

ANEKS I.
SVOJSTVA POJEDINIH KATEGORIJA MASLINOVOG ULJA

Kategorija	Masnih kiselina metilnih estera (FAMES) i masnih kiselina etil esteri (FAEEs)	Slobodne masne kiseline (%) (*)	Peroksidni broj mmol O ₂ /kg (*)	Voskovi mg/kg (**) (*)	2-gliceril monopalmitat (%)	Stigmastadieni mg/kg (1)	Razlika između HPLC ECN42 i teoretskog ECN42	K232 (*) K270 (*)	Delta-K (*)	Organoleptička analiza Medijana (Mm) (*)	Organoleptička analiza Medijana voćnosti (Mv) (*)
------------	---	---------------------------------	---	------------------------	-----------------------------	--------------------------	--	-------------------	-------------	--	---

1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg / kg ili 75 mg / kg < Σ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg i (FAEE/FAME E $\leq 1,5$	$\leq 0,8$	≤ 20	≤ 250	$\leq 0,9$ ako je udio palmitinske kiseline % ≤ 14 $\leq 1,0$ ako je udio palmitinske kiseline % > 14	$\leq 0,10$ $\leq 0,2$	$\leq 2,50$ $\leq 0,22$ $\leq 0,01$	Mm = 0 Mv > 0	
2. Djevičansko maslinovo ulje	–	$\leq 2,0$	≤ 20	≤ 250	$\leq 0,9$ ako je udio palmitinske kiseline % ≤ 14 $\leq 1,0$ ako je udio palmitinske kiseline % > 14	$\leq 0,10$ $\leq 0,2$	$\leq 2,60$ $\leq 0,25$ $\leq 0,01$	Mm $\leq 3,5$ Mv > 0	
3. Maslinovo ulje lampante	–	$> 2,0$	–	$\leq 300(3)$	$\leq 0,9$ ako je udio palmitinske kiseline % ≤ 14 $\leq 1,1$ ako je udio palmitinske kiseline % > 14	$\leq 0,50$ $\leq 0,3$	–	Mm > 3,5 ⁽²⁾ –	–

4.Rafinirano maslinovo ulje	—	$\leq 0,3$	≤ 5	≤ 350	$\leq 0,9$ ako je udio palmitinske kiseline % ≤ 14 $\leq 1,1$ ako je udio palmitinske kiseline % > 14	—	$\leq 0,3$	—	$\leq 1,10$	$\leq 0,16$	—	—
5. Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja	—	$\leq 1,0$	≤ 15	≤ 350	$\leq 0,9$ ako je udio palmitinske kiseline % ≤ 14 $\leq 1,0$ ako je udio palmitinske kiseline % > 14	—	$\leq 0,3$	—	$\leq 0,90$	$\leq 0,15$	—	—
6.Sirovo ulje kome maslina	—	—	—	> 350 (4)	$\leq 1,4$	—	$\leq 0,6$	—	—	—	—	—
7.Rafinirano ulje kome maslina	—	$\leq 0,3$	≤ 5	> 350	$\leq 1,4$	—	$\leq 0,5$	—	$\leq 2,00$	$\leq 0,20$	—	—

2. Djevičansko maslinovo ulje	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	$\leq$ kamp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	≥ 1000	$\leq 4,5$
3. Maslinovo ulje lampante	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	$\leq 0,10$	$\leq 0,10$	$\leq 0,10$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	—	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	≥ 1000	$\leq 4,5$ (3)
4. Rafinirano maslinovo ulje	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	$\leq 0,20$	$\leq 0,30$	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	$\leq$ kamp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	≥ 1000	$\leq 4,5$
5. Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	$\leq 0,20$	$\leq 0,30$	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	$\leq$ kamp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	≥ 1000	$\leq 4,5$

6. Sirovo ulje komine maslina	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,3$	$\leq 0,2$	$\leq 0,20$	$\leq 0,10$	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	—	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	≥ 500	≥ 2 (4)	$> 4,5$
7. Rafinir ano ulje komine maslina	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,3$	$\leq 0,2$	$\leq 0,40$	$\leq 0,35$	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	$<$ kamp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	≥ 800	≥ 1	$> 4,5$
8. Ulje komine maslina	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,3$	$\leq 0,2$	$\leq 0,40$	$\leq 0,35$	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	$<$ kamp.	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	≥ 600	≥ 1	$> 4,5$

- (1) Druge prisutne masne kiseline (%): palmitinska: 7,5 do 20,0; palmitoleinska: 0,3 do 3,5; heptadekanska: $\leq 0,3$; heptadecenska: $\leq 0,3$; stearinska: 0,5 do 5,0; oleinska: 55,0 do 83,0; linolna: 3,5 do 21,0.
- (2) Suma: delta-5,23-stigmastadienola + klerosterola + beta-sitosterola + sitostanola + delta-5,24-stigmastadienola.
- (3) Ulja s udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se maslinovim uljima lampante ako je ukupni udio alifatskih alkohola ≤ 350 mg/kg ili ako je udio eritriola i uvaola $\leq 3,5\%$.
- (4) Ulja s udjelom voskova između 300 mg/kg i 350 mg/kg smatraju se sirovim uljima komine maslina ako je ukupni udio alifatskih alkohola > 350 mg/kg i ako je udio eritriola i uvaola $> 3,5\%$.

