel	
E-mail	
Zvanje	

B) PODACI O SUBJEKTU

Naziv subjekta	
Adresa (ulica i broj, mjesto, županija)	
Telefon	
Telefaks	
MBO	
MBS	
E- mail	

C) PODACI O OBJEKTU

Naziv objekta	
Adresa (ulica i broj, mjesto, županija)	
Telefon	
Telefaks	
Odgovorna osoba (Ime i prezime)	
E- mail	

PRILOG XVII

	MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, RIBARSTVA I RURALNOG RAZVOJA	
---	---	---

UPISNIK ODOBRENIH OBJEKATA ZA PAKIRANJE MASLINOVIH ULJA S REGISTRIRANOM OZNAKOM

A) PODACI O PODNOSITELJU ZAHTJEVA

Ime i prezime	
Telefon	

Mobitel	
E-mail	
Zvanje	

B) PODACI O SUBJEKTU

Naziv subjekta	
Adresa (ulica i broj, mjesto, županija)	
Telefon	
Telefaks	
MBO	
MBS	
E- mail	

C) PODACI O OBJEKTU

Naziv objekta	
Adresa (ulica i broj, mjesto, županija)	
Telefon	
Telefaks	
Odgovorna osoba (Ime i prezime)	
E- mail	

Izvod iz evidencije subjekata koji obavljaju djelatnost s hranom odnosno izvod iz evidencije objekata	KLASA:
	UR. BROJ:
Rješenje o odobrenju objekta za pakiranje ekstra djevičanskih i djevičanskih maslinovih ulja s registriranom oznakom	KLASA:
	UR. BROJ:
Datum izdavanja Rješenja	
Datum upisa u Upisnik	
Alfanumerička identifikacija objekta u Upisniku	

[1]Pravilnikom se preuzimaju odredbe članka 118. (Priloga XVI) Uredbe Vijeća (EZ) br.1234/2007 od 22. listopada 2007. o uspostavljanju zajedničke organizacije poljoprivrednih tržišta i posebnim odredbama za određene poljoprivredne proizvode te odredbe Uredbe Komisije (EZ) br. 1019/2002 od 13. lipnja 2002. o tržišnim standardima za maslinovo ulje i

Uredbe Komisije (EEZ) br. 2568/91 od 11. srpnja 1991. o svojstvima ulja od ploda i komine maslina i metodama njihove analize.

[2]Pravilnik preuzima odredbe: – Direktive 2000/13/EC Europskog parlamenta i Vijeća o usklađivanju propisa država članica koji se odnose na označavanje, prezentaciju i reklamiranje prehrambenih proizvoda

[3]Zakon preuzima odredbe:

– Uredbe Vijeća (EZ-a) br. 510/2006 od 20. ožujka 2006. o zaštiti zemljopisnih oznaka podrijetla poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda i

– Uredbe Vijeća (EZ-a) br. 509/2006 od 20. ožujka 2006. o poljoprivrednim i prehrambenim proizvodima kao garantirano tradicionalnim specijalitetima

[4]Uzorak se ne mora kušati ukoliko se u mirisu uoče vrlo intenzivna negativna svojstva; ove posebne okolnosti upisuju se na ocjenjivački listić

[5]* Posebno u tim slučajevima, za eluiranje se mora koristiti smjesa benzena i acetona u omjeru 95:5 (v/v), kako bi se dobilo jasno odvajanje vrpce.

}

}