

Na osnovu člana 6 stav 2, člana 7 stav 4, člana 8 stav 4 i člana 9 stav 3 Zakona o maslinarstvu i maslinovom ulju ("Službeni list CG", br. 45/14 i 39/16), Ministarstvo poljoprivrede i ruralnog razvoja donijelo je

**PRAVILNIK  
O KARAKTERISTIKAMA I KVALITETU, NAČINU UZORKOVANJA I  
METODAMA ANALIZE MASLINOVOG ULJA\***

**Predmet**

**Član 1**

Ovim pravilnikom propisuju se bliže karakteristike kategorija maslinovog ulja, način uzorkovanja, metode analize i kvalitet maslinovog ulja, bliži uslovi u pogledu kadra i opreme za laboratorije, akreditacija laboratorije i panela.

**Ocjena kvaliteta maslinovog ulja**

**Član 2**

Prije stavljanja u promet, maslinovo ulje se ispituje i ocjenjuje u skladu sa ovim pravilnikom.

Ocjena kvaliteta i čistoće maslinovog ulja obuhvata ocjenu fizičko-hemijskih karakteristika i organoleptičkih karakteristika djevičanskog maslinovog ulja (senzorsko ocjenjivanje).

Ocjenu kvaliteta i čistoće maslinovog ulja vrši ovlašćena laboratorija.

Fizičko-hemijske karakteristike maslinovog ulja utvrđuju se analizom uzoraka.

Karakteristike, svojstva kvaliteta i čistoće maslinovog ulja date su u Prilogu 1 dio 1.

**Uslovi za ovlašćenu laboratoriju za ocjenu kvaliteta maslinovog ulja**

**Član 3**

Ovlašćena laboratorija koja vrši ocjenu fizičko-hemijskih karakteristika maslinovog ulja, treba da ima:

- 1) najmanje jednog zaposlenog sa završenim farmaceutskim, tehnološkim ili prirodno-matematičkim fakultetom (odsjek hemije i fizičke hemije);
- 2) najmanje jednog zaposlenog sa završenom srednjom hemijskom, farmaceutskom ili medicinskom školom;
- 3) prostorije za fizičko-hemijsku analizu;
- 4) laboratorijsku opremu za fizičko-hemijsku analizu.

Ovlašćena laboratorija koja vrši ocjenu organoleptičkih karakteristika djevičanskog maslinovog ulja (senzorsko ocjenjivanje), treba da ima:

- 1) najmanje jednog zaposlenog sa završenim farmaceutskim, tehnološkim ili prirodno-matematičkim fakultetom (odsjek hemije i fizičke hemije);
- 2) najmanje jednog zaposlenog sa završenom srednjom hemijskom, farmaceutskom ili medicinskom školom;
- 3) najmanje jedan panel tim, koji čine najmanje osam, a najviše 12 lica osposobljenih za senzorsku analizu;
- 4) prostorije za senzorsku analizu;
- 5) laboratorijsku opremu i opremu za senzorsku analizu ocjene ulja.

Laboratorija za fizičko-hemijsku analizu treba da bude akreditovana u skladu sa standardom ISO/IEC 17025.

## **Uzorkovanje i priprema uzoraka za ispitivanje**

### **Član 4**

Analiza maslinovog ulja vrši se laboratorijskom analizom uzoraka.

Uzorak maslinovog ulja proizvođač dostavlja na ispitivanje ovlaštenoj laboratoriji u četiri zatvorene boce od najmanje 0,25 l iz iste proizvodne serije.

Izuzetno od stava 2 ovog člana uzorak maslinovog ulja proizvođač može da dostavi i u pakovanju do ili većem od 5 l.

Uzorci treba da budu označeni, a njihov identitet potvrđen od strane proizvođača.

Uzeti uzorci maslinovog ulja smještaju se na tamno mjesto, zaštićeno od svjetlosti i jakih izvora toplote i šalju u laboratoriju na analizu najkasnije u roku od deset dana od dana uzimanja uzoraka.

Uzorkovanje maslinovog ulja iz stava 3 ovog člana vrši se u skladu sa Prilogom 1 dio 2.

## **Određivanje slobodnih masnih kiselina (hladna metoda)**

### **Član 5**

Analizom uzoraka ocjenjuje se kvalitet maslinovog ulja, određivanjem masnih kiselina (kisjelosti) u skladu sa Prilogom 2.

## **Određivanje peroksidnog broja**

### **Član 6**

Peroksidni broj je količina elemenata u uzorku maslinovog ulja, iskazanih u obliku miliekvivalenata aktivnog kiseonika na kilogram, koji pod radnim uslovima oksidišu kalijum jodidi i izražavaju se u milimolima aktivnog kiseonika po kilogramu.

Peroksidni broj iz stava 1 ovog člana, određuje se u skladu sa Prilogom 3.

## **Spektrofotometrijska analiza u ultraljubičastom području**

### **Član 7**

Spektrofotometrijsko ispitivanje u ultraljubičastom području daje podatke o kvalitetu maslinovog ulja, njegovoj očuvanosti i promjenama koje su u njemu uzrokovane tehnološkim procesima.

Spektrofotometrijskim ispitivanjem iz stava 1 ovog člana dobijaju se tri pokazatelja kvaliteta označena kao K232, K270 ili K268 ΔK (koeficijenti ekstinkcije).

Spektrofotometrijsko ispitivanje iz stava 2 ovog člana vrši se u skladu sa Prilogom 4.

## **Određivanje etil estara masnih kiselina**

### **Član 8**

Sadržaj metil estara masnih kiselina u maslinovom ulju određuje se metodom za istraživanje sadržaja voska i metil estara masnih kiselina gasnom hromatografijom.

Metodom iz stava 1 ovog člana utvrđuje se razlika između maslinovog ulja i maslinovog ulja komine i kvalitet ekstra djevičanskog maslinovog ulja.

Sadržaj etil estara masnih kiselina u maslinovom ulju iz stava 1 ovog člana određuje se u skladu sa Prilogom 5.

## **Senzorska ocjena djevičanskog maslinovog ulja**

### **Član 9**

Senzorskim ocjenjivanjem djevičanskog maslinovog ulja određuju se karakteristike arome djevičanskog maslinovog ulja.

Senzorskom ocjenom iz stava 1 ovog člana vrši se ocjena organoleptičkih karakteristika djevičanskog maslinovog ulja koje se koristi u prehrambene svrhe i vrši se u skladu sa Prilogom 6.

#### **Određivanje sadržaja voska kapilarnom gasnom hromatografijom**

##### **Član 10**

Određivanje sadržaja voska kapilarnom gasnom hromatografijom vrši se u skladu sa Prilogom 7.

#### **Određivanje sastava i sadržaja sterola i tritropskih dialkohola kapilarnom gasnom hromatografijom**

##### **Član 11**

Određivanje sastava i sadržaja sterola i tritropskih dialkohola kapilarnom gasnom hromatografijom vrši se u skladu sa Prilogom 8.

#### **Određivanje procenta 2-gliceril monopalmitata**

##### **Član 12**

Određivanje procenta 2-gliceril monopalmitata vrši se u skladu sa Prilogom 9.

#### **Određivanje metilnih estera masnih kiselina gasnom hromatografijom**

##### **Član 13**

Određivanje metilnih estera masnih kiselina gasnom hromatografijom vrši se u skladu sa Prilogom 10.

#### **Određivanje stigmastadiena u biljnim uljima**

##### **Član 14**

Određivanje stigmastadiena u biljnim uljima vrši se u skladu sa Prilogom 11.

#### **Određivanje razlike između stvarne i teoretske količine triacilglicerola**

##### **Član 15**

Određivanje razlike između stvarne i teoretske količine triacilglicerola vrši se u skladu sa Prilogom 12.

#### **Određivanje sadržaja alifatskih tritropskih alkohola kapilarnom gasnom hromatografijom**

##### **Član 16**

Određivanje sadržaja alifatskih i tritepskih alkohola kapilarnom gasnom hromatografijom vrši se u skladu sa Prilogom 13.

#### **Određivanje isparljivih halogenih rastvarača u maslinovom ulju**

##### **Član 17**

Određivanje isparljivih halogenih rastvarača u maslinovom ulju vrši se u skladu sa Prilogom 14.

#### **Sadržaj ulja u komini maslina**

##### **Član 18**

Određivanje sadržaja ulja u komini maslina vrši se u skladu sa Prilogom 15.

## **Određivanje jednog broja**

### **Član 19**

Određivanje jednog broja vrši se u skladu sa Prilogom 16.

## **Klasifikacija maslinovog ulja na osnovu senzorske ocjene**

### **Član 20**

Nakon senzorske ocjene ulje se razvrstava u skladu sa medijanom mana i medijanom voćnosti.

Medijan mana je mana maslinovog ulja koja se osjeća najvećim intenzitetom.

Medijan mana i medijan voćnosti izražavaju se do jedne decimale.

Maslinovo ulje razvrstava se upoređujući vrijednost medijana mana i medijana voćnosti sa referentnim intervalima i to:

- 1) ekstra djevičansko maslinovo ulje: medijan mana je 0 i medijan voćnosti je iznad 0;
- 2) djevičansko maslinovo ulje: medijan mana je iznad 0 ali ne veći od 3,5 i medijan voćnosti je iznad 0;
- 3) maslinovo ulje lampante: medijan mana je iznad 3,5 ili medijan mana je manji ili jednak 3,5 a medijan voćnosti je jednak 0.

## **Registar panela**

### **Član 21**

U registar panela upisuju se panel tim i senzorski ocjenjivači.

Upis u registar panela vrši se na osnovu zahtjeva.

## **Prestanak važenja**

### **Član 22**

Danom stupanja na snagu ovog pravilnika prestaje primjena Pravilnika o kvalitetu i drugim zahtevima za jestivo maslinovo ulje i jestivo ulje komine masline („Službeni list SRJ“, broj 54/99) i prestaje da važi Pravilnik o karakteristikama i kvalitetu, načinu uzorkovanja i metodama analize maslinovog ulja\* ("Službeni list CG", broj 33/15).

## **Prilozi**

### **Član 23**

Prilozi 1 do 16 čine sastavni dio ovog pravilnika.

Prilozi iz stava 1 ovog člana objaviće se samo u elektronskom izdanju "Službenog lista Crne Gore".

## **Stupanje na snagu**

### **Član 24**

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom listu Crne Gore".

---

\*U ovaj pravilnik prenešene su odredbe Regulative EU 2568/91 i Regulative EU 1308/13.

Broj: 320-1422/2019

Podgorica, 20. septembra 2019. godine

Ministar ,  
mr **Milutin Simović**, s.r.

## Karakteristike, svojstva kvaliteta i čistoće maslinovog ulja

## Dio 1

Karakteristike, svojstva kvaliteta i čistoće maslinovog uljadata su Tabeli 1.

Tabela 1

| Kategorija                                                                      | Etil estri masnih kiselina (FAEE) (*) | Kiselost (%) (*) | Peroksidni broj mEq O <sub>2</sub> /kg (*) | Voskovi mg/kg (**)                           | 2-gliceril monopalmitat (%)                                                                            | Stigmasta-dieni mg/kg ( <sup>1</sup> ) | Razlika: ECN42 (HPLC) i ECN42 (teoretski proračun) | K <sub>232</sub> (*) | K <sub>268</sub> ili K <sub>270</sub> (*) | Delta-K (*) | Organoleptičko ocjenjivanje Medijan mana (Mm) (*) | Organoleptičko ocjenjivanje Medijan vočnosti (Mv) (*) |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------------------|-------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje                                            | FAEE ≤ 30 mg/ kg                      | ≤ 0,8            | ≤ 20                                       | C42 + C44 + C46 ≤ 150                        | ≤ 0,9 ako je ukupni % palmitinske kiseline ≤ 14 %<br>≤ 1,0 ako je ukupni % palmitinske kiseline > 14 % | ≤ 0,05                                 | ≤  0,2                                             | ≤ 2,50               | ≤ 0,22                                    | ≤ 0,01      | Mm = 0                                            | Mv > 0                                                |
| 2. Djevičansko maslinovo ulje                                                   | -                                     | ≤ 2,0            | ≤ 20                                       | C42 + C44 + C46 ≤ 150                        | ≤ 0,9 ako je ukupni % palmitinske kiseline ≤ 14 %<br>≤ 1,0 ako je ukupni % palmitinske kiseline > 14 % | ≤ 0,05                                 | ≤  0,2                                             | ≤ 2,60               | ≤ 0,25                                    | ≤ 0,25      | Mm ≤ 3,5                                          | Mv > 0                                                |
| 3. Maslinovo ulje lampante                                                      | -                                     | > 2,0            | -                                          | C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 300 ( <sup>3</sup> ) | ≤ 0,9 ako je ukupni % palmitinske kiseline ≤ 14 %<br>≤ 1,1 ako je ukupni % palmitinske kiseline > 14 % | ≤ 0,50                                 | ≤  0,3                                             | -                    | -                                         | -           | Mm > 3,5 ( <sup>4</sup> )                         | -                                                     |
| 4. Rafinisano maslinovo ulje                                                    | -                                     | ≤ 0,3            | ≤ 5                                        | C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350                  | ≤ 0,9 ako je ukupni % palmitinske kiseline ≤ 14 %<br>≤ 1,1 ako je ukupni % palmitinske kiseline > 14 % | -                                      | ≤  0,3                                             | -                    | ≤ 1,10                                    | ≤ 0,16      | -                                                 | -                                                     |
| 5. Maslinovo ulje koje se sastoji od rafiniranih i djevičanskih maslinovih ulja | -                                     | ≤ 1,0            | ≤ 15                                       | C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350                  | ≤ 0,9 ako je ukupni % palmitinske kiseline ≤ 14 %<br>≤ 1,0 ako je ukupni % palmitinske kiseline > 14 % | -                                      | ≤  0,3                                             | -                    | ≤ 0,90                                    | ≤ 0,15      | -                                                 | -                                                     |
| 6. Sirovo ulje komine maslina                                                   | -                                     | -                | -                                          | C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350 ( <sup>5</sup> ) | ≤ 1,4                                                                                                  | -                                      | ≤  0,6                                             | -                    | -                                         | -           | -                                                 | -                                                     |
| 7. Rafinisano ulje komine maslina                                               | -                                     | ≤ 0,3            | ≤ 5                                        | C40 + C42 + C44 + C46 > 350                  | ≤ 1,4                                                                                                  | -                                      | ≤  0,5                                             | -                    | ≤ 2,00                                    | ≤ 0,20      | -                                                 | -                                                     |
| 8. Ulje komine maslina                                                          | -                                     | ≤ 1,0            | ≤ 15                                       | C40 + C42 + C44 + C46 > 350                  | ≤ 1,2                                                                                                  | -                                      | ≤  0,5                                             | -                    | ≤ 1,70                                    | ≤ 0,18      | -                                                 | -                                                     |

Ukupni izomeri koji bi se mogli (ili ne) razdvojiti kapilarnom kolonom.

(<sup>2</sup>) Ovo ograničenje se primjenjuje na maslinova ulja proizvedena od 1. ožujka 2014.

(3) Ulja sa udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se maslinovim uljima lampante ako je ukupni udio alifatičnih alkohola manji od ili jednak 350 mg/kg ili ako je udio eritrodiola i uvaola manji od ili jednak 3,5 %.

(4) Medijan mana može biti manji od ili jednak 3,5, a medijan voćnosti jednak 0.

(5) Ulja sa udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se sirovim uljima komine maslina ako je ukupni udio alifatičnih alkohola iznad 350 mg/kg i ako je udio eritrodiola i uvaola veći od 3,5 %.

| Kategorija                                                                      | Sastav masnih kiselina <sup>(1)</sup> |                |               |                |              |                 | Ukupni trans-oleinski izomeri (%) | Ukupni translinolenski izomeri (%) | Sastav sterola |                   |                                |                  |                                                     |                                         | Ukupni steroli (mg/kg) | Eritrodiol i uvaol (%) <sup>(**)</sup> |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------|---------------|----------------|--------------|-----------------|-----------------------------------|------------------------------------|----------------|-------------------|--------------------------------|------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------|----------------------------------------|
|                                                                                 | Miristinska (%)                       | Linolenska (%) | Arahidska (%) | Eikozenska (%) | Behenska (%) | Lignocinska (%) |                                   |                                    | Holesterol (%) | Brasikosterol (%) | Kampesterol <sup>(2)</sup> (%) | Stigmasterol (%) | App β-sitosterol <sup>(3)</sup> (%) <sup>(**)</sup> | Delta-7-stigmastanol <sup>(2)</sup> (%) |                        |                                        |
| 1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje                                            | ≤0,03                                 | ≤1,00          | ≤0,60         | ≤0,40          | ≤0,20        | ≤0,20           | ≤0,05                             | ≤0,05                              | ≤0,5           | ≤0,1              | ≤4,0                           | <kamp.           | >93,0                                               | ≤0,5                                    | ≥1000                  | ≤4,5                                   |
| 2. Djevičansko maslinovo ulje                                                   | ≤0,03                                 | ≤1,00          | ≤0,60         | ≤0,40          | ≤0,20        | ≤0,20           | ≤0,05                             | ≤0,05                              | ≤0,5           | ≤0,1              | ≤4,0                           | <kamp.           | >93,0                                               | ≤0,5                                    | ≥1000                  | ≤4,5                                   |
| 3. Maslinovo ulje lampante                                                      | ≤0,03                                 | ≤1,00          | ≤0,60         | ≤0,40          | ≤0,20        | ≤0,20           | ≤0,10                             | ≤0,10                              | ≤0,5           | ≤0,1              | ≤4,0                           | -                | ≥93,0                                               | ≤0,5                                    | ≥1000                  | ≤4,5 <sup>(4)</sup>                    |
| 4. Rafinisano maslinovo ulje                                                    | ≤0,03                                 | ≤1,00          | ≤0,60         | ≤0,40          | ≤0,20        | ≤0,20           | ≤0,20                             | ≤0,30                              | ≤0,5           | ≤0,1              | ≤4,0                           | <kamp.           | ≥93,0                                               | ≤0,5                                    | ≥1000                  | ≤4,5                                   |
| 5. Maslinovo ulje koje se sastoji od rafiniranih i djevičanskih maslinovih ulja | ≤0,03                                 | ≤1,00          | ≤0,60         | ≤0,40          | ≤0,20        | ≤0,20           | ≤0,20                             | ≤0,30                              | ≤0,5           | ≤0,1              | ≤4,0                           | <kamp.           | ≥93,0                                               | ≤0,5                                    | ≥1000                  | ≤4,5                                   |
| 6. Sirovo ulje komine maslina                                                   | ≤0,03                                 | ≤1,00          | ≤0,60         | ≤0,40          | ≤0,30        | ≤0,20           | ≤0,20                             | ≤0,10                              | ≤0,5           | ≤0,2              | ≤4,0                           | -                | ≥93,0                                               | ≤0,5                                    | ≥2500                  | >4,5 <sup>(5)</sup>                    |
| 7. Rafinisano ulje komine maslina                                               | ≤0,03                                 | ≤1,00          | ≤0,60         | ≤0,40          | ≤0,30        | ≤0,20           | ≤0,40                             | ≤0,35                              | ≤0,5           | ≤0,2              | ≤4,0                           | <kamp.           | ≥93,0                                               | ≤0,5                                    | ≥1800                  | >4,5                                   |
| 8. Ulje komine maslina                                                          | ≤0,03                                 | ≤1,00          | ≤0,60         | ≤0,40          | ≤0,30        | ≤0,20           | ≤0,40                             | ≤0,35                              | ≤0,5           | ≤0,2              | ≤4,0                           | <kamp.           | ≥93,0                                               | ≤0,5                                    | ≥1600                  | >4,5                                   |

<sup>1)</sup> Udio drugih masnih kiselina (%): palmitinska: 7,50-20,00; palmitoleinska: 0,30-3,50; heptadekanska:  $\leq 0,30$ ; heptadecenska:  $\leq 0,30$ ; stearinska: 0,50-5,00; oleinska: 55,00-83,00; linolna: 2,50-21,00.

<sup>2)</sup> Vidjeti Dodatak ovog Priloga.

<sup>3)</sup> App  $\beta$ -sitosterol: Delta-5,23-stigmastadienol + klerosterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-stigmastadienol.

<sup>4)</sup> Ulja sa udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se maslinovim uljima lampante ako je ukupni udio alifatičnih alkohola manji od ili jednak 350 mg/kg ili ako je udio eritrodiola i uvaola manji od ili jednak 3,5%.

<sup>5)</sup> Ulja sa udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se sirovim uljima komine maslina ako je ukupni udio alifatičnih alkohola iznad 350 mg/kg i ako je udjel eritrodiola i uvaola veći od 3,5 %.

#### *Napomene:*

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

(b) Ako najmanje jedno od svojstava ne odgovara navedenim vrijednostima, u smislu ovog Pravilnika kategorija ulja može se promijeniti ili se ulje može deklarirati kao onečišćeno.

(c) Ako je svojstvo koje se odnosi na kvalitet ulja označeno jednom zvjezdicom (\*), pod tim se podrazumijeva sljedeće:

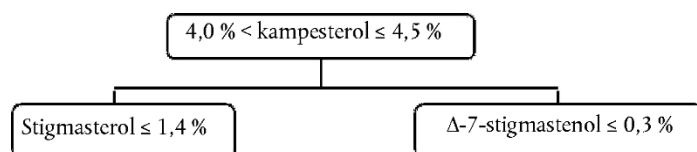
– kod maslinovog ulja lampante moguće je da se istovremeno oba navedena ograničenja razlikuju od navedenih vrijednosti,

– kod djevičanskih maslinovih ulja, ako se najmanje jedno od tih ograničenja razlikuje od navedenih vrijednosti, kategorija ulja se mijenja, iako se i dalje svrstava u jednu od kategorija djevičanskih maslinovih ulja.

(d) Ako je svojstvo označeno sa dvije zvjezdice (\*\*), to znači da je za sve tipove ulja komine maslina moguće da se istovremeno oba navedena ograničenja razlikuju od navedenih vrijednosti.

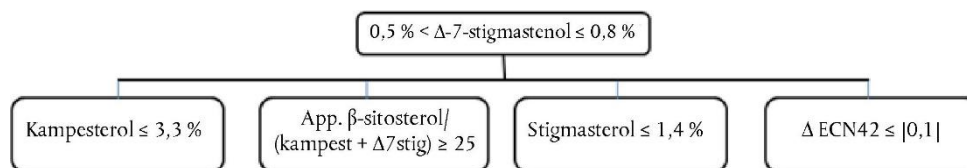
### Sadržaj kampesterola za djevičansko i ekstra djevičansko maslinovo ulje

Sadržaj kampesterola za djevičansko i ekstra djevičansko maslinovo ulje dat je u sljedećoj šemi:

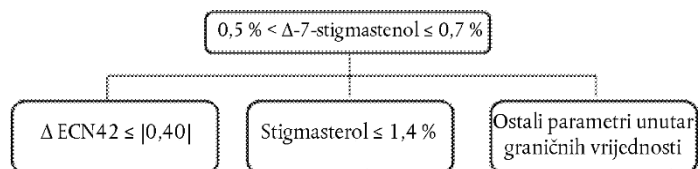


Sadržaj **delta-7-stigmasterol** za:

— ekstra djevičansko i djevičansko maslinovo ulje



— ulja komine maslina (sirova i rafinisana)



## Dio 2

### UZORKOVANJE MASLINOVOG ULJA DOSTAVLJENOG U PAKOVANJU DO ILI VEĆEM OD 5 l

#### 1. SADRŽAJ PRIMARNOG UZORKA

##### 1.1. Pakovanje do 5 l

„Primarni uzorak” za maslinovo ulje dostavljeno upakovanju koje ne prelazi 5 l dat je u Tabeli 1.

Tabela 1

#### Najmanja veličina primarnog uzorka mora da sadrži

| Kada unutrašnje pakovanje ima zapreminu | Primarni uzorak mora da se sastoji od ulja od                      |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| (a) 1 litra ili više                    | a) 1-og unutrašnjeg pakovanja;                                     |
| (b) manje od 1 litra                    | b) najmanjeg broja pakovana ukupne zapremine ne manje od 1,0 litra |

##### 1.2. Pakovanje preko 5 l

„Primarni uzorak” za maslinovo ulje dostavljeno u pakovanju koje prelazi 5 litara označava reprezentativni dio ukupnih dodatnih količina dobijenih postupkom smanjenja i dat je u Tabeli 2. Primarni uzorak mora se sastojati od različitih primjera. „Primjer” primarnog uzorka označava svaki paket koji čini primarni uzorak.

Tabela 2.

#### Minimalni broj dodatnih količina koje se uzimaju

| Broj pakovanja u seriji | Minimalni broj dodatnih količina koje se uzimaju |
|-------------------------|--------------------------------------------------|
| do 10                   | 1                                                |
| od ... 11 do 150        | 2                                                |

| Broj pakovanja u seriji    | Minimalni broj dodatnih količina koje se uzimaju |
|----------------------------|--------------------------------------------------|
| Od ... 151 do 500          | 3                                                |
| Od ... 501 do 1 500        | 4                                                |
| Od ... 1 501 do 2 500      | 5                                                |
| > 2 500 na 1 000 pakiranja | 1 rezervna dodatna količina                      |

Kako bi se smanjio volumen uzorkovanja pakovanja za pripremu primarnog uzorka homogenizuje se sadržaj dodatnih količina za uzorkovanje.

Kako bi se uzorak ulja zaštitio od uticaja vazduha, dijelovi različitih dodatnih količina ulja miješanjem se ulivaju u zajednički rezervoar za njihovu homogenizaciju.

Sadržaj primarnog uzorka mora se uliti u niz pakovanja najmanje zapremnine 1 l od kojih svaki predstavlja primjer primarnog uzorka.

Svako pakovanje puni se na način da se sloj vazduha na vrhu svede na najmanju moguću mjeru, nakon čega se pakovanje zatvori i zapečati kako bi se obezbijedilo da se proizvod ne može mijenjati i ta pakovanja se označavaju radi identifikacije.

## 2. ANALIZE I REZULTATI

2.1. Svaki primarni uzorak mora se podijeliti na laboratorijske uzorke.

2.2. Kad svi rezultati analize odgovaraju svojstvima određene kategorije ulja, čitava serija se proglašava odgovarajućom.

Ako samo jedan rezultat analize ne odgovara svojstvima deklarisanе kategorije ulja, čitava sserija se proglašava neodgovarajućom.

## 3. PROVJERA KATEGORIJE SERIJE

3.1. Kako bi se provjerila kategorija serije može se povećati broj primarnih uzoraka uzetih sa različitih mjesta serije u skladu sa sljedećom tabelom 3:

Tabela 3.

**Broj primarnih uzoraka određenih veličinom serije**

| Veličina serije (litre)       | Broj primarnih uzoraka                 |
|-------------------------------|----------------------------------------|
| manje od 7 500                | 2                                      |
| Od 7 500 do manje od 25 000   | 3                                      |
| Od 25 000 do manje od 75 000  | 4                                      |
| Od 75 000 do manje od 125 000 | 5                                      |
| Jednako i više od 125 000     | 6 + 1 za svakih dodatnih 50 000 Litara |

Svaka dodata količina maslinovog ulja koja predstavlja primarni uzorak uzima se saistog mjesta u seriji.

Stvaranje svakog primarnog uzorka sprovedi u skladu sa Tabelama 1 i 2 ovog dijela.

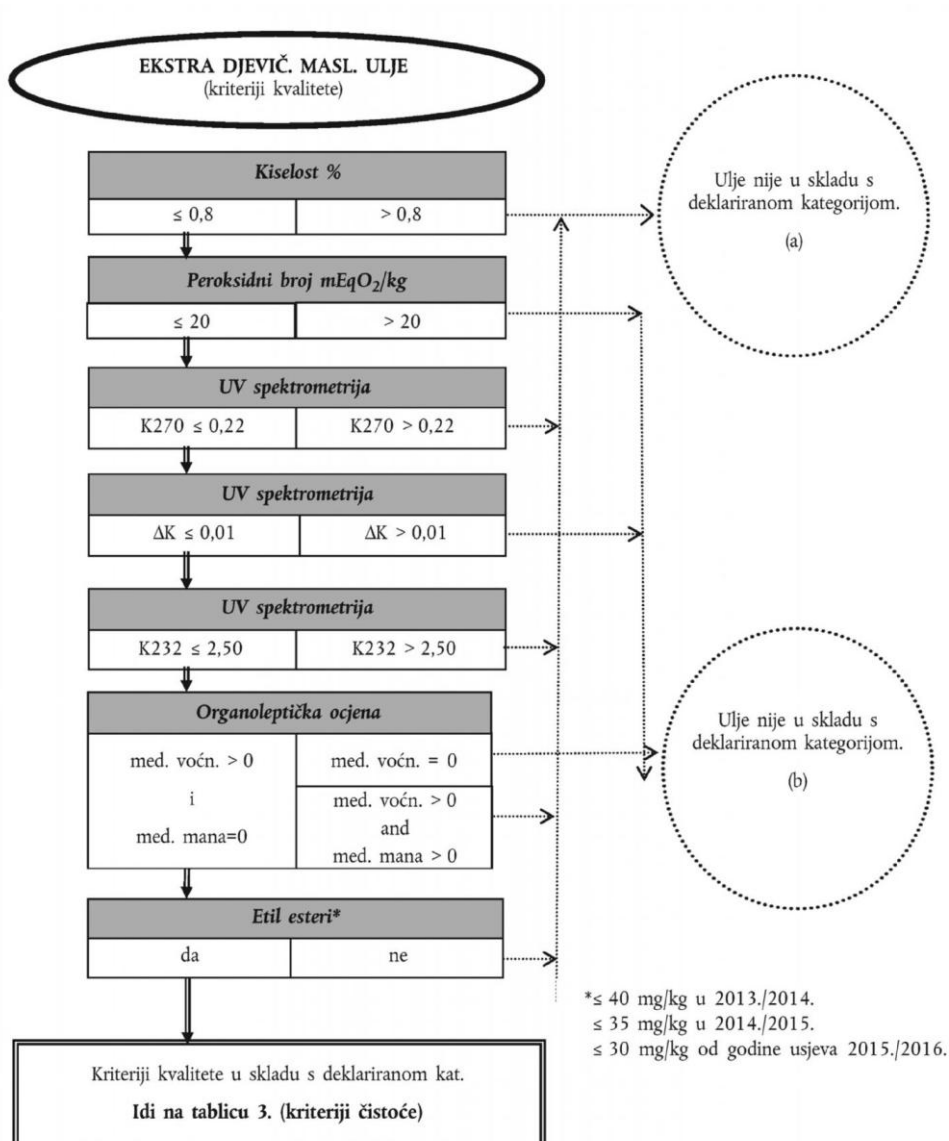
Svaki primarni uzorak zatim podliježe analizi tačke 2.1 ovog dijela.

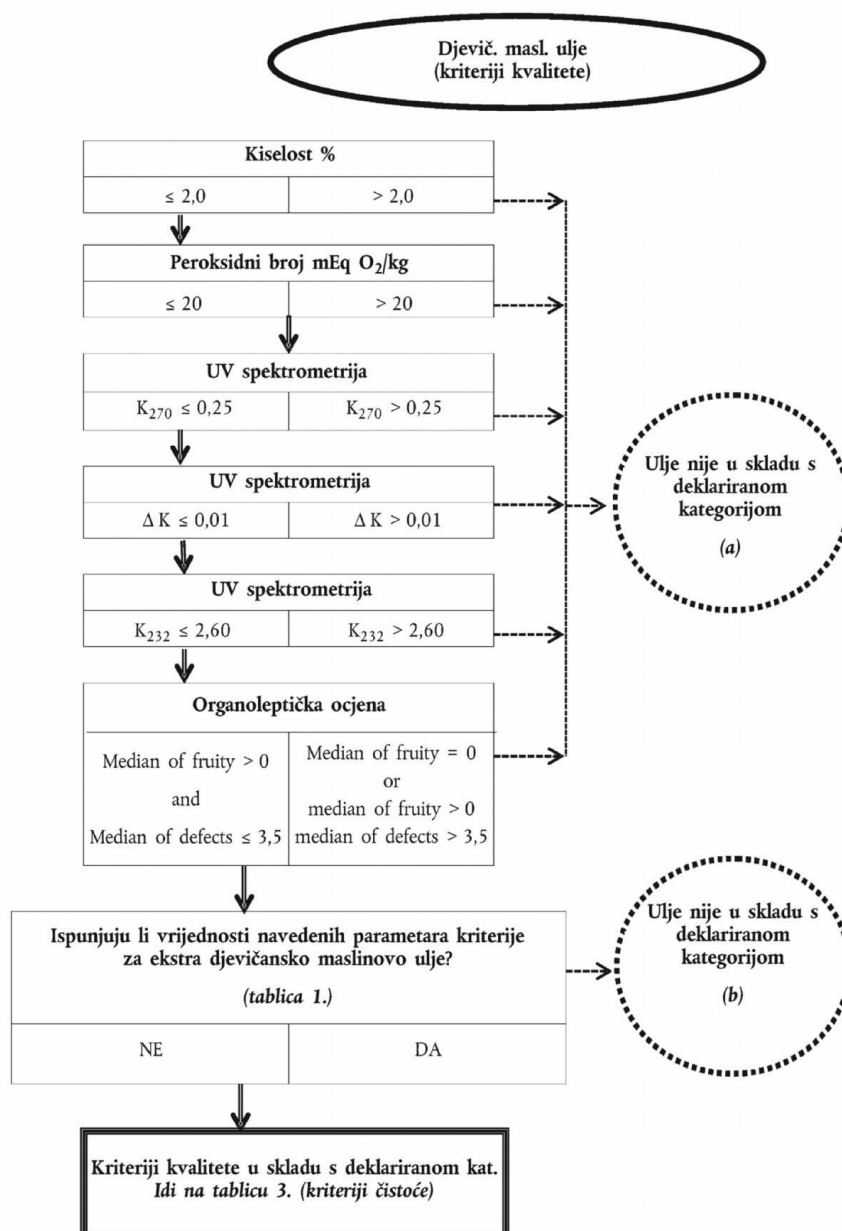
Ako jedan od rezultata analize iz tačke 2.1 ovog dijela najmanje jednog primarnog uzorka nije u skladu sa svojstvima određene kategorije ulja, čitava serija za uzorkovanje se proglašava neodgovarajućom.

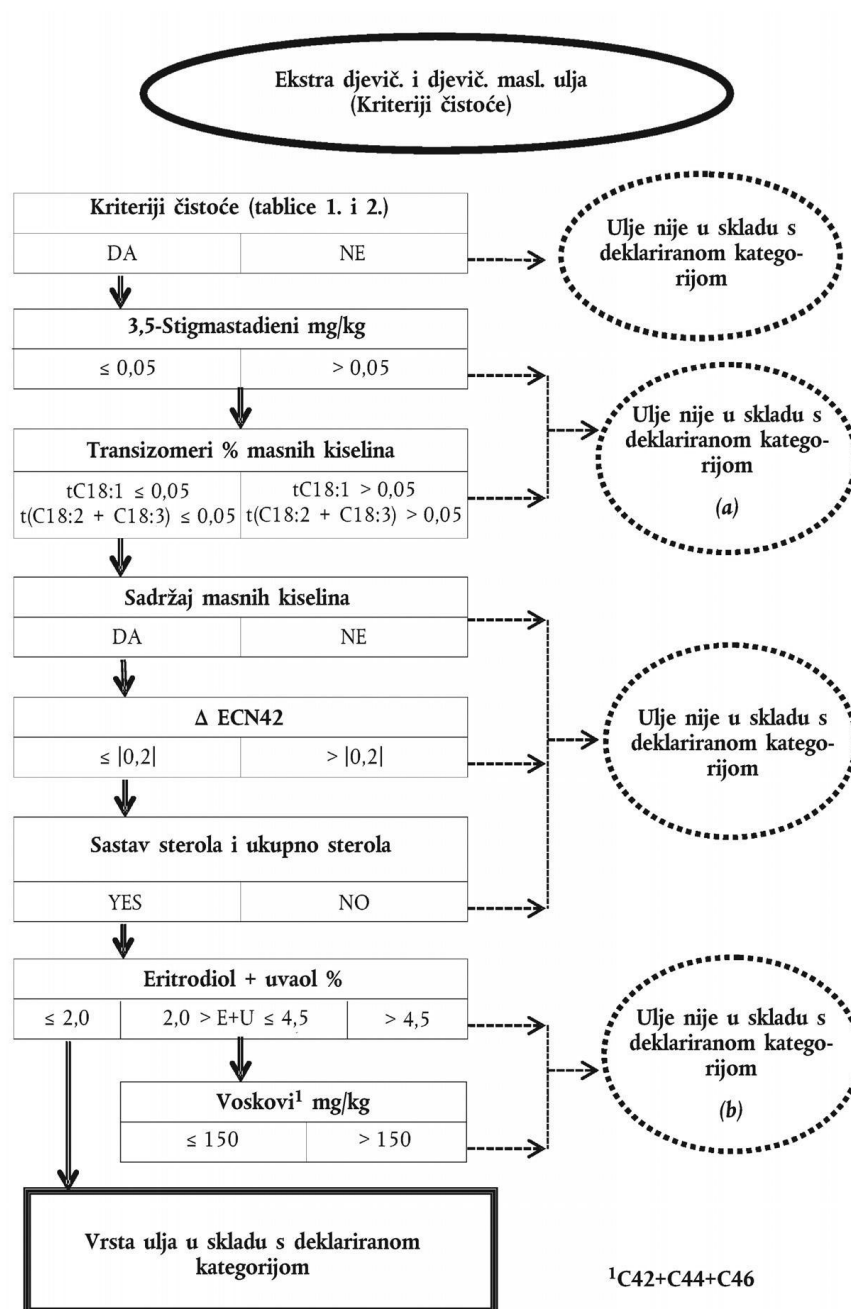
## PROVJERA USKLAĐENOSTI UZORKA MASLINOVOG ULJA SA ODREĐENOM KATEGORIJOM

Provjera usklađenosti uzorka maslinovog ulja sa kategorijama ekstra djevičanskog maslinovog ulja, djevičanskog maslinovog ulja i ekstra djevičanskog i djevičanskog maslinovog maslinovog ulja vrši se u skladu sa sljedećim slikama:

Slika 1







## ODREĐIVANJE SLOBODNIH MASNIH KISELINA (HLADNA METODA)

### 1. PRINCIP

Uzorak se rastvori u mješavini rastvarača i postojeće slobodne masne kiseline, određuje titracijom sa rastvorom kalijum hidroksida ili natrijum hidroksida.

### 2. REAGENSI

Reagensi treba da budu priznatog analitičkog kvaliteta, a voda koja se upotrebljava treba da bude destilovana ili odgovarajuće čistoće.

2.1. Dietil etar; 95 % etanol (V/V), mješavina djelova jednakih po zapremini.

Neutralizacija se vrši tačno u trenutku upotrebe rastvora kalijum hidroksida (2.2.) uz dodatak 0,3 ml rastvora fenolftaleina na 100 ml mješavine.

*Napomena 1.:* Dietil etar visoko je zapaljiv i može stvoriti eksplozivneperoksidge, a prilikom njegove upotrebe treba biti posebno pažljiv.

*Napomena 2.:* Ako nije moguće upotrijebiti dietil etar, može se upotrijebiti mješavina rastvora koja sadrži etanol i toluen, a ako je potrebno, etanol se može zamijeniti 2-propanolom.

2.2. Kalijum hidroksid ili natrijum hidroksid, titrisani etanol ili vodeni rastvor,  $c(\text{KOH})$  [ili  $c(\text{NaOH})$ ] približno 0,1 mol/l ili, ako je potrebno,  $c(\text{KOH})$  [ili  $c(\text{NaOH})$ ] približno 0,5 mol/l.

Neposredno prije upotrebe treba da bude poznata i provjerena tačna koncentracija rastvora kalijum hidroksida ili rastvora natrijum hidroksida i treba upotrijebiti rastvor koji je pripremljen najmanje pet dana prije upotrebe i dekantovan u smeđe staklene boce sa gumenim čepom, a rastvor treba da bude bezbojan ili boje slame.

Ako se pri upotrebi vodenog rastvora kalijum hidroksida ili natrijum hidroksida uoči fazno razdvajanje, vodeni rastvor treba zamijeniti rastvorom u etanolu.