Napomene:

- (a) Rezultati analiza moraju biti izraženi onim brojem decimalnih mjesta kojim je izražena granična vrijednost za pojedino svojstvo. Zadnji broj mora se uvećati za jednu jedinicu ako je broj koji slijedi veći od 4.
- (b) Ako najmanje jedno od svojstava ne odgovara navedenim vrijednostima, ulje se može ili svrstati u drugu kategoriju ili svrstati u ulje smanjenog kvaliteta za svrhe ovog pravilnika.
- (c) Svojstva označena jednom zvjezdicom (*), a odnose se na kvalitet ulja, podrazumijevaju sljedeće:
 - kod djevičanskih maslinovih ulja, ako vrijednost najmanje jednog od označenih svojstava ne zadovoljava graničnu vrijednost, ulje se svrstava u drugu odgovarajuću kategoriju unutar djevičanskih maslinovih ulja.
 - kod maslinovog ulja lampante, dovoljno je da barem jedno od označenih svojstava odgovara propisanim vrijednostima.
- (d) Ako je svojstvo označeno s dvije zvjezdice (**), znači da za sve tipove ulja komine maslina nije neophodno da sva označena svojstva istovremeno udovoljavaju propisanim vrijednostima.

ANEKS Ia.

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

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

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

Minimalni broj primarnih uzoraka koji treba da budu uzeti određen je veličinom serije u skladu s tabelom iz tačke 1.

Veličina primarnog uzorka određuje se na osnovu volumena pojedinačne ambalaže, u skladu s tabelom iz tačke 2.1.

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

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

1. BROJ PRIMARNIH UZORAKA KOJI TREBA UZETI

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

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

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

U slučaju sumnje, treba povećati broj uzetih primarnih uzoraka.

2. SADRŽAJ PRIMARNIH UZORAKA

2.1. Primarni uzorci moraju sadržavati:

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

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

- analize iz aneksa II., III., VIII. i IX. ovog pravilnika,
- analiza iz Aneksa XI. ovog pravilnika,
- druge analize.

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

3. ANALIZE I REZULTATI

- Svaki od primarnih uzoraka iz tačke 1. treba se podijeliti u laboratorijske uzorke, u skladu s tačkom 2.5. norme BAS EN ISO 5555, i analizirati kako slijedi:
 - određivanje slobodnih masnih kiselina, prema članu 3. stav (1) tačka a) ovog pravilnika,
 - određivanje peroksidnog broja, prema članu 3. stav (1) tačka b) ovog pravilnika,
 - spektrofotometrijska analiza, prema članu 3. stav (1) tačka g) ovog pravilnika,
 - određivanje sastava masnih kiselina, prema članu 3. stav (1) tačka h) ovog pravilnika.
- Ako jedan od rezultata analiza iz stava (a) tabele za barem jedan od primarnih uzoraka iz iste serije ne odgovara svojstvima označene kategorije ulja, cijela ta serija smatra se neodgovarajućom.

Ako rezultati analiza iz stava (a) tabele za svaki od primarnih uzoraka uzetih iz iste serije nisu jednaki, uzevši u obzir ponovljivost metoda o kojima je riječ, cijela serija smatra se nehomogenom i svaki primarni uzorak podvrgava se drugim propisanim analizama. U suprotnom, druge propisane analize provode se samo na jednom primarnom uzorku.
- Ako jedan od rezultata analiza iz drugog odlomka tačke (b) ne odgovara svojstvima označene kategorije ulja, cijela ta serija smatra se neodgovarajućom.

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

ANEKS Ib. STABLO ODLUKE ZA UTVRĐIVANJE DA LI UZORAK MASLINOVOG ULJA ODGOVARA OZNAČENOJ KATEGORIJI

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

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

Analize kontaminanata potrebne za utvrđivanje usklađenosti s važećim propisima provode se nezavisno od utvrđivanja usklađenosti sa svojstvima iz Aneksa I. ovog pravilnika.

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

Objašnjenje oznaka korištenih u tabelama:

- dvostruka linija (=) označava smjer koji treba slijediti u slučaju usklađenosti (pozitivan odgovor) s kriterijima iz prethodnog okvira. Tačkasta linija (...) upućuje na alternativni smjer koji se treba slijediti u slučaju neusklađenosti,
- naslovi u okvirima u tabelama 1 do 11 odnose se na analize propisane ovim pravilnikom na osnovu tabela ekvivalencije iz Dodatka I. ovog aneksa,
- slova u zagradama, koja se pojavljuju u kružnim simbolima (negativne odluke) u tabelama 1 do 11, upućuju na napomene iz Dodatka II. ovog aneksa. Slova sama po sebi ne obavezuju na izvršavanje analiza, niti znače vjerodostojnost navedenih pretpostavki.

Maslinovo ulje označeno kao:

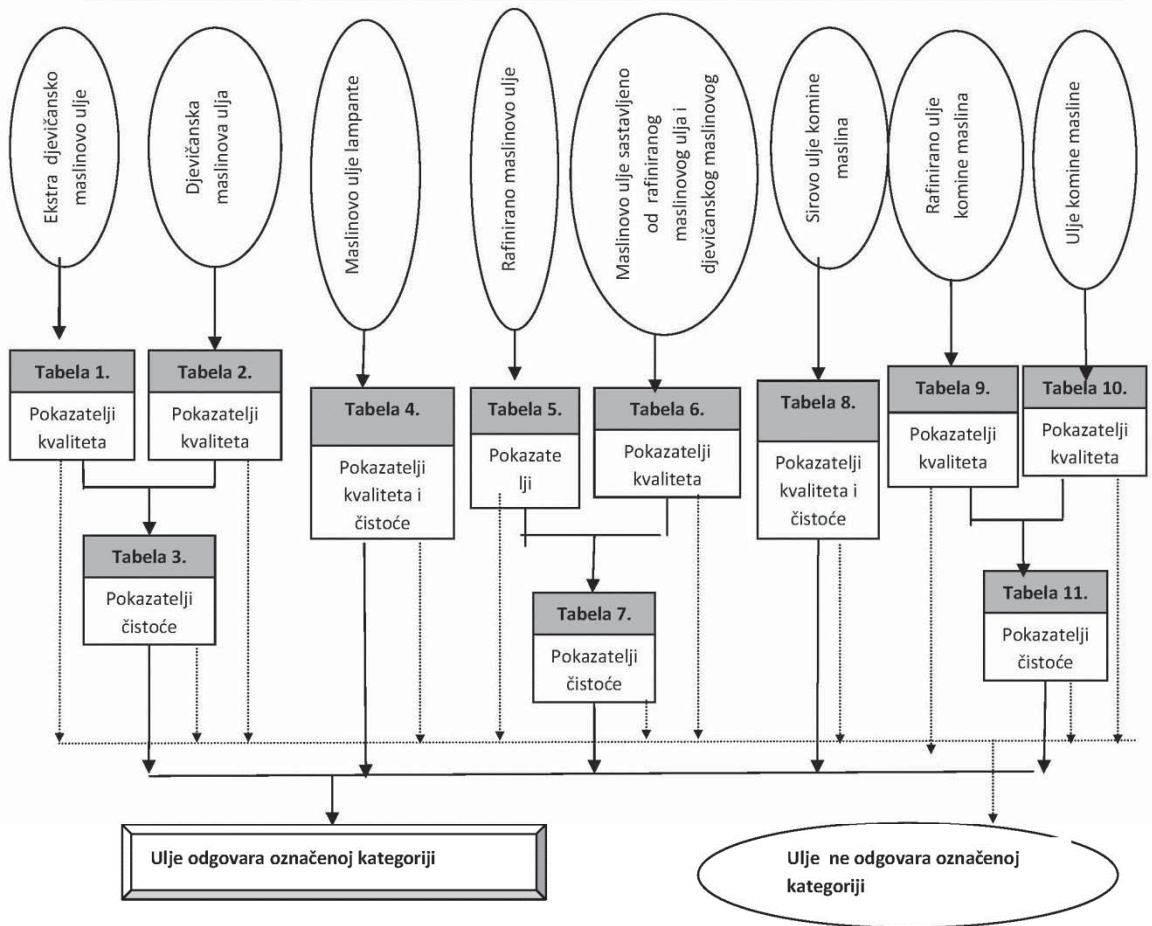


Tabela 1.

**Ekstra djevičansko maslinovo ulje
(Pokazatelj kvaliteta)**

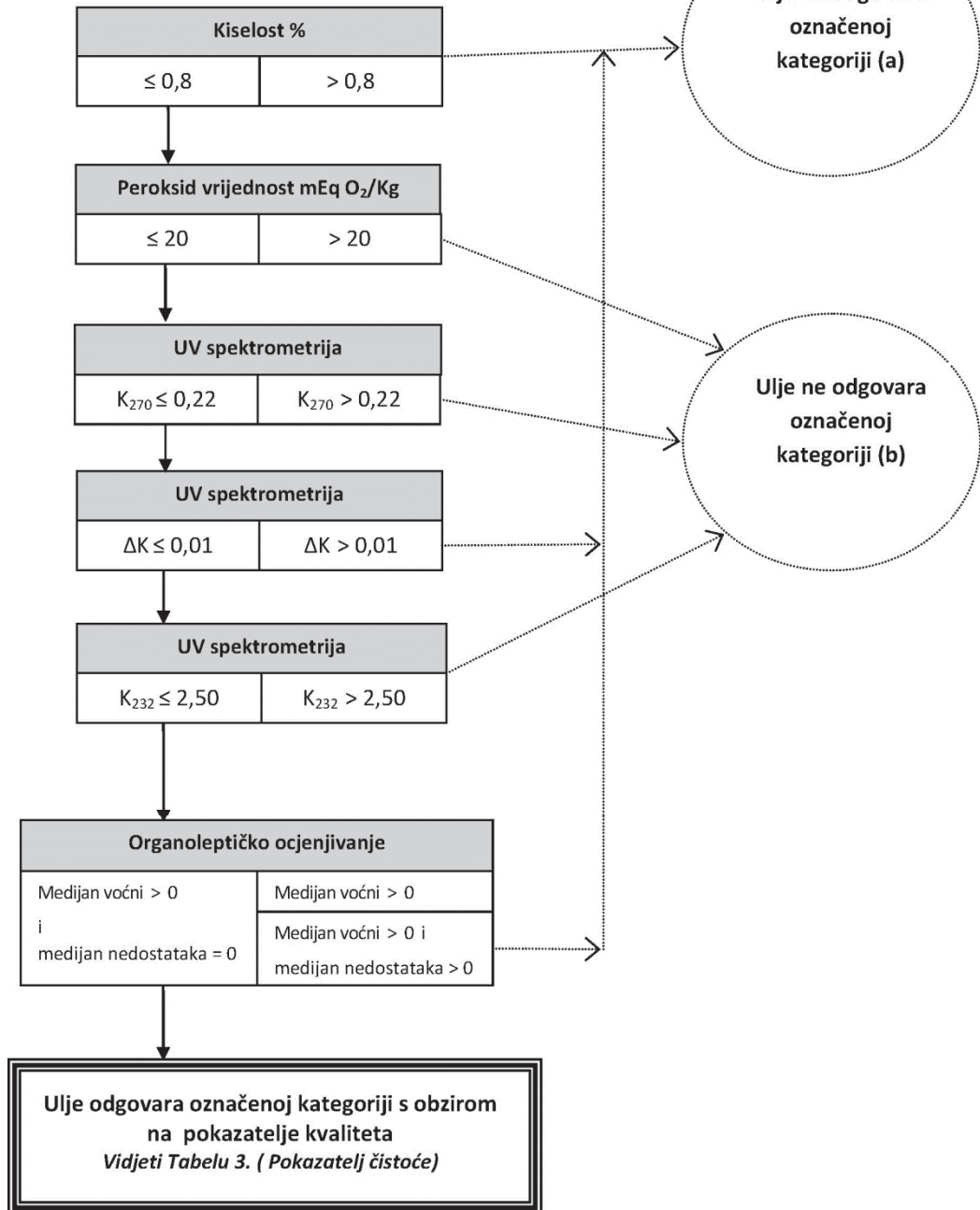


Tabela 2.

Djevičansko maslinovo ulje (pokazatelj kvaliteta)

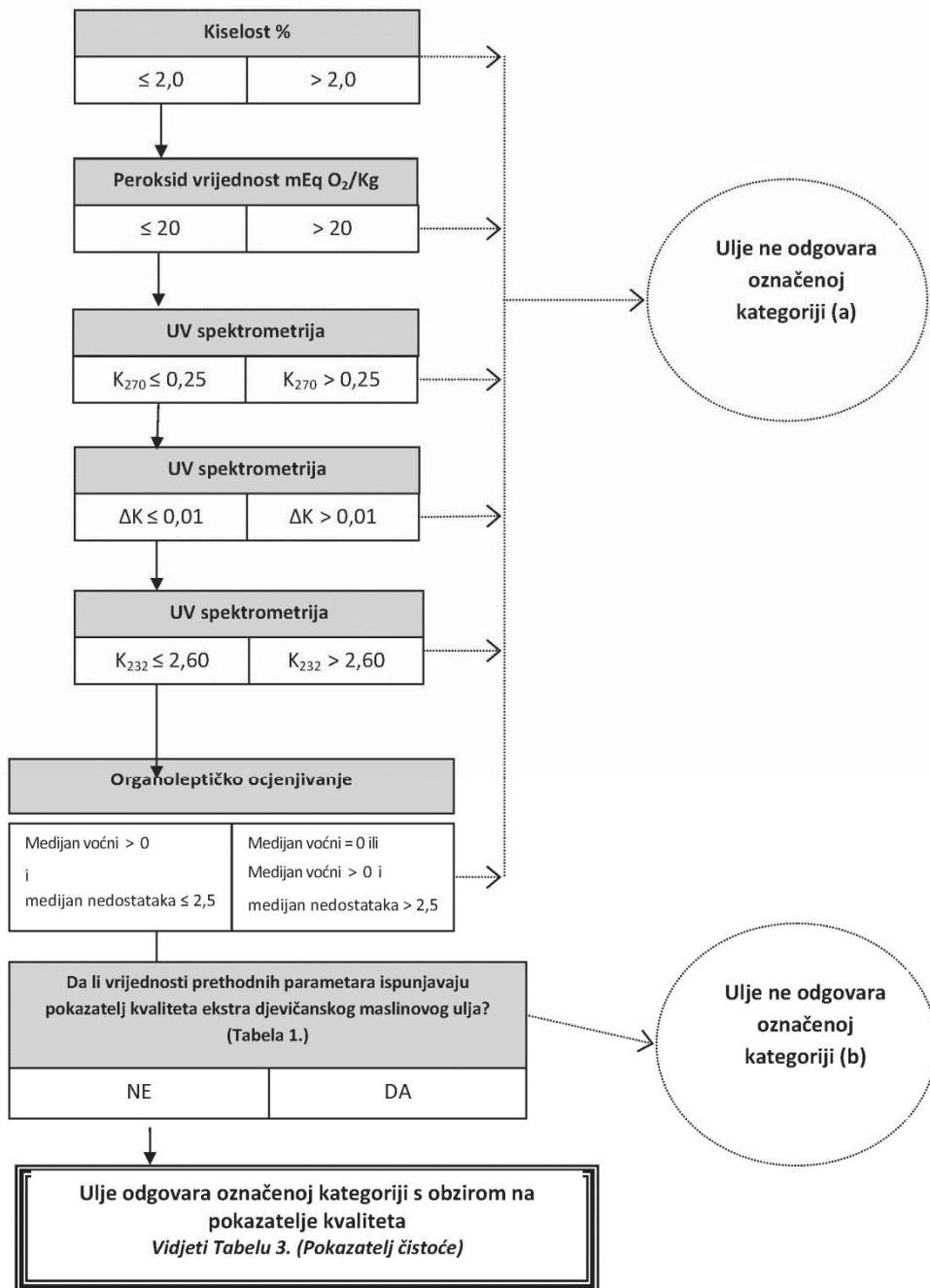


Tabela 3.

Ekstra djevičansko i djevičansko
maslinovo ulje (pokazatelj čistoće)

Pokazatelj kvaliteta (tabela 1. i 2.)	
DA	NE

Ulje ne odgovara
označenoj
kategoriji

3,5 – Stigmastadienes mg/kg	
$\leq 0,15$	$> 0,15$

Ulje ne odgovara
označenoj
kategoriji (a)

Trans izomeri % masnih kiselina	
tC18:1 $\leq 0,05$ t(C18:2+C18:3) $\leq 0,05$	tC18:1 $> 0,05$ t(C18:2+C18:3) $> 0,05$

Sadržaj masnih kiselina	
DA	NE

Ulje ne odgovara
označenoj
kategoriji

Δ ECN42	
$\leq 0,2$	$> 0,2$

Sastav sterola i ukupna vrijednost sterola	
DA	NE

Erythrodiol + uvaol %		
$\leq 2,0$	$2,0 < E+U \leq 4,5$	$> 4,5$

Ulje ne odgovara
označenoj kategoriji
(b)