*Napomena 3.:* Stabilni bezbojni rastvor kalijum hidroksida ili natrijum hidroksida može se pripremiti na sljedeći način: dovesti do ključanja 1 000 ml etanola ili vode sa 8 g kalijum hidroksida ili natrijum hidroksida i 0,5 g aluminijskih strugotina i pustiti da vri pod povratnim hladnjakom sat vremena. Odmah treba destilovati i rastvoriti potrebnu količinu kalijum hidroksida ili natrijum hidroksida u destilatu ili pustiti da odstoji nekoliko dana i zatim dekantovati kako bi se odvojila bistra, supernatantna tečnost od nataloženog kalijum karbonata ili natrijum karbonata.

Rastvor se može pripremiti i bez destilovanja, na sljedeći način: na 1 000 ml etanola ili vode dodati 4 ml aluminijum butilata i pustiti mješavinu da odstoji nekoliko dana. Dekantovanjem odvojiti supernatantnu tečnost i u njoj rastvoriti potrebnu količinu kalijum hidroksida ili natrijum hidroksida. Rastvor je spreman za upotrebu.

2.3. Rastvor 10 g/l fenolftaleina u 95 do 96 % etanolu (v/v) ili rastvor 20 g/l alkalnog plavog 6B ili timolftaleina u 95 do 96 % etanolu (v/v). U slučaju snažno obojenih ulja upotrebljavaju se alkalno plavo ili timolftalein.

### 3. OPREMA

Za određivanje slobodnih masnih kiselina koristi se sljedeća laboratorijska oprema:

1. analitička vaga;
2. Erlenmajerova tikvica zapremine 250 ml;
3. graduirana bireta zapremine 10 ml, klase A, sa podjelom od 0,05 ml ili odgovarajuću automatsku biretu.

### 4. POSTUPAK

#### 4.1. Priprema uzorka za ispitivanje

Ako je uzorak mutan, potrebno ga je filtrirati, u slučaju kad vlaga i nečistoća zajedno ne prelaze 1 %, treba koristiti uzorak bez dodatnog obrađivanja, a u slučaju kad su veći od 1 %, treba ga filtrirati.

#### 4.2. Uzorak za ispitivanje

Uzorak treba odabrati u zavisnosti od kiselosti u skladu sa sljedećom tabelom:

| Očekivana kiselost<br>(oleinska kiselost<br>g/100g) | Masa uzorka (g) | Preciznost vaganja<br>(g) |
|-----------------------------------------------------|-----------------|---------------------------|
| 0 do 2                                              | 10              | 0,02                      |
| > 2 do 7,5                                          | 2,5             | 0,01                      |
| > 7,5                                               | 0,5             | 0,001                     |

Uzorak treba izmjeriti u Erlenmeyerovoj tikvici.

#### 4.3. Određivanje

Uzorak (4.2.) treba rastvoriti u 50 do 100 ml prethodno neutralizovane mješavine dietil etera i etanola (2.1.).

Titrovati uz miješanje 0,1 mol/l rastvorom kalijum hidroksida ili natrijum hidroksida (2.2.) dok se ne promijeni boja indikatora (boja obojanog indikatora treba da bude postojana najmanje 10 sekundi).

Napomena 4.: Ako je potrebna količina rastvora kalijum hidroksida ili natrijum hidroksida od 0,1 mol/l veća od 10 ml, upotrebljava se rastvor od 0,5 mol/l ili se mijenja masa uzorka u skladu sa očekivanom kiselosti.

Napomena 5.: Ako rastvor tokom titrovanja postane mutan, treba dodati dovoljno rastvora (2.1.) da bi se dobio bistar rastvor.

Ako je prvi rezultat viši od utvrđenog ograničenja za kategoriju ulja treba izvršiti drugo testiranje.

#### ISKAZIVANJE REZULTATA

Kiselost izražena utežinskim procentima oleinske kiseline jednaka je

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

pri čemu je:

= zapremina rastvora kalijum hidroksida (ili natrijum hidroksida) utrošen za titrovanje, u mililitrima;

= tačna koncentracija u mol po litru upotrebljenog rastvora kalijum hidroksida (ili natrijum hidroksida) za titrovanje;

M = 282 g/mol, molarna masa u gramima po molu oleinske kiseline;

m = masa uzorka u gramima.

Oleinska kiselost iskazuje se kako slijedi:

do dva decimalna broja za vrijednosti od 0 do uključujući 1;

do jednog decimalnog broja za vrijednosti od 1 do uključujući 100.

## ODREĐIVANJE PEROKSIDNOG BROJA

### Definicija

Peroksidni broj je količina onih supstanci u uzorku, izraženih u obliku miliekvivalenata aktivnog kiseonika na kilogram, koji pod određenim uslovima oksiduju kalijum jodid.

### Princip

Reakcija ispitivanog dijela uzorka u rastvoru sirćetne kiseline i hloroforma sa rastvorom kalijum jodida. Titrovanje oslobođenog joda standardizovanim rastvorom natrijum tiosulfata.

### Oprema

Oprema koja se koristi ne smije sadržati supstance koje uzrokuju redukciju ili oksidaciju.

Napomena 1.: Površina podloge ne smije se zamastiti.

3.1 Staklena mjerna posudica zapremine 3 ml.

3.2 Tikvice sa užim grlom i čepom, zapremine približno 250 ml, treba da budu prethodno osušene i ispunjene čistim, suvim, inertnim gasom (azotom ili, još bolje, ugljen dioksidom).

3.3 Bireta zapremine 5 ml, 10 ml ili 25 ml, gradušana na najmanje 0,05 ml, po mogućnosti sa automatskim podešavanjem na nulu ili odgovarajuća automatska bireta.

3.4 Analitička vaga.

### Reagensi

4.1 Hloroform, kvalitet analitičkog reagensa, oslobođen od kiseonika prođuvavanjem strujom čistog, suvog inertnog gasa.

4.2 Glacijalna sirćetna kiselina, kvalitet analitičkog reagensa, oslobođena od kiseonika prođuvavanjem strujom čistog, suvog inertnog gasa.

4.3 Kalijum jodid, zasićeni vodeni rastvor, svježe pripremljen, bez joda i jodata. Rastvoriti oko 14 g kalijum jodida u oko 10 ml vode na sobnoj temperaturi.

4.4 Vodeni rastvor natrijum tiosulfata 0,01 mol/l (ekvivalent 0,01 N), precizno standardizovan neposredno prije upotrebe.

Svaki dan i prije upotrebe treba pripremiti svježi 0,01 mol/l rastvor natrijum tiosulfata od 0,1 mol/l standardnog rastvora natrijum tiosulfata, ili odrediti tačnu molarnost. Prethodna iskustva pokazala su da je stabilnost ograničena i da zavisi od pH vrijednosti i udjela slobodnog ugljen dioksida. Za razblaživanje upotrebljavati samo svježe prokuvanu vodu, eventualno pročišćenu azotom.

### **1. Za određivanje tačne molarnosti rastvora natrijum tiosulfata preporučuje se sljedeći postupak:**

Sapreciznošću od 0,001 g izvagati 0,27 g do 0,33 g kalijum jodata

( $m_{\text{KIO}_3}$ ) u odmjernu tikvicu (250 ml ili 500 ml) i do oznake razblažiti svježe prokuvanom vodom ( $V_2$ ), ohlađenom na sobnoj temperaturi.

Pipetom prenijeti 5 ml ili 10 ml rastvora kalijum jodata ( $V_1$ ) u Erlenmajerovu tikvicu od 250 ml. Dodati 60 ml svježe prokuvane vode, 5 ml 4 mol/l hidrovdonične kiseline i 25 mg do 50 mg kalijum jodida ili 0,5 ml zasićenog rastvora kalijum jodida. Titrovatitaj rastvor rastvorom natrijum tiosulfata ( $V_3$ ) kako bi se odredila tačna molarnost rastvora natrijum tiosulfata,

$$T = \frac{m_{KIO_3} \times V_1 \times 6 \times 10 \times w_{KIO_3}}{M_{KIO_3} \times V_2 \times V_3}$$

pri čemu je:

$m_{KIO_3}$  masa kalijum jodata u gramima  
 $V_1$  zapremina rastvora kalijum jodata u mililitrima (5 ml ili 10 ml)  
 $V_2$  ukupna zapremina rastvora kalijum jodata u mililitrima (250 ml ili 500 ml)  
 $V_3$  zapremina rastvora natrijum tiosulfata u mililitrima  
 $w_{KIO_3}$  čistoća kalijum jodata u g/100 g  
 $M_{KIO_3}$  molekularna masa kalijum jodata (214 g/mol)  
 $T$  tačna molarnost rastvora natrijum tiosulfata (mol/l).

Rastvor skroba, vodeni rastvor 10 g/l, svježe pripremljen korišćenjem prirodnog rastvorljivog skroba. Mogu se upotrebljavati i ekvivalentni reagensi.

## 6. Uzorak

Treba voditi računa da uzeti uzorak bude smješten na tamnom i hladnom mjestu u potpuno ispunjenim staklenim posudama, hermetički zatvorenima staklenim ili plutanim čepovima.

## 7. Postupak

Ispitivanje se mora sprovesti pri difuznom dnevnom svjetlu ili pod vještačkim svjetlom. U staklenoj mjernoj posudici ili, ako to ne uspije, u tikvici treba izvagati masu uzorka sa preciznošću od 0,001 g prema očekivanom peroksidnom broju u skladu sa sljedećom tabelom:

| Očekivani peroksidni broj (meq) | Masa ispitivanog dijela uzorka (g) |
|---------------------------------|------------------------------------|
| 0 do 12                         | 5,0 do 2,0                         |
| 12 do 20                        | 2,0 do 1,2                         |
| 20 do 30                        | 1,2 do 0,8                         |
| 30 do 50                        | 0,8 do 0,5                         |
| 50 do 90                        | 0,5 do 0,3                         |

Tikvicu treba odčepiti i u nju staviti staklenu mjernu posudicu koja sadrži ispitivani dio uzorka. Dodati 10 ml hlороforma. Miješanjem brzo rastvoriti uzorak. Dodati 15 ml sirćetne kiseline, zatim 1 ml rastvora kalijum jodida. Brzo začepiti, promućkati jedan minut i odložiti da odleži tačno pet minuta na tamnom mjestu i na temperaturi od 15 do 25 °C.

Dodati približno 75 ml destiliovane vode. Titrovati oslobođeni jod rastvorom natrijum tiosulfata snažnim protresanjem uz upotrebu rastvora skroba kao indikatora.

Na istom uzorku za ispitivanje sprovesti dva određivanja.

Istovremeno treba izvršiti analizu slijepe probe. Ako rezultat slijepe probe prelazi 0,05 ml 0,01 N rastvora natrijum tiosulfata treba zamijeniti nečiste reagense.

#### 8. Izražavanje rezultata

Peroksidni broj (PB) izražen u miliekvivalentima aktivnog kiseonika na kilogram dat je u sljedećoj formuli

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

pri čemu je:

V=zapremina standardizovanog rastvora natrijum tiosulfata (5.4.) utrošen za ispitivanje, izražen u mililitrima, ispravljen rezultatom za slijepu probu;

T=tačna molarnost korišćenog rastvora natrijum tiosulfata (5.4.), izražena u mol/l;

m=masa ispitivanog dijela uzorka u gramima.

Kao rezultat treba uzeti aritmetičku sredinu dva izvršena određivanja.

Rezultat određivanja treba navesti do jednog decimalnog broj.

## SPEKTROFOTOMETRIJSKO ISPITIVANJE U ULTRALJUBIČASTOM PODRUČJU

### UVOD

Spektrofotometrijskim ispitivanjem u ultraljubičastom području mogu se dati informacije o kvalitetu ulja, očuvanosti i promjenama koje su uzrokovane tehnološkim procesima. Do apsorpcija na talasnim dužinama utvrđenima u ovoj metodi dolazi zbog prisutnosti konjugovanih dienskih i trienskih jedinjenja koji nastaju kao posljedica oksidacionih procesa i/ili postupaka rafinisanja. Te apsorpcije se iskazuju kao specifične ekstinkcije  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  (ekstinkcija 1 %-tnog masenog udjela rastvora ulja u određenom rastvoru, u kiveti od 10 mm) što se uobičajeno označava sa K (naziva se i „koeficijentom ekstinkcije”).

### 1. PRINCIP

Uzorak se rastvara u propisanom rastvaraču, a sposobnost apsorpcije rastvarača mjeri se na utvrđenim talasnim dužinama u odnosu na čisti rastvor.

Specifične ekstinkcije na 232 nm i 268 nm u izooktanu ili na 232 nm i 270 nm u cikloheksanu izračunavaju se za koncentraciju 1 %-tnog masenog udjela u kiveti od 10 mm.

#### 1. OPREMA

- 2.1. Spektrofotometar pogodan za mjerenja na talasnim dužinama ultraljubičaste svjetlosti (220 nm do 360 nm), sa mogućnošću očitavanja pojedinačnih nanometarskih jedinica. Preporučuju se redovne provjere radi postizanja tačnosti i obnovljivosti sposobnosti apsorpcije i opseg talasnih dužina za rasipnu svjetlost.

- 2.1.1. *Opseg talasnih dužina* se može provjeriti upotrebom referentnog materijala koji se sastoji od filtera od optičkog stakla koje sadrži holmijum oksid ili rastvor holmijum oksida (zapečaćen ili nezapečaćen) sa jasnim apsorpcijskim frekvencijama. Referentni materijali namijenjeni su provjeri i baždarenju opsega talasnih dužina vidljivih i ultraljubičastih spektrofotometara sa nominalnim spektralnim frekvencijskim širinama od 5 nm ili manje. Mjerenja se sprovode u odnosu na vazduh kao slijepu probu u intervalu talasnih dužina od 640 do 240 nm, u skladu sauputstvima priloženim uz referentne materijale. Sprovodi se ispravljanje bazne linije sa praznim putem snopa pri svakoj promjeni širine proreza. Standardne talasne dužine navedene su u sertifikatu referentnog materijala.

- 2.1.2. *Opseg apsorpcije* se može provjeriti upotrebom komercijalno dostupnog zapečaćenog referentnog materijala koji se sastoji od kiselog rastvora kalijumdihromata u određenim koncentracijama i potvrđenim vrijednostima apsorpcije pri njihovim  $\lambda_{\text{max}}$  (četiri rastvora kalijum dihromata u perhlornoj kiselini zapečaćenog u četiri UV kvarcne kivete za mjerenje referentne vrijednosti linearnosti i fotometrijske tačnosti u UV-području). Rastvor kalijum dihromata mjeri se u odnosu na slijepu probu kiseline koja se primjenjuje nakon ispravljanja bazne linije u skladu sa uputima priloženim uz referentne materijale. Vrijednosti apsorpcije navedene su u sertifikatu referentnog materijala.

U cilju provjeravanja odziva fotoćelije i fotomultiplikatora druga mogućnost je postupiti na sljedeći način: odvagati 0,2000 g čistog kalijum hromata za spektrofotometriju i rastvoriti ga u 0,05 mol/l rastvoru kalijum hidroksida u građiranoj tikvici zapremine 1 000 ml i nadopuniti do oznake. Uzeti tačno 25 ml dobijenog rastvora, staviti u građisanu tikvicu zapremine 500 ml i razblažiti do oznake upotrebljavajući isti rastvor kalijum hidroksida.

Izmjeriti ekstinkciju tako dobijenog rastvora na 275 nm, upotrebljavajući rastvor kalijum hidroksida kao referentan. Ekstinkcija izmjerena upotrebom kivete od 1 cm treba biti  $0,200 \pm 0,005$ .

- 2.2. Pravougaone kvarcne kivete, sa poklopcima, pogodne za mjerenja na talasnim dužinama ultraljubičaste svjetlosti (220 do 360 nm) sa dužinom optičkog puta od 10 mm. Kivete napunjene vodom ili drugim pogodnim rastvaračem ne bi trebale pokazivati međusobne razlike u ekstinkciji većoj od 0,01 ekstinkcijskih jedinica.

- 2.3. Mjerne tikvice od 25 ml sa jednom oznakom, klase A.

2.4. Analitička vaga sa mogućnošću očitavanja uz odstupanje do 0,0001 g

#### 4. REAGENSI

Tokom analize, osim ako nije drugačije navedeno, upotrebljavati isključivo reagense priznate analitičke čistoće i destilovanu ili demineralizovanu vodu ili vodu iste čistoće.

Rastvor: Izooktan (2,2,4-trimetilpentan) za mjerenja na 232 nm i 268 nm i cikloheksan za mjerenja na 232 nm i 270 nm, sa sposobnošću apsorpcije manjom od 0,12 na 232 nm i manjom od 0,05 na 270 nm u odnosu na destilovanu vodu, izmjereno u kiveti od 10 mm.

#### 5. POSTUPAK

5.1. Uzorak mora biti savršeno homogen i bez lebdećih nečistoća. U protivnom, mora se profiltrirati kroz papir na temperaturi od približno 30 °C.

5.2. Od tako pripremljenog uzorka precizno odvagati približno 0,25 g (uz odstupanje do 1 mg) u graduisanoj tikvici od 25 ml, dopuniti propisanim rastvorom do oznake i homogenizovati. Dobijeni rastvor mora biti savršeno bistar. Ako je došlo do opalescencije ili zamućenosti, brzo profiltrirati kroz papir.

*NAPOMENA:* Po pravilu je masa od 0,25 – 0,30 g dovoljna za mjerenja sposobnosti apsorpcije djevičanskog ili ekstra djevičanskog maslinovog ulja na 268 nm i 270 nm. Za mjerenja na 232 nm uobičajeno je potrebno 0,05 g uzorka te se tako po pravilu pripremaju dva različita rastvora. Za mjerenja sposobnosti apsorpcije ulja komine maslina, rafinisanog maslinovog ulja i falsifikovanog maslinovog ulja, a zbog njihove veće sposobnosti apsorpcije, po pravilu je potrebna manja količina uzorka, npr. 0,1 g.

5.3. Prema potrebi ispraviti baznu liniju (220 – 290 nm) rastvorom u obje kvarcne kivete (uzorak i referenca), potom napuniti kvarcnu kivetu uzorka dobijenim ispitnim rastvorom i izmjeriti ekstinkcije na 232, 268 ili 270 nm u odnosu na rastvor koji je upotrijebljen kao referenca.

Očitane vrijednosti ekstinkcije moraju biti unutar intervala od 0,1 do 0,8 ili unutar linearnog raspona spektrofotometra koji treba provjeriti. Ako nije tako, mjerenja se moraju ponoviti upotrebljavajući, prema potrebi, rastvor veće ili manje koncentracije.

5.4. Nakon mjerenja sposobnosti apsorpcije na 268 ili 270 nm izmjeriti sposobnost apsorpcije pri  $\lambda_{\max}$ ,  $\lambda_{\max} + 4$  i  $\lambda_{\max} - 4$ . Te se vrijednosti sposobnosti apsorpcije upotrebljavaju radi određivanja odstupanja u specifičnoj ekstinkciji ( $\Delta K$ ).

*NAPOMENA:* smatra se da  $\lambda_{\max}$  iznosi 268 nm za izooktan koji se upotrebljava kao rastvor i 270 nm za cikloheksan.

#### 6. ISKAZIVANJE REZULTATA

6.1. Zabilježiti specifične ekstinkcije (koeficijente ekstinkcije) na različitim talasnim dužinama, izračunate kako slijedi:

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{c \times s}$$

pri čemu je:

$K\lambda$  = specifična ekstinkcija na talasnoj dužini  $\lambda$ ;

$E\lambda$  = ekstinkcija mjerena na talasnoj dužini  $\lambda$ ;

$c$  = koncentracija rastvora u g/100 ml;

$s$  = dužina puta kvarcne kivete u cm;

iskazano sa dva decimalna broja.

## 6.2. Odstupanje specifične ekstinkcije ( $\Delta K$ )

Odstupanje apsolutne vrijednosti ekstinkcije ( $\Delta K$ ) iskazuje se kao:

$$\Delta K = \left| K_m - \left( \frac{K_{\lambda m} - 4 + K_{\lambda m} + 4}{2} \right) \right|$$

pri čemu je  $K_m$  specifična ekstinkcija na talasnoj dužini za maksimalnu apsorpciju na 270 nm i 268 nm zavisno od upotrijebljenog rastvra.

Rezultati trebaju da budu iskazani sa dva decimalna broja.

## PRILOG 5

### ODREĐIVANJA VOSKOVA, METIL ESTARA MASNIH KISELINA I ETIL ESTARA MASNIH KISELINA KAPILARNOM GASNOM HROMATOGRAFIJOM

#### 1. UVOD

Ovom metodom se određuje udio voskova, metil estara masnih kiselina i etil estara masnih kiselina u maslinovom ulju. Pojedini voskovi i alkil estri razdvajaju se prema broju ugljenikovih atoma. Ova se metoda preporučuje kao sredstvo za razlikovanje maslinovog ulja i ulja komine maslina te kao parametar kvaliteta ekstra djevičanskih maslinovih ulja omogućavajući otkrivanje falsifikovanih mješavina ekstra djevičanskih maslinovih ulja s uljima nižeg kvaliteta, bilo da su djevičanska, od komine maslina ili neka dezodorisana ulja.

#### 2. PRINCIP

Dodavanje ulju odgovarajućih internih standarda i frakcionisanje pomoću hromatografske kolone punjene hidratizovanim silika gelom. Obnova frakcije koja je eluirana pod uslovima ovog testiranja (polarnost niža od polarnosti triglicerida) i neposredna analiza kapilarnom gasnom hromatografijom.

#### 3. APARATI

##### 3.1. Erlenmajerova tikvica, 25 ml.

**Staklena kolona** za tečnu hromatografiju, unutrašnjeg

##### 3.2. prečnika

15 mm, dužine 30-40 cm, sa odgovarajućom slavinom.

**Gasni hromatograf** s kapilarnom kolonom, opremljen

##### 3.3. sistemom za

direktno injektovanje uzorka u kolonu, koji se sastoji od:

##### 3.3.1. Termostatske komore sa regulatorom temperature.

##### 3.3.2. Hladni injektor za direktno unošenje uzorka u kolonu.

##### 3.3.3. Plamenjonizacioni detektor i pretvarač-pojačalo.

##### 3.3.4. Pisač-integrator (Napomena 1.) za upotrebu sa pretvaračem-pojačalom (tačka 3.3.3.), sa vremenom odziva manjim od 1 sekunde i promjenjivom brzinom papira.

*Napomena 1:* Takođe je moguće koristiti kompjuterski sistem ako se podaci o gasnoj hromatografiji unose putem računara.

- 3.3.5. **Kapilarna kolona, liveni silicijum dioksid (za analizu voskova i metili etil estara)**, dužine 8-12 m, unutrašnjeg prečnika 0,25-0,32 mm, iznutraravnomjerno obložene tečnom fazom (Napomena 2.) slojem debljine 0,10-0,30  $\mu\text{m}$ .

*Napomena 2.:* Na tržištu postoje tečne faze pogodne za ovu namjenupoput SE52, SE54 itd.

- 3.4. **Mikrošpric**, od 10 $\mu\text{l}$ , za direktno unošenje uzorka u kolonu, sčvrstofiksiranom iglom.

3.5. **Elektrovibrator.**

3.6. **Rotacioni vakuum-uparivač.**

3.7. **Visokotemperaturna peć (mufolna peć).**

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

3.9. Uobičajeno laboratorijsko stakleno posuđe.

#### 4. REAGENSI

- 4.1. **Silikagel** veličine zrna 60-200 $\mu\text{m}$ . Staviti silika gel u mufolnu pećna 500 °C najmanje 4 sata. Nakon hlađenja dodati 2 % vode na količinu silika gela. Dobro promućkati kako bi se suspenzija homogenizovala i držati na tamnom mjestu najmanje 12 sati prije upotrebe.

- 4.2. **n-heksan**, hromatografski stepen ili stepen ostatka (mora se provjeritičistoća).

Upozorenje - Para se može zapaliti. Držite se dalje od izvora toplote, iskrenja ili golog plamena. Uvijek proverite jesu li boce dobro zatvorene. Osigurajte pravilno provjetranje tokom upotrebe. Treba izbjegavati nakupljanje pare i otkloniti eventualne opasnosti od požara, poput grijača ili električnih aparata koji nisu proizvedeni od nezapaljivog materijala. Opasno je ako se para udiše jer može izazvati oštećenje nervnih élija. Treba izbjegavati udisanje pare. Ako je potrebno koristite odgovarajuće aparate za disanje. Treba izbjegavati dodir s očima i kožom.

#### 4.3. **Etil etar, za hromatografiju**

Visoko zapaljiv i umjereno toksičan, iritira kožu. Poguban ako se udiše. Može dovesti do oštećenja očiju. Efekti mogu biti zakasnjeli. To može stvoriti eksplozivne perokside. Pare se mogu zapaliti. Držite se dalje od izvora toplote, iskrenja ili golog plamena. Uvijek proverite jesu li boce dobro zatvorene. Osigurajte pravilno provjetranje tokom upotrebe. Treba izbjegavati nakupljanje pare i otkloniti eventualne ugroze od požara, poput grijača ili električnih aparata koji nisu proizvedeni od nezapaljivog materijala. Ne isparavajte do suvog ili gotovo suvog. Dodavanje vode ili odgovarajuće redukujućesupstance može smanjiti stvaranje peroksida. Nemojte piti. Treba izbjegavati udisanje pare. Izbjegavajte duži ili višekratni dodir s kožom.

#### 4.4. **n-heptan, za hromatografiju, ili izo-oktan**

Nezapaljiv. Opasan ako se udiše. Držite se podalje od izvora toplote, iskrenja ili golog plamena. Uvijek proverite jesu li boce dobro zatvorene. Osigurajte pravilno provjetranje tokom upotrebe. Treba izbjegavati udisanje pare. Izbjegavajte duži ili višekratni dodir s kožom.

- 4.5. **Standardni rastvor lauril arahidata** (Napomena 3.), koncentracije 0,05 % (m/V) u heptanu (interni standard za voskove).

Takođe je moguće koristiti palmitil palmitat, miristilstearat ili arahidil laureat.

**4.6. Standardni rastvor metil heptadekanoata, koncentracije 0,02 % (m/V) u heptanu (interni standard za metil i etil estere).**

**4.7. Sudan 1 (1-fenil-azo-2-naftol).**

**4.8. Noseći gas: vodonik ili helijum, čistoće za gasnu hromatografiju.**

*Vodonik.* Pod pritiskom vrlo zapaljiv. Držati podalje od izvora toplote, iskrenja ili golog plamena. Uvijek provjerite je li ventil boce dobro zatvoren kada nije u upotrebi. Uvijek koristite ventil s reduktorom pritiska. Smanjite napetost opruge reduktora prije otvaranja ventila na boci. Kada otvarate ventil nemojte stajati ispred otvora za ispuštanje iz boce. Osigurajte pravilno provjetravanje tokom upotrebe. Ne prenosite gas iz jedne boce u drugu. Nemojte miješati gas u boci. Osigurajte da se boce ne mogu prevrnuti. Držite ih dalje od sunčeve svjetlosti i izvora toplote. Držite ih u okruženju bez korozije. Ne koristite oštećene ili neoznačene boce.

*Helijum.* Kompresovani gas pod visokim pritiskom. Smanjuje količinu kiseonika za disanje. Držite boce zatvorenim. Osigurajte pravilno provjetravanje tokom upotrebe. Ne ulazite u skladište ako nije pravilno provjetreno. Uvijek koristite ventil s reduktorom pritiska. Smanjite napetost opruge reduktora prije otvaranja ventila na boci. Ne prenosite vodonik iz jedne boce u drugu. Osigurajte da se boce ne mogu prevrnuti. Kada otvarate ventil nemojte stajati ispred otvora boce. Držite ih dalje od sunčeve svjetlosti i izvora toplote. Držite ih u okruženju otpornom na koroziju. Ne koristite oštećene ili neoznačene boce. Nemojte udisati. Koristite isključivo za tehničke namjene.

**4.9. Pomoćni gasovi:**

— čisti vodonik, za gasnu hromatografiju,

— čisti vazduh, za gasnu hromatografiju.

*Vazduh.* Kompresovani gas pod visokim pritiskom. Koristiti s oprezom u prisutnosti zapaljivih supstanci budući da je temperatura samozapaljenja većine organskih jedinjenja u vazduhu znatno niža pod visokim pritiskom. Uvijek provjerite je li ventil boce dobro zatvoren kada nije u upotrebi. Uvijek koristiti ventil s reduktorom pritiska. Smanjite napetost opruge reduktora prije otvaranja ventila na boci. Kada otvarate ventil nemojte stajati ispred otvora boce. Ne prenosite gas iz jedne boce u drugu. Nemojte miješati gas u boci. Osigurajte da se boce ne mogu prevrnuti. Držite ih dalje od sunčeve svjetlosti i izvora toplote. Čuvajte ih u okruženju bez korozije. Ne koristite oštećene ili neoznačene boce. Vazduh namijenjen u tehničke svrhe ne smije se koristiti za udisanje ili aparate za disanje.

**5. POSTUPAK**

**5.1. Priprema hromatografske kolone**

Pomiješati 15 g silika gela (tačka 4.1.) sa n-heksanom (tačka 4.2.) i prenijeti u kolonu (tačka 3.2.). Ostaviti da se istaloži. Dopriniti taloženje pomoću elektrovibratora da se dobije ujednačeniji hromatografski sloj. Isprati s 30 ml n-heksana da se uklone sve nečistoće. Na vagi odvagati tačno 500 mg uzorka u Erlenmajeru zapremnine 25 ml (tačka 3.1.), koristeći analitičku vagu (tačka 3.8.), dodati odgovarajući udio internog standarda (tačka 4.5.) prema pretpostavljenom udjelu voska. Rastvoriti tačkatačkatačkaNa primjer, za maslinovo ulje dodati 0,1 mg lauril arahidrata, a za ulje od komine masline 0,25 do 0,50 mg i 0,05 mg metil heptadekanoata za ulja masline (tačka 4.6.).

Uzorak prenijeti u hromatografsku kolonu pomoću dva puta po 2 ml n-heksana (tačka 4.2.).

Rastvor ispuštati dok ne dostigne 1 mm iznad gornjeg nivoa absorbenta. Inspirati dalje mješavinom n-heksana/etil etra (odnos 99:1) i sakupiti 220 ml pri brzini protoka od oko 15 kapi svakih 10 sekundi. **(Ova frakcija sadrži metil i etil estre i voskove).** (Napomena 4.) (Napomena 5.).

Mješavina n-heksana/etil etra (99:1) mora se pripremati svakodnevno.

Za vizuelnu provjeru ispravnog eluiranja voskova, uzorku rastvora može se dodati 100 µl 1 % rastvora Sudana 1 u mješavini.

S obzirom da obojenje ima pređeni put između voskova i triglicerida, kada obojenje dođe do dna hromatografske kolone, eluiranje treba zaustaviti jer su svi voskovi eluirali.

Iz tako dobijene frakcije u rotacionom vakuum-uparivaču ispariti gotovo cijeli rastvor. Preostala 2 ml rastvora treba odstraniti pomoću blagog protoka azota. Sakupljenu frakciju koja sadrži metil i etil estere razblažiti sa 2-4 ml n-heptana ili izo-okšana.

## 5.2. Analiza gasnom hromatografijom

### 5.2.1. Pripremni radovi

Postaviti kolonu na gasni hromatograf (tačka 3.3.) povezivanjem ulaznog otvora na sastav neposredno na koloni i izlaznog otvora na detektor. Obaviti provjeru gasnog hromatografa (protok gasa, rad detektora i pisača itd.).

Ako se kolona koristi prvi put, potrebno je prvo kondicionirati. Pustiti da kroz kolonu prođe malo gasa, zatim uključiti gasni hromatograf. Postepeno zagrijavati tako da se za 4 sata postigne temperatura od 350 °C.

Održavati temperaturu najmanje dva sata, a zatim uređaj podesiti na radne uslove (postaviti protok gasa, zapaliti plamen, povezati na elektronički pisač (tačka 3.3.4.), postaviti temperaturu komore za kolonu, regulisati detektor itd.). 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, dok pozitivno odstupanje ukazuje da kolona nije dovoljno kondicionirana.

### 5.2.2. Izbor radnih uslova za voskove i metil i etil estre (Napomena 6.).

Radni slovi su uopšteno sljedeći:

— Temperatura kolone: 20 °C/min 5 °C/min

Početno 80 °C (1 min.) ————— 140 °C ————— 335 °C (20),

— Temperatura detektora: 350 °C,

— Količina ubrizganog uzorka: 1 µl rastvora u n-heptanu (2-4 ml),

— Noseći gas: helijum ili vodonik pri optimalnoj linearnoj brzini za odabrani gas (vidjeti Dodatak A),

— Osjetljivost instrumenta: pogodno za ispunjenje gore navedenih uslova.

Zahvaljujući visokoj konačnoj temperaturi, dozvoljeno je pozitivno odstupanje od najviše 10 % vrijednosti pune skale.

Uslovi se mogu promijeniti prema karakteristikama kolone i gasnog hromatografa kako bi se postiglo razdvajanje svih voskova i metil i etil estara masnih kiselina kao i zadovoljavajuće razdvajanje pikova (vidjeti slike 2., 3. i 4.) i vrijeme zadržavanja koje za interni standard lauril arahidata iznosi  $18 \pm 3$  minuta. Glavni pik koji pripada voskovima mora dostizati najmanje 60 % vrijednosti pune skale, dok interni standard metil heptadekanoata za metil i etil estre mora dostići vrijednost pune skale.

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

### 5.3. Sprovođenje analize

Mikrošpricom od 10  $\mu$ l uzeti 10  $\mu$ l rastvora, povući klip šprica tako da igla bude prazna. Staviti iglu u injektor i nakon 1-2 sekundi brzo ubrizgati. Nakon 5 sekundi polagano izvući iglu.

Registrovati hromatogram sve dok voskovi ili stigmastadieni potpuno ne eluiraju, zavisno od frakcije koja se analizira.

Bazna linija mora stalno zadovoljavati tražene uslove.

### 5.4. Identifikacija pikova

Identifikacija pojedinih pikova mora se temeljiti na vremenu zadržavanja, uporedbom sa poznatim vremenima zadržavanja mješavina voskova analiziranih pod istim uslovima. Identifikacija alkil estara vrši se iz mješavina metil i etil estara glavnih masnih kiselina u maslinovim uljima (palmitinskih i oleinskih).

Slika 1. prikazuje hromatogram voskova djevičanskog maslinovog ulja. Slike 2. i 3. prikazuju hromatograme dvije vrste ekstra djevičanskog maslinovog ulja u maloprodaji, od kojih jedno posjeduje metil i etil estre, a drugo ne. Na slici 4. su hromatogrami ekstra djevičanskog maslinovog ulja vrhunskog kvaliteta i istog tog ulja pomiješanog s 20 % dezodorisanog ulja.

### 5.5. Određivanje udjela voskova

Pomoću integratora izračunani površine pikova internog standarda lauril arahidata i alifatičnih estara  $C_{40}$  do  $C_{46}$ .

Udio ukupnih voskova izračunavamo dodavanjem svakog pojedinog voska u mg/kg ulja, kako slijedi:

$$\text{Voskovi; mg/kg} = \frac{\sum A_x \cdot P \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

$A_s$  = površina pika internog standarda lauril arahidata, računskim proračunom

$m_s$  = masa dodatog internog standarda lauril arahidata, u miligramima

$m$  = masa uzorka za analizu, u gramima.

#### 5.5.1. Kvantitativna analiza metil i etil estara

Pomoću integratora izračunati površine pikova internog standarda metil heptadekanoata, masnih kiselina metil estara  $C_{16}$  i  $C_{18}$  i masnih kiselina etil estara  $C_{16}$  i  $C_{18}$ .

Izračunati udio svakog alkil estera u mg/kg ulja, kako slijedi:

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

gdje  
je:

$A_x$  = površina pika pojedinog  $C_{16}$  i  $C_{18}$  estara, računskim  
proračunom  
 $A_s$  = površina pika internog standarda metil heptadekanoata,  
računskim proračunom

$m_s$  = masa dodatog internog standarda metil heptadekanoata, u  
miligrama  
mima

$m$  = masa uzorka za izračun, u gramima.

## 6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

Ukupan udio različitih voskova  $C_{40}$  do  $C_{46}$  (*Napomena 7.*) izražava se u miligramima po kilogramu ulja.

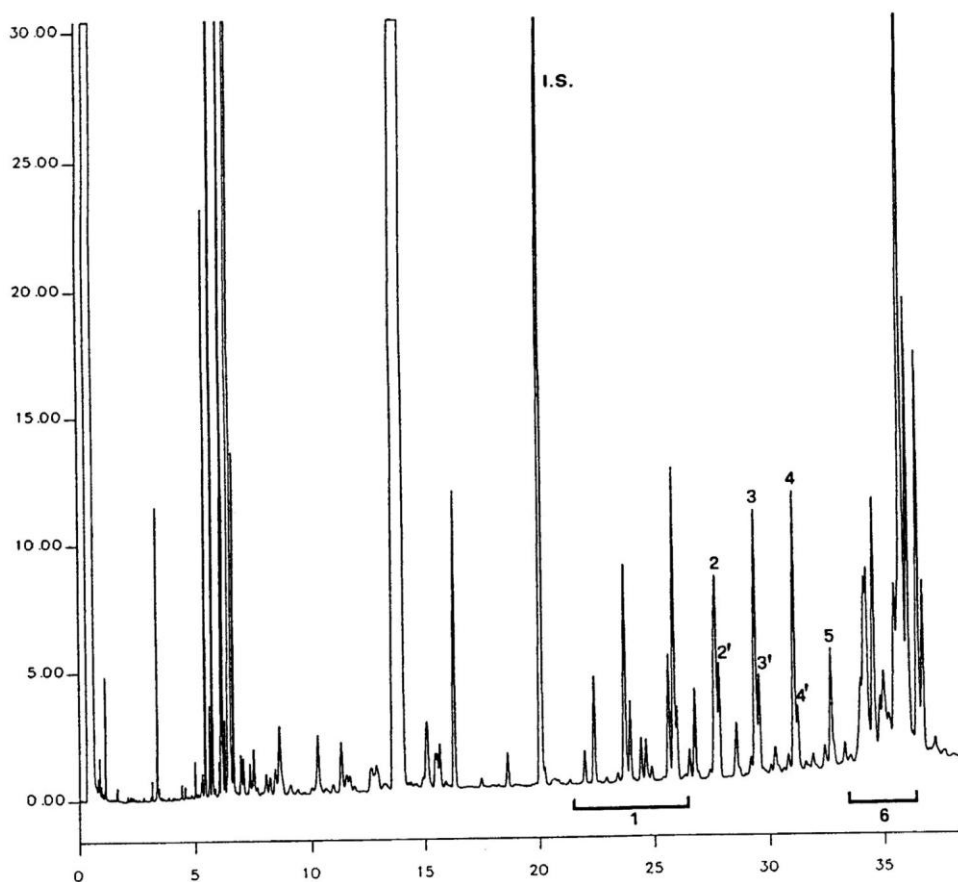
Ukupan udio metil estara i etil estara  $C_{16}$  do  $C_{18}$  i njihov zbir. Rezultati treba da budu izraženi najbliže moguće odnosu mg/kg.

Komponente koje treba kvantifikovati odnose se na pikove sparnim brojevima ugljenika između estara  $C_{40}$ - $C_{46}$  kao primjer može se koristiti hromatogram voskova maslinovog ulja prikazan na priloženoj slici. Ako se  $C_{46}$  estar pojavi dva puta, preporučuje se da se za njegovu identifikaciju analizira frakcija voskova ulja komine masline gdje je pik  $C_{46}$  jednostavno identifikovati jer je očigledno najveći.

Treba izraziti odnos između etil estara i metil estara.

Slika 1.

Primjer gasnog hromatograma frakcije voska maslinovog ulja <sup>(1)</sup>



Pikovi s vremenom zadržavanja metil i etil estara masnih kiselina 5-8 minuta.

Legenda:

I.S. = lauril arahidat

1 = diterpenski esteri

2 + 2' = estri C<sub>40</sub>

3 + 3' = estri C<sub>42</sub>

4 + 4' = estri C<sub>44</sub>

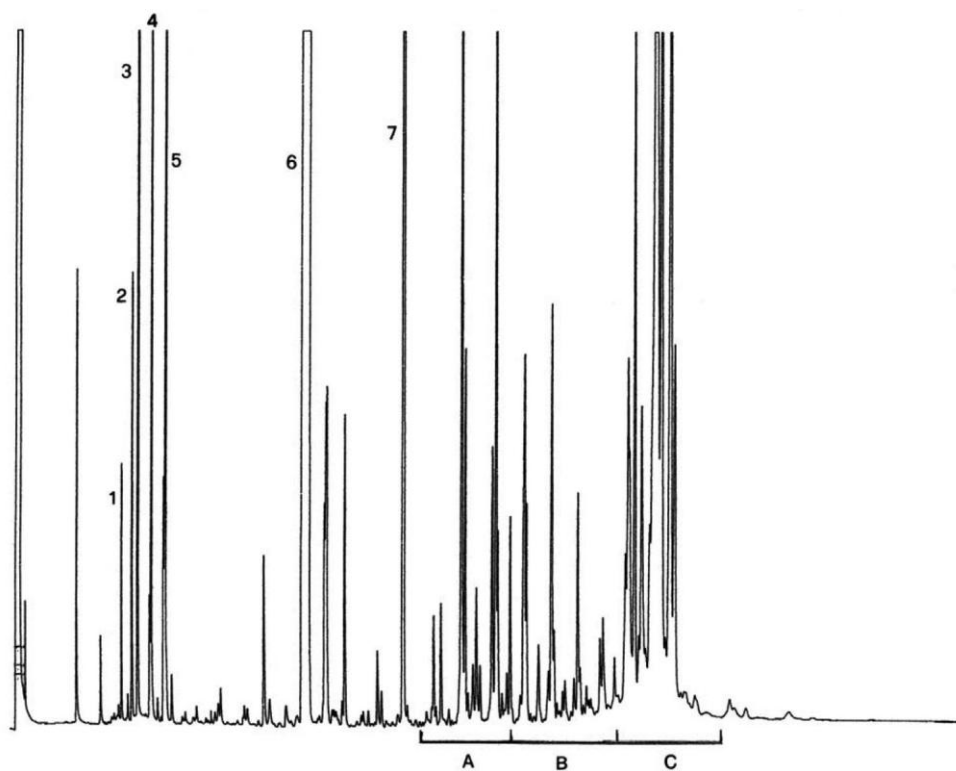
5 = estri C<sub>46</sub>

6 = sterolni estri i triterpenski alkohol

<sup>(1)</sup> Nakon eluiranja sterolnih estera, hromatogram ne smije pokazivati signifikantne pikove (trigliceridi).

Slika 2.

Metil estri, etil estri i voskovi u djevičanskom maslinovom ulju

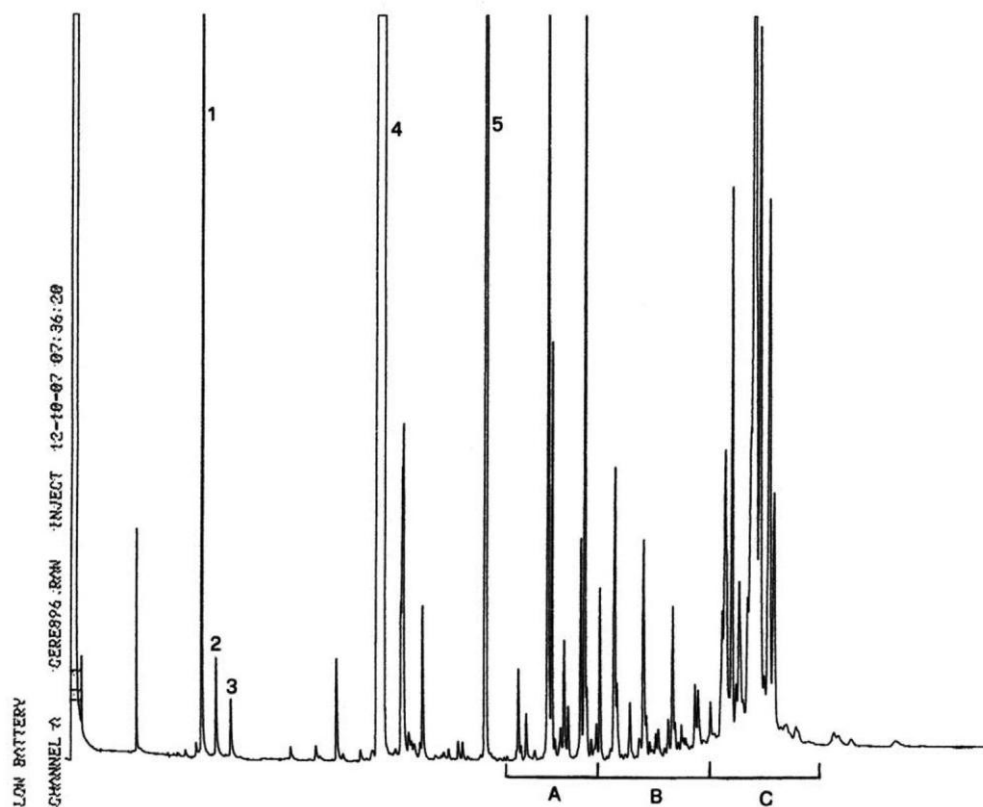


Legenda:

- 1 – Metil C<sub>16</sub>
- 2 – Etil C<sub>16</sub>
- 3 – Metil heptadekanoat I.S.
- 4 – Metil C<sub>18</sub>
- 5 – Etil C<sub>18</sub>
- 6 – Skvalen
- 7 – Lauril arahidat I.S.
- A – Diterpenski esteri
- B – Voskovi
- C – Sterolni estri i triterpenski estri

Slika 3.

Metil estri, etil estri i voskovi u ekstra djevičanskom maslinovom ulju

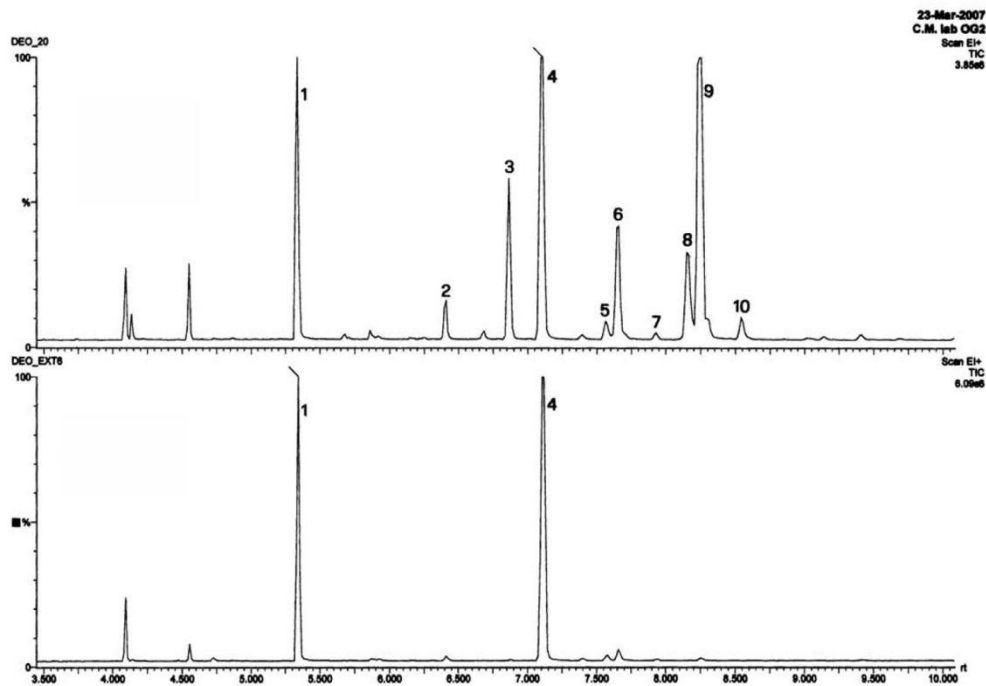


Legenda:

- 1 – Metil heptadekanoat I.S.
- 2 – Metil C<sub>18</sub>
- 3 – Etil C<sub>18</sub>
- 4 – Skvalen
- 5 – Lauril arahidat I.S.
- A – Diterpenski esteri
- B – Voskovi
- C – Sterolni estri i triterpenski estri

Slika 4.

Dio hromatograma ekstra djevičanskog maslinovog ulja i istog ulja miješanog s dezodorisanim uljem



Legenda:

- 1 – Metil miristat I.S.
- 2 – Metil palmitat
- 3 – Etil palmitat
- 4 – Metil heptadekanoat I.S.
- 5 – Metil linoleat
- 6 – Metil oleat
- 7 – Metil stearat
- 8 – Etil linoleat
- 9 – Etil oleat
- 10 – Etil stearat

#### Određivanje linearne brzine gasa

U gasni hromatograf podešen na normalne radne uslove ubrizgava se 1 do 3  $\mu$ l metana (ili propana). Mjeri se vrijeme koje je potrebno gasu da prođe kroz kolonu, od trenutka ubrizgavanja do pojave pika ( $t_M$ ).

Linearna brzina, u cm/s, data je formulom  $L/t_M$ , gdje je  $L$  dužina kolone u cm, a  $t_M$  vrijeme izmjereno u sekundama.

## ORGANOLEPTIČKO OCJENJIVANJE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

### 1. UVOD

Organoleptičko ocjenjivanje primjenjuje se samo na djevičansko maslinovo ulje i na klasifikaciju ili označivanje takvog ulja na temelju intenziteta uočenih mana i voćnosti koje je utvrdio skup odabranih, obučanih i praćenih ocjenjivača.

### 2. SVOJSTVA

Svojstva djevičanskog maslinovog ulja utvrđena organoleptičkim ocjenjivanjem mogu biti:

#### 2.1. Negativna svojstva

*Buđavo/blatno* Aroma karakteristična za ulje dobijeno iz maslina kojemu su bile naslagane u hrpama ili uskladištene i kod kojih je došlo do visokog stepena anaerobne fermentacije, ili ulje koje je ostalo u dodiru sa talogom koji se stvara u podzemnim rezervoarima i koje je bilo izloženo i procesu anaerobne fermentacije.

*Ustajalo-vlažno-zemljasto* Aroma karakteristična za ulja dobijena iz plodova na kojima su se, zbog skladištenja u vlažnim uslovima u periodu od nekoliko dana, razvile brojne gljivice i kvasci ili za ulje dobijeno iz maslina koje su sakupljene sa ostacima zemlje ili blata i nijesu oprane.

*Vinsko-sirćetno-kiselo-kiselkasto* Aroma karakteristična za neka ulja koja podsjećaju na vino ili sirće i tu aromu uglavnom je prouzrokovao proces aerobne fermentacije u plodovima ili ostacima maslinovog tijesta na neodgovarajuće očišćenim filter-slojnicama, što dovodi do stvaranja sirćetne kiseline, etil acetata i etanola.

*Užeglo* Aroma ulja koja su bila izložena intenzivnim oksidacijskim procesima.

*Smrznute masline (mokro drvo)* Aroma karakteristična za ulja dobijena od maslina koje su bile smrznute na stablu.

#### 2.1.1. Ostala negativna svojstva

|                               |                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Zagrijano ili zagoreno</i> | Aroma karakteristična za ulja koja su bila izložena pretjeranom i/ili dugotrajnom zagrijavanju tokom prerade, posebno u slučaju kad se miješanje sprovodilo u neprikladnim temperaturnim uslovima. |
| <i>Sijeno-drvo</i>            | Aroma karakteristična za neka ulja proizvedena od maslina koje su se osušile.                                                                                                                      |
| <i>Grubo</i>                  | Osjećaj gustoće i pastoznosti u ustima koji daju pojedina stara ulja.                                                                                                                              |
| <i>Mašinsko ulje</i>          | Aroma ulja koja podsjećaju na naftu, ulje za podmazivanje ili mineralno ulje.                                                                                                                      |
| <i>Biljna voda</i>            | Aroma kakvu ulje poprima zbog dužeg dodira sa biljnom vodom koja je podvrgnuta fermentacijskim procesima.                                                                                          |

|                  |                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Salamura</i>  | Aroma ulja dobijenog iz maslina koje su čuvane u salamuri.                                                                                                                                                                      |
| <i>Metalno</i>   | Aroma koja podsjeća na metal karakteristična je za ulja koja su bila u dužem dodiru sa metalnim površinama tokom drobljenja, miješanja, presovanja ili skladištenja.                                                            |
| <i>Oporo</i>     | Aroma karakteristična za ulje dobijeno iz maslina koje su presovane na novim filter-slojnicama. Aroma se može razlikovati u zavisnosti od jesu li filter-slojnice napravljene od zelene trave esparto ili sušene trave esparto. |
| <i>Crvljivo</i>  | Aroma karakteristična za ulje dobijeno iz maslina koje su napale larve maslinove muve ( <i>Bactrocera oleae</i> ).                                                                                                              |
| <i>Krastavac</i> | Aroma koja nastaje kad je ulje predugo hermetički zatvoreno, posebno u limenim kutijama, a pripisuje se stvaranju 2,6 nonadienala.                                                                                              |

### 3.2. Pozitivna svojstva

*Voćnost*- Skup mirisnih osjećaja koji zavise od sorte karakterističan za ulje od zdravih i svježih maslina, bilo zrelih ili nedozrelih. Zapaža se direktno i/ili u zadnjem dijelu nosa

*Gorkost* - Primarni ukus karakterističan za ulje dobijeno od zelenih maslina ili maslina koje su tek počele mijenjati boju. Zapaža se putem okruženih papila poređanih na jeziku u obliku slova „V”.

*Pikantnost* - Taktilni osjećaj peckanja svojstven uljima proizvedenim na početku godine usjeva, uglavnom još od nedozrelih maslina. Može se raspoznati po cijeloj usnoj šupljini, a posebno u grlu.

### 3.3. Neobvezna terminologija u svrhu označivanja

Pozitivna svojstva (voćno, gorko, pikantno): prema intenzitetu percepcije:

- *Intenzivno*, kad je medijan svojstva veći od 6,
- *Srednje*, kad je medijan svojstva između 3 i 6,
- *Blago*, kad je medijan svojstva manji od 3.

|                       |                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Voćnost</i>        | Skup mirisnih osjećaja karakterističan za ulja, koji zavisi od sorti masline i nastaje od zdravih i svježih maslina u kojima ne prevladava ni zelena ni zrela voćnost. Zapaža se direktno i/ili u zadnjem dijelu nosa. |
| <i>Zelena voćnost</i> | Skup mirisnih osjećaja karakterističan za ulja, koji podsjeća na zeleno voće, zavisi od sorti masline i nastaje od zelenih, zdravih i svježih maslina. Zapaža se direktno i/ili u zadnjem dijelu nosa.                 |
| <i>Zrela voćnost</i>  | Skup mirisnih osjećaja karakterističan za ulja, koji podsjeća na zrelo voće, ovisi o sorti masline i nastaje od zdravih i svježih maslina. Zapaža se direktno i/ili u zadnjem dijelu nosa.                             |
| <i>Harmonično</i>     | Ulje koje ne pokazuje neuravnoteženost, čime se misli na mirisno-ukusni i čulni doživljaj gdje je medijan za svojstvo gorčine i medijan za svojstvo pikantnosti veći od medijana voćnosti za najviše dvije tačke.      |
| <i>Blago ulje</i>     | Ulje čiji je medijan za svojstva gorčine i pikantnosti 2 ili manji.                                                                                                                                                    |

Popis izraza prema intenzitetu percepcije:

| Izrazi za koje je potrebno dostaviti<br>sertifikat o<br>organoleptičkom ocjenjivanju | Medijan svojstva |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Voćnost                                                                              | —                |
| zrela voćnost                                                                        | —                |
| zelena voćnost                                                                       | —                |
| blaga voćnost                                                                        | manje od 3       |
| srednja voćnost                                                                      | između 3 i 6     |
| intenzivna voćnost                                                                   | više od 6        |
| blaga zrela voćnost                                                                  | manje od 3       |
| srednja zrela voćnost                                                                | između 3 i 6     |
| intenzivna zrela voćnost                                                             | više od 6        |
| blaga zelena voćnost                                                                 | manje od 3       |

|                                                                                      |                                                                                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Izrazi za koje je potrebno dostaviti<br>sertifikat o organoleptičkom<br>ocjenjivanju | Medijan svojstva                                                                                                                     |
| srednja zelena voćnost                                                               | između 3 i 6                                                                                                                         |
| intenzivna zelena voćnost                                                            | više od 6                                                                                                                            |
| blaga gorkost                                                                        | manje od 3                                                                                                                           |
| srednja gorkost                                                                      | između 3 i 6                                                                                                                         |
| intenzivna gorkost                                                                   | više od 6                                                                                                                            |
| blaga pikantnost                                                                     | manje od 3                                                                                                                           |
| srednja pikantnost                                                                   | između 3 i 6                                                                                                                         |
| intenzivna pikantnost                                                                | više od 6                                                                                                                            |
| Harmonično ulje                                                                      | Medijan za svojstvo<br>gorčine i<br>medijan za svojstvo<br>pikantnosti<br>veći je od medijana<br>voćnosti<br>za najviše dvije tačke. |
| Blago ulje                                                                           | Medijan za svojstva<br>gorčine i<br>pikantnosti nije veći od 2                                                                       |

#### 4. ČAŠA ZA ORGANOLEPTIČKO OCJENJIVANJE ULJA

##### NAMJENA

Svrha ovog standarda je da opiše karakteristike čaše namjenjene za upotrebu u organoleptičkoj analizi. Osim toga, opisuje jedinicu za grijanje koja je potrebna da se dođe i održi prava temperatura za ovu analizu.

##### 2. OPIS ČAŠE

- Maksimalna postojanost, kako bi se spriječilo da se staklo nagine i da ulje bude proliveno.
- Baza koja se lako uklapa u udubljena jedinice za grijanje, tako da se dno stakla ravnomjerno zagrijava.
- Uska usta koja pomažu da se koncentrišu mirisi i olakšaju njihovu identifikaciju.
- Od tamnog stakla koje sprečava degustatora da vidi boju.

Na taj način se eliminišu sve predrasude ili tendencije koje mogu uticati na objektivnost određivanja.

##### 2.1. Dimenzije

Čaša ima sledeće dimenzije:

Ukupni kapacitet ..... 130 ml + 10 ml  
 Ukupna visina ..... 60 mm + 1 mm  
 Prečnik usta ..... 50 mm + 1 mm  
 Prečnik stakla je najširi ..... 70 mm + 1 mm  
 Prečnik osnove ..... 35 mm + 1 mm  
 Debljina stakla na bočnim stranama ..... 1,5 mm + 0,2 mm

Debljina osnove stakla ..... 5 mm + 1 mm

Svaka čaša mora biti od stakla za sat, čiji prečnik mora biti 10 mm veći od usta stakla. Ovo satno staklo se koristi kao poklopac za sprečavanje gubitka aroma i ulaza prašine.

## 2.2. Proizvodne karakteristike

Čaša mora biti od otpornog stakla; mora biti tamne boje tako da je boja njen sadržaj se ne može razaznati, i ne smije biti ogrebotina ili mjehurića.

Obruč mora biti ravan, gladak i sa prirubnicom.

Staklo mora biti žareno tako da opstane na temperaturnim promjenama kroz koje mora proći tokom testova.

## 2.3. Uputstvo za upotrebu

Čaše treba očistiti neupotrebljivanim sapunom ili deterdžentom i zatim ih isprati više puta sve dok sredstvo za čišćenje nije potpuno uklonjeno. Završno ispiranje će biti sa destilovanom vodom, nakon čega se čaše ostavljaju da se isprazne i zatim osuše u peći za sušenje.

Ne smiju se koristiti koncentrisane kiseline ili smješe hromne kiseline.

Čaše se čuvaju u peći ili u ormarićima u kojima moraju biti zaštićeni od kontaminacije od bilo kakvih stranih mirisa.

Prije upotrebe, svaka čaša mora biti pomirisana kako bi se osiguralo da nema stranog mirisa.

Kada se test priprema, treba voditi računa da se unese broj svake čaše i ulja.

## UREĐAJ ZA GRIJANJE

Uzorci se organoleptički ispituju na podešenoj temperaturi, koja u slučaju jestivih ulja mora biti  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . U tu svrhu treba instalirati uređaj za zagrijavanje u svakoj kabini u dosegu degustatora. Sadrži aluminijski blok uronjen u atermostatski kontrolisanu vodu kupku, kako bi se održala ista temperatura. Temperaturna razlika između uređaja za zagrijavanje i ulja ne smije biti veći od  $+ 2^\circ\text{C}$ .

## 5. PROSTOR ZA ORGANOLEPTIČKO OCJENJIVANJE

### 1. UVOD

Prostor za testiranje dizajniran je da obezbijedi panelu koji učestvuje u senzorskim testovima pogodno, udobno, standardizovano okruženje koje olakšava rad i pomaže da se poboljša ponovljivost rezultata

### 2. NAMJENA

Svrha ovog standarda je da odredi osnovne uslove koje treba ispuniti kada se instalira soba za testiranje.

### 3. OPŠTE SPECIFIKACIJE ZA UGRADNJU

Prostorije, koliko god bile velike, moraju ispunjavati sledeće specifikacije:

Da budu prijatne i prikladno osvijetljene ali neutralne u stilu. U tu svrhu, umirujuća, jednostavna, svijetla boja preporučuje se za zidove. Prostorije moraju biti takve da se lako čiste i da budu odvojene od svih izvora buke; prema tome, poželjno je da su zvučno izolovane. Takođe, moraju biti bez stranih mirisa, za koju svrhu, ako je moguće, moraju biti opremljene sa efikasnim uređajem za ventilaciju. Ako fluktuacije temperature okoline to opravdavaju, test prostorija mora biti opremljena klima uređajem kako bi atmosfera bila blizu  $20-25^\circ\text{C}$ .

#### 3.1. Dimenzije

Dimenzije prostorija često zavise od mogućnosti laboratorija ili kompanije. Uopšteno govoreći, trebalo bi da budu dovoljno prostrane da omoguće ugradnju deset kabina i prostor za pripremu uzoraka.

Međutim, što je veća površina izdvojena za instalacije, to bolje, budući da se tada mogu obezbijediti pomoćna područja, na primjer, za uređaje za čišćenje, pripremu hrane i sl.

#### 3.2. Osvjetljenje

Opšte osvetljenje, bilo od sunčeve svjetlosti ili od svjetiljki (na primjer, trakastog osvetljenja) mora biti uniformno, kontrolisano i difuzno.

#### 3.3 Temperatura

Prostorije se stalno održavaju na temperaturi od  $20-25^\circ\text{C}$ .

## 4. OPIS KABINA

### 4.1. Opšte karakteristike

Kabine za senzorsku analizu postavljaju se jedna pored druge u prostorijama. Oni moraju biti identične i moraju biti odvojene pregradama koje su dovoljno visoke i široke, da izoluju degustatore dok sjede.

Kabine mogu biti napravljene od bilo kojeg odgovarajućeg materijala koji se lako čisti (drvo, vitrifikovana šperploča, laminirana obloga, itd.). Ako se boja koristi, mora biti potpuno suva i bez mirisa.

Sjedišta predviđena u kabinama moraju biti udobna i moraju imati podesivu visinu uređaja.

Svaka kabina mora biti opremljena individualnim osvjetljenjem, pravcem i intenzitetom koje se mogu prilagoditi.

#### 4.2. Dimenzije

Kabine moraju biti dovoljno velike i udobne:

Širina: 0,75 m (bez sudopera)

0.85 m (sa sudoperom)

Dužina: 0,50 m

0.20m višak za pregradu

Visina particija:

Minimalno 0,60 m od stola

Visina tabele: 0.75 m.

#### 4.3. Sto

Površina stola mora biti takva da se lako čisti.

Dio ove površine treba da se koristi za sudoper opremljen tekućom vodom za piće.

Uzorci moraju držati tokom ispitivanja na konstantnoj temperaturi koja je iznad ili ispod temperature okoline, poželjno je da ima odgovarajuću napravu za tu namjenu. (vruća ploča, i sl.).

Police se takođe postavlja na visinu od oko 1,10 m od poda (naočare, mali uređaji, itd.).

Ako raspored kabina u prostoriji za testiranje to dozvoljava, može se instalirati uređaj za olakšavanje prezentacije uzoraka.

3). Ako ima dovoljno prostora, preporučuje se da se obezbijede odvojeni prostori za pripremu uzoraka, police za raspoređivanje čaša ili aparata, i prostorije za održavanje razgovora prije ili nakon testiranja. Ako postoje, takve prostorije moraju biti čiste; bez mirisa, buke ili razgovora iz ovih prostorija, koje bi ometali rad ocjenjivača.

Napomene:

Opisani su idealni uslovi. Međutim, ako nije moguće imati takve uslove isključivo za senzorsku analizu, ispitivanja se mogu obavljati u prostorijama koje zadovoljavaju opisani minimalni uslovi (osvetljenje, temperatura, buka, mirisi) postavljanjem mobilnih kabina koje su sastavljene od sklopivih elemenata na takav način da, u najmanju ruku, izoluju degustatore jedan drugog.

#### 5.PRIBOR

Kako bi organoleptički ocjenjivači mogli pravilno sprovesti svoj zadatak, u svakom odjeljku nadohvat ruke treba da se nalaziti sljedeći pribor:

— čaše (standardizovane) koje sadrže uzorke označene šifrom, ostavljene poklopljenima stakalcem na temperaturi  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ;

— obrazac za ocjenjivanje (vidi Sliku 1.) u štampanom obliku ili u elektronskom obliku pod uslovom da su zadovoljeni uslovi obrasca za prosuđivanje i, ako je potrebno, sa uputstvima za njegovo korišćenje;

— hemijska olovka;

— kriške jabuke i/ili voda, gazirana vodom i/ili prepečenac;

— čaša vode sobne temperature;

— list u kojem se podsjeća na opšta pravila

— pljuvačnice.

## 7.VOĐA PANELA I OCJENJIVAČI

### 7.1. Vođa panela

Vođa panela treba da je odgovarajuće osposobljen sa stručnim poznavanjem vrsta ulja s kojima će se susretati tokom svog rada. On je ključna osoba u panelu i odgovoran je za njenu organizaciju i djelovanje.

Rad vođe panela zahtijeva osnovnu obuku o alatima senzorske analize, senzorske vještine, pedantnost prilikom pripremanja, organizacije i ocjenjivanja, vještinu i strpljivost potrebne za planiranje i sprovođenje ocjenjivanja na naučni način.

On je jedina osoba odgovorna za izbor, obuku i nadzor ocjenjivača sa ciljem potvrđivanja stepena njihove sposobnosti. On je stoga odgovoran za procjenu ocjenjivača koji uvijek trebaju biti objektivni i za koje moraju razviti posebne postupke koji se temelje na testovima i čvrstim kriterijima prihvatanja i odbijanja.

On je odgovoran su za rad panela i stoga i za njeno ocjenjivanje za koje moraju dati pouzdan i objektivni dokaz. U svakom slučaju, on u svakom trenutku mora dokazati da su metoda i ocjenjivači pod kontrolom.

On snosi krajnju odgovornost za čuvanje evidencije panela. Ta evidencija uvijek mora biti sljedeća. On mora ispuniti zahtjeve za osiguravanje i kvalitet utvrđen u međunarodnim normama za senzorsku analizu i u svakom trenutku osigurati anonimnost uzoraka.

On je odgovoran za inventar i osiguravanje da su aparatura i oprema potrebni za ispunjenje zahtjeva iz specifikacija ove metode odgovarajuće čisti i održavani i o tome moraju voditi pisane dokaze, kao i o usklađenosti s uslovima ocjenjivanja.

On je odgovoran za primanje i čuvanje uzoraka po njihovom dolasku u laboratoriju, kao i o njihovom čuvanju nakon ocjenjivanja. Pri tome on u svakom trenutku osiguravaju anonimnost i ispravno skladištenja uzoraka zbog čega mora razviti pisane postupke kako bi se osiguralo da čitav proces bude sljediv i osiguran.

Dalje, odgovoran je za pripremanje i kodiranje uzoraka i njihovu podjelu organoleptičkim ocjenjivačima u skladu s odgovarajućim načinom ispitivanja koji odgovara prethodno utvrđenim protokolima, kao i za prikupljanje i statističku obradu podataka dobijenih od ocjenjivača.

On je nadležan za razvoj i izradu nacrtu svih drugih postupaka koji bi mogli biti potrebni za dopunu ove norme i za osiguravanje ispravnog rada panela.

On mora tražiti načine za uporedbu rezultata panela s onima koje su dobili od drugih panela koje su obavile analizu djevičanskog maslinovog ulja kako bi potvrdili da panel radi ispravno.

Dužnost vođe panela je i motivisanje članova panela podsticanjem interesa, radoznalosti i takmičarskog duha među njima. U tu svrhu preporučuje im se da osiguraju nesmetani dvostrani protok informacija s članovima panela informišući ih o svim zadacima koje obavljaju i o dobijenim rezultatima. Uz to, on treba da osigura da neće odati svoje mišljenje i treba spriječiti mogućnost da eventualni neki ocjenjivači svoje kriterijume nametnu drugim ocjenjivačima.

Trebaju dovoljno rano okupiti ocjenjivače i odgovoriti na sve upite koji se odnose na sprovođenje ocjenjivanja, a trebaju se suzdržati od izražavanja svog mišljenja o predmetnom uzorku.

#### 7.1.1. *Zamjenik vođe panela*

Zbog opravdanih razloga vođu panela može zamijeniti njegov zamjenik koji može preuzeti zadatke koji se odnose na sprovođenje ocjenjivanja. Taj zamjenik mora posjedovati sve bitne vještine koje su potrebne za obavljanje ove funkcije.

### 7.2. Ocjenjivači

Osobe koje kao organoleptički ocjenjivači učestvuju u organoleptičkim ocjenjivanjima maslinovog ulja moraju to činiti dobrovoljno. Stoga se kandidatima preporučuje da svoj zahtjev podnesu pisanim putem. Kandidate bira, obučava i nadzire vođa panela u skladu s njihovim sposobnostima razlikovanja sličnih uzoraka; treba imati na umu da će se njihova preciznost poboljšati daljnjom obukom.

Ocjenjivači moraju djelovati kao pravi senzorski posmatrači, ostavljajući sa strane svoje lične sklonosti i izvještavajući isključivo o osjećajima koje opažaju. Zbog toga uvijek moraju raditi u tišini, opušteno i bez žurbe, usmjeravajući pažnju što je više moguće na uzorak koji ocjenjuju.

Za svako organoleptičko ocjenjivanje potrebno je između 8 i 12 ocjenjivača iako je dobro imati nekoliko rezervnih ocjenjivača u slučaju moguće odsutnosti nekih ocjenjivača.

## 8.USLOVI TESTIRANJA

### 8.1. **Prikaz uzorka**

Uzorak ulja za analizu dijeli se u standardizovanim čašama za ocjenjivanje.

Čaša treba da sadrži 14–16 ml ulja, ili između 12,8 i 14,6 g ako se uzorci moraju vagati, i biti poklopljena staklom.

Svako se staklo označava šifrom koja se sastoji od nasumično odabranih brojeva ili kombinacije slova i brojeva. Šifra se bilježi na temelju bezmirisnog sistema.

### 8.2. Testiranje i temperatura uzorka

Za vrijeme trajanja testiranja uzorci ulja za ocjenjivanje čuvaju se u čašama na  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ta temperatura je odabrana zato što je na njoj lakše posmatrati organoleptičke razlike nego na sobnoj temperaturi i zato što pri nižim temperaturama aromatski sastojci svojstveni tim uljima slabo isparavaju, a više temperature dovode do stvaranja isparljivih sastojaka tipičnih za zagrijana ulja.

Prostor za testiranje mora da bude sobne temperature između  $20^{\circ}$  i  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 8.3. Vrijeme testiranja

Jutro je najbolje vrijeme za testiranje ulja, jer tokom dana postoje optimalna razdoblja za čula ukusa i mirisa, a prije obroka povećava se osjetljivost na nadražaje mirisa i ukusa, dok se nakon njih ta percepcija smanjuje.

Preporučuje se da se sesije za testiranje održavaju između 10 i 12 sati ujutro.

### 8.4. Ocjenjivači: opšta pravila ponašanja

Ocjenjivači organoleptičkih svojstava maslinovog ulja treba da ocjenu vrše u unaprijed određeno vrijeme i treba da se pridržavaju sljedećih pravila:

— ne smiju pušiti barem 30 minuta prije vremena određenog za testiranje;

- ne smiju prethodno koristiti nikakav parfem, kozmetički preparat ili sapun čiji bi se miris mogao zadržati do vremena testiranja. Trebaju koristiti neparfimisani ili blago parfimisani sapun za pranje ruku koji nakon tog trebaju isprati i osušiti onoliko puta koliko je potrebno da bi se uklonili svi mirisi;
- da ne konzumiraju hranu barem jedan sat prije početka testiranja;
- ako osjete da se fizički ne osjećaju dobro, a posebno ako su im zahvaćena čula mirisa ili ukusa, ili ako se zbog nekog psihičkog uzroka ne može koncentrisati na posao, organoleptički ocjenjivači će odustati od testiranja;
- pažljivo da pročitaju uputstva koje se nalaze na obrascu za ocjenjivanje i da ne počinju ocjenjivanjem uzoraka sve dok nijesu u potpunosti pripremljeni za zadatak koji trebaju ispuniti (opušteno i bez žurbe);
- za vrijeme zadatka treba da budu tihi.

## 9.POSTUPAK ZA ORGANOLEPTIČKO OCJENJIVANJE I KLASIFIKACIJU DJEVIČANSKOG MASLINOVA ULJA

### 9.1. Tehnika degustacije

- 9.1.1. Ocjenjivači treba da uzmu čašu, koju drže poklopljenu staklenim poklopcem, i lagano je nagnuti; i u tom položaju trebaju potpuno zarotirati tako da tečnost obloži što veću unutrašnju površinu čaše. Nakon što je ovaj korak završen, trebaju otklopiti čašu i mirisati uzorak polaganim i dubokim udisajima kako bi ocijenili ulje. Mirisanje ne bi trebalo trajati duže od 30 sekundi. Ako u tom roku ne dođu do zaključka, prije novog pokušaja trebaju se nakratko odmoriti.

Nakon završetka testiranja mirisa ocjenjivači trebaju ocijeniti osjećaje izazvane u usnoj duplji (cjelokupni retronazalni doživljaj dobijen mirisom, ukusom i dodirima). U tu svrhu trebaju uzeti mali gutljaj ulja od približno 3 ml i ulje rasporede po cijeloj usnoj šupljini, od prednjeg dijela usta i jezika, sa strane i do zadnjeg dijela pa sve do nepca i grla jer intenzitet percepcije ukusa i čulnog doživljaja varira zavisno o dijelu jezika, nepca i grla.

Treba rasporediti dovoljnu količinu ulja vrlo polako preko zadnje strane jezika prema grlu i da se istovremeno ocjenjivač koncentriše na redoslijed kojim se javljaju gorki i pikantni nadražaji. U protivnom bi oba ta nadražaja kod nekih ulja mogla proći neprimijećeno ili bi nadražaj pikantnosti mogao prikriti gorčinu.

Uvlačenje kratkih uzastopnih udisaja kroz usta omogućava organoleptičkom ocjenjivaču ne samo da dobro rasporedi uzorak po cijeloj usnoj šupljini, već i da zapazi isparljive aromatične sastojke u zadnjem dijelu nosa forsirajući upotrebu ovog kanala.

Ako ocjenjivači ne uoče voćnost u uzorku, a intenzitet negativnog svojstva na kojem se temelji klasifikacija iznosi najviše 3,5, organizovaće se ponovna analizu uzorka na temperaturi okoline, uz određivanje konteksta i pojma temperature okoline. Kada uzorak dostigne sobnu temperaturu, ocjenjivači bi ga trebali ponovo ocijeniti isključivo kako bi provjerili zapaža li se voćnost i u tom slučaju treba označiti njen intenzitet na ljestvici.

Trebalo bi razmotriti i čulni doživljaj pikantnosti. U tu se svrhu preporučuje progutati ulje.

- 9.1.2. Prilikom organoleptičkog ocjenjivanja djevičanskog maslinovog ulja preporučuje se ocjenjivanje najviše četiri uzorka u svakoj sesiji sa najviše tri sesije dnevno kako bi se izbjegli kontra efekti koji bi mogli nastati neposrednim probanjem drugih uzoraka.

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

Preporučuje se mala kriška jabuke koja se nakon žvakanja može ispljunuti u pljuvačnicu. Nakon tog se usta isperu sa malo vode sobne temperature. Između završetka jedne sesije i početka druge mora da protekne barem 15 minuta.

### 9.2. Način na koji ocjenjivači upotrebljavaju obrazac za ocjenjivanje

Svaki ocjenjivač u komisiji treba pomirisati i zatim probati <sup>(1)</sup> razmatrano ulje. Oni zatim na skali od 10 cm prikazanoj na predmetnom obrascu za ocjenjivanje označavaju intenzitet svakog negativnog i pozitivnog svojstva.

<sup>(1)</sup> Mogu odustati od degustacije ulja kad primijete bilo kakvo intenzivno negativno svojstvo direktno mirisom kada će tu izuzetna okolnost zabilježiti na obrascu za ocjenjivanje.

Ako ocjenjivač primijeti negativna svojstva, navodi ih pod naslovom „ostalo” koristeći izraz ili izraze koji najpreciznije opisuju ta svojstva.

### 9.3. Način na koji vođa panela upotrebljava podatke

Vođa panela skuplja obrasce za ocjenjivanje koje je ispunio svaki ocjenjivač i pregleda intenzitete označene za pojedina svojstva. Ako uoči ikakvu nepravilnost, poziva ocjenjivača da ponovo pregleda svoj obrazac za ocjenjivanje i ako je potrebno, ponovi ocjenjivanje.

Vođa panela unosi podatke ocjenjivanja od svakog člana u kompjutorski program radi statističkog izračunavanja rezultata analize, na temelju izračuna njihovog medijana. Podaci za dotični uzorak upisuju se pomoću matrice koja se sastoji od 9 stupaca koji predstavljaju 9 senzornih svojstava i n linija koje predstavljaju n članova panela.

Kad se primijeti mana i nju pod naslov „Ostalo” navede najmanje 50 % članova panela, vođa panela izračunava medijan te mane i izrađuje odgovarajuću klasifikaciju.

Vrijednost grubog koeficijenta varijacije kojim se utvrđuje klasifikacija (nedostatak najvećeg intenziteta i svojstva voćnosti) ne smije biti veća od 20 %.

U suprotnom vođa panela mora ponoviti ocjenjivanje specifičnog uzorka u drugoj sesiji ocjenjivanja. Ako se to često događa, vođa panela preporučuje se da ocjenjivačima pruži dodatnu obuku.

### 9.4. Klasifikacija ulja

Ulje se razvrstava u skladu sa medijanom mana i medijanom svojstva voćnosti. Medijan mana definisan je kao medijan mane koja se osjeća najvećim intenzitetom. Medijan mana i medijan svojstva voćnosti iskazuju se do jednog decimalnog broja.

Ulje se razvrstava upoređujući vrijednost medijana mana i medijana svojstva voćnosti s referentnim intervalima. U obzir je uzeta i greška metode pri utvrđivanju ograničenja tih intervala koji se stoga smatraju apsolutnima. Programskim paketima omogućuje se prikaz razvrstavanja u obliku statističke tabele ili grafika:

- (a) ekstra djevičansko maslinovo ulje: medijan mana je 0, a medijan svojstva voćnosti je iznad 0;
- (b) djevičansko maslinovo ulje: medijan mana je iznad 0, ali ne veći od 3,5 i medijan svojstva voćnosti je iznad 0;
- (c) djevičansko maslinovo ulje lampante: medijan mana je iznad 3,5 ili medijan mana je 3,5 ili manji, a medijan voćnosti je jednak 0.

Kad je medijan svojstva pikantnosti i/ili gorkosti veći od 5,0, navodi se na potvrdi o ocjenjivanju.

Za ocjenjivanja koja su namijenjena nadziranju uskađenosti sprovodi se jedno ispitivanje. U slučaju protivoocjenjivanja moraju se organizovati dvije uporedne analize u različitim sesijama. Rezultati dvije uporedne analize moraju biti statistički homogeni. Ako to nije slučaj, uzorak se mora ponovo dvaput analizirati. Konačna vrijednost medijana svojstava na kojima se temelji klasifikacija izražavaće se na osnovu prosjeka oba medijana.