Voskovi mg/kg	
≤ 250	> 250

Ulje odgovara označenoj kategoriji

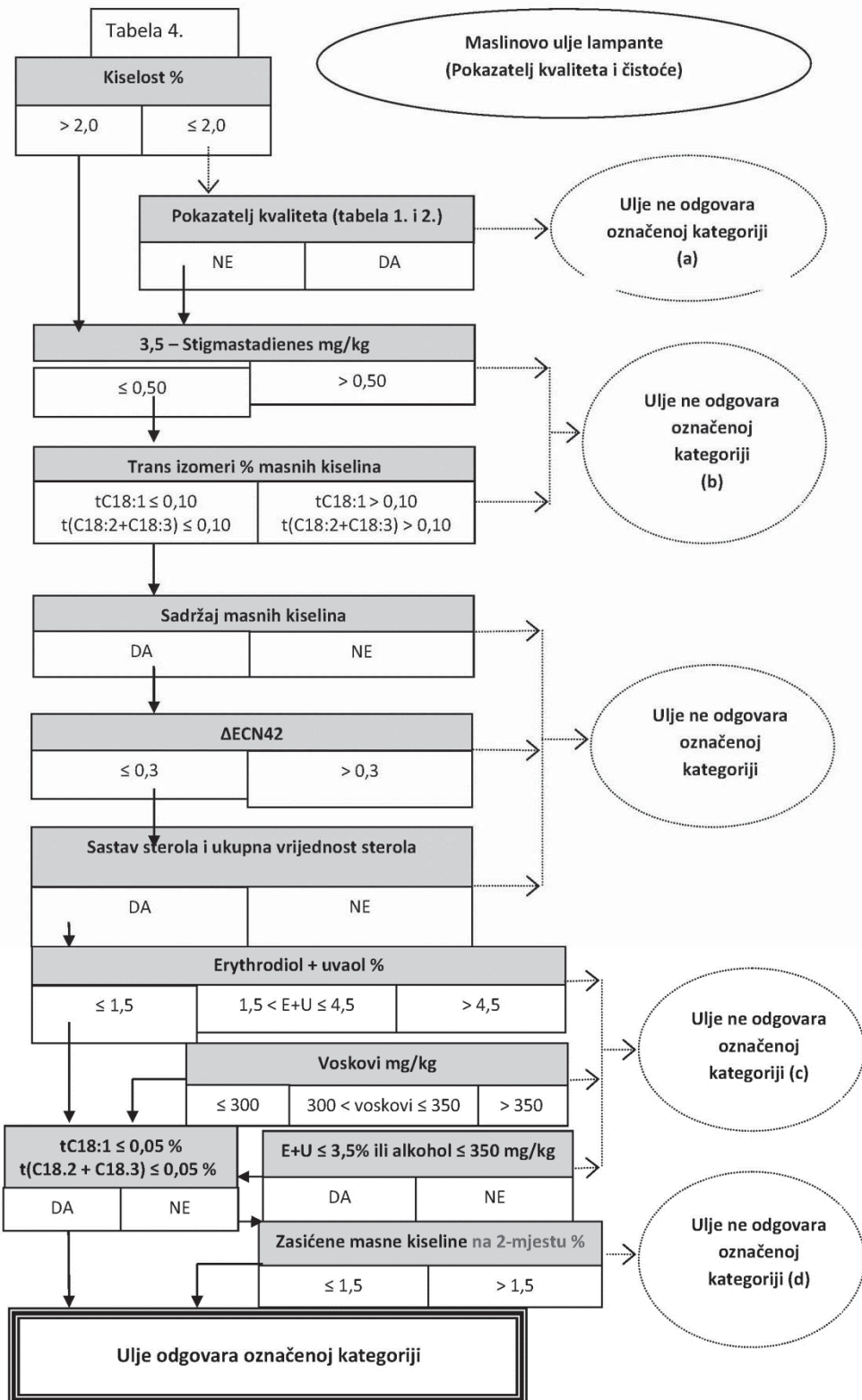


Tabela 5.

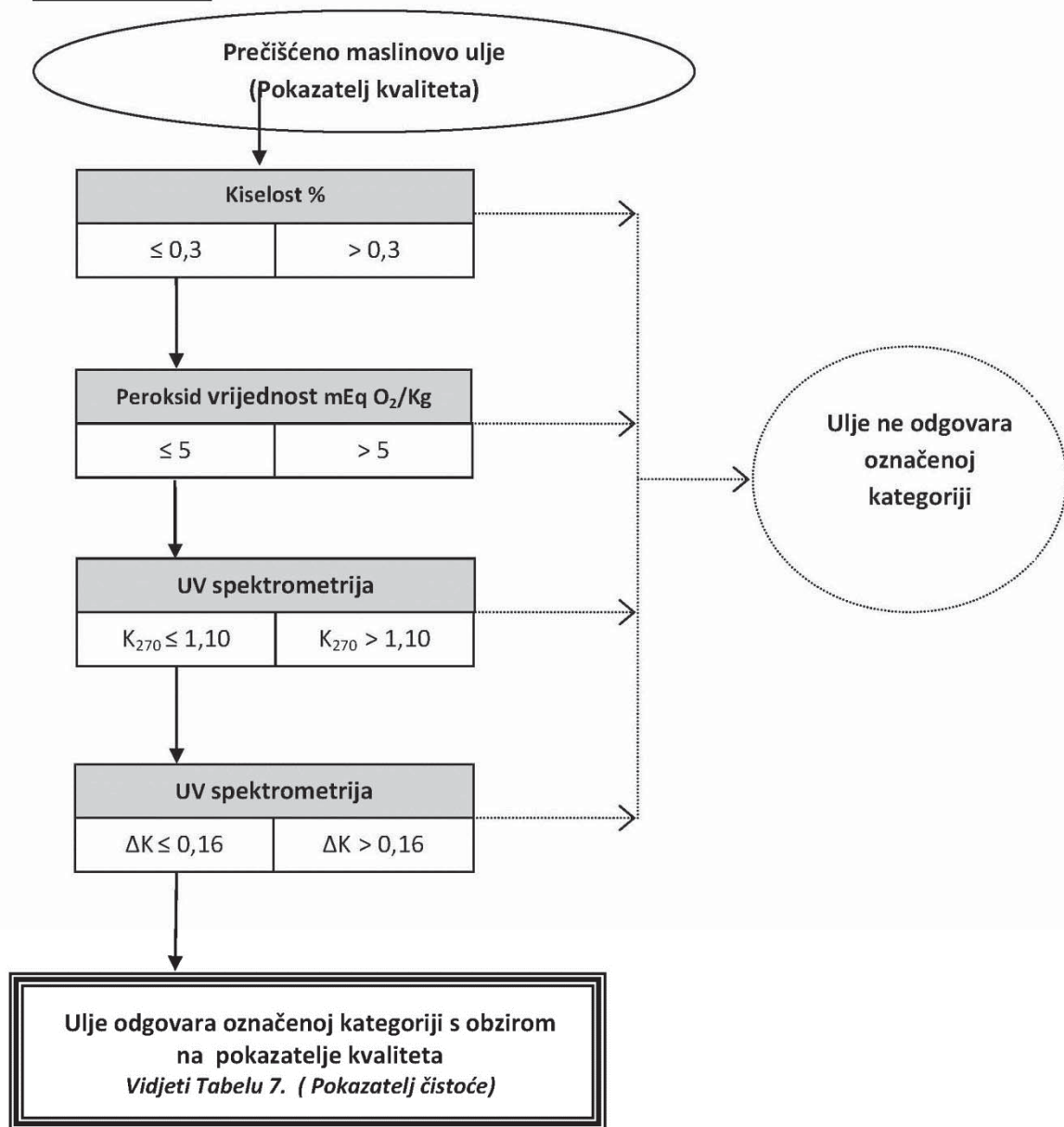


Tabela 6.

**Maslinovo ulje sastavljeno od prečišćenog
maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja
(Pokazatelj kvaliteta)**

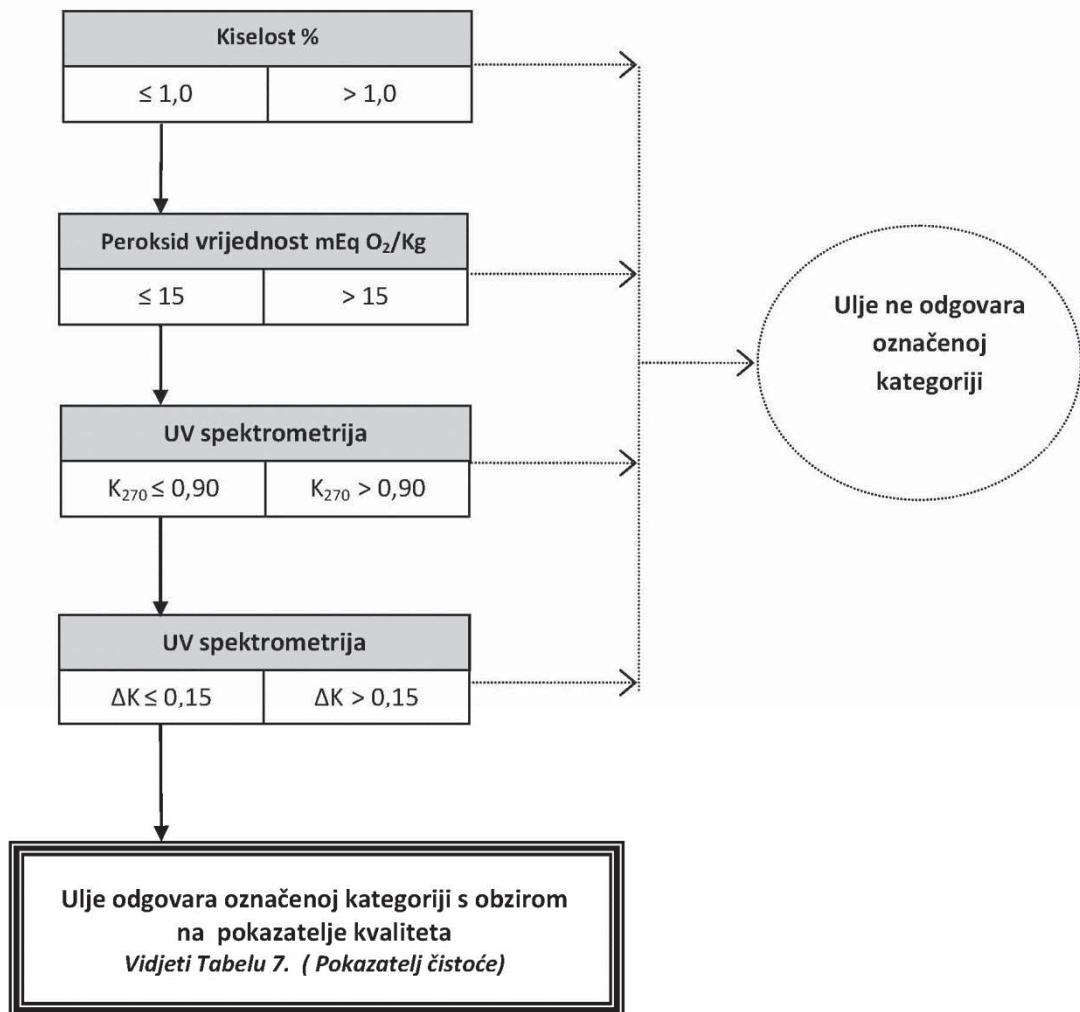


Tabela 7.