### 9.5. Kriterijumi dvije uporedne analize

Normalizovana greška upotrebljava se da bi se utvrdilo jesu li rezultati dvije uporedne analize homogeni ili statistički prihvatljivi:

$$E_n = \frac{|Me_1 - Me_2|}{\sqrt{\frac{U_1^2 + U_2^2}{2}}}$$

Pri tome su  $Me_1$  i  $Me_2$  medijani dvije uporedne analize (prve i druge analize), a  $U_1$  i  $U_2$  proširene nesigurnosti dobijene za dvije vrijednosti:

$$U_1 = c \times s^* \times \frac{\sqrt{CV_r} \times Me_1}{100}$$

Za proširenu nesigurnost,  $c = 1,96$ ; prema tome:

$$U_1 = 0,0196 \times CV_r \times Me_1$$

pri čemu je  $CV_r$  grubi koeficijent varijacije.

Kako bi se moglo tvrditi da dvije dobijene vrijednosti nisu statistički različite,  $E_n$  mora iznositi najviše 1,0.

## Metoda izračunavanja medijana i intervala pouzdanosti

### Medijan

$$Me \frac{1}{4} \frac{1}{2} p \text{ } \delta X < x_m \text{ } \bar{p} \text{ } \frac{1}{2} \wedge p \text{ } \delta X \bar{p} \geq \frac{1}{2} \hat{a}$$

Medijan se definiše kao realni broj  $X_m$  za koji vrijedi da je vjerovatnost ( $p$ ) da vrijednosti raspodjele ( $X$ ) budu niže od tog broja ( $X_m$ ) manja ili jednaka 0,5 i da je istovremeno vjerovatnost ( $p$ ) da vrijednosti raspodjele ( $X$ ) budu manje ili jednake  $X_m$  veća ili jednaka 0,5. Praktičnija definicija glasi da je medijan 50-i procenat unutar distribucije brojeva u rastućem nizu. Jednostavnijim riječima, to je središnja tačka posloženog skupa neparnih brojeva ili prosjek dvije središnje tačke u posloženom skupu parnih brojeva.

### Gruba standardna devijacija

Kako bi došli do pouzdanog procjenjivanja varijabilnosti oko prosjeka, potrebno je pozvati se na grubu standardnu devijaciju kako se procjenjuje prema Stuartu i Kendallu (4). Formula daje asimptotsku grubu standardnu devijaciju, tj. grubu procjenu varijabilnosti razmatranih podataka pri čemu je  $N$  broj očitavanja, a IQR međukvartalni interval koji obuhvata tačno 50 % slučajeva u dotičnoj raspodjeli vjerovatnosti.

$$\begin{array}{c} 1; 25 \text{ } \ddot{U} \\ \ddot{a} \text{ } \text{IQR} \\ s \text{ } \frac{1}{4} \text{ } \text{---} \text{ } p \text{ } N \\ 35 \text{ } \text{---} \text{ } \text{---} \\ 1 \text{ } \text{---} \text{ } \ddot{U} \text{ } \text{---} \end{array}$$

Međukvartalni interval izračunava se izračunom najveće razlike između 75-tog i 25-tog procenta.

$$IQR \frac{1}{4} 75:\text{procenat} \text{ } \ddot{A} \text{ } 25:\text{procenat}$$

Pri čemu je procenat ona vrijednost  $X_{pc}$  za koju važi da je vjerovatnoća( $p$ ) da vrijednosti raspodjele budu manje od  $X_{pc}$  niža ili jednaka specifičnom procentu i da je istovremeno vjerovatnost ( $p$ ) da vrijednosti raspodjele budu manje ili jednake  $X_{pc}$  veća ili jednaka tom specifičnom procentu. Procenat ukazuje na odabrani dio distribucije. U slučaju medijana on iznosi 50/100.

$$\begin{array}{ccc} n & & n \\ \text{postotnik } \frac{1}{4} \frac{1}{2} p \text{ } \delta X < & \text{---} & \text{---} \\ x_{pc} \text{ } \bar{p} \text{ } \bar{p} & 100 \wedge p \delta X \bar{p} \delta X_{pc} \text{ } \bar{p} \text{ } \bar{p} & \frac{10}{0 \hat{a}} \end{array}$$

Radi praktičnosti, procenat je ona vrijednost raspodjele koja odgovara specifičnoj površini ispod krivulje distribucije ili gustoće. Na primjer, 25. procenat predstavlja vrijednost distribucije koja odgovara površini od 0,25 ili 25/100.

U ovoj metodi procentisu izračunati na temelju stvarnih vrijednosti koje se pojavljuju u matrici podataka (postupak izračunavanja procenta).

### Grubi koeficijent varijacije (%)

CVr% predstavljačisti broj koji ukazuje na procenat varijabilnosti analiziranog skupa brojeva. Iz tog razloga je on posebno koristan za ispitivanje pouzdanosti ocjenjivača.

$$CVr \frac{1}{4} \frac{5 \hat{a}}{100} \text{ } \ddot{U} \text{ } \ddot{U} 100 \\ Me$$

### Intervali pouzdanosti medijana od 95 %

Intervali pouzdanosti od 95 % (vrijednost greške prve vrste koja iznosi 0,05 ili 5 %) predstavlja interval unutar kojeg bi vrijednost medijana mogla varirati kada bi bilo moguće ponoviti ocjenjivanje. Praktično predstavlja interval varijabilnosti ocjenjivanja u datim uslovima rada krenuvši od pretpostavke da ga je moguće ponoviti mnogo puta. Kao i kod  $CVr\%$ , interval pomaže u procjeni pouzdanosti ocjenjivanja.

$$C:I_{gornji}^{1/4} Me \pm \delta c \bar{U} s^{\frac{1}{4}} \bar{D}$$

$$C:I_{donji}^{1/4} Me \pm \delta c \bar{U} s^{\frac{1}{4}} \bar{D}$$

pri čemu je  $C = 1,96$  za interval pouzdanosti na razini od 95 %.

## PRILOG 7

### ODREĐIVANJE SADRŽAJA VOSKA KAPILARNOM GASNOM HROMATOGRAFIJOM

#### 1. PREDMET

Kapilarnom gasnom hromatografijom utvrđuje se sadržaj voska u maslinovom ulju. Voskovi se odvajaju prema broju njihovih atoma ugljenika. Metoda se posebno može koristiti za razlikovanje maslinovog ulja dobijenog cijedenejm i onog dobijenog ekstrakcijom (ulje komine maslina).

#### 2. PRINCIP

Dodaje se odgovarajući interni standard masti ili ulju, potom frakcionišemo pomoću hromatografije na hidratizovanoj koloni od silika gela. Frakcija koja je u početku eluirana u uslovima testiranja, (čija je polarnost slabija od polarnosti triglicerida), vraća se i neposredno analizira kapilarnom gasnom hromatografijom.

#### 3. OPREMA

3.1 Erlenmajerova tikvica zapremine 25 ml.

3.2 Staklena kolona za gasnu hromatografiju, unutrašnjeg promjera 15,0 mm, dužine 30 do 40 cm, s pipcem.

3.3. Odgovarajući gasni hromatograf sa kapilarnom kolonom, opremljen sastavom za neposredno uvođenje u kolonu koji se sastoji od sljedećeg:

3.3.1. Termostatska komora za kolone, opremljena regulatorom temperature.

3.3.2. Hladni injektor za direktno unošenje u kolonu.

3.3.3. Plamenjonizacijski detektor i pretvarač sa pojačalom.

3.3.4. Snimač-integrator kompatibilan sa pretvaračem sa pojačalom (3.3.3.), sa vremenom reakcije koje nije duže od jedne sekunde i sa varijabilnom brzinom papira. (Takođe je moguće koristiti kompjutorizovane sastave koji omogućavaju dobijanje podataka o gasnoj hromatografiji putem računara.)

3.3.5. Staklena ili kvarcna kapilarna kolona dužine 8 do 12 m, unutrašnjeg prečnika od 0,25 do 0,32 mm, sa tečnom fazom, s ujednačenom debljinom filma između 0,10 i 0,30  $\mu m$ . (Na tržištu su dostupne tečne faze pogodne za tu svrhu tipa SE-52 ili SE-54.)

3.4. Mikrošpric za direktno unošenje u kolonu zapremine 10  $\mu$ l s čvrsto fiksiranom iglom.

3.5. Električna tresilica.

3.6. Rotirajući isparivač.

3.7. Visokotemperaturna peć.

3.8. Analitička vaga sa zagarantovanom preciznošću od  $\pm 0,1$  mg.

3.9. Uobičajeno laboratorijsko stakleno suđe.

#### 4. REAGENSI

4.1. Silika gel veličine zrna između 60 i 200  $\mu$ m.

Silika gel staviti na četiri sata u peć na 500 °C. Nakon hlađenja, dodati 2 % vode u odnosu na količinu uzorkovanog silika gela. Dobro promućkati da se suspenzija homogenizuje. Čuvati na tamnom mjestu najmanje 12 sati prije upotrebe.

4.2. n-heksan, za hromatografiju.

4.3. dietil etar, za hromatografiju.

4.4. n-heptan, za hromatografiju.

4.5. Standardni rastvor lauril arahidata koncentracije 0,1 % (m/v) u heksanu (interni standard).

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

4.6. Noseći gas: vodonik ili helijum, gasno-hromatografska čistoća.

4.7. Pomoćni gasovi:

— vodonik, čistoće za gasnu hromatografiju,

— vazduh, čistoće za gasnu hromatografiju.

#### 4. POSTUPAK

##### 5.1. Priprema hromatografske kolone

Pomiješati 15 g silikagela (4.1.) sa n-heksanom (4.2.) i prenijeti u kolonu (3.2.). Rastvoriti i ostaviti da se samo slegne. Dovršiti taloženje pomoću električne tresilice (3.5.) kako bi se postigao što ujednačeniji hromatografski sloj. Propustiti 30 ml n-heksana kako bi se odstranile sve eventualne nečistoće. Korišćenjem vage (3.8.) odvagati tačno 500 mg uzorka u Erlenmajerovu tikvicu zapremine 25 ml (3.1.), dodati odgovarajuću količinu internog standarda (4.5.), zavisno od pretpostavljenog sadržaju voska. Na primjer, dodati 0,1 mg lauril arahidata za maslinovo ulje i 0,25 do 0,5 mg za ulje komine maslina. Prenijeti pripremljen uzorak na hromatografsku kolonu pomoću dva puta po 2 ml n-heksana (4.2.).

Rastvarč ispuštati dok ne dostigne 1 mm iznad gornje granice absorbenta, potom filtrirati ostalih 70 ml n-heksana kako bi se uklonili prirodno prisutni n-alkani. Potom započeti hromatografsko eluiranje sakupljanjem 180 ml mješavine n-heksana/dietil etra (odnos 99:1), pri brzini protoka od oko 15 kapi svakih 10 sekundi. Eluiranje uzorka se izvodi na sobnoj temperaturi pri  $22 \pm 4$  °C.

Mješavina n-heksana/dietil etra, (99:1), priprema sesvakodnevno.

— Za vizuelnu provjeru ispravnog eluiranja voskova, može se dodati 100 µm 1 % sudana iz elucijske mješavine u uzorak u rastvoru. S obzirom da obojenje ima pređeni put između voskova i triglicerida, kad obojenje dođe do dna kolone, eluat treba rastvoriti jer će tada svi voskovi biti eluirani.

Osušiti tako dobijenu frakciju u vakum uparivaču (3.6.) dok se ne ukloni gotovo sav rastvor. Ukloniti preostala 2 ml rastvora pomoću slabe struje azota; potom dodati 2-4 ml n-heptana. rastvoriti

## 5.2. Analiza gasnom hromatografijom

### 5.2.1. Pripremne radnje

Postaviti kolonu na gasni hromatograf (3.3) spajajući ulazni otvor na sastav neposredno na koloni i izlazni otvor na detektor. Obaviti opštu provjeru gasnog hromatografa (funkcioniranje protoka gasa, efikasnostosjetljivost detektora i snimača itd.).

Ako se kolona koristi po prvi put, potrebno je najprije kondicionirati. Pustiti da kroz kolonu proteče malo gasa, zatim uključiti gasni hromatograf. Postupno zagrijavati do dostizanja temperature od 350 °C nakon približno četiri sata. Održavati temperaturu najmanje dva sata te potom regulisati aparat na radne uslove, (regulisanje protoka gasa, paljenje plamena, spoj na elektronički snimač (3.3.4), prilagođavanje temperature peći za kolonu, prilagođavanje detektora itd.), i zapisati signal pri osjetljivosti koja je najmanje dvostruka od one koju zahtijeva analiza. Bazna linija mora biti linearna, bez pikova i bez bilo kakvih znakova otklona.

Negativno pravolinijskoskretanje ukazuje da spojevi kolone nisu dobro postavljeni; pozitivano skretanje da kolona nije pravilno kondicionirana.

### 5.2.2. Izbor radnih uslova

Radni uslova su uglavnom sljedeći:

— temperatura kolone:

|                             | 20 °C/<br>minuti |        | 5 °C/<br>minuti |                | 20 °C/<br>minuti |                 |
|-----------------------------|------------------|--------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|
| Inicijalno<br>80 °C<br>(1') | →                | 240 °C | →               | 325 °C<br>(6') | →                | 340 °C<br>(10') |

— temperatura detektora: 350 °C,

— količina ubrizgane supstance: 1 µl rastvora n-heptana (2-4ml),

— Noseći gas: helijum ili vodonik pri ispravnoj linearnoj brzini za odabrani gas

— osjetljivost instrumenta: pogodno za sljedeće uslove:

Uslovi se mogu modifikovati u skladu s karakteristikama kolone i gasnog hromatografa kako bi se dobilo razdvajanje svih voskova i zadovoljavajuća rezolucija pika, (vidjeti sliku); retenciono vrijeme internog standarda C<sub>32</sub> mora biti 18 ± 3 minute. Najreprezentativniji pik voska mora biti najmanje 60 % pune skale.

Parametre za integraciju pikova potrebno je odrediti na takav način da se postigne ispravna procjena površine pikova koja se analizira.

Zbog visoke konačne temperature, dopušten je pozitivan otklon od najviše 10 % pune skale.

### 5.3. Sprovođenje analize

Pomoću mikrošpric zapremine 10 µl unosi se 1 µl rastvora; klip šprica izvući dok se igla ne isprazni. Iglu uvesti u sastav za injektovanje i nakon 1-2 sekunde brzo injektovati; nakon otprilike pet sekundi, lagano izvući iglu.

Bilježiti sve dok voskovi nisu u potpunosti eluirani.

Bazna linija u svakom trenutku mora zadovoljavati tražene uslove.

### 5.4. Identifikovanje pikova

Pikovi se identifikuju pomoću retencionih vremena upoređivanjem sa mješavinama voskova čije je retenciono vrijeme poznato, a koji su analizirani u istim uslovima.

Na slici je prikazan hromatogram voskova djevičanskog maslinovog ulja.

### 5.5. Ocjena količina

Pomoću integratora odrediti površine pikova koje odgovaraju internom standardu i alifatičnim esterima od C<sub>40</sub> do C<sub>46</sub>.

Izračunati sadržaj voska svakog pojedinog estera u mg/kg masti određujemo prema sljedećoj formuli: ester, mg/kg =

$$\text{ester;mg=kg}^{-1} = A_x \times \frac{m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

pri čemu je:

$A_x$  = površina pika svakog estera, u kvadratnim milimetrima;

$A_s$  = površina pika internog standarda, u kvadratnim milimetrima;

$m_s$  = masa dodatog internog standarda, u miligramima;

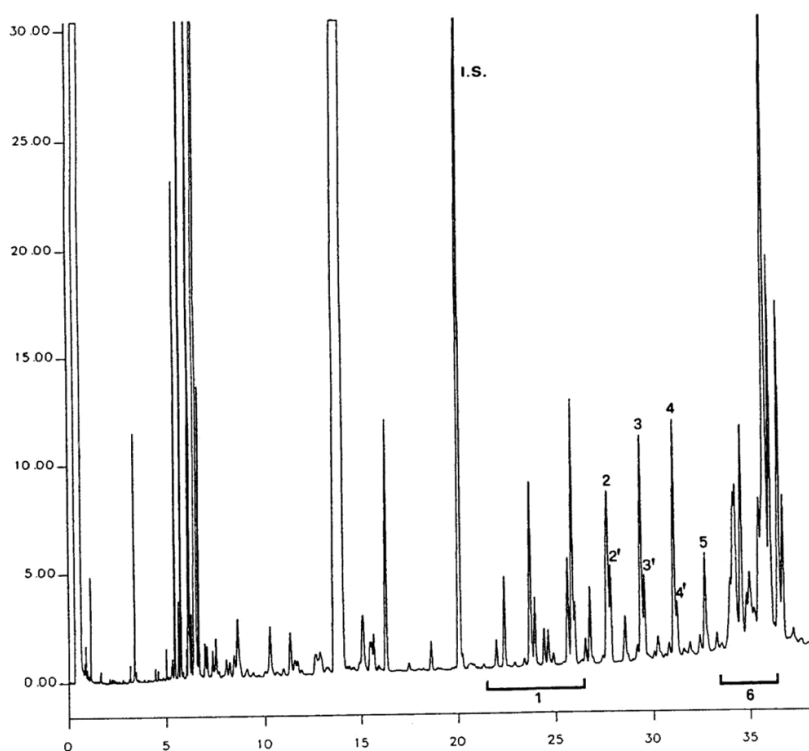
$m$  = masa uzorka za analizu, u gramima.

## 6. ISKAZIVANJE REZULTATA

Iskazati ukupan sadržaj različitih voskova C<sub>40</sub> do C<sub>46</sub> u mg/kg masti (ppm).

Sastojci koje treba kvantifikovati odnose se na pikove s brojevima parova ugljenika između C<sub>40</sub> do C<sub>46</sub> estera, korišćenjem primjera hromatograma voska maslinovog ulja prikazanog na donjoj slici. U slučaju da se C<sub>46</sub> ester pojavi dva puta, preporučuje se da se za njegovu identifikaciju analizira frakcija voskova ulja komine maslina gdje je pik C<sub>46</sub> jednostavno identifikovati jer je u očiglednoj većini.

Rezultati trebaju biti izraženi na jednu decimalu.

**Hromatogram voskova maslinovog ulja <sup>(1)</sup>****Legenda:**

I.S. = Lauril arahidat

1. = Diterpenski esteri

2 + 2' = Esteri C<sub>40</sub>

3 + 3' = Esteri C<sub>42</sub>

4 + 4' = Esteri C<sub>44</sub>

5. = Esteri C<sub>46</sub>

6. = Sterolni estri i triterpenski alkohol

<sup>1)</sup> Nakon eluiranja sterolnih estera, linija hromatograma ne smije pokazivati nikakve znatne pikove (trigliceridi).

**Određivanje linearne brzine gasa**

U gasni hromatograf, postavljen na normalne radne uslove, ubrizgava se 1-3  $\mu$ l metana (ili propana). Mjeri se vrijeme potrebno za protok gasa kroz kolonu od trenutka injektiranja do pojave pika ( $t_M$ ). Linearna brzina u cm/s zadana je formulom  $L/t_M$ , pri čemu je L dužina kolone u cm, a  $t_M$  je vrijeme mjereno u sekundama;

## ODREĐIVANJE SASTAVA I SADRŽAJA STEROLA I TRITERPENSKIH DIALKOHOLA KAPILARNOM GASNOM HROMATOGRAFIJOM

### 1. UVOD

Kapilarnom gasnom hromatografijom određuje se udio pojedinačnih i ukupnih sterola i triterpenskih dialkohola u maslinovim uljima i uljima komine maslina.

### 2. PRINCIP

Ulje sa dodatkom  $\alpha$ -holestanholestanolholestanola koji služi kao interni standard saponifikuje se rastvorom kalijum hidroksida u etanolu i zatim se neosapunjiva stvar ekstrahuje etil etrom.

Frakcija sterola i triterpenskih dialkohola odjeljuje se od neosapunjivog ekstrakta tankoslojnom hromatografijom na osnovnoj silika gel ploči. Frakcije koje se dobiju sa silika gela pretvaraju se u trimetilsilil etere i zatim analiziraju kapilarnom gasnom hromatografijom.

### 3. APARATURA

Uobičajena laboratorijska oprema, a posebno sljedeće:

3.1. Tikvica od 250 ml s povratnim hladilom i nastavcima od brušenog stakla.

3.2. Lijevak za odjeljivanje od 500 ml.

3.3. Tikvice od 250 ml.

3.4. Cjeloviti instrument za analizu tankoslojnom hromatografijom, korišćenjem staklenih ploča veličine  $20 \times 20$  cm.

3.4. Ultraljubičasta svjetiljka talasne dužine 254 ili 366 nm.

3.5. Mikrošpric od 100  $\mu$ l i 500  $\mu$ l.

3.7. Cilindrični lijevak za filtriranje s poroznom pločom G 3 (poroznost između 15 i 40  $\mu$  m) približnog prečnika 2 cm i visine 5 cm, primjeren za filtriranje pod vakuumom s muškim spojem od brušenog stakla.

3.8. Vakuumska tikvica od 50 ml, sa ženskim spojem od brušenog stakla koji se može pričvrstiti na lijevak za filtriranje (tačka 3.7.).

3.9. Epruveta od 10 ml s konusnim dnom i brtvenim staklenim čepom.

3.10. Gasni hromatograf koji se može koristiti sa kapilarnom kolonom sa razdjelnim sastavom za injektiranje koji se sastoji od:

3.10.1. Termostatske komore za kolone koja može održavati željenu temperauru satačnošću od  $\pm 1$  °C;

3.10.2. Jedinice za injektiranje s mogućnošću podešavanja temperature, sa elementom za uparavanje od persilaniziranog stakla i razdjelnim sastavom;

3.10.3. Plamenojonizacijskog detektora (FID);

3.10.4. Sastava za prikupljanje podataka koji se može koristiti s detektorom FID (tačka 3.10.3.) koji se može uključiti ručno.

3.11. Kvarcna kapilarna kolona dužine između 20 i 30 m, unutrašnjeg prečnika između 0,25 i 0,32 mm, sa slojem 5 % difenila - 95 % dimetil-polisiloksana (SE-52 ili SE-54 ili odgovarajućom stacionarnom fazom), s ujednačenom debljinom filma između 0,10 i 0,30  $\mu$ m.

3.12. Mikrošpric za gasnu hromatografiju zapremine 10 l s čvrsto učvršćenom iglom primjerenom za razdjelno injektiranje.

3.13. Eksikator s kalcijum hloridom

#### 4. REAGENSI

4.1. Kalijum hidroksid, minimalne koncentracije 85 %

4.2. Rastvor kalijum hidroksida u etanolu približno 2 mol/l

Rastvoriti 130 g kalijum hidroksida (tačka 4.1.), uz hlađenje, u 200 ml destilovane vode, a zatim dopuniti etanolom do jednog litra (tačka 4.10). Rastvor treba čuvati u dobro začepljenim bocama od tamnog stakla i čuvati najviše dva dana.

4.3. Etil etar, analitičkog kvaliteta.

4.4. Rastvor kalijum hidroksida u etanolu približno 0,2 N

Rastvoriti 13 g kalijum hidroksida (tačka 4.1.) u 20 ml destilovane vode i dopuniti etanolom do jednog litra (tačka 4.10.).

Rastvoriti

4.5. Bezvodni natrijum sulfat, analitičkog kvaliteta.

4.6. Staklene ploče (20 × 20 cm) sa slojem silika gela, bez indikatora fluore-scencije, debljine 0,25 mm (na tržištu su dostupne ploče spremne za upotrebu).

4.7. Toluen, za hromatografiju.

4.8. Aceton, za hromatografiju.

4.9. n-heksan, za kvalitet hromatografije.

4.10. Etil eter, za kvalitet hromatografije.

4.11. Etanol analitičkog kvaliteta.

4.12. Etil acetat analitičkog kvaliteta.

4.13. Referentni rastvor za tankoslojnu hromatografiju: 5 %-tni rastvor holesterola ili fitosterola i eritrodiola u etil acetatu (tačka 4.11.).

4.14. 2,7-diklorofluorescein, 0,2 %-tni rastvor u etanolu. Može se učiniti blago alkalnim dodavanjem nekoliko kapi rastvora 2 N kalijum hidroksida u alkoholu (tačka 4.2.).

4.15. Bezvodni piridin, za kvalitet hromatografije (vidi Napomenu 5).

4.16. Heksametildisilazan analitički kvalitet.

4.17. Trimetilhlorsilan analitički kvalitet.

4.18. Rastvor sterolnih trimetilsilil etara iz uzorka.

Treba se pripremiti neposredno prije korištenja od sterola i eritrodiola dobijenih iz ulja koja ih sadrže.

4.19.  $\alpha$ -holestanholestanol, čistoće veće od 99 % (čistoća se mora provjeriti gasnom hromatografijom).

4.20. Rastvor  $\alpha$ -holestanholestanola internog standarda, 0,2 %-tni rastvor (m/V) u etil acetatu (tačka 4.11.).

4.21. Rastvor 10 g/l fenolftaleina u etanolu (tačka 4.10.).

4.22. Noseći gasovi: vodonik ili helijum, gasno-hromatografske čistoće.

4.23. Pomoćni gasovi: vodonik, helijum, azot i vazduh, gasno-hromatografske čistoće.

4.24. Smješa n-heksana (tačka 4.9.) i etil etra (tačka 4.10.) 65:35 (V/V).

4.25. Reagens za sililaciju koji se sastoji od smjese piridina, heksametildisi- lazana i trimetilhlorosilana.

## 5. POSTUPAK

### 5.1. Pripremanje neosapunjive supstancesupstance.

5.1.1. Pomoću mikrošprica (tačka 3.6.) od 500  $\mu$ l u tikvicu zapremine 250 ml ubrizgati onu količinu 0,2 %-tnog rastvora  $\alpha$ -holestanholestanola internog standarda (tačka 4.20.) koja sadrži količinu holestanholestanola koja je približno jednaka 10 % sadržaja sterola uzorka. Na primjer, na 5 g uzorka maslinovogulja treba dodati 500  $\mu$ l rastvora  $\alpha$ -holestanholestanola (tačka 4.20.) i 1 500  $\mu$ l za ulje komine maslina. Upariti do suvog pod blagom strujom azota a u toplom vodenom kupatilu i, nakon što se tikvica ohladi, izvagati  $5 \pm 0,01$  g suvog filtriranog uzorka u istu tikvicu.

Ulja i masti životinjskog ili biljnog porijekla kojasadrže znatne količine holesterola mogu pokazati pik saretencionim vremenom koje je blizu onome kolesta- nola. U tom slučaju frakcija sterola treba se analizirati dvostruko - s internim standardom i bez njega.

5.1.2. Dodati 50 ml 2 mol /l rastvora kalijum hidroksida u etanolu (tačka 4.2.) i staklene perlice, namjestiti povratni kondezator (hladnjak) i zagrijavati do tačke slabog vrenja dok se ne završi saponifikacija. Nastaviti sa zagrijavanjem još 20 minuta, a zatim dodati destilovane vode od 50 ml kroz povratni kondezator, odvojite ga i ohladite tikvicu na približno 30 ° C.

5.1.3. Kvantitativno prenijeti sadržaj tikvice u lijevak za razdvajanje od 500 ml (tačka 3.2.) s nekoliko porcija destilovane vode (50 ml). Dodati približno 80 ml etil etra (tačka 4.10.), snažno promućkati približno 60 sekundi, povremeno ispuštajući pritisak okretanjem lijevka za razdvajanje i otvaranjem slavine. Ostaviti dok se dvije faze potpuno ne razdvoje.

Odvojiti saponifikacioni rastvor što je moguće potpunije u drugi lijevak za razdvajanje. Uraditi još dvije ekstrakcije na vodeno-alkoholnoj fazi na isti način, uz korišćenje između 60 i 70 ml etil etra (tačka 4.10.).

Svaka se emulzija može otkloniti dodavanjem malih količina etanola (tačka 4.11.).

5.1.4. Kombinovati tri ekstrakta etera u jednom lijevku za razdvajanje koji sadrži 50 ml vode. Nastaviti ispirati s vodom (50 ml) sve dok se u vodi kojom se ispiralo više ne pojavljuje ružičasto obojenje prilikom dodavanja kapljica rastvora fenolftaleina (tačka 4.21.).

Nakon uklanjanja vode kojom se ispiralo profiltrirati kroz bezvodni natrijum sulfat (tačka 4.5.) u prethodno izvavanoj tikvici od 250 ml ispirati lijevak i filter malim količinama etil etera (tačka 4.10.).

5.1.5. Rastvor upariti destilovanjem na vakuum uparivaču na 30 °C. Dodati 5 ml acetona i potpuno odstraniti isparljivi rastvarač pod blagom strujom azota. Ostatak osušiti u peći 15 min na  $103 \pm 2$  °C. Ohladiti u eksikatoru i izvagati uz odstupanje do 0,1 mg.

5.2. Razdvajanje frakcija sterola i triterpenskih dialkohola (eritrodiol + uvaol)

5.2.1. Pripremanje osnovnih ploča za tankoslojnu hromatografiju. Uroniti silika gel ploče (tačka 4.6.) u rastvor 0,2 mol/l kalijum hidroksida u etanolu (tačka 4.5.) na 10 sekundi, zatim ih ostaviti da se dva sata suše u digestoru i na kraju ih staviti u peč na sat vremena na 100 °C.

Izvaditi ploče iz peći i skladištiti u eksikator s kalcijum hloridom (tačka 3.13.) do upotrebe (ploče obrađene na ovaj način moraju se upotrijebiti u roku od 15 dana).

Kad se za razdvajanje frakcije sterola koriste osnovnesilika gel ploče, nema potrebe da se neosapunjive supstance obrađuju aluminijumom. Na taj način svi sastojci koji su po prirodi kiseli (masne kiseline i drugi) zadržavaju se na liniji raspršivanja, a vrpca sterola jasno se odvaja od trake alifatičnih i triterpenskih alkohola.

- 5.2.2. U kadici za razvijanje unijeti smjesu heksana i etil etra (tačka 4.24.) (Napomena 4.) do nivoa od približno 1 cm. Kadicu zatvoriti odgovarajućim poklopcem i ostaviti tako na najmanje pola sata, na hladnom mjestu, kako bi se uspostavila ravnoteža tečnosti ipare. Trake filter-papira umočene u eluens mogu se postaviti na unutrašnje površine kadice. Time se skraćuje vrijeme razvijanja za otprilike jednu trećinu i dobija jednoličnija, pravilna elucija komponenata.

Smjesa za razvijanje treba da se zamijeni za svako ispitivanje da bi se postigli savršeni ponovljivi uslovi elucije ili se umjesto toga može koristiti rastvor n-heksana i etil etra 50:50 (V/V).

- 5.2.3. Pripremiti približno 5 %-tni rastvor neosapunjivih supstanci (tačka 5.1.5.) u etil acetatu (tačka 4.12.) i pomoću mikrosprica od 100 µl nanijeti 0,3 ml tog rastvora u tankoj i ujednačenoj liniji na donji rub (2 cm) hromatografske ploče (tačka 5.2.1.). Poravnato s nanosom nanijeti između u 2 i 3 µl referentnog rastvora supstanci (tačka 4.13.) tako da se traka sterola i triterpenskih alkohola može identifikovati nakon razvijanja.
- 5.2.4. Postaviti ploču unutar kadice za razvijanje koja je pripremljena kako je navedeno u tački 5.2.2. Sobnu temperaturu treba održavati između 15 i 20 °C (Napomena 5.). Kadicu odmah zatvoriti poklopcem i ostaviti da eluira dok prednji dio rastvora ne dosegne približno 1 cm od gornjeg ruba ploče. Ploča se zatim vadi iz kadice za razvijanje, a rastvor isparava pod strujom vrućeg vazduha ili se ploča ostavlja još neko kraće vrijeme u digestoru.

Na višim temperaturama razdvajanje se može pogoršati.

- 5.2.5. Blago i jednoliko pošpricati ploču rastvorom 2,7-dihlorofluoresceina (tačka 4.14.) i zatim je ostaviti da se osuši. Kad se ploča posmatra pod ultraljubičastom svjetlošću, trake sterola i triterpenskih alkohola mogu se identifikovati tako što su poravnate s mrljama dobijenim od referentne rastvora (tačka 4.13.). Krajevi trake označe se uz kraj fluorescencije crnom olovkom (vidi TLC ploču na slici 3).
- 5.2.6. Silika gel koji se nalazi u označenom području sastruže se pomoću metalne spatule. Tako dobijeni fino usitnjeni materijal unijeti u lijevak za filtriranje (tačka 3.7.). Dodati 10 ml vrućeg etil acetata (tačka 4.13.), pažljivo izmiješati metalnom spatulom i filtrirati pod vakuumom, skupljajući filtrat u vakuumsku tikvicu (tačka 3.8.) spojenu na lijevak za filtriranje.

Ostatak u tikvici isprati tri puta etil etrom (tačka 4.3.) (približno 10 ml svaki put), skupljajući filtrat u istu tikvicu spojenu na lijevak, ispariti filtrat do zapremine od 4 do 5 ml, preostali rastvor prenijeti u prethodno izvaganu epruvetu zapremine 10 ml (tačka 3.9.), upariti do suvog laganim zagrijavanjem pod blagom strujom azota, ponovno dopuniti sa nekoliko kapi acetona (tačka 4.8.) i ponovno upariti do suvog.

Ostatak unutar epruvete mora se sastojati od frakcija sterola i triterpenskih alkohola.

### 5.3. Pripremanje trimetilsilil etara.

- 5.3.1. Dodati reagens za silaniziranje (tačka 4.25.) (Napomena 6.), u promjeru od po 50 µl na svaki miligram sterola i triterpenskih alkohola, u epruvetu koja sadrži frakciju sterola i triterpena tako da se izbjegne bilo kakva apsorpcija vlage (Napomena 7.)

Rastvori spremne za upotrebu dostupni su na tržištu. Dostupni su i drugi reagensi za silaniziranje kao što su npr. bistrimetilsililtrifluoracetamid + 1 % trimetilhlorsilan za miješanje s jednakom zapreminom bezvodnog piridina.

Piridin se može zamijeniti jednakom količinom acetonitrila.

- 5.3.2. Epruvetu treba začeptiti i pažljivo promućkati (bez preokretanja) sve dok se sastojci u potpunosti ne rastope. Ostaviti da odstoji najmanje 15 minuta na sobnoj temperaturi i zatim centrifugirati nekoliko minuta. Bistri rastvor spreman je za analizu gasnim hromatografom.

Normalno je da dođe do blage opalescencije koja neće uzrokovati anomalije. Stvaranje bijelog floka ili pojava ružičastog obojenja znakovi su prisutnosti vlage ili propadanja reagensa. U tom slučaju treba ponoviti ispitivanje (samo ako se koristi heksametildisilazan ili trimetilhlorsilan).

#### 5.4. Analiza gasnom hromatografijom

##### 5.4.1. Pripremne djelatnosti i kondicioniranje kapilarne kolone.

- 5.4.1.1. Namjestiti kolonu (tačka 3.11.) u gasni hromatograf tako da se početak kolone spoji na razdjelni injektor, a izlazni kraj kolone na detektor.

Sprovesti opštu provjeru stanja jedinice gasnoghromatografa (curenje iz gasnih tokova, efikasnost detektora, efikasnost sastava za razdvajanje i sastava za bilježenje, itd.).

- 5.4.1.2. Ako se kolona koristi prvi put, preporučljivo je podvrgnuti je postupku kondicioniranja: kroz kolonu se pusti malo gasa, a zatim se jedinica gasnog hromatografa uključi i postupno zagrijava dok se ne postigne temperatura koja je najmanje 20 °C iznad radne temperature. Ta se temperatura treba održavati najmanje dva sata, zatim se cijela jedinica stavlja u radne uslove (prilagođavanje protoka gasa i razdvajanja, paljenja plamena, provjera spoja s računarskim sistemom, prilagođavanje komore za kolonu, temperature detektora i injektora, itd.), a zatim se bilježi signal osjetljivosti koja je najmanje dvostruko viša od nivoa predviđenog za analizu. Bazna linija za praćenje treba da bude linearna, bez pikova ikakve vrste i ne smije pokazivati nikakve znakove otklona.

Negativan pravougaoni otklon ukazuje na to da je došlo do curenja iz spojeva kolone, a pozitivan otklon ukazuje na to da kolona nije kondicionirana na odgovarajući način.

Temperatura kondicioniranja mora uvijek da bude najmanje 20 °C niža od maksimalne temperature utvrđene za primijenjenu stacionarnu fazu.

#### 5.4.2. Izbor radnih uslova.

##### 5.4.2.1. Opšti radni uslovi su kako slijedi:

- Temperatura kolone:  $260 \pm 5$  °C;
- Temperatura injektora: 280 - 300 °C;
- Temperatura detektora: 280 - 300 °C;
- Linearna brzina nosećeg gasa: helijum između 20 i 35 cm/s, vodonik između 30 i 50 cm/s;
- Promjer razdvajanja: između 1:50 i 1:100,
- Osjetljivost instrumenta: između 4 i 16 puta viša od minimalne atenuacije;
- Osjetljivost bilježenja: - Između 1 i 2 mV pune skale;
- Količina injektirane supstance: između 0,5 i 1 µl rastvora TMSE.

Gore navedeni uslovi mogu se modifikovati u skladu sa svojstvima kolone i svojstvima gasnog hromatografa ne bi li se dobili hromatogrami koji udovoljavaju sljedećim zahtjevima:

- Retenciono vrijeme pika  $\beta$ -sitosterola treba da bude  $20 \pm 5$  minuta;
- Pik kampesterola treba da bude: za maslinovo ulje (prosječan udio 3 %)  $20 \pm 5$  % vrijednosti pune skale; za sojino ulje (prosječni udio 20 %)  $80 \pm 10$  % vrijednosti pune skale;
- Svi prisutni steroli moraju biti odvojeni. Osim odvajanja, pikovi moraju biti i potpuno razdvojeni, tj. trag pika mora se vratiti na baznu liniju prije no što krene stvarati novi pik. Međutim, nepotpuno razdvajanje toleriše se u slučaju da se pik pri RRT 1,02 može kvantifikovati korišćenjem okomice.

#### 5.4.3. Analitički postupak

- 5.4.3.1. Korišćenjem mikrošpricazapremine 10 µl unijeti 1 µl heksana, 0,5 µl zraka, i zatim između 0,5 i 1 µl rastvora uzorka. Pritom podignuti klip mikrošprica da bi se igla ispraznila. Igla se uvodi kroz membranu injektora; nakon jedne do dvije sekunde rastvor se brzo injektira, a nakon približno pet sekundi igla se polako izvlači.

Može se upotrijebiti i automatski injektor.

- 5.4.3.2. Bilježenje treba sprovoditi sve dok se TMSE prisutnih triterpenskih dialkohola u potpunosti ne eluiraju. Bazna linija treba u svakom trenutku da odgovara zahtjevima (tačka 5.4.1.2.).

#### 5.4.4. Identifikovanje pikova

Identifikovanje pojedinačnih pikova sprovodi se na temelju retencionog vremena i upoređivanjem s mješavinom sterolnih i triterpenskih dialkohola TMSE koja se analizirala u jednakim uslovima (vidi Dodatak).

Steroli i triterpenski dialkoholi se eluiraju sledećim redosledom: holesterol, brasikasterol, ergosterol, 24-metilen holesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, 7-kampesterol, 5,23-stigmastadienol, klerosterol,

β-sitosterol, sitostanol, 5-avenasterol, 5,24-stigmasta- dienol, 7-stigmasterol, 7-avenasterol, eritrodiol i uvaol.

#### 5.4.5. Kvantitativna procjena.

- 5.4.5.1. Površine pikova α-holestanola i sterola i triterpenskih dialkohola izračunavaju se korišćenjem kompjuterskog sistema. Pikove bilo kojega od jedinjenja koji nisu uključeni među one navedene u Tabeli 1. (ergosterol se ne smije izračunavati) ne treba uzimati u obzir. Koeficijent odziva za α-holestanol treba biti jednak 1. holestankorišćenjesistemholestan
- 5.4.5.2. Treba izračunati koncentraciju svakog pojedinačnog sterola u mg/kg masnog materijala kako slijedi:

$$\text{sterol } x \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

pri čemu je:

$A_x$  = površina pika sterola x, u izračunima računarskog sistema;

$A_s$  = površina pika α-holestanholestanola; u izračunarskog sistema;

$m_s$  = masa dodatnog α-holestanholestanola, u miligramima;

$m$  = masa uzorka korištenog za određivanje, u gramima.

## 6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

- 6.1. Koncentracije pojedinačnih sterola iskazuju se kao mg/kg masnog materijala, a njihov ZbirZbir kao „ukupni steroli”.

Sastav svakog pojedinačnog sterola i eritrodiola i uvaola iskazuje se jednim decimalnim brojem.

Ukupni sastav sterola mora se iskazati bez ijednog decimalnog broja.

- 
- 6.2. Izračunati procenat svakog pojedinačnog sterola iz odnosa površine pika prema ukupnoj površini pikova za sterole:

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

pri čemu je:

$A_x$  = površina pika za x;

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

4. Beta-sitosterol: 5-23-stigmastadienol + klerosterol + -sitosterol + sito- stanol + 5-avenasterol + 5-24-stigmastadienol.

## 6.4. Izračunavanje procenta eritrodiola i uvaola:

Er p Uv  
 Eritrodiol p uvaol ¼ Er p Uv p ΣA Û 100

pri čemu je

ΣA = ZbirZbir površine sterola u izračunima računarskog sastava;

Er = površina eritrodiola u izračunima računarskog sastava;

Uv = površina uvaola u izračunima računarskog sastava;

### Određivanje linearne brzine gasa

U gasni hromatograf postavljen na normalne radne usloveinjektira se između 1 i 3 µl metana (ili propana) i zatim se mjeri vrijeme koje je gasu potrebno da protekne kroz kolonu od trenutka injektiranja do trenutka pojavljivanja pika (tM).

Linearna brzina u cm/s zadata je s L/tM, pri čemu je L dužina kolone u cm, a tM izmjereno vrijeme u sekundama.

Tabela 1.

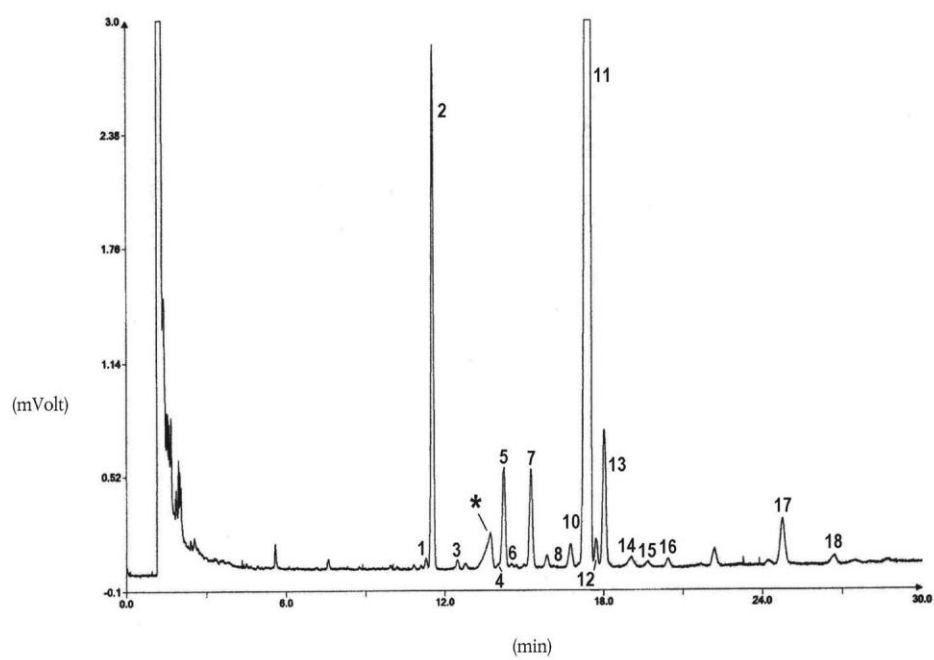
### Relativna retenciona vremena za sterole

| Pik | Identifikacija        |                                           | Relativno retenciono vrijeme |              |
|-----|-----------------------|-------------------------------------------|------------------------------|--------------|
|     |                       |                                           | SE 54 kolona                 | SE 54 kolona |
| 1   | Holesterol            | -5-holesten-3β-ol                         | 0,67                         | 0,63         |
| 2   | Holestanol            | 5α-holestan-3β-ol                         | 0,68                         | 0,64         |
| 3   | Brasikasterol         | [24S]-24-metil- -5,22-holestadien-3β-ol   | 0,73                         | 0,71         |
| *   | Ergosterol            | [24S] 24 metil -5-7-22 holestatrien 3β-ol | 0,78                         | 0,76         |
| 4   | 24-metilen-kolesterol | 24-metilen- -5,24-holestadien-3β-o1       | 0,82                         | 0,80         |
| 5   | Kampesterol           | (24R)-24-metil- -5-holesten-3β-ol         | 0,83                         | 0,81         |
| 6   | Kampestanol           | (24R)-24-metil-holestan-3β-ol             | 0,85                         | 0,82         |
| 7   | Stigmasterol          | (24S)-24-etil- -5,22-holestadien-3β-ol    | 0,88                         | 0,87         |
| 8   | -7-kampesterol        | (24R)-24-metil- -7-holesten-3β-ol         | 0,93                         | 0,92         |
| 9   | -5,23-stigmastadienol | (24R,S)-24-etil- -5,23-holestadien-3β-ol  | 0,95                         | 0,95         |
| 10  | Hlerosterol           | (24S)-24-etil- -5,25-holestadien-3β-ol    | 0,96                         | 0,96         |
| 11  | β-sitosterol          | (24R)-24-etil- -7-holesten-3β-ol          | 1,00                         | 1,00         |
| 12  | Sitostanol            | 24-etil-holestan-3β-ol                    | 1,02                         | 1,02         |
| 13  | -5-avenasterol        | (24Z)-24-etiliden- -holesten-3β-ol        | 1,03                         | 1,03         |
| 14  | -5-24-stigmastadienol | (24R,S)-24-etil- -5,24-holestadien-3β-ol  | 1,08                         | 1,08         |
| 15  | -7-stigmastenol       | (24R,S)-24-etil- -7-holesten-3β-ol        | 1,12                         | 1,12         |
| 16  | -7-avenasterol        | (24Z)-24-etiliden- -7-holesten-3β-ol      | 1,16                         | 1,16         |

|    |            |                                         |      |      |
|----|------------|-----------------------------------------|------|------|
| 17 | Eritrodiol | 5 $\alpha$ olean-12en-3 $\beta$ 28 diol | 1,41 | 1,41 |
| 18 | Uvaol      | 12-ursen-3 $\beta$ 28 diol              | 1,52 | 1,52 |

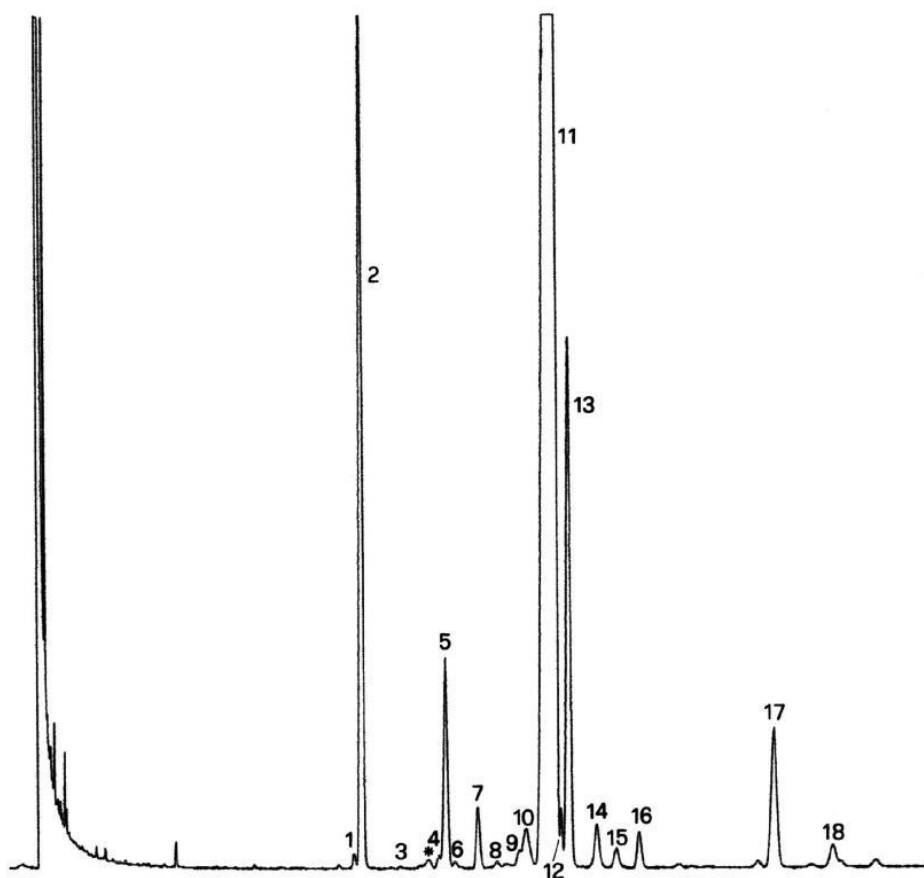
Slika 1.

**Gasni hromatogram frakcije sterola i triterpenskih alkohola maslinova ulja lampante  
(dodat unutrašnji standard)**



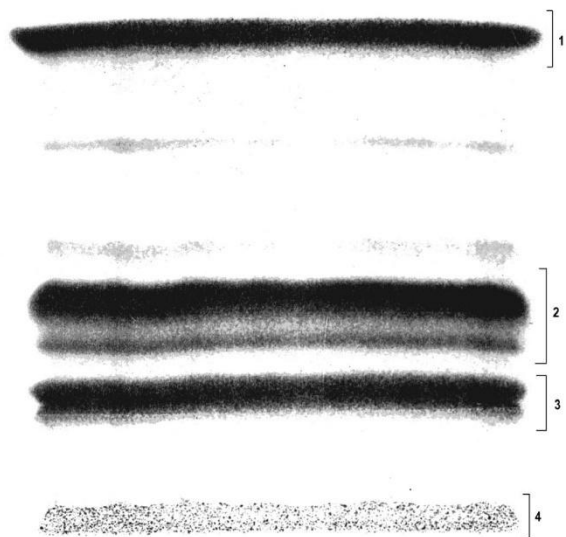
Slika 2.

Gasni hromatogram frakcije sterola i triterpenskih alkohola rafinisanog maslinova ulja  
(dodat unutrašnji standard)



*Slika 3.*

**TLC ploča ulja komine maslina sa područjem koja se sastruže za određivanje sterola i triterpenskih alkohola**



- 1 – Skvalen
- 2 – Triterpen i alifatični alkoholi
- 3 – Steroli i alifatični dialkoholi
- 4 – Početak i slobodne masne kiseline

## ODREĐIVANJE PROCENTA 2-GLICERIL MONOPALMITATA

### 1. UVOD

Procenat palmitinske kiseline u položaju 2. na trigliceridima utvrđuje se određivanjem procenta 2-gliceril monopalmitata, koji se može primijeniti na biljna ulja koja su tečna 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. na molekulu triglicerida uzrokuje pojavu monoglicerida u položaju 2. Procenat 2-gliceril monopalmitata u frakciji monoglicerida se određuje nakon sizlaniziranja kapilarnom gasnom hromatografijom.

### 3. OPREMA I MATERIJALI

- 3.1. Erlenmajerova tikvica zapremine 25 ml
- 3.2. Laboratorijske čaše zapremine 100, 250 i 300 ml,
- 3.3. Staklena hromatografska kolona unutarnjeg razmjera 21-33 mm, dužina 400 mm, s pločom od sinter-stakla i pipcem
- 3.4. Menzure zapremine 10, 50, 100 i 200 ml
- 3.5. Tikvice zapremine 100 i 250 ml
- 3.6. Vakuum uparivač
- 3.7. Epruvete za centrifugiranje s konusnim dnom zapremine 10 ml s čepom od brušenog stakla
- 3.8. Centrifuga za epruvete zapremine 10 i 100 ml
- 3.9. Termostat koji omogućava stabilnu temperaturu od  $40 \pm 0,5$  °C
- 3.10. Graduirane pipete zapremine 1 i 2 ml
- 3.11. Špricazapremine 1 ml
- 3.12. Mikrošpricazapremine 100 µm
- 3.13. Lijevak zapremine 1 000 ml
- 3.14. Kapilarni gasni hromatograf opremljen hladnim injektorom za neposredno ubrizgavanje uzorka u kolonu i peći koja može održavati odabranu temperaturu u granicama od oko 1 °C
- 3.15. Hladni injektor na koloni za neposredno ubrizgavanje uzorka u kolonu
- 3.16. Plamenojonizacijski detektor i elektrometar
- 3.17. Snimač-integrator prilagođen elektrometru s vremenom reakcije koje nije duže od jedne sekunde i s varijabilnom brzinom papira
- 3.18. Staklena ili kvarcna kapilarna kolona dužine 8 do 12 metara, unutrašnjeg razmjera 0,25-0,32 mm, prekrivena metilpolisiloksanom ili fenil metil- polisiloksanom 5 %, debljine 0,10-0,30 µm, koja se može koristiti na 370 °C

3.19. Mikrošpriczapremine 10  $\mu$ l s tvrdom iglom (od kaljenog stakla), dužine najmanje 7,5 cm za neposredno ubrizgavanje na koloni.

#### 4. REAGENSI

4.1. Silika gel veličine zrna između 0,063 i 0,200 mm, (70/280 mesh), pripremljen kako slijedi: staviti silika gel u porculansku posudu, osušiti u inkubatoru pri 160 °C četiri sata, potom ga ostaviti da se ohladi u eksikatoru pri sobnoj temperaturi. Dodati 5 % vode na masu silika gela kako slijedi: izvagati 152 g silika gela u Erlenmajerovu tikvicu, zatim dodati 8 g destilovane vode, začepiti i lagano promućkati da se voda ravnomjerno rasporedi. Ostaviti da odstoji najmanje 12 sati prije upotrebe.

4.2. n-heksan (za hromatografiju)

4.3. Izopropanol

4.4. Izopropanol, 1/1 (v/v) vodeni rastvor

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

4.6. Pufer rastvor tris-hidroksimetilaminometana: 1 M rastvora prilagođenog na pH 8, (potenciometrijska kontrola), koncentracijom HCl (1/1 v/v)

4.7. Natrijum holat, enzimatskog kvaliteta, vodeni rastvor 0,1 % (ovaj rastvor se mora iskoristiti u roku od dvije nedejlje od pripreme)

4.8. Kalcijum hlorid, 22 % vodeni rastvor

4.9. Dietil eter za hromatografiju

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

4.11. Natrijum hidroksid, rastvor 12 % po težini

4.12. Fenolftalein, 1 % rastvor u etanolu

4.13. Noseći gas: vodonik ili helijum, za gasnu hromatografiju

4.14. Pomoćni gasovi: vodonik, čistoće najmanje 99 %, bez vlage i organskih supstance i vazduha, za gasnu hromatografiju, iste čistoće

4.15. Reagens za silaniziranje: mješavina piridina/heksametildisilazana, trime- tilklorosilana 9/3/1 (v/v/v). (Rastvori spremni za upotrebu su dostupni na tržištu. Mogu se koristiti drugi reagensi za silaniziranje, posebno bistrimetilsilil trifloracetamid + 1 % trimetilklorosilan, razrijeđen jednakom zapreminom bezvodnog piridina.)

4.16. Referentni uzorci: čisti monogliceridi ili mješavine monoglicerida s poznatim procentnim udjelom sličnim uzorku.

#### 5. METODA

##### 5.1. Priprema uzorka

5.1.1. Ulja sa slobodnim kiselinama manjim od 3 % ne treba neutralizovati prije hromatografije na koloni silika gela. Ulja sa slobodnom kiselinama većim od 3 % se moraju neutralizovati kao u tački 5.1.1.1.

5.1.1.1. Uлити 50 g ulja i 200 ml n-heksana u lijevak zapremine 1 000 ml (3.13.). Dodati 100 ml izopropanola i količinu rastvora 12 % natrijum nitroksida (4.11.) istovjetnu slobodnoj kiselosti ulja uvećanu za 5 %. Snažno mućkati jedan minut. Dodati 100 ml destilovane vode, ponovo promućkati i ostaviti da odstoji.

Nakon dekantiranja ukloniti donji sloj koji sadrži sapune. Skinuti među- slojeve (sluz i nerastvorljive supstance). Isprati heksanski rastvor neutralizovanog ulja uzastopnim dodavanjem rastvor 1/1 (v/v) izopropanol/voda (4.4.) u obrocima od 50-60 ml dok ne nestane ružičasta boja fenolftaleina.

Ukloniti najveći dio heksana vakuumskom destilacijom, (pomoću rotaconog isparivača, na primjer), i prenijeti ulje u tikvicu zapremine 100 ml (3.5.). Osušiti ulje u vakuumu dok se rastvor potpuno ne ukloni.

Nakon okončanja postupka, kiseline u ulju treba da budu manje od 0,5 %.

5.1.2. Staviti 1,0 g ulja napravljenog kao što je gore navedeno u Erlenmajerovu tikvicu zapremine 25 ml (3.1.) i rastvoriti u 10 ml mješavine za razvijanje (4.10.). Ostaviti rastvor da odstoji najmanje 15 minuta prije kolonske hromatografije sa silika gelom.

Ako je rastvor mutan, centrifugirati, kako bi se osigurali optimalni uslovi za hromatografiju. (Mogu se koristiti kapsule gotovog silika gela SPE od 500 mg pripremljenog za upotrebu.)

#### 5.1.3. Priprema hromatografske kolone

Uлити oko 30 ml rastvora za razvijanje (4.10.) u kolonu (3.3.), staviti komad vate u donji dio kolone pomoću staklenog štapića; utisnuti da se ukloni vazduh.

U laboratorijskoj čaši pripremiti rastvor od 25 g silika gela (4.1.) u približno 80 ml rastvora za razvijanje i prenijeti u kolonu pomoću lijevka.

Provjeriti nalazi li se sav silika gel u koloni; isprati rastvorom za razvijanje (4.10.), otvoriti pipac i pustiti da tečnost dostigne nivo od oko 2 mm iznad nivoa silika gela.

#### 5.1.4. Kolonska hromatografija

Odvagati tačno 1,0 g uzorka pripremljenog kao u tački 5.1 u Erlenmajerovu tikvicu zapremine 25 ml (3.1.).

Rastopiti uzorak u 10 ml rastvora za razvijanje (4.10.). Unijeti rastvor u hromatografsku kolonu pripremljenu kao u tački 5.1.3. Izbjeći remećenje površine kolone.

Otvoriti pipac i uliti rastvor uzorka dok ne dostigne nivo silika gela. Razviti sa 150 ml rastvora za razvijanje. Prilagoditi brzinu protoka na 2 ml/min (tako da 150 ml uđe u kolonu za oko 60-70 minuta).

Sakupiti eluat u prethodno izvaganu tikvicu zapremine 250 ml. Upariti rastvor pod vakuumom i skinuti konačne tragove rastvora pod strujom azota.

Izvagati tikvicu i izračunati dobijen ekstrakt.

Ako se koriste kapsule gotovogsilika gela SPE spremnog za upotrebu, primijeniti sljedeću metodu: staviti 1 ml rastvora (5.1.2.) u pripremljene kapsule sa 3 ml n-heksana.

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

Sakupiti eluat u epruvetu zapremine 10 ml i osušiti pod strujom azota.

Izložiti suvi ostatak pankreasnoj lipazi (5.2.). (Bitno je provjeriti sastav masne kiseline prije i nakon prelaska kapsule SPE.)

## 5.2. Hidroliza pankreasnom lipazom

5.2.1. Odvagati u epruvetu za centrifugiranje 0,1 g ulja pripremljenog kao u tački 5.1. Dodati 2 ml pufer rastvora, (4.6.), 0,5 ml rastvora natrijumholata, (4.7.), i 0,2 ml rastvora kalcijum hlorida, dobro promiješati nakon svakog dodavanja. Zatvoriti epruvetu čepom od brušenog stakla i staviti u termostat na  $40 \pm 0,5$  °C.

5.2.2. Dodati 20 mg lipaze, pažljivo promućkati, (izbjеći kvšenje čepa), i staviti epruvetu u termostat na tačno dva minuta. Potom ga skinuti, snažno mućkati tačno 1 minut i ostaviti da se hladi.

5.2.3. Dodati 1 ml dietil etra, začepiti i snažno promućkati, potom centrifugirati i prenijeti rastvor etra u čistu, suhu epruvetu pomoću mikroštricaljke.

## 5.3. Priprema silanizovanih derivata i gasna hromatografija

5.3.1. Mikrošpicom prenijeti 100 µm rastvora, (5.2.3.), u epruvetu s konusnim dnom zapremine 10 ml.

5.3.2. Ukloniti rastvor pod blagom strujom azota, dodati 200 µm 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 (zavisno o hromatografskim uslovima): dobijen je rastvor spreman za gasnu hromatografiju.

## 5.4. Gasna hromatografija

Radni uslovi:

— temperatura injektora, (injektor neposredno na koloni), niža od temperature ključanja rastvora (68 °C),

— temperatura detektora: 350 °C,

— temperatura kolone; programiranje temperature peći: 60 °C u trajanju od 1 minuta, povećavanje za 15 °C u minuti do 180 °C, potom po 5 °C u minuti do 340 °C, potom 340 °C u trajanju od 13 minuta,

— noseći gas: vodonik ili helijum, postavljen na linearnu brzinu dostatnu da se dobije rezolucija naznačena na slici 1. Retenciono vrijeme triglicerida C<sub>54</sub> mora biti  $40 \pm 5$  minuta (vidjeti sliku 2.). (Gore naznačeni radni uslovi su indikativni. Operateri će ih morati optimizovati kako bi dobili željenu rezoluciju. Pik koji odgovara 2-gliceril monopalmitatu mora imati minimalnu visinu jednaku 10 % skale snimača.),

— količina injektovane supstance: 0,5-1 µm rastvora n-heksana (5 ml) (5.3.3.). 5.4.1. Identifikovanje pikova

Pojedini monogliceridi mogu se identifikovati na temelju svojih retencionih vremena i uporedbom s onim dobijenim za standardne monogliceridne smjese pod istim uslovima.

#### 5.4.2. Kvantitativna procjena

Površina svakog pika izračunava se pomoću elektroničkog integratora.

### 6. ISKAZIVANJE REZULTATA

Procenat gliceril monopalmitata se izračunava iz prečnika površine relevantnog pika prema ukupnoj površini pikovog monoglicerida, (vidjeti sliku 2.), korišćenjem formule:

gliceril monopalmitat (%):  $\frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$  gdje je:

$A_x$  = površina pika koja odgovara gliceril monopalmitatu  $\Sigma A$  = ukupna površina pikova za monogliceride  
Rezultat mora biti izražen na jednu decimalu.

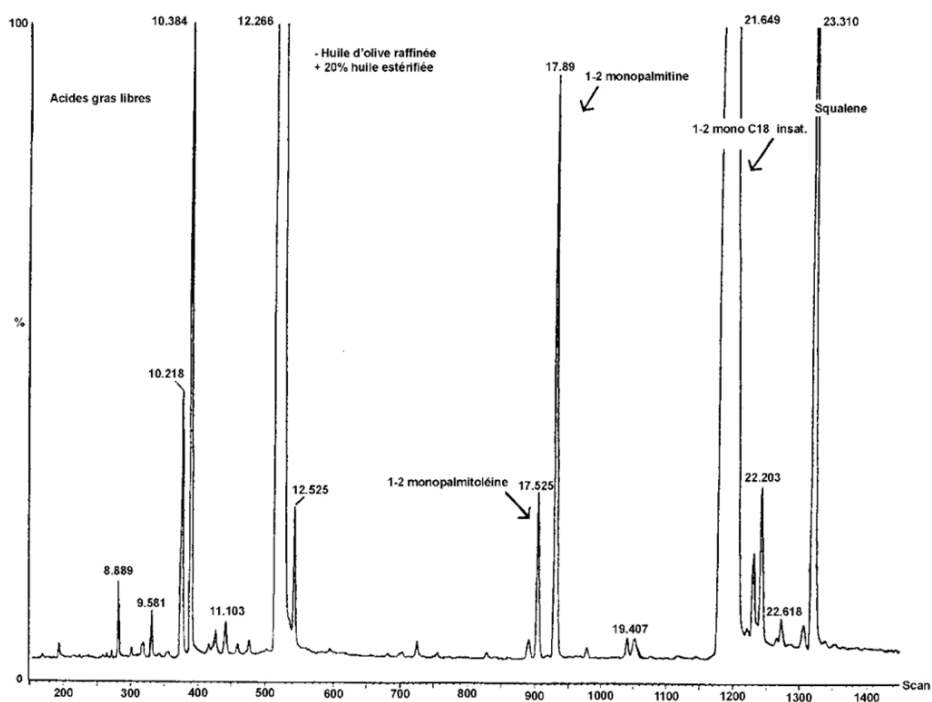
### 7. IZVJEŠTAJ O ISPITIVANJU

Izvještaj o ispitivanju treba da sadrži:

- upućivanje na metodu iz ovog priloga,
- sve informacije potrebne za punu identifikaciju uzorka,
- rezultat analize,
- svako odstupanje od metode, bilo da je posljedica odluke predmetnih stranaka ili drugog razloga,
- podaci za identifikaciju laboratorija, datum analize i potpis onih koji su odgovorni za analizu.

Slika 1.

Hromatogram proizvoda reakcije silaniziranja dobijenih djelovanjem lipaze na rafinisano maslinovo ulje s dodatkom 20 % esterificiranog ulja (100 %)



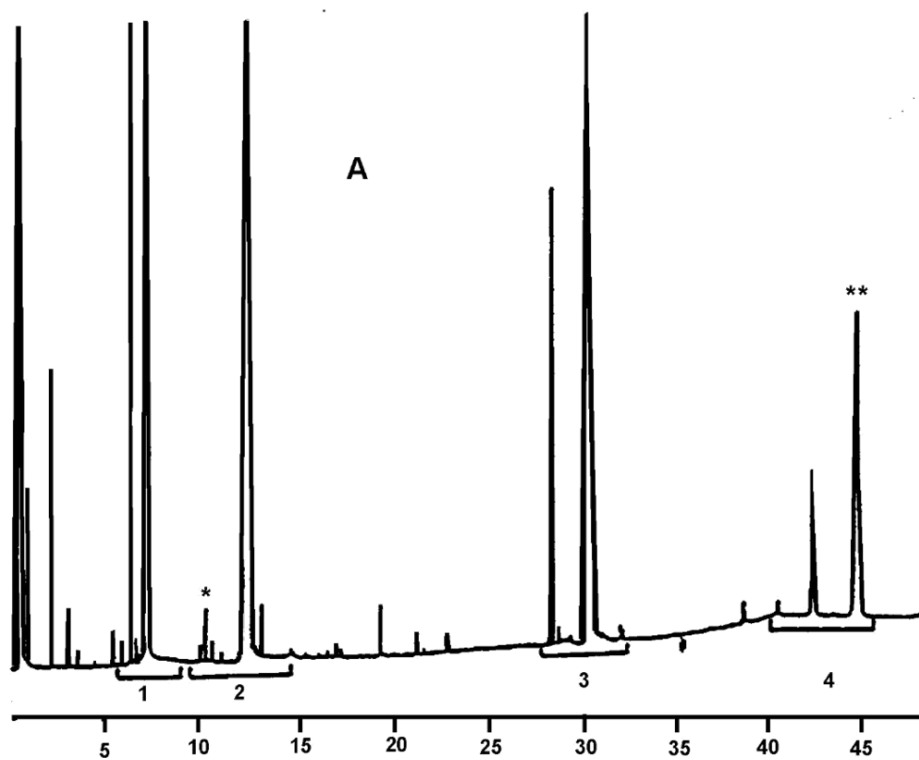
Legenda: „acides gras libres” = slobodne masne kiseline; „Huile d’olive raffinée + 20 % huile estérifiée” = rafinisano maslinovo ulje + 20 % esterifikovano ulje; „1-2 monopalmitoléine” = 1-2 monopalmitolein; „1-2 mono C<sub>18</sub> insat.” = nezasićeni 1-2 mono C<sub>18</sub>

Slika 2.

**Hromatogram:**

(A) neesterifikovano maslinovo ulje, nakon djelovanja lipaze; nakon silaniziranja; pod ovim uslovima, (kapilarna kolona 8-12 m), frakcija voska se eluira istovremeno kao i frakcija diglicerida ili malo nakon nje.

Nakon lipaze, sadržaj triglicerida ne smije preći 15 %



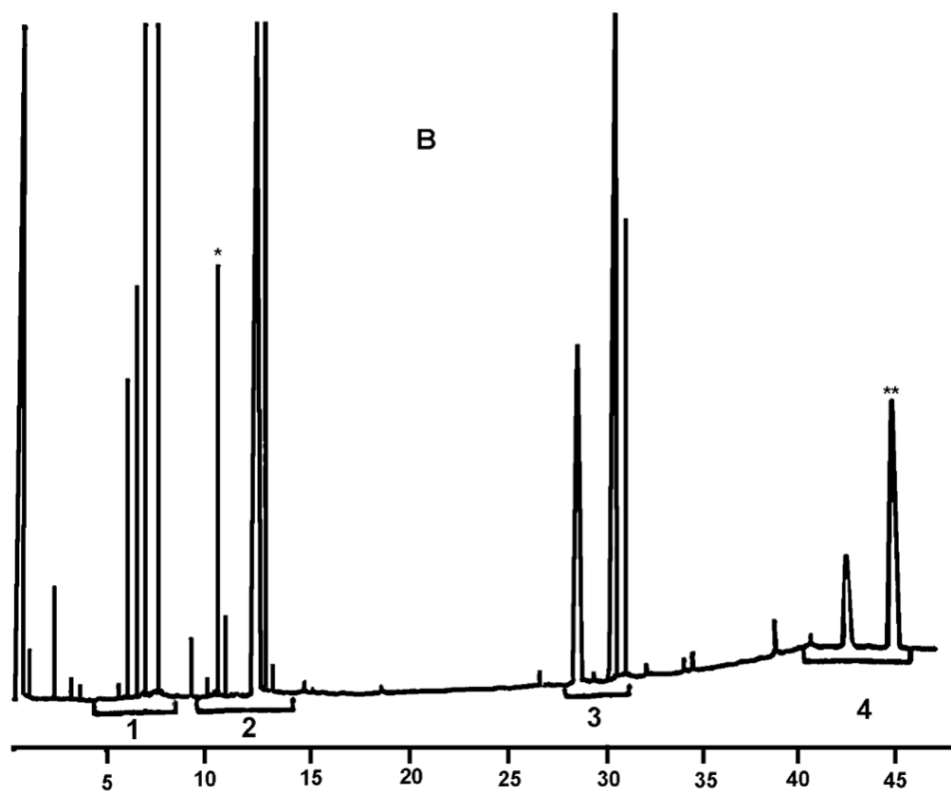
*Legenda:*

- 1. = Slobodne masne kiseline
- 2. = Monogliceridi
- 3. = Digliceridi
- 4. = Trigliceridi
- \* = 2-monopalmitin
- \*\* = Triglicerid C<sub>54</sub>

**Hromatogram:**

**(B)** neesterifikovano ulje nakon djelovanja lipaze; nakon silanizovanja; pod ovim uslovima, (kapilarna kolona 8-12 m), frakcija voska se eluira istovremeno kad i frakcija diglicerida ili malo nakon nje.

Nakon lipaze, sadržaj triglicerida ne smije prelaziti 15 %.



*Legenda:*

- 1. = Slobodne masne kisjeline
- 2. = Monogliceridi
- 3. = Digliceridi
- 4. = Trigliceridi
- \* = 2-monopalmitin
- \*\* = Triglicerid C<sub>54</sub>

## 8. NAPOMENE

1. Lipaze sa zadovoljavajućom aktivnošću su dostupne na tržištu. One se takođe mogu napraviti u laboratoriji na sljedeći način:

Ohladite 5 kg svježe svinjske gušterače na 0 °C. Odstranite okolnu tvrdnu mast i vezivno tkivo i sameljite u gustu tečnost u mikseru. Miješajte pastu s 2,5 litara bezvodnog acetona 4-6 sati, zatim centrifugirajte. Ekstrahujte ostatak još tri puta s jednakom zapreminom bezvodnog acetona, a zatim dva puta s mješavinom acetona/dietilnog etera (1/1 v/v) i dva puta s dietilnim eterom.

Osušiti ostatak u vakuumu 48 sati da biste dobili stabilan prah koji se može dugotrajno spremiti u hladnjaku, zaštićen od vlage.

2. praćenje aktivnosti lipaze Pripremiti emulziju maslinovog ulja kako slijedi:

U mikseru miješajte 10 minuta mješavinu 165 ml rastvora gumi arabike 100 g/l, 15 g zdrobljenog leda i 20 ml prethodno neutralizovanog maslinovog ulja.

Ulijte 10 ml emulzije u laboratorijsku čašu zapremine 50 ml, zatim dodajte 0,3 ml rastvora natrijum holata 0,2 g/ml i potom 20 ml destilovane vode.

Stavite laboratorijsku čašu u termostatski namješten na 37 °C; umetnite elek- trode pH-metra i spiralnu miješalicu.

Biretom dodajte rastvor 0,1 N natrijum hidroksida, kap po kap, dok se ne dobije pH od 8,3.

Dodajte alikvot vodene suspenzije praha lipaze (0,1 g/ml lipaze). Čim pH-metar pokaže 8,3, uključite zapornu uru i ukapajte rastvor natrijum hidroksida brzinom kojom se održava pH na 8,3. Očitajte svaki minut zapreminu potrošenog rastvora.

Zabilježite podatke na x/y grafikonu s vremenom na osi x i milimetrima potrošene alkalnog rastvora 0,1 N da se zadrži konstantan pH na y osi. Trebali biste dobiti linearni grafik.

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

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

pri čemu je:

A aktivnost lipaze u jedinicama/mg

V broj mililitara rastvora 0,1 N natrijum hidroksida u minutu  
(proračun iz grafikona)

N titar rastvora natrijum hidroksida, m masa u mg ispitane  
lipaze

Jedinica lipaze definisana je kao količina enzima koja oslobađa 10 mikroekvivalenata kiseline u minutu.

## ODREĐIVANJE METIL ESTARA MASNIH KISELINA GASNOM HROMATOGRAFIJOM

### 1. UVOD

Vezane masne kiseline triacilglicerola (engl. *triacylglycerols* – TAGs) te, zavisno od metode esterifikacije, slobodne masne kiseline (engl. *free fattyacids* – FFA) pretvaraju se u metil estre masnih kiselina (FAME) kojise određuju kapilarnom gasnom hromatografijom.

Metodom koja je opisana u ovom Prilogu dozvoljava se određivanje FAME-a od C<sub>12</sub> do C<sub>24</sub>, uključujući zasićene, *cis*- i *trans*-jednostruko nezasićene i *cis*- i *trans*-višestruko nezasićene metil estre masnih kiselina.

### 2. PRINCIP

Gasna hromatografija (engl. *Gas chromatography* – GC) upotrebljava se za kvantitativnu analizu FAME-a. Metilmetil estri masnih kiselina (FAME) pripremaju se u skladu s dijelom A. Zatim se injektiraju u injektor u kojem isparavaju. Razdvajanje FAME-a izvršava se na analitičkoj koloni specifičnog polariteta i dužine. Plamenjonizujućip Plamenjonizujući detektor (engl. *Flame Ioni-sation Detector* – FID) upotrebljava se za uočavanje FAME-a. Uslovi analizenavedeni su u dijelu B.

Vodonik ili helijum mogu se upotrebljavati kao noseći gas (mobilna faza) u gasnoj hromatografiji FAME-a s FID-om. Vodonik ubrzava razdvajanje i daje oštrije pikove. Stacionarna faza je mikroskopski sloj tankog tekućeg filma na inertnoj čvrstoj površini od kvarca.

Kako prolaze kroz kapilarnu kolonu, isparljivi komponente koji se analiziraju međusobno djeluju sa stacionarnom fazom ostavljajući premaz na unutrašnjoj površini kolone. Zbog takvog različitog međusobnog djelovanja različitih komponenti oni eluiraju u različito vrijeme koje se naziva retencionim vremenom komponente za dati skup analitičkih parametara. Upoređivanje retencionih vremena upotrebljava se za identifikaciju različitih komponenti.

### DIO A.

## PRIPREMA METILMETIL ESTARA MASNIH KISELINA IZ MASLINOVOG ULJA I ULJA KOMINE MASLINA

### 1. UVOD

U ovom se dijelu navodi način pripreme metilmetil estara masnih kiselina. Njime su obuhvaćene metode pripreme metilmetil estara masnih kiselina iz maslinovog ulja i ulja komine maslina.

### 2. PODRUČJE PRIMJENE

Priprema metil estara masnih kiselina iz maslinovog ulja i ulja komine maslina vrši se postupkom transesterifikacije sarastvorom kalijum hidroksida u metanolu na sobnoj temperaturi. Pitanje potrebe za prečišćavanjem uzorka prije transesterifikacije zavisi od sadržaja slobodnih masnih kiselina u uzorku i analitičkom parametru koji treba odrediti, a koji je moguće odabrati u skladu sa sljedećom tabelom:

### 3. METODOLOGIJA

#### 3.1. Transesterifikacija s rastvorom kalijum hidroksida u metanolu na sobnoj temperaturi

##### 3.1.1. *Princip*

Metil estri formiraju se transesterifikacijom s rastvrom kalijum hidroksida u metanolu, kao međuprodukti prije nego što nastupi saponifikacija.

##### 3.1.2. *Reagensi*

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

3.1.2.2. Heksan, hromatografske čistoće.

3.1.2.3. Heptan, hromatografske čistoće.

3.1.2.4. Dietilni eter, stabilizovan za analizu.

3.1.2.5. Aceton, hromatografske čistoće.

3.1.2.6. Rastvor za eluiranje za čišćenje ulja kolonskom/SPE hromatografijom, smjesa heksana/dietil etera 87/13 (v/v).

3.1.2.7. Kalijum hidroksid, rastvor u metanolu koncentracije oko 2 mol/l: rastvoriti 11,2 g kalijum hidroksida u 100 ml metanola.

3.1.2.8. Silika gel ulošci, 1 g (6 ml) za ekstrakciju na čvrstu fazu.

##### 3.1.3. *Oprema*

3.1.3.1. Epruvete zapremine 5 ml s navojnim čepom s PTFE spojem.

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

#### 3.1.4. Pročišćavanje uzoraka ulja

Prema potrebi se uzorak pročišćava prolaskom ulja kroz silika gel uloške za ekstrakciju na čvrstu fazu. Silika gel uložak (3.1.2.8.) se stavi u vakuumski instrument za eluciju i ispere pod vakuumom sa 6 ml heksana (3.1.2.2.); ispiranje se odvija bez vakuuma. Zatim se rastvor ulja (približno 0,12 g) u 0,5 ml heksana (3.1.2.2.) stavi u kolonu. Kad rastvor prođe u silika gel, eluira se pod vakuumom s 10 ml smjese heksana/dietil etera (87:13 v/v) (3.1.2.6.). Ukupni eluat se homogenizira i podjeli na dva po zapremini približno jednaka dijela. Alikvot se upari do suvoće rotirajućim isparivačem pod sniženim pritiskom na sobnoj temperaturi. Ostatak se rastvori u 1 ml heptana te je rastvor spreman za analizu masnih kiselina gasnom hromatografijom. Drugi alikvot se upari, a ostatak rastvori u 1 ml acetona za analizu triglicerida HPLC metodom, ako je potrebno.

#### 3.1.5. Postupak

U epruvetu s navojnim čepom zapremine 5 ml (3.1.3.1.) odvagati oko 0,1 g uzorka ulja. Dodati 2 ml heptana (3.1.2.2.) i promućkati. Dodati 0,2 ml rastvora kalijum hidroksida u metanolu (3.1.2.7.), zatvoriti čepom s PTFE spojem, čvrsto zatvoriti i jako mućkati 30 sekundi. Ostaviti da se slegne dok se gornja rstvor ne razbistri. Dekantirati gornji sloj koji sadrži metil estre. Heptanski ratsovr spreman je za injektovanje u gasni hromatograf. Preporučuje se čuvanje rastvora u hladnjaku do gasno-hromatografske analize. Ne preporučuje se čuvanje rastvora duže od 12 sati.

### DIO B.

#### ANALIZA METIL ESTARA MASNIH KISELINAGASNOM HROMATOGRAFIJOM

##### 1. UVOD

U ovom se dijelu daju opšte smjernice za primjenu kapilarne gasne hromatografije radi utvrđivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava smjese metilmetil estera masnih kiselina dobijenih u skladu s metodom utvrđenom u dijelu A.

Ovaj se dio ne primjenjuje na polimerizovane masne kiseline.