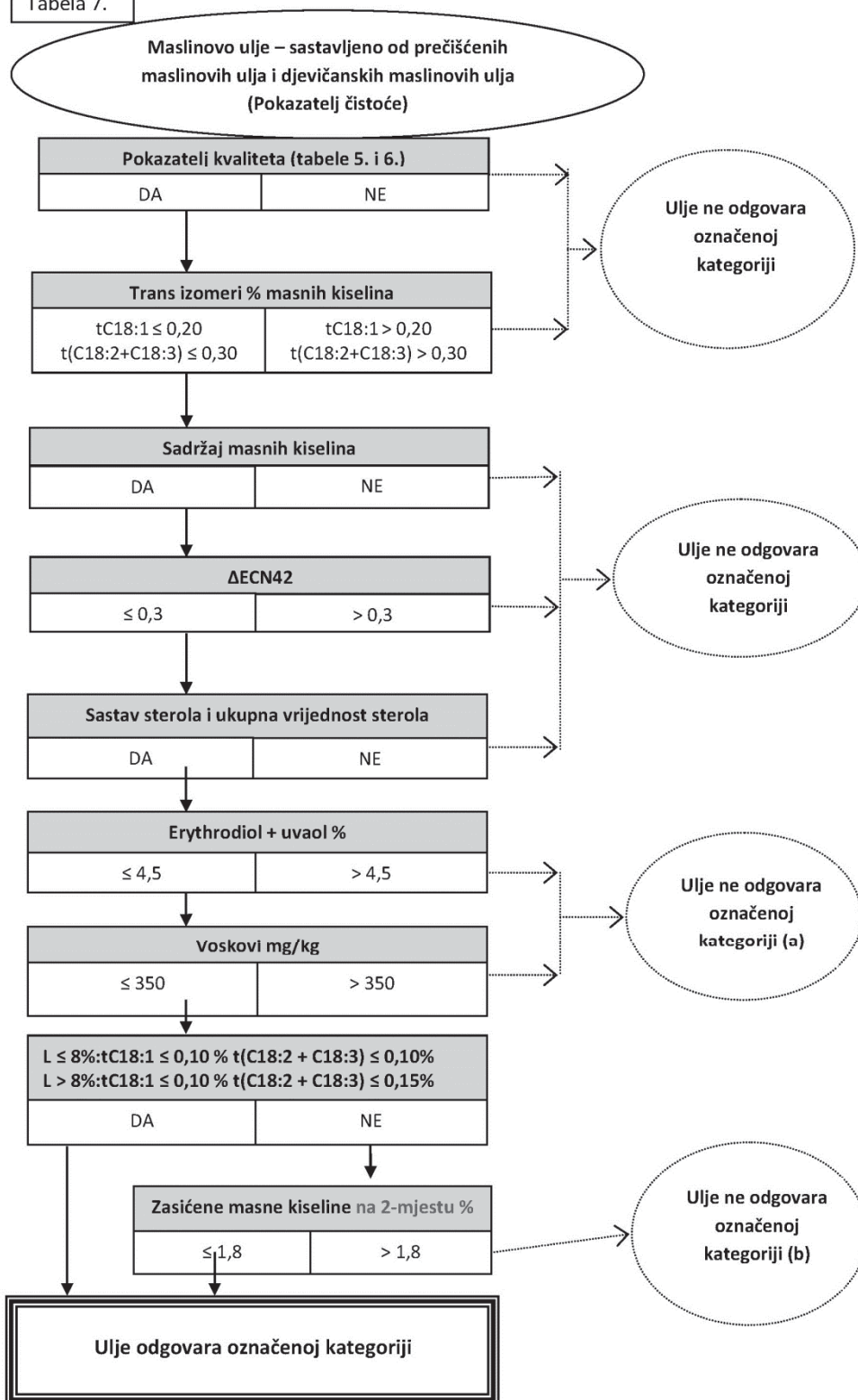


Tabela 8.