##### 2. REAGENSI

###### 2.1. Noseći gas

Inertni gas (helijum ili vodonik), temeljito osušen, sa sadržajem kiseonika manjim od 10 mg/kg.

Vodonikom se može udvostručiti brzina analize, ali opasanje. Dostupni su sigurnosni uređaji.

###### 2.2. Pomoćni gasovi

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

2.2.2. Vazduh ili kiseonik, bez organskih nečistoća.

2.2.3. Azot (čistoće  $> 99\%$ ).

###### 2.3. Referentni standard

Smjesa metilmetil estara čistih masnih kiselina ili metilmetil estara masti poznatog sastava, po mogućnosti nalik onoj masne supstance koja se analizira. Cis-izomeri i trans-izomeri oktadecenoičnih, oktadekadienoičnih i oktadekatrienoičnih metilmetil estara korisni su za identifikaciju trans-izomera nezasićenih kiselina.

Posebnu pažnju potrebno je posvetiti sprečavanju oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina.

##### 3. OPREMA

Navedena uputstva odnose se na uobičajenu opremu koja se upotrebljava za gasnu hromatografiju, uključujući kapilarne kolone i plamenojonizujućiplamenoionizaconi detektor.

### 3.1. **Gasni hromatograf**

Gasni hromatograf treba da sadrži sljedeće elemente.

#### 3.1.1. *Sastav za injektiranje*

Upotrijebiti sastav za injektiranje s kapilarnim kolonama, u kojem slučaju sistem za injektiranje treba biti izrađen posebno za upotrebu s takvim kolonama. Po vrsti injektor može biti s dijeljenjem uzorka ili bez dijeljenja uzorka u koloni.

#### 3.1.2. *Peć*

Peć je u stanju zagrijati kapilarnu kolonu na temperaturu od najmanje 260 °C i održavati željenu temperaturu unutar 0,1 °C. Ovaj posljednji zahtjev posebno je važan kad se upotrebljava kvarcna cijev.

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

#### 3.1.3. *Kapilarna kolona*

3.1.3.1. Cijev, izrađena od materijala koji je inertan u odnosu prema supstance koja će se analizirati (uobičajeno, staklo ili kvarc). Unutrašnji promjer je između 0,20 i 0,32 mm. Unutrašnja površinu obrađuje se na odgovarajući način (na primjer pripremanje površine, deaktiviranje) prije nanošenja premaza stacionarne faze. Za masne kiseline i cis- i trans-izomere masnih kiselina dosvoljna je dužina od 60 m.

3.1.3.2. Prikadne su i vezane odnosno umrežene stacionarne faze tipa polarni polisiloksan (cijanosilikoni).

: Postoji opasnost od mogućnosti da polarni polisiloksani prouzrokuju poteškoće pri identifikovanju i odvajanju linolenske kiseline i C<sub>20</sub> kiselina.

Premazi su tanki, odnosno, od 0,1 do 0,2 µm.

#### 3.1.3.3. Sastavljanje i kondicioniranje kolone

Uvažavati normalne mjere predostrožnosti pri sastavljanju kapilarnih kolona, odnosno namještanje kolone u peći (nosioc). Izbor i sastavljanje priključaka (čvrsto zaptiveni da ne bi došlo do curenja), pozicioniranje krajeva kolone u injektoru i na detektoru (smanjivanje slobodne(neiskorištene) zapremine). Kolonu staviti pod struju nosećeg gasa (na primjer 0,3 bar (30 kPa) za kolonu dužine 25 m i unutrašnjeg prečnika 0,3 mm).

Kolonu kondicionirati temperaturnim programiranjem peći na 3 °C/min od temperature okoline na temperaturu koja je 10 °C niža od granične temperature raspadanja stacionarne faze. Održavati ovu temperaturu peći jedan sat, dok se bazna linija ne stabilizuje. Vratiti je na 180 °C da bi radila u izotermnim uslovima.

Odgovarajuće unaprijed kondicionirane kolone dostupne su u slobodnoj trgovini.

#### 3.1.4. *Plameno-jonizacioni detektor i pretvarač s pojačalom*

### 3.2. **Špric**

Špric ima maksimalni zapreminu 10 µl i građirana je s podjelom po 0,1 µl.

### 3.3. **Sastav prikupljanja podataka**

Sastav prikupljanja podataka internetski povezan s detektorima i u kojem se upotrebljava računarski program prikladan za integraciju i normalizaciju pika.

## 4. POSTUPAK

Aktivnosti opisane u tačkama od 4.1. do 4.3. ove tačke odnose se na upotrebu plameno-jonizacionog detektora.

### 4.1. **Uslovi ispitivanja**

#### 4.1.1. *Izbor optimalnih radnih uslova za kapilarne kolone*

Zbog efikasnosti i propusnosti kapilarne kolone odvajnje sastojaka i trajanje analize uvelikom zavise od brzine protoka nosećeg gasa kroz kolonu. Stoga je potrebno optimizovati radne uslove djelovanjem na ovaj

parametar (ili, jednostavnije, na glavni gubitak kolone), zavisno od toga želi li se poboljšati razdvajanje ili ubrzati analiza.

Sljedeći su se uslovi pokazali prikladni za razdvajanje FAME-ova (C<sub>4</sub> do C<sub>26</sub>). Primjeri hromatograma prikazani su u Dodatku B:

|                         |                                         |
|-------------------------|-----------------------------------------|
| Temperatura injektora:  | 250 °C                                  |
| Temperatura detektora:  | 250 °C                                  |
| Temperatura peći:       | 165 °C (8 min) do 210 °C na<br>2 °C/min |
| Noseći gas vodonik:     | pritisak na vrhu kolone, 179<br>kPa     |
| Ukupni protok:          | 154,0 ml/min                            |
| Promjer razdvajanja:    | 1:100                                   |
|                         | 1                                       |
| Zapremina injektiranja: | μl                                      |

#### 4.1.2. Određivanje rezolucije (vidi Dodatak A)

Izračunati rezoluciju R dva susjedna pika I i II  
upotrebljavajući sljedeću formulu:

$$R = 2 \times ((d_{r(II)} - d_{r(I)}) / (\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ or } R = 2 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)}) / (\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ (USP) (engl. United States Pharmacopeia),}$$

ili

$$R = 1,18 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)}) / (\omega_{0,5(I)} + \omega_{0,5(II)})) \text{ (EP, BP, JP, DAB) (JP (engl. Japanese Pharmacopeia), EP (fr. Pharmacopée Européenne), BP (engl. British Pharmacopeia))}$$

pri čemu je:

$d_{r(I)}$  retenciona udaljenost pika I;

$d_{r(II)}$  retenciona udaljenost pika II;

$t_{r(I)}$  retenciono vrijeme pika I;

$t_{r(II)}$  retenciono vrijeme pika II;

$\omega_{(I)}$  širina baze pika I;

$\omega_{(II)}$  širina baze pika II;

$\omega_{0,5}$  širina pika određenog jedinjenja, na srednjoj visini pika;

Ako je  $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$ , izračunati R upotrebljavajući sljedeće formule:

$$R = (d_{r(II)} - d_{r(I)}) / \omega = (d_{r(II)} - d_{r(I)}) / 4\sigma$$

pri čemu je:

$\sigma$  standardno odstupanje (vidi Dodatak A, sliku 1.).

Ako je udaljenost između dva pika  $d_{r(II)} - d_{r(I)}$  jednaka  $4\sigma$ , faktor rezolucije  $R = 1$ .

Ako dva pika nisu u potpunosti razdvojena, tangente na tačkama infleksije dva pika ukrštaju se u tački C. Radi potpunog razdvajanja dva pika udaljenost između dva pika mora biti jednaka:

$$d_{r(II)} - d_{r(I)} = 6\sigma \text{ iz čega je } R = 1,5 \text{ (vidi Dodatak A, sliku 3.)}$$

#### 4. IZRAŽAVANJE REZULTATA

##### 5.1 Kvalitativna analiza

Identifikovati pikove metil estra za uzorak iz hromatograma u Dodatku B., slici 1., ako je potrebno interpolacijom ili njihovim upoređivanjem s referentnim mješavinama smješa metil estera (kako je navedeno u tački 2.3.).

##### 5.2. Kvantitativna analiza

###### 5.2.1. Određivanje sastava

Izračunati odnose mase  $w_i$  pojedinačnih metil estera masnih kiselina, izražavanje kao maseni udio metil estara, kako slijedi:

###### 5.2.2. Metoda izračunavanja

###### 5.2.2.1. Opšti slučaj

Izračunati sadržaj datog sastojka  $i$ , izražen kao maseni udio metil estara, određivanjem postotka koji predstavlja površina odgovarajućeg pika u odnosu na zbir površina svih pikova, upotrebljavajući sljedeću formulu:

metilmetilmetilmetil

$$w_i = (A_i / \Sigma A) \times 100$$

pri čemu je:

$A_i$  površina ispod pika pojedinačnih metil estara masnih kiselina  $i$ ;

$\Sigma A$  zbir površina pod svim pikovima svih pojedinačnih metil estara masnih kiselina.

Rezultati se iskazuju sa dva decimalna broja.

*Napomena 4.:* Za masti i ulja odnos mase metil estara masnih kiselina jednak je odnosu mase triacilglicerola u gramima na 100 g. U slučajevima u kojima ova pretpostavka nije dopuštena, postupiti u skladu sa potačkom 5.2.2.2 ove tačke.

###### 5.2.2.2. Upotreba Korekcionih faktora

U određenim slučajevima, na primjer kad su prisutne masne kiseline sa manje od osam atoma ugljenika ili kiseline sa sekundarnim grupama, vrše se korekcije površine s pomoću specifičnih Korekcionih faktora ( $F_{ci}$ ). Ti se faktori određuju za svaki pojedinačni instrument. U tu se svrhu upotrebljavaju prikladni referentni materijali čiji je sastav masnih kiselina odgovarajućeg raspona.

*Napomena 5.:* Ti Korekциони faktori nisu identični teoretskim Korekcionim faktorima FID-a koji su navedeni u Dodatku A s obzirom na to da uključuju i radnu efikasnost sastava za injektiranje itd. Međutim, u slučaju većih razlika treba provjeriti radnu efikasnost cijelog sastava.

Za ovu referentnu smjesu maseni udio FAME  $i$  zadat je sljedećom formulom:

$$w_i = (m_i / \Sigma m) \times 100$$

pri čemu je:

$m_i$  masa FAME  $i$  u referentnoj smjesi;

$\Sigma m$  zbir masa raznih sastojaka kao FAME-ovi referentne smjese.

Iz hromatograma referentne smjese izračunati procenat po površini za FAME *i* kako slijedi:

$$w_i = (A_i / \Sigma A) \times 100$$

pri čemu je:

$A_i$  površina FAME *i* u referentnoj smjesi;

$\Sigma A$  zbir svih površina svih FAME-ova referentne smjese.

Korekcionni faktor  $F_c$  tada je

$$F_c = (m_i \times \Sigma A) / (A_i \times \Sigma m)$$

Za uzorak maseni udio svakog FAME *i* je:

$$w_i = (F_i \times A_i) / \Sigma (F_i \times A_i)$$

Rezultati se iskazuje s dva decimalna broja.

*Napomena 6.:* Izračunata vrijednost odgovara masenom udjelu pojedinačnih masnih kiselina izračunatih kao triacilgliceroli na 100 g masti.

#### 5.2.2.3. Upotreba internog standarda

U nekim analizama (na primjer gdje nisu sve masne kiseline kvantifikovane, kao kad su prisutne kiseline sa četiri i šest ugljenika zajedno s kiselinama sa 16 i 18 ugljenika, ili kad je potrebno odrediti apsolutnu količinu masnih kiselina u nekom uzorku) potrebno je upotrebljavati interni standard. Često se upotrebljavaju masne kiseline s 5, 15 ili 17 ugljika. Potrebno je odrediti korekcionni faktor (ako postoji) za interni standard.

Maseni udio sastojka *i*, iskazan kao metil estri, dat je formulom:

$$w_i = (m_{IS} \times F_i \times A_i) / (m \times F_{IS} \times A_{IS})$$

pri čemu je:

$A_i$  je površina FAME *i*;

$A_{IS}$  je površina internog standarda;

$F_i$  je Korekcionni faktor masne kiseline *i*, iskazan kao FAME;

$F_{IS}$  je Korekcionni faktor internog standarda;

*m* je masa uzorka za ispitivanje u miligramima;

$m_{IS}$  je masa internog standarda u miligramima.

Rezultati se iskazuje sa dva decimalna broja.

## 6. IZVJEŠTAJ O ISPITIVANJU

U izvještaju o ispitivanju navode se metode upotrijebljene za pripremu metil estara i za gasnu hromatografsku analizu. Sadrži i sve pojedinosti djelovanja koje nisu navedene u ovoj standardnoj metodi ili se smatraju opcionalnim zajedno s pojedinostima o bilo kom događaju koji je mogao uticati na rezultate.

Izvješt o ispitivanju uključuje sve informacije potrebne za potpunu identifikaciju uzorka.

## 7. PRECIZNOST

### 7.1. Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja

Vrijednosti izvedene iz ovog međulaboratorijskog ispitivanja možda neće biti primjenjive na raspone koncentracija i matrice koji se razlikuju od zadatih.

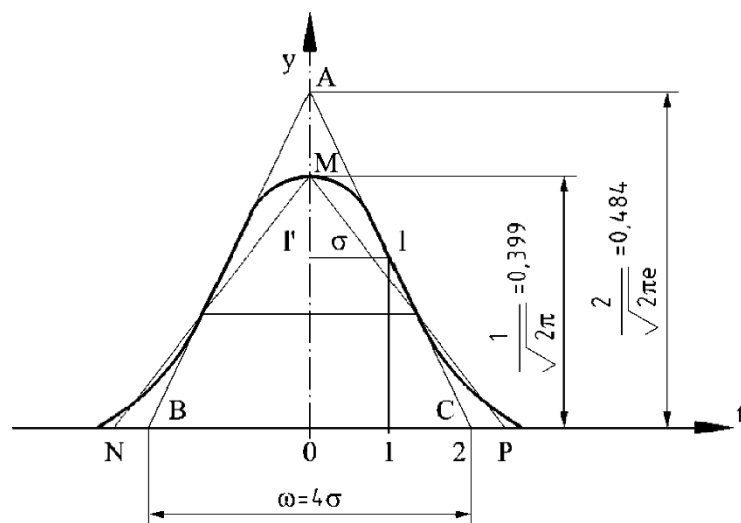
### 7.2. Ponovljivost

Apsolutna razlika između rezultata dva nezavisna pojedinačna ispitivanja koje je primjenom iste metode na jednakom ispitnom materijalu u istoj laboratoriji u kratkom vremenskom intervalu izvršio isti analitičar upotrebljavajući istu opremu ne smije u više od 5 % slučajeva prelaziti uobičajene norme.

### 7.3. Obnovljivost

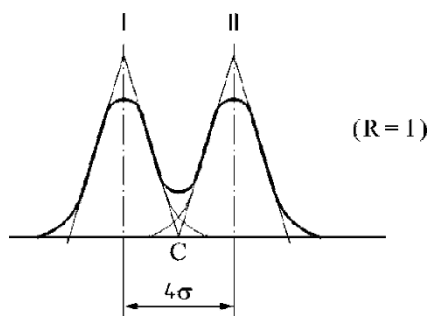
Apsolutna razlika između rezultata dva nezavisna pojedinačna ispitivanja koja su primjenom iste metode na jednakom ispitnom materijalu u različitim laboratorijima izvršili različiti analitičari upotrebljavajući različitu opremu ne smije u više od 5 % slučajeva prelaziti uobičajene norme.

Slika 1.

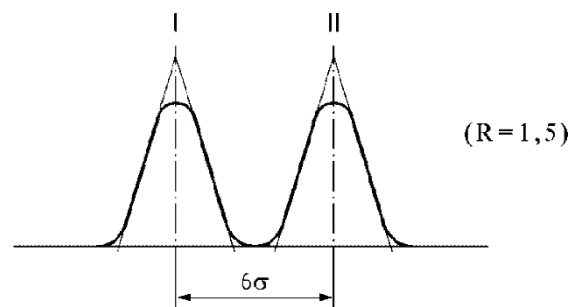


$\omega_{0,5}$  širinom na pola visine trougla ( $ABC$ ) i b širinom na pola visine trougla ( $NPM$ ).

Slika 2.

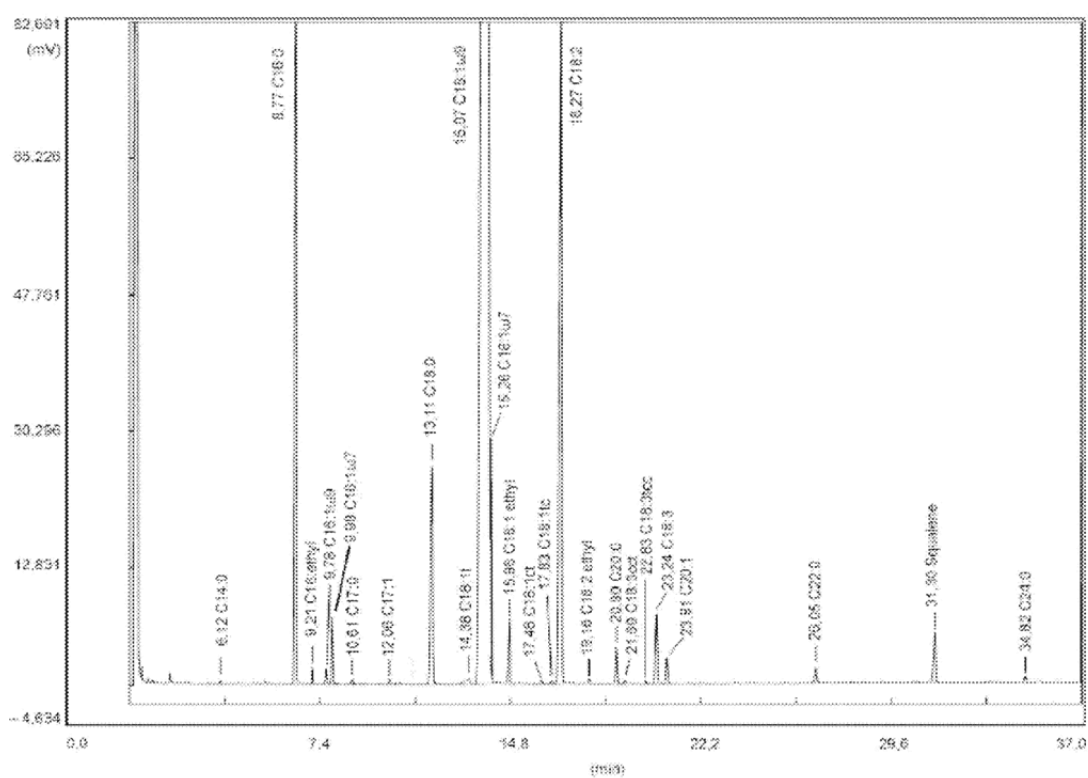


Slika 3.



Slika 1.

Gani-hromatografski profil dobijen metodom hladne metilacije iz ulja komine maslina



Hromatografski pikovi odgovaraju metil i etil estrima, osim ako nije drugačije drugačije navedeno.

## METODA ZA ODREĐIVANJE STIGMASTADIENA UBIJNIM ULJIMA

### 1. CILJ

Određivanje stigmastadiena u biljnim uljima koja sadrže niske koncentracije tih ugljikovodika, posebno u djevičanskom maslinovom ulju i sirovom ulju komine maslina.

### 2. UVOD

Taj se standard može primijeniti na sva biljna ulja, iako su mjerenja pouzdana samo u slučaju kada sadržaj tih ugljikovodika iznosi od 0,01 do 4,0 mg/kg. Ta je metoda posebno primjerena za otkrivanje prisutnosti rafiniranih biljnih ulja (maslinovog, ulja komine maslina, suncokretovog, palminog itd.) u djevičanskom maslinovom ulju budući da rafinirana ulja sadrže stigmastadiene, za razliku od djevičanskih ulja.

### 3. PRINCIP

Izdvajanje neosapunjive komponente. Razdvajanje frakcije steroidnih ugljikovodika hromatografijom na koloni sa silika gelom i analiza kapilarnom gasnom hromatografijom.

### 4. OPREMA

- 4.1. Tikvica zapremine 250 ml za upotrebu s povratnim hladnjakom.
- 4.2. Lijevci za razdvajanje zapremine 500 ml.
- 4.3. Tikvica okruglog dna zapremine 100 ml.
- 4.4. Vakum uparicač
- 4.5. Staklena hromatografska kolona (unutrašnjeg prečnika 1,5 do 2,0 cm i dužine 50 cm) s teflonskim ventilom i zatvaračem od staklene vune ili pločicom od sinter-stakla na dnu. Za pripremu kolone sa silika gelom u hromatografsku kolonu treba usuti heksan do nivoa od 5 cm od dna te napuniti emulzijom silikagela u heksanu (15 g u 40 ml) uz pomoć dodatka heksana. Pričekati da se staloži te primjenom laganih vibracija dovršiti taloženje. Dodati bezvodni natrijum sulfat do nivoa od približno 0,5 cm i konačno eluirati višak heksana.
- 4.6. Gasni hromatograf s plamenojonizujućim detektorom, injektor s dijeljenjem uzorka ili injektorom koji omogućava direktno ubrizgavanje na početak (hladne) kolone (*cold on-column*) i peći s mogućnošću podešavanja temperature na  $\pm 1$  °C.  
supstance Razdvajanje plamenojonizujućim
- 4.7. Kvarcna kapilarna kolona za gasnu hromatografiju (unutrašnjeg prečnika 0,25 ili 0,35 mm i dužine 25 m) obložena s 5 %-tnom fenilmetilsilikonskom fazom debljine sloja od 0,25 mm.

#### *Napomena 1.:*

Mogu se upotrijebiti i druge kolone slične ili niže polarnosti.

- 4.8. Snimač-integrator s mogućnošću uporabe integracijskoga načina dolina-dolina (*valley-valley*).
- 4.9. Mirkošpic od 5 do 10 ml za gasnu hromatografiju s neodvojivom iglom.
- 4.10. Električni pokrivač ili grijaća ploča.

## 5. REAGENSI

Svi reagensi trebaju biti analitičkog kvaliteta, osim ako je drugačije određeno. Voda koja se koristi treba biti destilovana ili barem jednake čistoće.

- 5.1. Heksan ili smješa alkana intervala vrelišta od 65 do 70 °C, destilovani sa kolonom za ispravljanje.

*Napomena 2.:*

Rastvor se mora destilovati i kako bi se odstranile nečistoće.

5.3. 96 %-tni v/v etanol.

### 5.4. Bezvodni natrijum sulfat

- 5.4. 10 %-tni alkoholni rastvor kalijum hidroksida. Dodati 10 ml vode u 50 g kalijum hidroksida, promiješati, a zatim tu smještu rastvoriti u etanolu tako da ukupna zapremina bude 500 ml.

*Napomena 3.:*

Alkoholni rastvor kalijum hidroksida stajanjem posmeđi. Treba se svakodnevno pripremati ponovo i treba ga čuvati u dobro zatvorenim bocama od tamnog stakla.

- 5.5. Silika-gel 60 za hromatografiju na koloni, 70 do 230 mesh, (Merck, referenca 7734 ili slično).

*Napomena 4.:*

Silika-gel se obično može direktno upotrebljavati bez ikakve obrade. Međutim, određene serije silika-gela mogu imati nisku aktivnost, te time uzrokovati slabije hromatografsko razdvajanje. U tim uslovima silika-gel treba obraditi na sledeći način: aktivirati silika-gel zagrijavanjem na 550 °C najmanje četiri sata. Nakon zagrijavanja staviti silika-gel u eksikator dok se hladi, a zatim ga premjestiti u začepljenu tikvicu. Dodati 2 % vode i promućkati smještu sve dok u njoj više nema vidljivih grudvica i ona postane rastresita.

U slučaju da serije silika-gela uzrokuju hromatograme s pikovima koji se preklapaju, silika-gel treba obraditi na gore navedeni način. Alternativa bi mogla biti upotreba ekstra čistog silika-gela 60 (Merck, referenca 7754).

5.6. Osnovni rastvor (200 ppm) holesta-3,5-diena (Sigma, 99 %-tne čistoće) u heksanu (10 mg u 50 ml).

- 5.7. Standardni rastvor holesta-3,5-diena u heksanu koncentracije 20 ppm, dobijen razblaživanjem gore navedenog rastvora.

*Napomena 5.:*

Rastvori pod 5.6 i 5.7. stabilni su najmanje četiri meseca ako se čuvaju na temperaturi nižoj od 4 °C.

5.8. Rastvor n-nonakozana u heksanu približne koncentracije 100 ppm.

5.9. Noseći gas za hromatografiju: helijum ili vodonik 99,9990 %-tne čistoće.

- 5.10. Pomoćni gasovi za plamenojonizujućiplamenojonizujuć detektor: vodonik 99,9990 %-tne čistoće i prečišćeni vazduh.

## 6. POSTUPAK

### 6.1. Priprema neosapunjive tvari

- 6.1.1. Izvagati  $20 \pm 0,1$  g ulja u tikvicu od 250 ml (4.1.), dodati 1 ml standardnog rastvora kolesta-3,5-diena (20  $\mu$ g) i 75 ml alkoholnog rastvora kalijum hidroksida koncentracije 10 %, postaviti na povratno hladilo i zagrijati na lagano vrenje 30 minuta. Odvojiti tikvicu s uzorkom od izvora toplote i pustiti rastvor da se lagano ohladi (ne smije se potpuno ohladiti jer će se uzorak staložiti). Dodati 100 ml vode i rastvor uz pomoć 100 ml heksana prelići u lijevak za razdvajanje (4.2.). Smjesu snažno mućkatimućkati 30 sekundi i ostaviti da se odvoji.

#### *Napomena 6.:*

Ako se pojavi emulzija koja brzo ne nestane, dodati malu količinu etanola.

- 6.1.2. Premjestiti donju vodenu fazu u drugi lijevak za odjeljivanje i opet je ekstrahovati s 100 ml heksana. Vodenu fazu još jednom odliti i tri puta isprati heksanske ekstrakte (pomiješane u još jednom lijevku za odjeljivanje), svaki put sa 100 ml smješe vode i etanola (1:1), dok se ne postigne neutralni pH faktor.

#### 6.1.3.

Heksanski rastvor prelići preko bezvodnog natrijum sulfata (50 g), isprati s 20 ml heksana i heksan upariti na vakuum uparivaču na 30 °C pod sniženim pritiskom dok se ne osuši.

### 6.2. Razdvajanje frakcije steroidnih ugljovodonika

- 6.2.1. Taj talog prenijeti na kolonu za frakcije dodavanjem dva puta po 1 ml heksana, pustiti da se nivo rastvora spusti na vrh natrijum sulfata kako bi se dobio uzorak na koloni te započeti hromatografsku eluciju s heksanom protoka od približno 1 ml/min. Zanimariti prvih 25 do 30 ml eluata i zatim skupiti sljedećih 40 ml frakcije. Nakon prikupljanja frakciju premjestiti u tikvicu okruglog dna zapremine 100 ml (4.3.).

#### *Napomena 7.:*

Prva frakcija sadrži zasićene ugljovodonike (slika 1 a), a druga frakcija steroidne ugljovodonike. Daljom elucijom dobijaju se skvalen i skvalenu srodna jedinjenja. Kako bi se postiglo dobro razdvajanje zasićenih od steroidnih ugljovodonika potrebna je optimizacija frakcijskih zapremina. Radi toga, zapremina prve frakcije treba biti tako podešen da pri analizi druge frakcije pikovi koji predstavljaju zasićene ugljovodonika budu niski (pogledati sliku 1 c); ako se ne pojave, ali intenzitet standardnog pika bude nizak, zapreminu treba smanjiti. Uostalom, potpuno razdvajanje sastojaka prve i druge frakcije nije potrebno; budući da se pikovi u analizi gasnom hromatografijom ne preklapaju ako se uslovi gasne hromatografije prilagode kako je navedeno pod 6.3.1. Optimiziranje zapremina druge frakcije uopšteno nije potrebno budući da postoji dobro razdvajanje kod daljnjih sastojaka. Ipak, prisutnost velikog pika s otprilike 1,5 minuta kraćim retencionim vremenom od standardnog, nastaje zbog skvalena i ukazuje na loše razdvajanje.

#### 6.2.2.

Ispariti drugu frakciju u vakuum uparivaču na 30 °C pod sniženim pritiskom dok se ne osuši te nastali talog odmah rastopiti u 0,2 ml heksana. Rastvor do analize čuvati u frižideru.

Talozi pod 6.1.3. i 6.2.2. ne smiju se čuvati u suvom stanju niti na sobnoj temperaturi. Čim se dobiju treba im dodati rastvor, a taj rastvor treba čuvati u frižideru.

### 6.3. Gasna hromatografija

- 6.3.1. Radni uslovi za injektovanje s razdvajanjem:

— temperatura injektora: 300 °C,

- temperatura detektora: 320 °C,
- snimač-integrator: parametri integracije trebaju biti namješteni tako da omogućuju tačnu procjenu područja. Preporučuje se integracijski način dolina-dolina (*valley-valley*),
- osjetljivost: otprilike 16 puta veća od najmanje atenuacije,
- količina ubrizganog rastvora: 1 µl,
- podešavanje temperature peći: početno šest minuta na 235 °C, a zatim temperatura raste za 2 °C/min do 285 °C,
- injektor s razdvojnikom protoka 1: 15,
- noseći gas: helijum ili vodonik pri pritisku od 120 kPa.

Ti se uslovi mogu prilagoditi u skladu s karakteristikama hromatografa i kolone da bi se dobili hromatogrami koji udovoljavaju sljedećim zahtjevima: pik unutarnjeg standarda mora se pojaviti u roku od 5 minuta od vremena koje je navedeno pod 6.3.2.; pik unutrašnjeg standarda treba dosežati barem 80 % punog raspona.

Sastav gasne hromatografije mora se provjeriti ubrizgavanjem smjese početnog rastvora holestadiena i (5.6.) i n-nonakozana (5.8.). Pik holesta-3,5-diena treba da se pojavi prije pika n-nonakozana (slika 1 c); u slučaju da se to ne dogodi, mogu se preduzeti dvije mjere: sniziti temperaturu peći i/ili upotrijebiti kolonu niže polarnosti.

#### 6.3.2. Identifikovanje pikova

Pik unutrašnjeg standarda pojavljuje se nakon približno 19 minuta, dok je relativno retenciono vrijeme 3,5-stigmastadiena 1,29 (vidjeti sliku 1 b). 3,5-stigmastadien pojavljuje se s malim količinama svog izomera te obično zajedno eluiraju kao jedan hromatografski pik. Međutim, ako je kolona previše polarna ili ima visoku rezoluciju, izomer se može pojaviti kao mali pik ispred i blizu pika 3,5-stigmastadiena (slika 2). Da bi se osigurala elucija stigmastadiena kao jednog pika, preporučuje se zamijeniti kolonu manje polarnom ili kolonom s većim unutrašnjim razmjerom.

#### Napomena 9.:

Stigmastadieni za referencu mogu se dobiti analizom rafinisanog biljnog ulja uz upotrebu manje količine uzorka (1 do 2 g). Stigmastadieni stvaraju istaknut i lako uočljiv pik.

#### 6.3.3. Kvantitativna analiza

Sadržaj se stigmastadiena određuje na temelju formule:

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

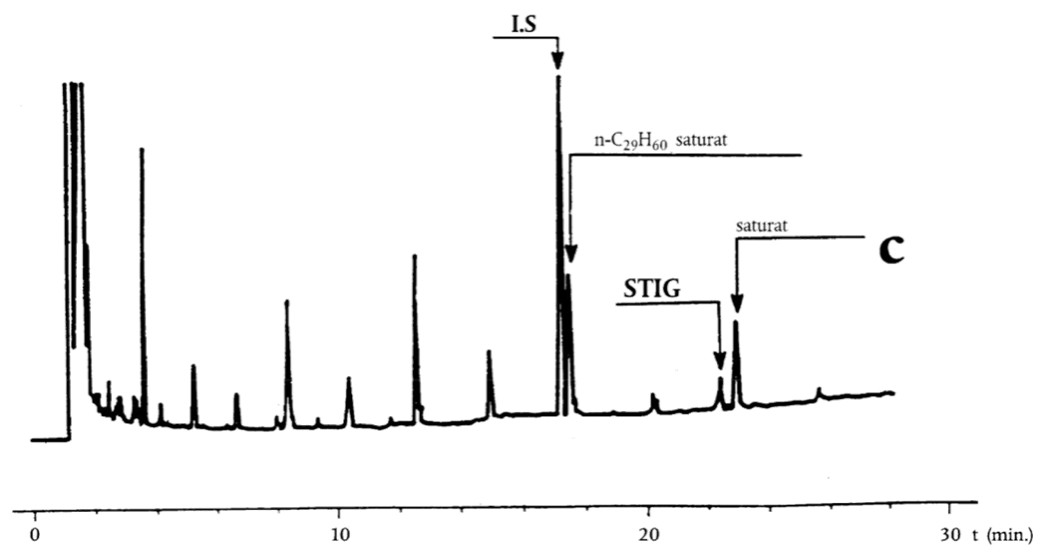
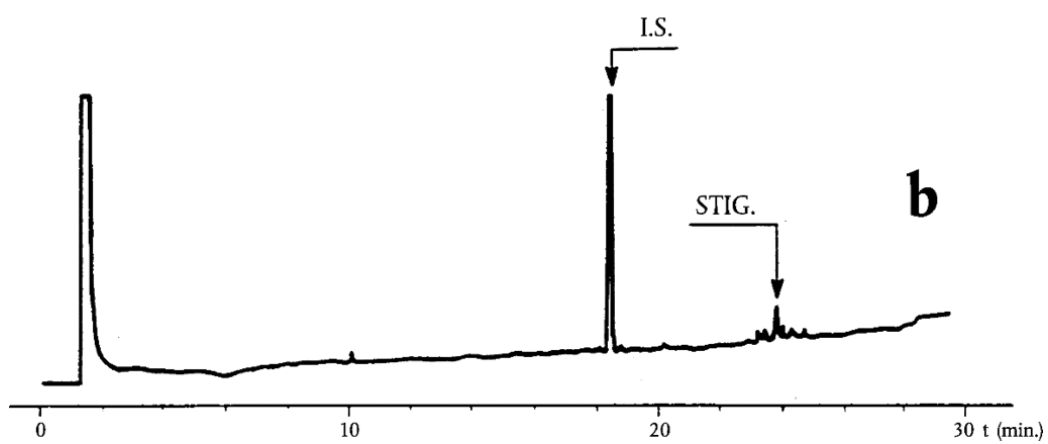
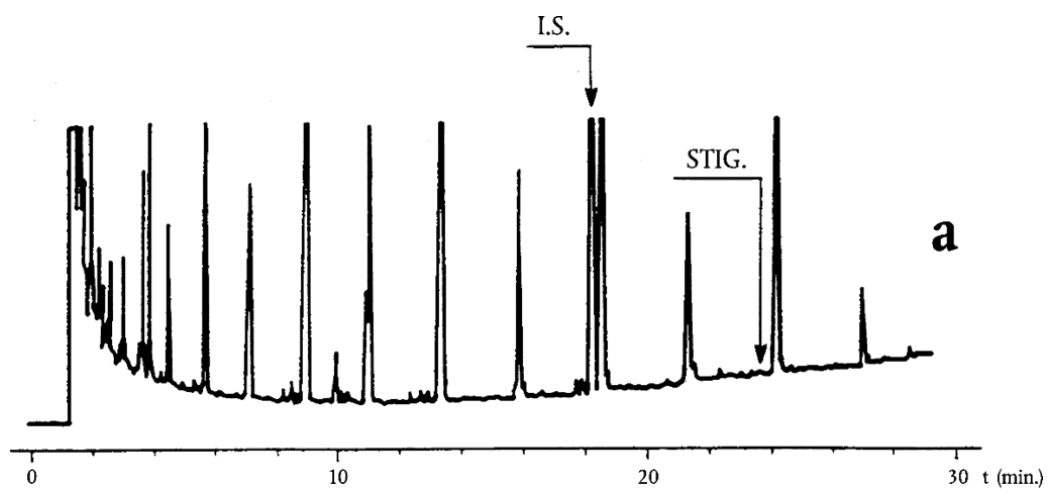
gdje je:

$A_s$  = područje stigmastadienskoga pika (ako se pik razdvoji na dva izomera, ZbirZbir područja oba vrha),

$A_c$  = područje unutrašnjeg standarda (holestadien),

$M_c$  = masa dodatnog standarda u mikrogramima,  
 $M_o$  = masa korištenog ulja u gramima.

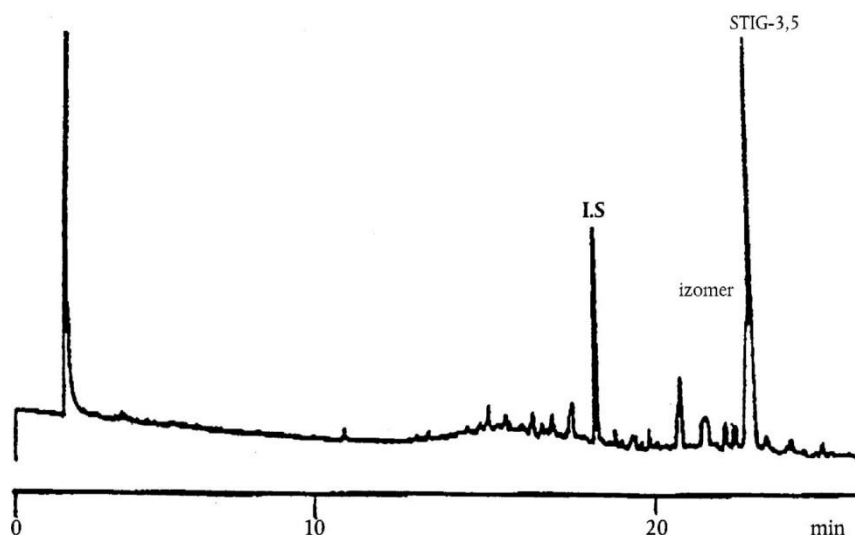
Granica detekcije: približno 0,01 mg/kg.



### Slika 1

Gasni hromatogrami dobijeni analizom uzoraka maslinovog ulja na kvarcnoj kapilarnoj koloni (unutarnjeg promjera 0,25 mm i dužine 25 m) obloženoj s 5 %-tnom fenilmetilsilikonskom fazom debljine sloja od 0,25 mm.

- (a) Prva frakcija (30 ml) djevičanskog ulja sa dodatkom standarda.
- (b) Druga frakcija (40 ml) maslinovog ulja koje sadrži 0,10 mg/kg stigmastadiena.
- (c) Druga frakcija (40 ml) koja sadrži mali postotak prve frakcije.



### Slika 2

Gasni hromatogram dobijen analizom uzoraka rafinisanog maslinovog ulja na stupcu DB-5 i koji pokazuje izomer 3,5-stigmastadiena.

## ODREĐIVANJE RAZLIKE IZMEĐU STVARNE I TEORETSKE KOLIČINE TRIACILGLICEROLA S ECN 42

### 1. UVOD

Određivanje apsolutne razlike između eksperimentalnih vrijednosti triacilglicerola (TAG) s ekvivalentnim ugljikovim brojem 42 (ECN42<sub>HPLC</sub>) dobijenog određivanjem u ulju, tečnom hromatografijom visokih performansi i teoretske vrijednosti TAG-a s ekvivalentnim ugljenikovim brojem 42 (ECN 42<sub>teoretski</sub>) izračunato na temelju sastava masnih kiselina.

### 2. PODRUČJE PRIMJENE

Ova norma se primjenjuje na maslinova ulja. Metoda se primjenjuje za dokazivanje prisustva malih količina sjemenskih ulja (bogatih linolnom kiselinom) u svim kategorijama maslinovih ulja.

### 3. PRINCIP

Udio triacilglicerola s ECN 42 određen HPLC metodom i teoretski udio triacilglicerola s ECN 42 (izračunan na temelju sastava masnih kiselina utvrđenog gasno-tečnom hromatografijom) podudaraju se unutar određenih granica za čista ulja. Razlika veća od vrijednosti utvrđenih za pojedine vrste ulja ukazuju na to da ulje sadrži sjemenska ulja.

### 4. METODA

Metoda izračunavanja teoretskog udjela triacilglicerola s ECN 42, te razlike između teoretskog udjela i rezultata dobijenih HPLC metodom, u osnovi predstavlja upoređivanje analitičkih podataka dobijenih pomoću drugih metoda. Mogu se razlikovati tri faze: određivanje sastava masnih kiselina kapilarnom gasnom hromatografijom, 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, 250 i 500 ml.

4.1.2. Laboratorijske čaše, 100 ml.

4.1.3. Staklena hromatografska kolona unutrašnjeg razmjera 21 mm, dužine 450 mm, s pipkom i normiranim konusnim nastavkom (s unutarnje strane) pri vrhu.

4.1.4. Lijeenci za odjeljivanje od 250 ml, s normiranim konusnim nastavkom (s vanjske strane) na dnu, prikladni za spajanje na vrh kolone.

4.1.5. Stakleni štapić dužine 600 mm.

4.1.6. Stakleni lijevak razmjera 80 mm.

4.1.7. Odmjerne tikvice od 50 ml.

4.1.8. Odmjerne tikvice od 20 ml.

4.1.9. Rotirajući uparivač.

4.1.10. Tečni homatograf visokih performansikoji omogućuje termo- statsku kontrolu temperature kolone.

4.1.11. Jedinica za injektiranje 10 µl.

4.1.12. Detektor: diferencijalni refraktometar. Osjetljivost na punoj skali treba da bude najmanje  $10^{-4}$  jedinica indeksa refrakcije.

4.1.13. Kolona: cijev od nerđajućeg čelika dužine 250 mm i unutrašnjeg promjera 4,5 mm, napunjen zrcima silika gela razmjera 5  $\mu$ m s 22 do 23 % ugljenika u obliku oktadecilsilana.

4.1.14. Softver za obradu podataka.

4.1.15. Posude od oko 2 ml, s teflonskim zatvaračima i čepovima s navojem.

## 4.2. Reagensi

Reagensi moraju biti analitičke čistoće. Rastvori za eluiranje moraju biti takvi da se mogu nekoliko puta reciklirati, a da to ne utiče na odvajanja, i iz njih moraju biti odstranjeni svi gasovi.

4.2.1. Petroleter 40 do 60 °C za hromatografiju ili heksan.

4.2.2. Svježe destilovan etil etar bez peroksida.

4.2.3. Rastvor za eluiranje za čišćenje ulja kolonskom hromatografijom, smjesa petroletera/etil etera 87/13 (v/v).

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

4.2.5. Staklena vuna.

4.2.6. Aceton za HPLC.

4.2.7. Acetonitril ili propionitril za HPLC.

4.2.8. Rastvor za eluiranje za HPLC: acetonitril + aceton (promjere treba prilagoditi tako da se postigne željeni stepen razdvajanja; započinje se sa smjesom 50:50) ili propionitril.

4.2.9. Rastvor za rastapanje: aceton.

4.2.10. Referentni trigliceridi: mogu se koristiti trigliceridi dostupni na tržištu (tripalmitin, triolein itd.) u kom slučaju se vremena zadržavanja bilježe u skladu s ekvivalentnim ugljenikovim brojem ili se pak mogu koristiti referentni hromatogrami dobijeni iz sojinog ulja, smjese sojina i masliovog ulja u promjeru 30:70 te čistog maslinovog ulja (vidjeti napomene 1. i 2. i slike 1. do 4.).

4.2.11. 6-mililitarska kolona za ekstrakciju na čvrstoj fazi, s fazom 1 g silika gela.

## 4.3. Priprema uzoraka

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

### 4.3.1. Priprema hromatografske kolone

Napuniti kolonu (4.1.3.) s oko 30 ml rastvora za eluiranje (4.2.3.), a zatim u kolonu unijeti malo staklene vune (4.2.5.) gurajući je do dna kolone staklenim štapićem (4.1.5.).

U laboratorijskoj čaši od 100 ml pripremiti suspenziju 25 g silika gela (4.2.4.) u 80 ml eluacijske mješavine (4.2.3.) te je prebaciti u kolonu pomoću staklenog lijevka (4.1.6.).

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

Otvaranjem pipka pri dnu kolone, rastvor se ispusti do visine od 1 cm iznad površine silika gela.

### 4.3.2. Hromatografija na koloni

S tačnošću od 0,001 g odvatti  $2,5 \pm 0,1$  g prethodno filtriranog, homogenizovanog i osušenog ulja, ako je potrebno, u odmjernu tikvicu zapremine 50 ml (4.1.7.).

Rastvoriti u oko 20 ml rstvora za eluiranje (4.2.3.). Ako je potrebno, lagano zagrijati da bi se lakše rastvorilo. Ohladiti na sobnu temperaturu i prilagoditi zapreminu rastvorom za eluiranje.

Pomoću volumetrijske pipete unijeti 20 ml rastvora u kolonu pripremljenu u skladu s 4.3.1., otvoriti pipak i pustiti da rastvor eluira do nivoa sloja silika gela.

Potom eluirati sa 150 ml rastvora za eluiranje (4.2.3.), prilagođavajući protok rastvora na oko 2 ml/min (za 150 ml treba 60 do 70 minuta da prođe kroz kolonu).

Eluat se skuplja u tikvicu okruglog dna zapremine 250 ml (4.1.1.) prethodno tariranu u peći i točno izvaganu. Rastvor se ukloni na rotirajućem vakuum uparivaču (4.1.9.) te zatim izvaže ostatak u tikvici koji će se koristiti za pripremu rastvora za HPLC analizu i za pripremu metil estera.

Udio sakupljenog uzorka iz kolone mora biti najmanje 90 % za kategorije ekstra djevičanskog, djevičanskog, običnog i rafinisanog maslinovog ulja te najmanje 80 % za maslinovo ulje lampante i ulje komine maslina.

#### 4.3.3. Čišćenje s ekstrakcijom na čvrstoj fazi

Kolona sa silika gelom za ekstrakciju na čvrstoj fazi aktivira se sa 6 ml heksana (4.2.3.) u vakuumu, izbjegavajući isušivanje.

S tačnošću od 0,0001 g izvagati 0,12 g u posudi od 2 ml (4.1.15.) i rastvoriti s 0,5 ml heksana (4.2.3.).

Rastvor unijeti u kolonu za ekstrakciju na čvrstoj fazi i eluirati s 10 ml heksana-dietil etera (87:13 v/v) (4.2.3.) pod vakuumom.

Sakupljena frakcija se u rotacijskom isparivaču (4.1.9.) upari do suvoće pod sniženim tlakom na sobnoj temperaturi. Ostatak se rastvori u 2 ml acetona (4.2.6.) za analizu triacilglicerola (TAG).

### 4.4. Analiza HPLC metodom

#### 4.4.1. Priprema uzoraka za hromatografiju

5 %-tni rastvor uzorka koji će se analizirati priprema se vaganjem 0,5

± 0,001 g uzorka u odmjernoj tikvici od 10 ml te nadopunjavanjem do 10 ml rastvora (4.2.9.).

#### 4.4.2. Postupak

Postaviti sastav za hromatografiju. Upumpati rastvor za eluiranje (4.2.8.) brzinom od 1,5 ml/min da bi se pročistio cijeli sastav. Pričekati dok se ne dobije stabilna bazna linija.

Injekovati 10 µl uzorka pripremljenog kao u tački 4.3.

#### 4.4.3. Izračunavanje i izražavanje rezultata

Koristiti metodu normalizacije površine, odnosno, pretpostavlja se da zbir površina pikova koji odgovaraju TAG-ovima od ECN42 do ECN52 iznosi 100 %.

Izračunati relativni postotak svakog triglicerida pomoću formule:

$$\text{triglicerida} \% = \frac{\text{površina pika}}{\sum \text{površina pikova}} \cdot 100$$
  
Rezultate treba izraziti s najmanje dva decimalna broja.

Vidjeti napomene 1. do 4.

### 4.5. Izračunavanje sastava triacilglicerola (Mol %) na osnovu podataka o sastavu masnih kiselina (% površina)

#### 4.5.1. Određivanje sastava masnih kiselina

Sastav masnih kiselina utvrđuje se u skladu s normom ISO 5508 pomoću kapilarne kolone. Metil esteri pripremaju se na temelju COI/ T.20/dok. br. 24.

#### 4.5.2. Masne kiseline koje se uzimaju u obzir za izračunavanje

Gliceridi se grupišu prema njihovom ekvivalentnom broju ugljenika (ECN), uzimajući u obzir sljedeće ekvivalentnosti između ECN-a i masnih kiselina. U obzir se uzimaju samo masne kiseline sa 16 i 18 atoma ugljenika jer su samo one bitne za maslinovo ulje. Masne kiseline bi trebalo normalizovati do 100 %.



$$\text{Mol \% NMK} \frac{1}{4} 100 - \text{Mol \% ZMK}$$

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

Masne kiseline raspoređene su u tri grupe kako slijedi: dvije istovjetne grupe za 1- i 3- položaj i jedna za 2- položaj, sa različitim koeficijentima za zasićene (P i S) i nezasićene masne kiseline (Po, O, L i Ln).

##### 4.5.5.1. Zasićene masne kiseline na 2-položaju [P(2) i S(2)] (4):

$$\text{Mol \% P}\delta 2\text{P} \frac{1}{4} \text{Mol \% P} \delta 1,2,3\text{P} \ddot{\alpha} 0,06$$

$$\text{Mol \% S}\delta 2\text{P} \frac{1}{4} \text{Mol \% S} \delta 1,2,3\text{P} \ddot{\alpha} 0,06$$

##### 4.5.5.2. Nezasićene masne kiseline na 2-položaju [Po(2), O(2), L(2) i Ln(2)] (5):

$$\text{Mol \% Po}\delta 2\text{P} \frac{1}{4} \frac{\text{Mol \% Po}\delta 1,2,3\text{P}}{\text{Mol \% NMK}} \ddot{\alpha} \delta 100 - \text{Mol \% P}\delta 2\text{P} - \text{Mol \% S}\delta 2\text{P}$$

$$\text{Mol \% O}\delta 2\text{P} \frac{1}{4} \frac{\text{Mol \% O}\delta 1,2,3\text{P}}{\text{Mol \% NMK}} \ddot{\alpha} \delta 100 - \text{Mol \% P}\delta 2\text{P} - \text{Mol \% S}\delta 2\text{P}$$

$$\text{Mol \% L}\delta 2\text{P} \frac{1}{4} \frac{\text{Mol \% L}\delta 1,2,3\text{P}}{\text{Mol \% NMK}} \ddot{\alpha} \delta 100 - \text{Mol \% P}\delta 2\text{P} - \text{Mol \% S}\delta 2\text{P}$$

$$\text{Mol \% Ln}\delta 2\text{P} \frac{1}{4} \frac{\text{Mol \% Ln}\delta 1,2,3\text{P}}{\text{Mol \% NMK}} \ddot{\alpha} \delta 100 - \text{Mol \% P}\delta 2\text{P} - \text{Mol \% S}\delta 2\text{P}$$

##### 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)] (6):

$$\text{Mol \% P}\delta 1,3\text{P} \frac{1}{4} \frac{\text{Mol \% P}\delta 1,2,3\text{P} - \text{Mol \% P}\delta 2\text{P}}{2} \text{p Mol \% P}\delta 1,2,3\text{P}$$

$$\text{Mol \% S}\delta 1,3\text{P} \frac{1}{4} \frac{\text{Mol \% S}\delta 1,2,3\text{P} - \text{Mol \% S}\delta 2\text{P}}{2} \text{p Mol \% S}\delta 1,2,3\text{P}$$

$$\text{Mol \% Po}\delta 1,3\text{P} \frac{1}{4} \frac{\text{Mol \% Po}\delta 1,2,3\text{P} - \text{Mol \% Po}\delta 2\text{P}}{2} \text{p Mol \% Po}\delta 1,2,3\text{P}$$

$$\text{Mol \% O}\delta 1,3\text{P} \frac{1}{4} \frac{\text{Mol \% O}\delta 1,2,3\text{P} - \text{Mol \% O}\delta 2\text{P}}{2} \text{p Mol \% O}\delta 1,2,3\text{P}$$

$$\text{Mol \% L}\delta 1,3\text{P} \frac{1}{4} \frac{\text{Mol \% L}\delta 1,2,3\text{P} - \text{Mol \% L}\delta 2\text{P}}{2} \text{p Mol \% L}\delta 1,2,3\text{P}$$

$$\text{Mol \% Ln}\delta 1,3\text{P} \frac{1}{4} \frac{\text{Mol \% Ln}\delta 1,2,3\text{P} - \text{Mol \% Ln}\delta 2\text{P}}{2} \text{p Mol \% Ln}\delta 1,2,3\text{P}$$

#### 4.5.6. *Izračunavanje triacilglicerola*

##### 4.5.6.1. TAG sa jednom masnom kiselinom (AAA, ovdje LLL, PoPoPo) (7)

$$\text{Mol \% AAA} \frac{1}{4} \frac{\text{Mol \% A}\delta 1,3\text{P} \ddot{\alpha} \text{Mol \% A}\delta 2\text{P} \ddot{\alpha} \text{Mol \% A}\delta 1,3\text{P}}{10\,000}$$

##### 4.5.6.2. TAG s dvije masne kiseline (AAB, ovdje PoPoL, PoLL) (8)

$$\text{Mol \% AAB} \frac{1}{4} \frac{\text{Mol \% A}\delta 1,3\text{P} \ddot{\alpha} \text{Mol \% A}\delta 2\text{P} \ddot{\alpha} \text{Mol \% B}\delta 1,3\text{P}}{2\,10\,000}$$

$$\text{Mol \% ABA} \frac{1}{4} \frac{\text{Mol \% A}\delta 1,3\text{P} \ddot{\alpha} \text{Mol \% B}\delta 2\text{P} \ddot{\alpha} \text{Mol \% A}\delta 1,3\text{P}}{10\,000}$$

##### 4.5.6.3. TAG sa tri različite masne kiseline (ABC, ovdje OLLn, PLLn, PoOLn, PPoLn) (9)

$$\text{Mol \% ABC} \frac{1}{4} \frac{\text{Mol \% A}\delta 1,3\text{P} \ddot{\alpha} \text{Mol \% B}\delta 2\text{P} \ddot{\alpha} \text{Mol \% C}\delta 1,3\text{P}}{10\,000}$$

$$\text{Mol \% BCA}_{\frac{1}{4}} = \frac{\text{Mol \% B}\ddot{1},3\text{P} + \text{Mol \% C}\ddot{2}\text{P} + \text{Mol \% A}\ddot{1},3\text{P} + 2}{10\,000}$$

$$\text{Mol \% CAB}_{\frac{1}{4}} = \frac{\text{Mol \% C}\ddot{1},3\text{P} + \text{Mol \% A}\ddot{2}\text{P} + \text{Mol \% B}\ddot{1},3\text{P} + 2}{10\,000}$$

#### 4.5.6.4. Triacilgliceroli sa ECN 42

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

LLL

PoLL i pozicioni izomer LPoL

OLLn i pozicioni izomeri OLnL i LnOL

PoPoL i pozicioni izomer PoLPo

PoOLn i pozicioni izomeri OPoLn i OLnPo

PLLn i pozicioni izomeri LLnP i LnPL

PoPoPo

SLnLn i pozicioni izomer LnSLn

PPoLn i pozicioni izomeri PLnPo i PoPLn

Triacilgliceroli s ECN 42 izraženi su kao ZbirZbir ovih devet triacilglicerola, uključujući njihove pozicione izomere. Rezultate treba izraziti s najmanje dva decimalna broja.

### 5. OCJENJIVANJE REZULTATA

Izračunati teoretski udio upoređuje se s udjelom utvrđenim HPLC analizom. Ako je apsolutna razlika koju dobijemo kad od podataka HPLC oduzmemo teoretske podatke veća od vrijednosti navedenih za odgovarajuću kategoriju ulja u normi, uzorak sadrži sjemensko ulje.

Rezultati se izražavaju s dva decimalna broja.

### 6. PRIMJER (BROJEVI SE ODOSE NA ODJELJKE U TEKSTU METODE)

#### — 4.5.1. Izračunavanje molarnih % masnih kiselina iz podataka dobijenih gasno-tečno hromatografijom (normalizovana površina %)

Gasno-tečnom hromatografijom dobijaju 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 (vidjeti formulu (1))

$$\text{Mol P} = \frac{\frac{10}{256,4}}{4} \times \frac{1}{4} = 0,03900 \text{ mola}$$

$$\text{Mol S} = \frac{\frac{3}{284,5}}{3} \times \frac{1}{4} = 0,01054 \text{ mola}$$

$$\begin{aligned}
 & \frac{5}{1} \\
 & \frac{254,}{4} \text{ } \frac{1}{4} 0,00393 \text{ mola} \\
 \text{Mol Po} &= \text{Po} \\
 & \frac{75}{282,} \text{ } \frac{1}{4} 0,26549 \text{ mola} \\
 \text{Mol O} &= \text{O} \\
 & \frac{10}{280,} \\
 \text{Mol L} &= \text{L} \text{ } \frac{1}{4} 0,03566 \text{ mola L} \\
 & \frac{1}{278,} \text{ } \frac{1}{4} 0,00359 \text{ mola} \\
 \text{Mol Ln} &= \text{Ln} \\
 \text{Ukupno} &= 0,35821 \text{ Mol TAG}
 \end{aligned}$$

— 4.5.4. *Normalizacija masnih kiselina na 100 % (vidjeti formulu (2))*

$$\begin{aligned}
 \text{Mol \% P(1,2,3)} &= \frac{0,03900 \text{ mola P} \cdot 100}{0,35821 \text{ mola}} \cdot \frac{1}{4} 10,887 \% \\
 \text{Mol \% S(1,2,3)} &= \frac{0,01054 \text{ mola S} \cdot 100}{0,35821 \text{ mola}} \cdot \frac{1}{4} 2,942 \% \\
 \text{Mol \% Po(1,2,3)} &= \frac{0,00393 \text{ mola Po} \cdot 100}{0,35821 \text{ mola}} \cdot \frac{1}{4} 1,097 \% \\
 \text{Mol \% O(1,2,3)} &= \frac{0,26549 \text{ mola O} \cdot 100}{0,35821 \text{ mola}} \cdot \frac{1}{4} 74,116 \% \\
 \text{Mol \% L(1,2,3)} &= \frac{0,03566 \text{ mola L} \cdot 100}{0,35821 \text{ mola}} \cdot \frac{1}{4} 9,955 \% \\
 \text{Mol \% Ln(1,2,3)} &= \frac{0,00359 \text{ mola Ln} \cdot 100}{0,35821 \text{ mola}} \cdot \frac{1}{4} 1,002 \% \\
 \text{Ukupno Mol \%} &= 100 \%
 \end{aligned}$$

ZbirZbir zasićenih i nezasićenih masnih kiselina na 1,2,3-položaju TAG (vidjeti formulu (3)):

$$\text{mola \% ZMK } \frac{1}{4} 10,887 \% \text{ } \frac{1}{4} 2,942 \% \text{ } \frac{1}{4} \mathbf{13,829 \%}$$

$$\text{mola \% NMK } \frac{1}{4} 100,000 \% - 13,829 \% \text{ } \frac{1}{4} \mathbf{86,171 \%}$$

— 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)] (vidjeti formulu (4))*

$$\text{Mol \% P} \frac{2}{2} \text{ } \frac{1}{4} 10,887 \% \text{ } \frac{1}{4} 0,06 \text{ } \frac{1}{4} 0,653 \text{ Mol \%}$$

$$\text{Mol \% S} \frac{2}{2} \text{ } \frac{1}{4} 2,942 \% \text{ } \frac{1}{4} 0,06 \text{ } \frac{1}{4} 0,177 \text{ Mol \%}$$

— 4.5.5.2. *Nezasićene masne Kiseline*

na 2-položaju [Po(1,3), O(1,3),

L(1,3) i Ln(1,3)] (vidjeti formulu (5))

|             |                                 |            |
|-------------|---------------------------------|------------|
|             | <u>1,097 %</u>                  |            |
| Mol % Pođ2Đ | 86,171 ä đ 100 – 0,653 –        | 1,262 Mol  |
| ¼           | % 0,177Đ ¼                      | %          |
|             | 74,116                          |            |
|             | %                               |            |
| Mol % Ođ2Đ  | 86,171 ä đ 100 – 0,653 – 0,177Đ | 85,296 Mol |
| ¼           | % ¼                             | %          |
|             | 9,955                           |            |
|             | %                               |            |
| Mol % Lđ2Đ  | 86,171 ä đ 100 – 0,653 –        | 11,457 Mol |
| ¼           | % 0,177Đ ¼                      | %          |
|             | <u>1,002 %</u>                  |            |
| Mol % Lnđ2Đ | 86,171 ä đ 100 – 0,653 –        | 1,153 Mol  |
| ¼           | % 0,177Đ ¼                      | %          |

— 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)] (vidjeti formulu (6))

|               |          |                        |
|---------------|----------|------------------------|
|               | 10,887 – |                        |
| Mol % Pđ1,3P  | 0,653    | ¼ 16,004 mola          |
| ¼             | 2        | p 10,887 %             |
|               | 2,942 –  |                        |
| Mol % Sđ1,3P  | 0,177    |                        |
| ¼             | 2        | p 2,942 ¼ 4,325 mola % |
|               | 1,097 –  |                        |
| Mol % Pođ1,3P | 1,262    |                        |
| ¼             | 2        | p 1,097 ¼ 1,015 mola % |
|               | 74,116 – |                        |
| Mol % Ođ1,3P  | 85,296   | p 74,116 ¼ 68,526 mola |
| ¼             | 2        | %                      |
|               | 9,955 –  |                        |
| Mol % Lđ1,3P  | 11,457   |                        |
| ¼             | 2        | p 9,955 ¼ 9,204 mola % |
|               | 1,002 –  |                        |
| Mol % Lnđ1,3P | 1,153    |                        |
| ¼             | 2        | p 1,002 ¼ 0,927 mola % |

— 4.5.6. *Izračunavanje triacilglicerola*

Iz izračunatog sastava masnih kiselina na sn-2- i sn-1,3-položajima:

| MK u     | 1,3-položaju | 2-položaju |
|----------|--------------|------------|
| P        | 16,004 %     | 0,653 %    |
| S        | 4,325 %      | 0,177 %    |
| Po       | 1,015 %      | 1,262 %    |
| O        | 68,526 %     | 85,296 %   |
| L        | 9,204 %      | 11,457 %   |
| Ln       | 0,927 %      | 1,153 %    |
| ZbirZbir | 100,0 %      | 100,0 %    |

izračunavaju se sljedeći triacilgliceroli:

LLL

PoPoPo

PoLL s jednim pozicionim izomerom

SLnLn s jednim pozicionim izomerom

PoPoL s jednim pozicionim izomerom

PPoLn s dva poziciona izomera

OLLn s dva pozicionim izomera

PLLn s dva pozicionim izomera

PoOLn s dva pozicionim izomera

— 4.5.6.1. TAG sa jednom masnom kiselinom (LLL, PoPoPo)

(vidjeti formulu (7))

$$\begin{aligned} \text{Mol \% LLL} &= \frac{9,204 \% \cdot 11,457 \% \cdot 9,204 \%}{1,015 \% \cdot 1,262 \% \cdot 1,015 \%} = 0,09706 \text{ Mol LLL} \cdot 10\,000 \\ \text{Mol \% PoPoPo} &= 0,00013 \text{ Mol PoPoPo} \cdot 10\,000 \end{aligned}$$

— 4.5.6.2. TAG sa dvije masne kiseline (PoLL, SLnLn, PoPoL) (vidjeti formulu (8))

$$\text{Mol \% PoLL} = \frac{1,015 \% \cdot 11,457 \% \cdot 9,204 \%}{2} = 0,02141 \cdot 10\,000$$

$$\text{Mol \% LPoL} = \frac{9,204 \% \cdot 1,262 \% \cdot 9,204 \%}{2} = 0,01069 \cdot 10\,000$$

**0,03210 Mol PoLL**

$$\text{Mol \% SLnLn} = \frac{4,325 \% \cdot 1,153 \% \cdot 0,927 \%}{2} = 0,00092 \cdot 10\,000$$

$$\text{Mol \% LnSLn} = \frac{0,927 \% \cdot 0,177 \% \cdot 0,927 \%}{2} = 0,00002 \cdot 10\,000$$

**0,00094 Mol SLnLn**

$$\text{Mol \% PoPoL} = \frac{1,015 \% \cdot 1,262 \% \cdot 9,204 \%}{2} = 0,00236 \cdot 10\,000$$

$$\text{Mol \% PoLPo} = \frac{1,015 \% \cdot 11,457 \% \cdot 1,015 \%}{2} = 0,00118 \cdot 10\,000$$

**0,00354 Mol PoPoL**

— 4.5.6.3. TAG sa tri različite masne kiseline (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) Vidjeti formulu (9)

$$\text{Mol \% PPLn} = \frac{16,004 \% \cdot 1,262 \% \cdot 0,927 \%}{2} = 0,00374 \cdot 10\,000$$

$$\text{Mol \% LnPPo} = \frac{0,927 \% \cdot 0,653 \% \cdot 1,015 \%}{2} = 0,00012 \cdot 10\,000$$

$$\text{Mol \% PoLnP} = \frac{1,015 \% \cdot 1,153 \% \cdot 16,004 \%}{2} = 0,00375 \cdot 10\,000$$

**0,00761 Mol PPLn**

$$\text{Mol \% OLLn} = \frac{68,526 \% \cdot 11,457 \% \cdot 0,927 \%}{2} = 0,014556 \cdot 10\,000$$

$$\text{Mol \% LnOL} = \frac{0,927 \% \cdot 85,296 \% \cdot 9,204 \%}{2} = 0,014555 \cdot 10\,000$$

$$\text{Mol \% LLnO} = \frac{9,204 \% \cdot 1,153 \% \cdot 68,526 \%}{2} = 0,014544 \cdot 10\,000$$

**0,43655 Mol OLLn**

$$\text{Mol \% PLLn} = \frac{16,004 \% \cdot 11,457 \% \cdot 0,927 \%}{2} = 0,003399 \cdot 10\,000$$

$$\text{Mol \% LnPL} = \frac{0,927 \% \cdot 0,653 \% \cdot 9,204 \%}{2} = 0,00111 \cdot 10\,000$$

$$\text{Mol \% LLnP} = \frac{9,204 \% \cdot 1,153 \% \cdot 16,004 \%}{2} = 0,003397 \cdot 10\,000$$

**0,06907 Mol PLLn**

$$\begin{array}{l} \text{Mol \% PoOLn} \frac{1,015 \% \ddot{a} 85,296 \% \ddot{a} 0,927 \% \ddot{a} 2}{\frac{1}{4}0,01605} 10\,000 \\ \text{Mol \% LnPoO} \frac{0,927 \% \ddot{a} 1,262 \% \ddot{a} 68,526 \% \ddot{a} 2}{\frac{1}{4}0,01603} 10\,000 \\ \text{Mol \% OLnPo} \frac{68,526 \% \ddot{a} 1,153 \% \ddot{a} 1,015 \% \ddot{a} 2}{\frac{1}{4}0,01604} 10\,000 \end{array}$$

**0,04812 Mol PoOLn**

**ECN42 = 0,69512 Mol TAG**

*Napomena 1.:* Redoslijed eluiranja može se odrediti izračunavanjem ekvivalentnog broja ugljenika, što se najčešće definiše izrazom  $ECN = \frac{1}{4} CN - 2n$ , pri čemu je CN broj atoma ugljenika, a n broj dvostrukih veza; preciznije se može izračunati tako da se u obzir uzme izvor dvostruke veze. Ako su  $n_o$ ,  $n_l$  i  $n_{ln}$  brojevi dvostrukih veza koje se pripisuju oleinskoj, linolnoj i linolenskoj kiselini, ekvivalentni broj ugljenik se može izračunati pomoću izraza:

$$EN = \frac{1}{4} CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln}$$

pri čemu se koeficijent  $d_o$ ,  $d_l$  i  $d_{ln}$  može izračunati pomoću referentnih triglicerida. U uslovima propisanim ovom metodom, približno vrijedi sljedeći odnos:

$$ECN = \frac{1}{4} CN - \ddot{d} 2,60 n_o - \ddot{d} 2,35 n_l - \ddot{d} 2,17 n_{ln}$$

*Napomena 2.:* S nekoliko referentnih triglicerida je takođe moguće izračunati rezoluciju u odnosu na triolein:

$$\alpha = \frac{RT^1 - RT_{\text{triolein}}}{RT - RT_{\text{otapalo}}}$$

primjenom korigovanog (smanjenog) vremena zadržavanja  $RT^1 = RT - RT_{\text{otapalo}}$

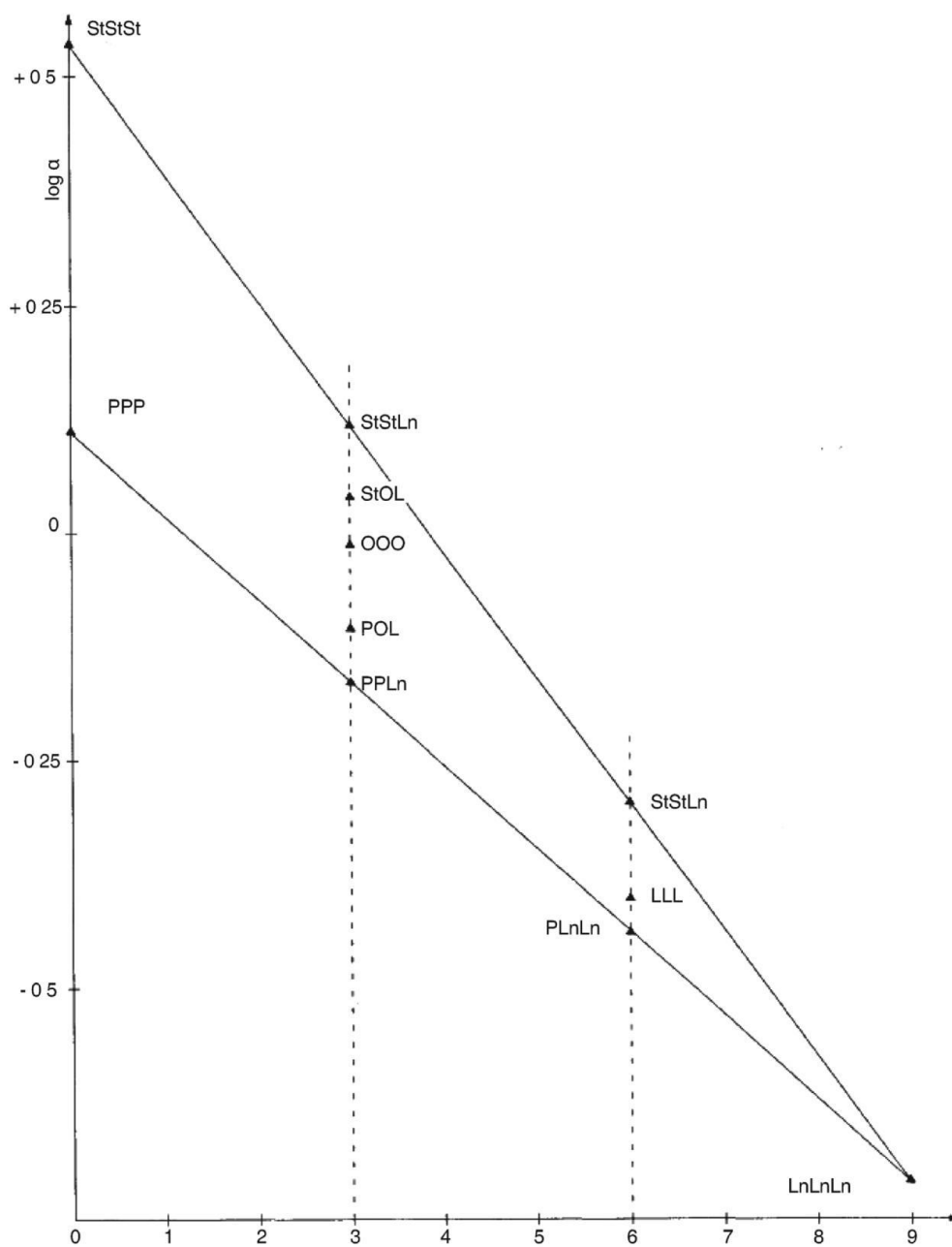
Grafikon  $\log \alpha$  u zavisnosti od f (broj dvostrukih veza) omogućuje određivanje vremena zadržavanja za sve trigliceride masnih kiselina koji su prisutni u referentnim trigliceridima — vidjeti sliku 1.

*Napomena 3.:* Efikasnost kolone mora omogućiti jasno razdvajanje pika trilinoleina od pikova triglicerida sa susjednim RT. Eluiranje se sprovodi do pika ECN 52.

*Napomena 4.:* Ispravno određivanje površina svih pikova važnih za analizu je osigurano ako drugi pik koji odgovara ECN 50 doseže 50 % pune skale pisača.

Slika 1.

Grafik zavisnosti  $\log \alpha$  od  $f$  (broj dvostrukih veza)



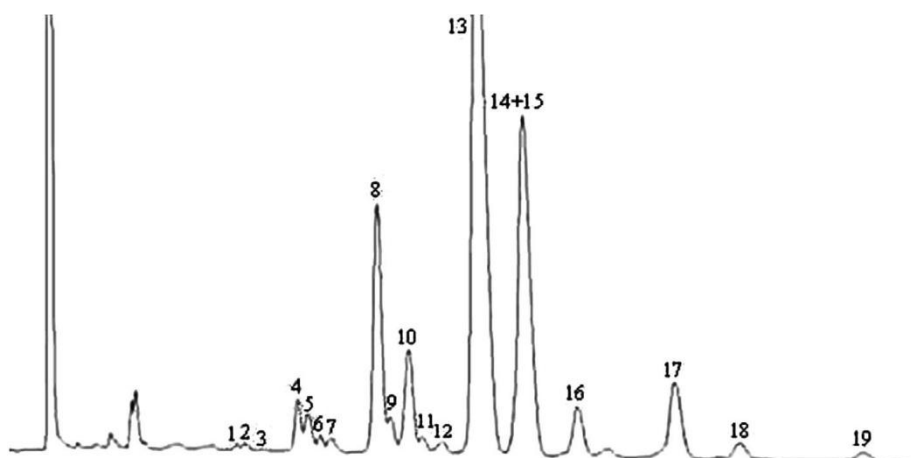
Broj dvostrukih veza

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

Slika 2.

**Maslinovo ulje sa niskim udjelom linolne kiseline**

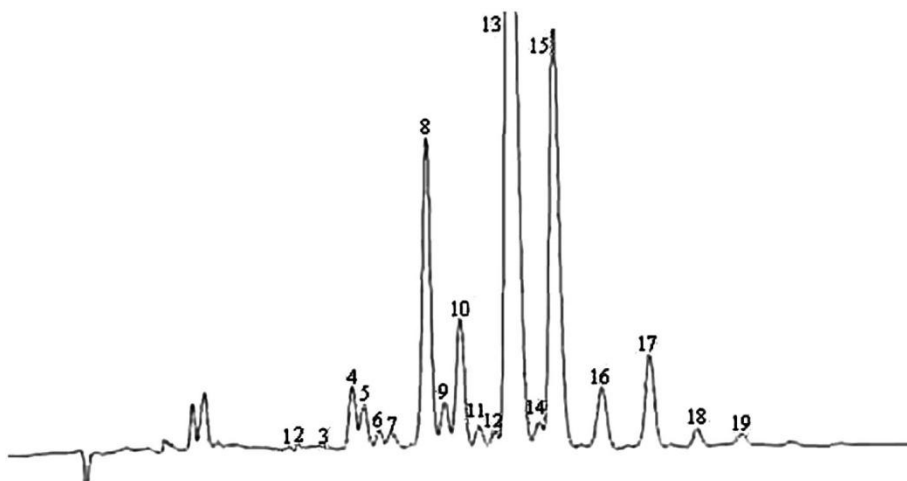
(a)



Sa rastvorom: Aceton/Acetonitril.

PROFIL a: Glavne komponente hromatografskih pikova: **ECN42**: (1) LLL + PoLL; (2) OLLn + PoOLn; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL + PoOL; (5) OOLn + PLL; (6) POLn + PPOPo; (7) OOL + PoOO; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP; (14 + 15) SOL + POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS.

(b)



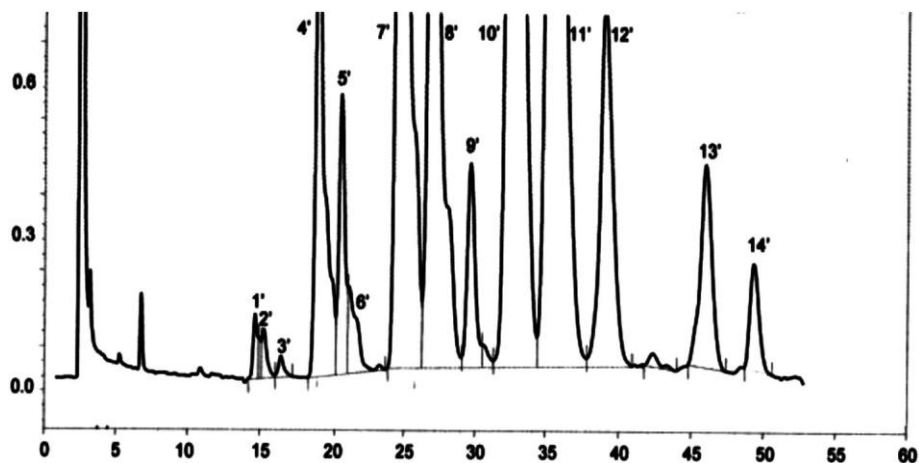
Sa rastvorom: Propionitril

PROFIL b: Glavne komponente hromatografskih pikova: **ECN42**: (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPOPo + PPOl; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS

Slika 3.

Maslinovo ulje sa visokim udjelom linolne kiseline

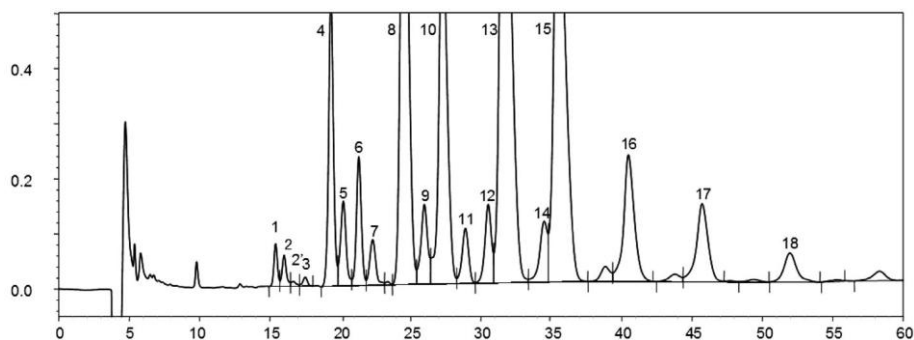
(a)



Sa rastvorom: Aceton/Acetonitril (50:50).

Profil a: Glavne komponente hromatografskih pikova: **ECN42**: (1') LLL + PoLL; (2') OLLn + PoOLn; (3') PLLn; **ECN44**: (4') OLL + PoOL; (5') OOLn + PLL; (6') POLn + PPOPo; **ECN46**: (7') OOL + PoOO; (8') PLO + SLL + PoOP; (9') PLP + PoPP; **ECN48**: (10') OOO; (11') POO + SLL + PPoO; (12') POP + PLS; **ECN50**: (13') SOO; (14') POS + SLS

(b)



Sarastvaračem: Propionitril.

Profil b: Glavne komponente hromatografskih pikova: **ECN42**: (1) LLL; (2 + 2') OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPOPo + PPoL; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; **ECN48**: (12) PLP; (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS; **ECN52**: (19) AOO.

## ODREĐIVANJE SADRŽAJA ALIFATIČNIH I TRITERPENSKIH ALKOHOLA KAPILARNOM GASNOM HROMATOGRAFIJOM

### 1. PREDMET

Ovim Prilogom se opisuje metoda za određivanje sadržaja alifatičnih i triterpenskih alkohola u uljima i mastima.

### 2. PRINCIP

Masna supstanca s dodatkom 1-eikosanola koji služi kao interni standard saponifikuje se rastvorom kalijum hidroksida u etanolu i zatim se neosapunjiva supstanca ekstrahuje dietil etrom. Alkoholna frakcija se odvaja od neosapunjive supstance tankoslojnom hromatografijom na bazičnoj podlozi od silika-gela; alkoholi koji se dobiju sa silika-gela transformišu se u trimetilsilil etre i analiziraju kapilarnom gasnom hromatografijom.

### 3. OPREMA

- 3.1. Tikvica okruglog dna zapremine 250 ml s povratnim hladilom i nastavcima od brušenog stakla.
- 3.2. Lijevak za odjeljivanje zapremine 500 ml.
- 3.3. Tikvice okruglog dna zapremine 250 ml.
- 3.4. Hromatografska kadica za tankoslojnu hromatografiju, za staklene ploče veličine  $20 \times 20$  cm.
- 3.4. Ultraljubičasta svjetiljka talasne dužine 366 ili 254 nm.
- 3.5. Mikrošpric od 100  $\mu$ l i 500  $\mu$ l.
- 3.7. Cilindrični lijevak za filtriranje s poroznom pločom G3 (poroznost 15-40  $\mu$ m), promjera približno 2 cm i dubine približno 5 cm, s nastavkom prikladnim za filtriranje pod vakuumom i 12/21 s muškim šlifom od brušenog stakla.
- 3.8. Vakuumska tikvica zapremine 50 ml, s 12/21 ženskim šlifom od brušenog stakla za korišćenje s lijevkom za filtriranje (3.7.).
- 3.9. Epruveta zapremine 10 ml s konusnim dnom i nepropusnim čepom.
- 3.10.1. termostatske komore za kolone (peć), koja može održavati željene temperature uz tačnost  $\pm 1$  °C;
- 3.10.2. jedinica za injektiranje s mogućnošću podešavanja temperature, s elementom za uparavanje od persilaniziranog stakla;
- 3.10.3. plamenojonizujući detektor i mjerni pretvarač s pojačalom;
- 3.10.4. snimač-integrator koji se može povezati s pretvaračem s pojačalom (3.10.3.), s vremenom reakcije koje nije duže od jedne sekunde i s varijabilnom brzinom papira.
- 3.11. staklena ili kvarcna kapilarna kolona dužine 20 do 30 m, unutrašnjeg promjera 0,25 do 0,32 mm, s SE-52, SE-54 ili drugom odgovarajućom tečnom fazom, ravnomjerne debljine filma između 0,10 i 0,30  $\mu$ m.
- 3.12. Mikrošpric za gasnu hromatografiju zapremine 10  $\mu$ l, s tvrdom iglom.
- 3.13. Analitička vaga osjetljivosti 1 mg (s podjelom od 0,1 mg).

### 4. REAGENCI

- 4.1. Kalijum hidroksid, približno 2 mol/l rastvora u etanolu: 130 g kalijum hidroksida (minimalne koncentracije 85 %) rastvori se uz hlađenje u 200 ml destilovane vode i zatim dopuni etanolom do jednog litra. Rastvor treba čuvati u dobro začepljenoj boci od tamnog stakla.
- 4.2. Dietil etar, analitičke čistoće.
- 4.3. Bezvodni natrijum sulfat, analitičke čistoće.
- 4.4. Staklene ploče sa slojem silika gela, bez indikatora fluorescencije, debljine 0,25 mm (na tržištu su dostupne ploče spremne za upotrebu).
- 4.5. Kalijum hidroksid, približno 0,2 mol/l rastvora u etanolu: 13 g kalijum hidroksida otopi se u 20 ml destilovane vode i zatim dopuni etanolom do jednog litre.
- 4.6. Benzen, za hromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
- 4.7. Aceton, za hromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
- 4.8. Heksan, za hromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
- 4.9. Dietilni eter, za hromatografiju (vidjeti 5.2.2.).
- 4.10. Hloroform, za hromatografiju.

#### ▼ M28

- 4.11. Referentni rastvor za tankoslojnu hromatografiju: C<sub>20</sub>-C<sub>28</sub> alkohola 0,5 % u hloroformu ili alkoholna frakcija dobijena kako je navedeno u tački 5.2. od neosapunjivih supstanci ulja komine maslina.

#### ▼ M19

- 4.12. 0,2 %-tni rastvor 2',7'-dihlorfluoresceina u etanolu. Može se učiniti blago alkalnim dodavanjem nekoliko kapi rastvora 2 mol/l kalijum hidroksida.
- 4.13. Bezvodni piridin, za hromatografiju.
- 4.14. Heksametildisilazan.
- 4.15. Trimetilhlorosilan.
- 4.16. Standardni rastvor trimetilsilil etra alifatičnih alkohola od C<sub>20</sub> do C<sub>28</sub>. Mogu se pripremiti iz mješavina čistih alkohola, neposredno prije upotrebe.
- 4.17. 0,1 %-tni (m/v) rastvor 1-eikosanola u hloroformu (interni standard).
- 4.18. Noseći gas: vodonik ili helijum, hromatografske čistoće.
- 4.19. Pomoćni gas: azot, hromatografske čistoće.

### 5. POSTUPAK

#### 5.1. Priprema neosapunjive supstanci

- 5.1.1. Pomoću mikrošprica od 500 µl u tikvicu okruglog dna zapremine 250 ml ubrizgati zapreminu 0,1 %-tnog rastvora 1-eikosanola u hloroformu (4.17.), koji sadrži udio 1-eikosanola približno jednak 10 % sadržaja alifatičnih alkohola u dijelu uzorka koji se uzima za analizu. Na primjer, za 5 g uzorka dodaje se 250 µl 0,1 %-tni rastvor 1-eikosanola u slučaju maslinovog ulja i 1 500 µl u slučaju ulja komine maslina.

Upariti do suvog u struji azota i zatim izvagati tačno 5 g suvog filtriranog uzorka u istu tikvicu.

- 5.1.2. Dodati 50 ml 2 mol/l rastvora kalijum hidroksida u etanolu, pričvrstiti povratni hladnjak (kondezator) i zagrijavati u vodenom kupatilu do tačke slabog vrenja, uz neprekidno miješanje tokom zagrijavanja, dok se

ne završi saponifikacija (rastvor postaje bistar). Zagrijavanje nastaviti još sljedećih 20 minuta i zatim kroz hladnjak dodati 50 ml destilovane vode. hladnjak se zatim odvoji i tikvica ohladi na približno 30 °C.

- 5.1.3. Sadržaj tikvice kvantitativno prenijeti u lijevak za odjeljivanje zapremine 500 ml dodajući destilovanu vodu nekoliko puta, tako da se ukupno doda približno 50 ml destilovane vode. Dodati približno 80 ml dietil etra, snažno mućkati približno 30 sekundi i odložiti da se slegne (Napomena 1).

Odvojiti donju vodenu fazu sakupljajući je u drugom lijevku za razdvajanje. Na vodenoj fazi na isti se način vrše još dvije ekstrakcije, uz korišćenje 60 do 70 ml dietil etra za svaku.

Ako se stvori emulzija, može se ukloniti prskanjem malim količinama etanola ili metanola.

- 5.1.4. Ekstrakte dietil etra miješati u lijevku za odjeljivanje i isprati destilovanom vodom (po 50 ml) dok voda kojom se ispiralo ne pokaže neutralnu reakciju.

Vodu od ispiranja odbaciti, a etarsku-fazu osušiti bezvodnim natrijum sulfatom i profiltrirati u prethodno izvaganu tikvicu zapremine 250 ml, uz ispiranje lijevka i filtera malim količinama dietil etra koje se dodaju na ukupnu količinu.

- 5.1.5. Eter destilovati do zapremine od nekoliko ml te zatim sušiti pod blagim vakuumom ili pod strujom azota, sušenje se završava u peći na 100 °C približno četvrtinu sata te zatim vaga nakon hlađenja u eksikatoru.

## 5.2. Razdvajanje alkoholnih frakcija

- 5.2.1. Priprema osnovnih ploča za tankoslojnu hromatografiju: silika gel ploče (4.4) potpuno se uranjaju u rastvor kalijum 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 sat vremena.

Ploče se izvade iz peći i skladište u eksikator s kalcijum hloridom do upotrebe (ploče obrađene na ovaj način moraju se upotrijebiti u roku od 15 dana).

Kada se koriste osnovne silika gel ploče za razdvajanje alkoholnih frakcija, nije potrebno tretirati neosapunjive supstance aluminijum oksidom. Na taj se način svi kiseli sastojci (masne kiseline i drugi) zadržavaju na početku, čime se dobija traka alifatičnog alkohola i traka terpenskog alkohola, a obje se značajno razlikuju od trake sterola.

- 5.2.2. U komoru za razvijanje ploča unijeti mješavinu heksana i dietil etra u zapreminskom odnosu 65/35 (v/v), do nivoa od približno 1 cm <sup>(1)</sup>.

Komora se zatvara odgovarajućim poklopcem i ostavlja pola sata kako bi se uspostavila ravnoteža između pare i tečnosti. Trake filter-papira namočene u eluens mogu se pričvrstiti na unutrašnju površinu komore kako bi se skratilo vrijeme razvijanja za otprilike jednu trećinu i dobila jednoličnija, pravilna elucija komponenata.

<sup>(1)</sup> Posebno u tim slučajevima, za eluiranje se mora koristiti smjesa benzena i acetona u promjeru 95:5 (v/v), kako bi se dobilo jasno razdvajanje traka.

*Napomena 3: Rastvor za razvijanje mora se zamijeniti za svaku analizu kako bi se postigli ponovljivi uslovi razvijanja.*

- 5.2.3. Pripremi se približno 5 %-tna rastvora neosapunjivih supstance (5.1.5) u hloroformu i, pomoću mikrošprica od 100 µl, nanese 0,3 ml tog rastvora u što tanjoj i jednoličnijoj liniji na TLC ploču približno 2 cm od donje

ivice TLC ploče. U ravni originalnog sloja, nanosi se 2 do 3  $\mu$ l referentnog rastvora alifatičnih alkohola (4.11.) radi identifikovanja trake alifatičnog alkohola nakon završetka razvijanja.

- 5.2.4. Ploča se smjesti u komoru za razvijanje pripremljenu kako je opisano u 5.2.2. Temperaturu okoline treba održavati između 15 i 20 °C. Komora se odmah zatvara poklopcem i ostavi da eluira dok prednji dio rastvora ne dosegne približno 1 cm od gornjeg ruba ploče.

Ploča se zatim izvadi iz komore za razvijanje, a rastvor isparuje pod strujom vrućeg vazduha ili se ploča ostavlja neko vrijeme u digestoru.

- 5.2.5. Ploča se blago i jednoliko pošprica rastvorom 2',7'-diklorfluoresceina kad se posmatra pod ultraljubičastim svjetlom. Trake alifatičnih alkohola moguće je identifikovati uporedbom sa slojem dobijenim od referentnog rastvora: krajevi trake označe se crnom olovkom; označavajući zajedno traku alifatičnih alkohola i traku terpenkih alkohola neposredno iznad nje (napomena 4.)

Trake alifatičnih alkohola i terpenkih alkohola uzimaju se zajedno zbog mogućih migracija nekih alifatičnih alkohola u vrpcu terpenkih alkohola. Primjer odjeljivanja tankoslojnom hromatografijom prikazan je na slici 1. Dodatka.

- 5.2.6. Silika gel koji se nalazi u označenom području sastrugati pomoću metalne spatule. Tako dobijeni fino usitnjeni materijal unijeti u lijevak za filtriranje (3.7.). Dodati 10 ml vrućeg hloroforma, pažljivo izmiješati metalnom spatulom i filtrirati pod vakuumom, skupljajući filtrat u Erlenmajerovu tikvicu (3.8.) spojenu na lijevak za filtriranje.

Silika gel u tikvici isprati tri puta dietil etrom (približno 10 ml svaki put), skupljajući filtrat u istu tikvicu spojenu na lijevak. Filtrat ispariti do zapremine od 4 do 5 ml, prenijeti preostali rastvor u prethodno izvagano epruvetu zapremine 10 ml (3.9.), sušiti laganim zagrijavanjem pod blagom strujom azota, rastvoriti s nekoliko kapi acetona, ponovo sušiti, staviti u peč na 105 °C približno 10 minuta, ostaviti da se ohladi u eksikatoru i izvagati.

Ostatak unutar epruvete sastoji se od alkoholne frakcije.

## 5.5. Pripremanje trimetilsilil etara

- 5.3.1. Reagens za silaniziranje, koji se sastoji od mješavine piridina, heksame- tildisilazana i trimetilklorosilana u volumnom promjeru 9:3:1 (v/v/v) (Napomena 5.), u prečniku od po 50  $\mu$ l na svaki miligram alifatičnih alkohola, dodaje se u epruvetu koja sadrži alkoholnu frakciju, tako da se izbjegne bilo kakva apsorpcija vlage (Napomena 6).

Napomena 5: Rastvori spremni za upotrebu dostupni su u slobodnoj trgovini. Takođe su dostupni drugi reagensi za silaniziranje kao što su npr. bis-trimetilsililtrifluoracetamid + 1 % trimetil hlorosila, za miješanje sa jednakom zapreminom bezvodnog piridina.

Normalno je da dođe do blage opalescencije koja neće uticati na rezultat. Stvaranje bijelog flokulata ili pojava ružičastog obojenja upućuju na prisutnost vlage ili propadanje reagensa. U tom slučaju ispitivanje treba ponoviti.

- 5.3.2. Epruvetu treba začepiti i pažljivo promućkati (bez preokretanja) dok se alifatični alkoholi potpuno ne rastvore. Ostavi se da stoji najmanje 15 minuta na sobnoj temperaturi i zatim centrifugira nekoliko minuta. Bistri rastvor spreman je za analizu gasnim hromatografom.

## 5.6. Analiza gasnim hromatografom

### 5.4.1. Preliminarni postupci, punjenje kolone

- 5.4.1.1. Kolona se učvrsti u gasni hromatograf, priključujući početak kolone na injektor spojen sa sastavom razdvajanja, a kraj kolone na detektor. Sprovedi opštu provjeru sklopa gasnog hromatografa (čvrstoću spoja (zatvaranja) gasnih priključaka, efikasnost detektora, efikasnost sastava razdvajanja i sastava za bilježenje itd.).
- 5.4.1.2. Ako se kapilarna kolona koristi prvi put, preporučuje se da se podvrgne kondicioniranju. Kroz kapilarnu kolonu pusti se da proteče malo nosećeg gasa, a zatim se sklop gasnog hromatografa uključi i postupno se zagrijava dok se ne postigne temperatura koja je najmanje 20 °C iznad radne temperature (vidjeti napomenu 7.). Ta se temperatura treba održavati ne kraće od dva sata, zatim se sklop dovede na radne uslove (regulisanje protoka gasa, paljenje plamena dijeljenja, spoj na elektronički uređaj za bilježenje, prilagođavanje temperature komore (peći) kapilarne kolone, detektor i injektor, i tako dalje), a signal se prilagođava na osjetljivost koja je najmanje dvostruko viša od najvišeg nivoa predviđenog za vršenje analize. Bazna linija za praćenje treba biti linearna, bez pikova ikakve vrste i ne smije pokazivati nikakve znakove otklona. Negativan pravougaoni otklon ukazuje na to da spojevi kolone nisu savršeno čvrsti (zapiveni), dok pozitivan otklon ukazuje na to da kolona nije dovoljno kondicionirana.

Temperatura kondicioniranja mora biti najmanje 20 °C niža od maksimalne temperature predviđene za primijenjenu tečnu fazu.

### 5.4.2. Izbor radnih uslova

#### 5.4.2.1. Opšti radni uslovi su sljedeći:

- temperatura kolone: inicijalna izoterma postavlja se na 180 °C osam minuta, a zatim se programira na povećanje od 5 °C/min dok ne dosegne 260 °C i daljih 15 minuta pri 260 °C,
  - temperatura injektora: 280 °C
  - temperatura detektora: 290 °C
  - linearna brzina nosećeg gasa: helijum 20 do 35 cm/s, vodonik 30 do 50 cm/s,
  - odnos razdvajanja: 1:50 do 1:100,
  - osjetljivost instrumenta: 4 do 16 puta veća od minimalne atenuacije,
  - osjetljivost bilježenja: 1 do 2 mV pune skale,
  - brzina papira: 30 do 60 cm/h,
  - količina injektovane supstance: 0,5 do 1 µl TMSE rastvora,
- Uslove se mogu modifikovati u skladu s karakteristikama kolone i gasnog hromatografa kako bi se dobili hromatogrami koji zadovoljavaju sljedećim uslovima:
- retenciono vrijeme alkohola C<sub>26</sub> treba biti 18 ± 5 minuta,
  - pik alkohola C<sub>22</sub> treba biti 80 ± 20 % vrijednosti pune skale za maslinovo ulje, odnosno 40 ± 20 % vrijednosti pune skale za sjemensko ulje.

5.4.2.2. Zahtjevi SE provjeravaju ponovljenim injektiranjem standardne TMSE mješavine alkohola i radni uslovi se prilagođavaju kako bi se postigli najbolji mogući rezultati.

5.4.2.3. Parametri za integrisanje pikova određuju se na takav način da se postigne ispravna procjena površine pikova koje se analizira.

#### 5.4.3. Postupak analize

5.4.3.1. Korišćenjem mikrošpricazapremine 10 µl unosi se 1 µl heksana, za kojim slijedi 0,5 µl vazduha, a nakon toga 0,5 do 1 µl rastvora uzorka. Pritom klip mikrošprica treba podignuti da bi se igla ispraznila. Igla se uvodi kroz membranu sklopa za injektovanje; nakon jedne do dvije sekunde rastvor se brzo injektuje, a nakon približno pet sekundi igla se polako izvlači.

5.4.3.2. Bilježenje treba sprovoditi sve dok se TMSE prisutnih alifatičnih alkohola u potpunosti ne eluira. Bazna linija treba u svakom trenutku da odgovara zahtjevima tsčke 5.4.1.2.

#### 5.4.4. Identifikovanje pikova.

Identifikovanje pojedinačnih pikova sprovodi se u skladu s retencionim vremenima i upoređivanjem sa standardnom TMSE smješom koja se analizira pri jednakim usovima.

Primjeri hromatograma alkoholne frakcije rafinisanog maslinovog ulja prikazani su na slikama 2. i 3. Dodatka.

#### 5.4.5. Kvantitativna ocjena

5.4.5.1. Površine pikova 1-eikosanola i alifatičnih alkohola C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub> i C<sub>28</sub> izračunavaju se elektroničkom integracijom.

5.4.5.2. Sadržaj svakog alifatičnog alkohola, iskazan u mg/1 000

g masne supstance, izračunava se kako slijedi:

$$\text{alkohol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

pri čemu je:

A<sub>x</sub> = površina pika alkohola x

A<sub>s</sub> = površina 1-eikosanola  
masa 1-eikosanola u

m<sub>s</sub> = miligramima

m = masa uzorka u gramima

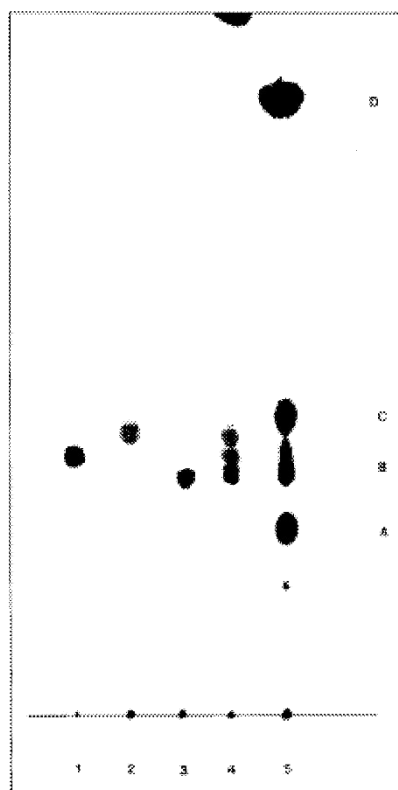
## 6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

Iskazuje se sadržaj pojedinih alifatičnih alkohola u mg/1 000 g masne supstance i zbir „ukupnih alifatičnih alkohola”.

### Primjer razdvajanja tankoslojnom hromatografijom i primjeri Hromatograma

Slika 1.

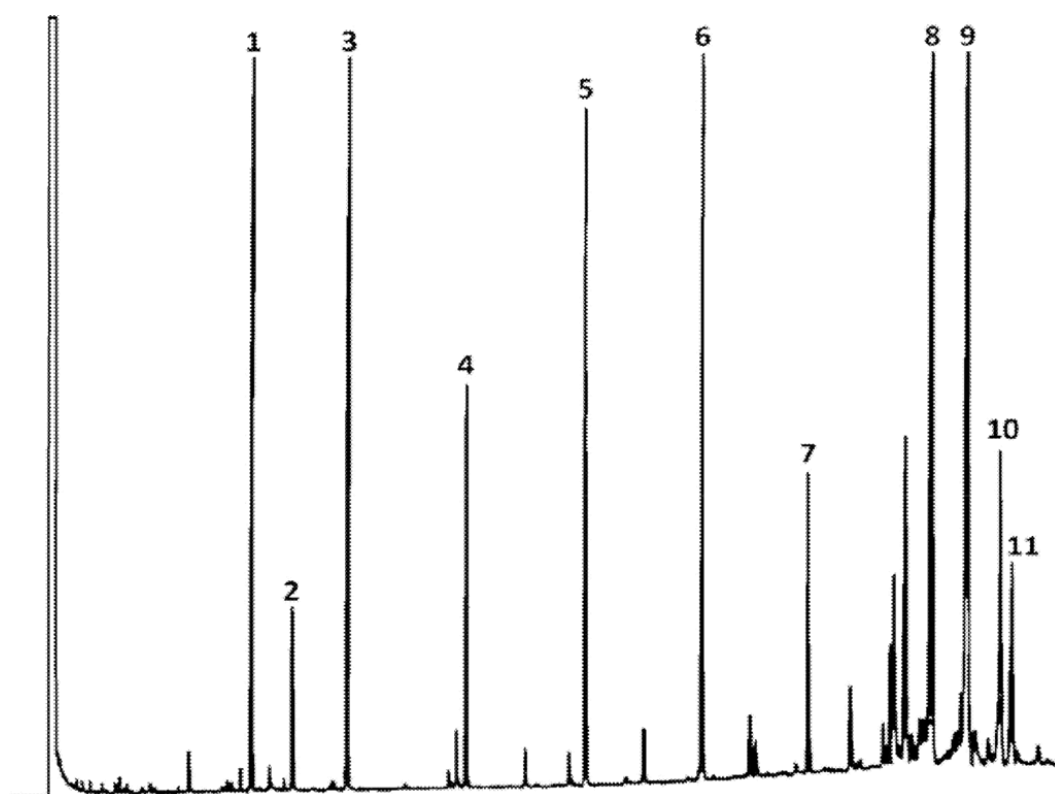
Ploče za tankoslojnu hromatografiju neosapunjive frakcije maslinovog ulja eluirane heksanom/dietil etrom (65/35)



- |   |                                         |              |
|---|-----------------------------------------|--------------|
| 1 | Alkohol C <sub>26</sub>                 | A Steroli    |
| 2 | Alkohol C <sub>30</sub>                 | Alifatični   |
| 3 | Alkohol C <sub>20</sub>                 | B alkoholi   |
| 4 | Alkoholne mješavine C <sub>20-22-</sub> | Triterpenski |
| 5 | Ekstra djevičansko                      | C alkoholi   |
|   | neosapu- njavo                          | D Skvalen    |

Slika 2.

Hromatogram alkoholne frakcije rafinisanog maslinovog ulja



1 = Fitol

2 = Geranilgeraniol  
= Alkohol C

3<sub>20</sub> (IS)  
= Alkohol C

4<sub>22</sub>

5 = Alkohol C<sub>24</sub>

6 = Alkohol C<sub>26</sub>

7 = Alkohol C<sub>28</sub>

8 = Cikloartenol

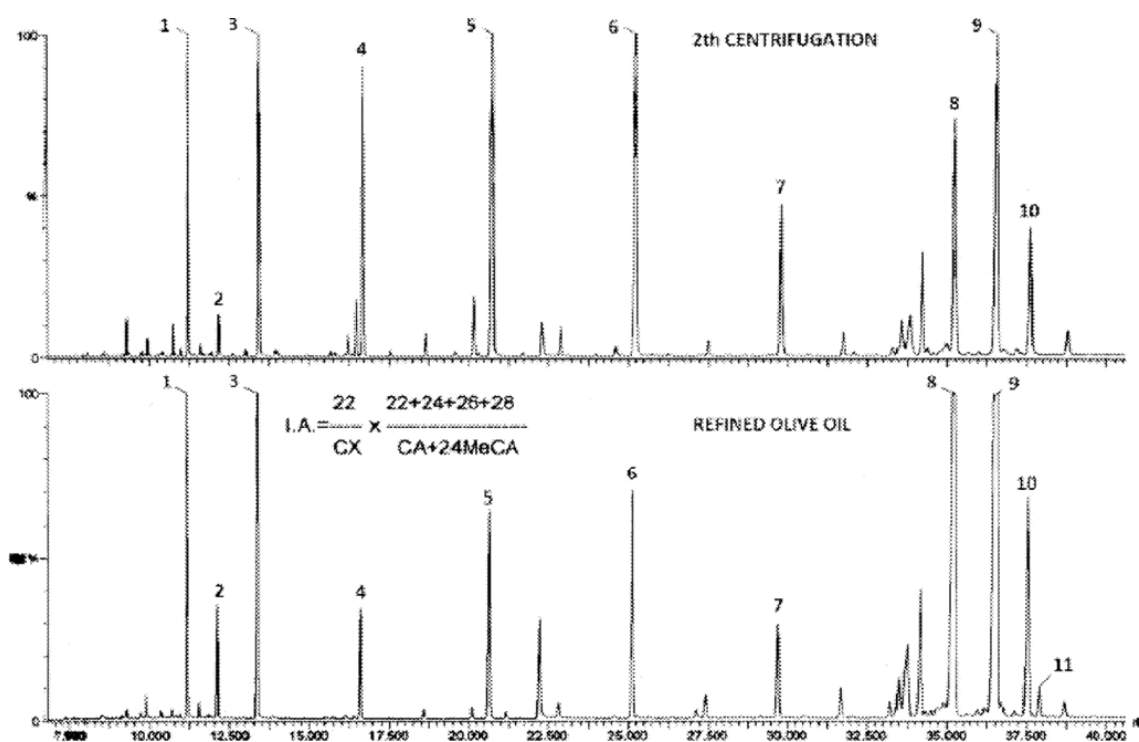
9 = 24-  
metilencikloartenol

10 = Citrostadienol

11 = Ciklobranol

Slika 3.

Alifatični i triterpenski alkoholi u rafinisanom maslinovom ulju i maslinovom ulje koje je podvrgnuto dvostrukom centrifugiranju



- |                             |                             |                                     |
|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 1 = Fitol                   | 5 = Alkohol C <sub>24</sub> | 9 = 24-metilencikloartenol (24MeCA) |
| 2 = Geranilgeraniol (CX)    | 6 = Alkohol C <sub>26</sub> | 10 = Citrostadienol                 |
| 3 = Alkohol C <sub>20</sub> | 7 = Alkohol C <sub>28</sub> | 11 = Ciklobranol                    |
| 4 = Alkohol C <sub>22</sub> | 8 = Cikloartenol (CA)       |                                     |

## ODREĐIVANJE SADRŽAJA ISPARLJIVIH HALOGENISANIH RASTVORA U MASLINOVOM ULJU

### 1. METODA

Analiza gasnom hromatografijom uz korišćenje „head space” tehnike.

### 2. OPREMA

#### 2.1. Uređaj za gasnu hromatografiju opremljen detektorom zahvata elektrona (ECD).

##### 2.2. Uređaj „head space”.

#### 2.3. Staklena kolona za gasnu hromatografiju, dužine 2 m i razmjera 2 mm, stacionarna faza faza OV 10110 % ili ekvivalent, na nosaču od kalcinisanе, diatomejske zemlje, oprane kiselinom i silanizovane, veličine čestica 80 do 100 mesh.

#### 2.4. Nosač i pomoćni gas: azot za gasnu hromatografiju, odgovarajući za detekciju zahvatom elektrona.

#### 2.5. Staklene tikvice od 10 do 15 ml, sa teflonskim slojem i aluminijskim čepom kroz koji se može uvesti špric.

##### 2.6. Spojnice za hermetičko zatvaranje.

##### 2.7. Špric za gas između 0,5 i 2 ml.

### 3. REAGENSI

Standard: isparljivi rastvori čiji stepen čistoće odgovara za gasnu hromatografiju.

### 4. POSTUPAK

#### 4.1. Tačno odvagajte oko 3 g ulja u staklenoj tikvici (koja se neće ponovo koristiti); hermetički je zatvorite. Stavite je u termosta na 70 °C na sat vremena. Koristeći špric pažljivo izuzmite između 0,2 i 0,5 ml „head space”-a (parne faze). Injektirajte je u kolonu uređaja za gasnu hromatografiju namješteno kako slijedi:

— temperatura injektora: 150 °C,

— temperatura kolone: 70 do 80 °C,

— temperatura detektora: 200 do 250 °C.

Mogu se koristiti i druge temperature pod uslovom da rezultati ostanu ekvivalentni.

#### 4.2. Referentni rastvori: pripremite standardne rastvore koristeći rafinisano maslinovo ulje bez tragova rastvora u koncentracijama u rasponu od 0,05 do 1 ppm (mg/kg) i koji odgovaraju pretpostavljenom sadržaju uzorka. Halogenisani rastvori mogu se razblažiti korišćenjem pentana.

#### 4.3. Kvantitativno prosuđivanje: uporedite površine ili visine pikova uzorka i standardnog rastvora one koncentracije za koju pretpostavljate da je najpribližnije. Ako je odstupanje veće od 10 %, treba ponoviti analizu uz upoređivanje s nekim drugim rastvorom standarda dok odstupanje ne bude manje od 10 %. Sadržaj se određuje na temelju prosjeka elementarnih injiciranja.

#### 4.4. Iskazivanje rezultata: u ppm (mg/kg). Granica detekcije za ovu metodu je 0,01 mg/kg.

## SADRŽAJ ULJA U KOMINI MASLINA

### 1.1. Oprema

- primjeren uređaj za ekstrakciju opremljen tikvicom s okruglim dnom zapremine 200 – 250 ml,
- električno grijano kupatilo (npr., pješčano kupatilo ili vodeno kupatilo) ili grejna ploča,
  - analitička vaga,
  - sušnica postavljena na maksimalnu temperaturu od 80 °C
- električno grijana sušnica s ugrađenim termostatom postavljenim na  $103 \pm 2$  °C, koji se može pročistiti strujom vazduha, ili kojim se može rukovati pri sniženom pritisku,
- mehanički mlin koji se lako čisti i koji omogućava mljevenje komine maslina bez povećanja njene temperature ili bilo koje druge promjene sadržaja vlage, isparljivih supstanci ili supstanci koje se ekstrahiraju heksanom,
- čaura za ekstrakciju i vata ili filter-papir s kojeg su već odstranjene supstance koje se mogu ekstrahirati heksanom,
  - eksikator,
  - sito sa otvorima promjera 1 mm,
  - male čestice prethodno osušenog kamena plovućca.

### 1.2. Reagensi

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

## 2. POSTUPAK

### 2.1. Pripremanje uzorka za ispitivanje

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

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

### 2.2. Uzorak za ispitivanje

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

### 2.3. Pripremanje čaure za ekstrakciju

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

### 2.4. Prethodno sušenje

Ako je komina masline vrlo vlažna (odnosno, ako je sadržaj vlage i isparljivih supstanci viši od 10 %), izvršite prethodno sušenje tako da napunjenu čauru za ekstrakciju (ili filter-papir) na odgovarajuće vrijeme stavite u sušnicu u kojoj temperatura nije viša od 80 °C, a sa ciljem smanjivanja sadržaja vlage i isparljivih supstanci na manje od 10 %.

### 2.5. Pripremanje tikvice s okruglim dnom

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

### 2.6. Početna ekstrakcija

Čauru za ekstrakciju (ili filter-papir) u kojoj je uzorak za ispitivanje umetnite u uređaj za ekstrahovanje. U tikvicu ulijte potrebnu količinu heksana. Spojite tikvicu s uređajem za ekstrahovanje i sve zajedno stavite na električno grijanu kupku. Stepwn zagrijavanja prilagodite na takav način da brzina refluksa ne bude sporija od tri kapi u sekundi (umjereno, ne snažno ključanje). Nakon četiri sata ekstrahovanja pustite da se ohladi. Izvadite čauru za ekstrakciju iz uređaja za ekstrahovanje i postavite je u vazdušnu stuju s ciljem odstranjivanja većine rastvora.

### 2.7. Druga ekstrakcija

Sadržaj čaure za ekstrakciju istresite u mikro-drobiticu i sameljite ga što je sitnije moguće. Vratite svu samljevenu mješavinu u čauru (bez rasipanja) i stavite je nazad u uređaj za ekstrahovanje.

Nastavite s ekstrahovanjem tokom sljedeća dva sata koristeći istu tikvicu s okruglim dnom koja je sadržala inicijalni ekstrakt.

Dobijeni rastvor u tikvici za ekstrahovanje mora biti bistar. Ako nije, profiltrirajte ga kroz filter-papir te tikvicu i filter-papir nekoliko puta isperite heksanom. Sakupite filtrat i rastvor za ispiranje u drugu tikvicu s okruglim dnom koja je prethodno bila osušena i izvagana uz odstupanje do 1 mg.

### 2.8. Odstranjivanje rastvora i vaganje ekstrakta

Veći dio rastvora odstranite destilacijom na električno grijanoj kupki. Sve preostale tragove rastvora odstranite zagrijavanjem tikvice u sušnici na  $103 \pm 2$  °C tokom 20 minuta. Postupak odstranjivanja pospješite bilo uduvavanjem vazduha, ili pak, što je preporučljivo, nekog inertnog gasa, u određenim vremenskim intervalima ili korišćenjem sniženog pritiska.

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

Ponovo zagrijavajte 10 minuta u istim uslovima, ohladite u eksikatoru i izvagajte.

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

Sprovedite dva uporedna određivanja.

## 3. ISKAZIVANJE REZULTATA

### 3.1. Metoda izračunavanja i formula

(a) Ekstrakt, iskazan kao procenat u odnosu na masu primljenog proizvoda, jednak je:

$$S = \frac{m_1}{m_0} \cdot \frac{100}{U}$$

pri čemu je:

S = maseni udio ekstrakta u odnosu na primljeni proizvod,

$m_0$  = masa uzorka, u gramima,

$m_1$  = masa ekstrakta nakon sušenja, u gramima.

Za rezultat uzmite aritmetičku sredinu dva uporedna određivanja, pod uslovom da su ispunjeni zahtjevi za ponovljivost.

Rezultat iskažite jednim decimalnim brojem.

(b) Ekstrakt se iskazuje na temelju suve tvari, korišćenjem sljedeće formule:

$$S = \frac{100}{U} \cdot \frac{m_1}{m_0} \text{ procenat ulja u ekstraktu na temelju suve supstance;}$$

pri čemu je:

S = procenat ekstrakta u smislu primljenog proizvoda (vidjeti tačku (a)),

U = njegov sadržaj vlage i isparljivih tvari.

### 3.2. Ponovljivost

Razlika između dva uporedna određivanja koje isti analitičar sprovodi istovremeno, ili neposredno jedno za drugim, ne smije biti viša od 0,2 g ekstrakta heksana na 100 g uzorka.

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

## ODREĐIVANJE JODNOG BROJA

## 1. UVOD

Ovim prilogom utvrđuje se metoda za određivanje jodnog broja u mastima životinjskog i biljnog porijekla i u uljima, u daljem tekstu: masti.

## 2. DEFINICIJA

Za potrebe ove metode primjenjuje se sljedeća definicija:

- 2.1. *Jodni broj* označava masu joda koju je uzorak apsorbirao u radnim uslovima adicijom na dvostruke veze masti ili ulja.

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

## 3. PRINCIP

Dio uzorka za ispitivanje rastvori se u rastvoru uz dodatak Wijsovog reagensa. Nakon određenog vremena dodaju se rastvor kalijum jodida i voda, a oslobođeni jod se titruje rastvorom natrijum tiosulfata.

## 4. REAGENSI

Svi reagensi moraju biti prihvaćene analitičke čistoće.

4.1. *Voda*, u skladu sa zahtjevima nstandardae ISO 3693, 3. stadijum.

4.2. *Kalijum jodid*, rastvor 100 g/l, koji ne sadrži jodate niti slobodni jod.

4.3. *Skrob*, rastvor.

5 g rastvorljivog skroba pomiješa se sa 30 ml vode, pa se ova mješavinadoda u 1 000 ml ključale vode, pusti da vri tri minuta i zatim ostavi da se ohladi.

- 4.4. *Natrijum tiosulfat*, standardni volumetrijski rastvor koncentracije  $c(\text{Na}_2 \text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$ , koji je standardizovan ne duže od sedam dana prije upotrebe.

- 4.5. *Rastvor* pripremljen miješanjem jednakih zapremina cikloheksana isirćetne kiseline.

- 4.6. *Wijsov reagens*, sadrži jodni monohlorid u sirćetnoj kiseline. Treba koristiti Wijsov reagens koji je dostupan u slobodnoj trgovini.

## 5. OPREMA

Uobičajena laboratorijska oprema, a posebno sljedeća:

- 5.1. *Staklene odmjerne posudice*, pogodne za dio uzorka za ispitivanje njegovo raspoređivanje u tikvice (6.2).

- 5.2. *Erlenmajerove tikvice*, zapremine 500 ml, sačepovima od brušenog stakla ipotpuno suve.

## 6. PRIPREMANJE UZORKA ZA ISPITIVANJE

Homogenizovani uzorak osuši se iznad natrijum sulfata i filtrira.

## 7. POSTUPAK

- 7.1. *Uzorak za ispitivanje*

Masa uzorka za ispitivanje razlikuje se zavisno od njegovog očekivanog jodnog broja, kao što je prikazano u tabeli 1.

**Tabela 1.**

| Očekivani jodni broj | Masa dijela uzorka za ispitivanje (g) |
|----------------------|---------------------------------------|
| manje od 5           | 3,00                                  |
| 5 do 20              | 1,00                                  |
| 21 do 50             | 0,40                                  |
| 51 do 100            | 0,20                                  |
| 101 do 150           | 0,13                                  |
| 151 do 200           | 0,10                                  |

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

## 7.2. Određivanje

Dio uzorka za ispitivanje staviti u tikvicu zapremine 500 ml (6.2.). Dodati 20 ml rastvora (4.5.) da bi se rastvorila mast. Dodajte tačno 25 ml Wijsovog reagensa (4.6.), umetniti čep, kružno promiješati sadržaj i staviti tikvicu na tamno mjesto. Za Wijsov reagens ne smije se koristiti usna pipeta!

Na sličan način pripremiti slijepu probu sa rastvorom i reagensom, ali bez dijela uzorka za ispitivanje.

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

Po isteku zadatog vremena u svaku tikvicu dodati po 20 ml rastvora kalijum jodida (4.2.) i 150 ml vode (4.1.).

Titrovati standardnim volumetrijskim rastvorom natrijum tiosulfata (4.4.) sve dok žuta boja koju daje jod gotovo u potpunosti ne nestane. Dodati nekoliko kapi rastvora skroba (4.3.) i nastaviti titrovati sve dok neposredno nakon vrlo energičnog protresanja ne nestane plava boja.

Dopušteno je potenciometrijsko titrovanje za određivanje završne tačke.

## 7.3. Broj određivanja

Izvršiti dvostruko određivanje na istom uzorku za ispitivanje.

## 8. ISKAZIVANJE REZULTATA

Jodni broj (g  $I_2$ /100 g ulja) računa se prema sledećoj jednačini:

$$\text{Jodni broj (g } I_2/100 \text{ g ulja)} = [(V_1 - V_2) / m] \times 12,69 \times c$$

pri čemu je:

$c$  = brojčana vrijednost tačne koncentracije, iskazana u molovima po litru, upotrijebljenog standardnog volumetrijskog rastvora natrijum tiosulfata (4.4.);

$V_1$  = brojčana vrijednost zapremine, u mililitrima, standardnog volumetrijskog rastvora natrijum tiosulfata (4.4.) koji je korišten za slijepu probu;

$V_2$  = brojčana vrijednost zapremine, u mililitrima, standardnog volumetrijskog rastvora natrijum tiosulfata (4.4.) koja je korištena za određivanje;

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

Za rezultat uzet aritmetičku sredinu dva određivanja, pod uslovim da su ispunjeni zahtjevi za ponovljivost (9.2.)