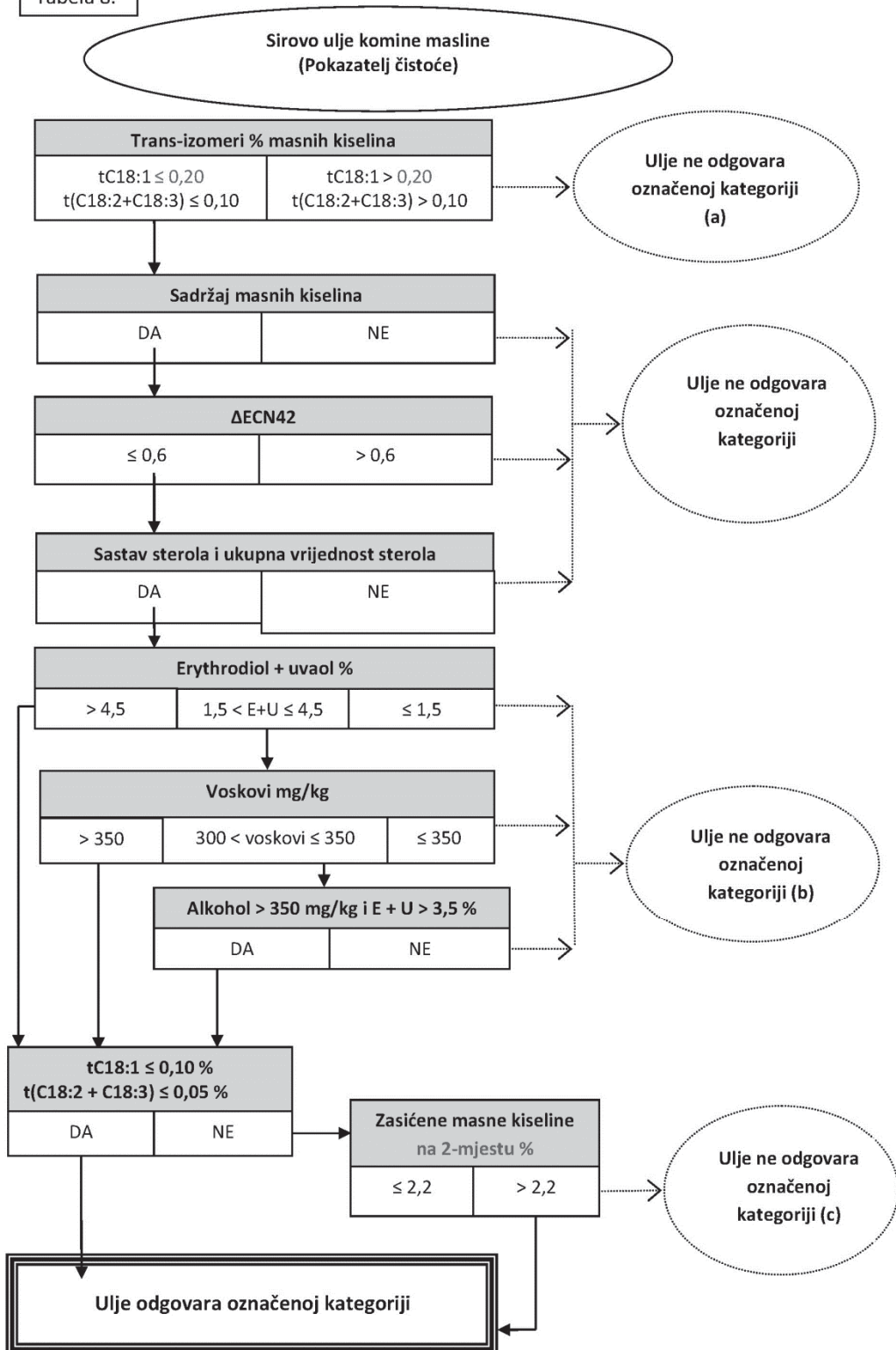


Tabela 9.

**Prečišćeno ulje komine masline
(Pokazatelj kvaliteta)**

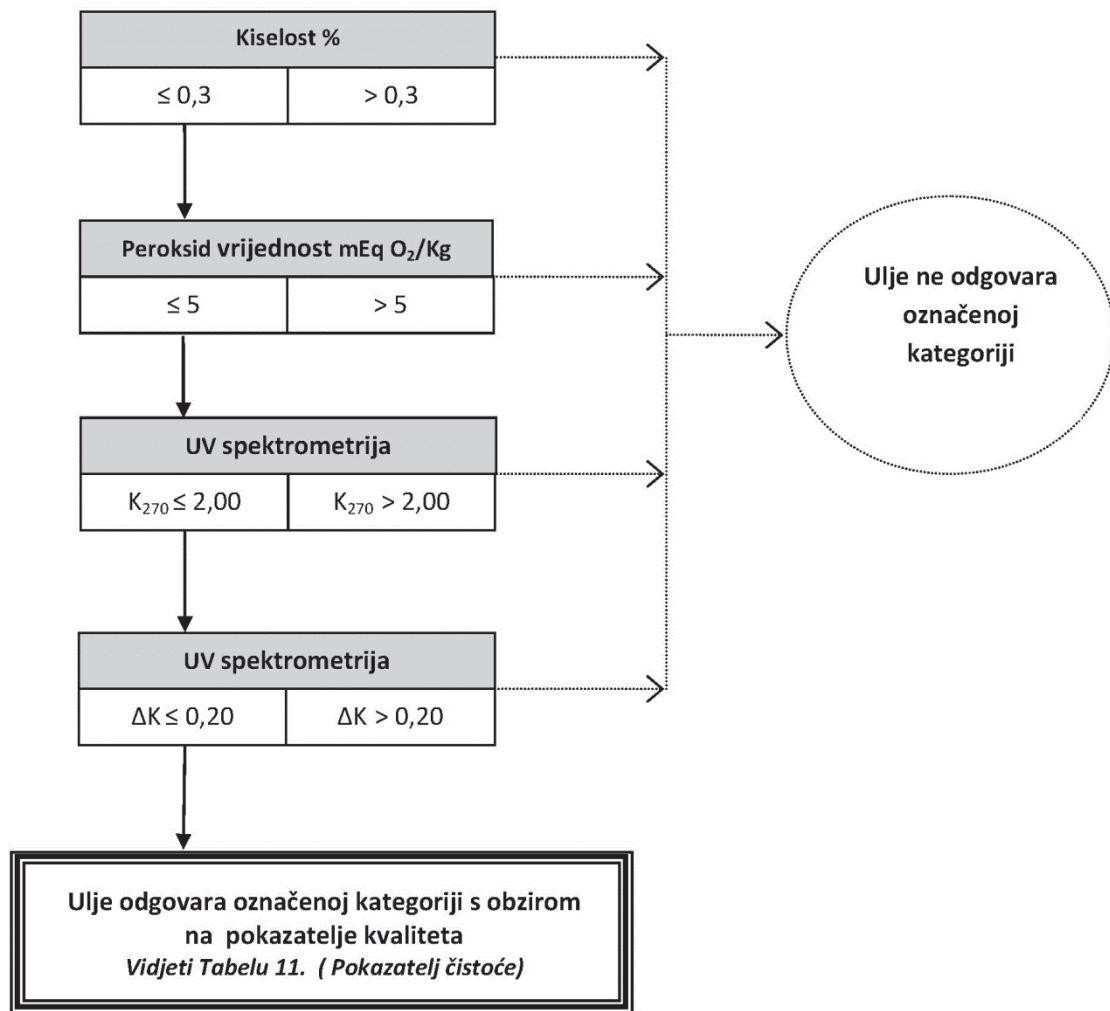


Tabela 10.

**Prečišćeno ulje komine masline
(Pokazatelj kvaliteta)**

Kiselost %	
$\leq 1,0$	$> 1,0$

Peroksid vrijednost mEq O ₂ /Kg	
≤ 15	> 15

UV spektrometrija	
$K_{270} \leq 1,70$	$K_{270} > 1,70$

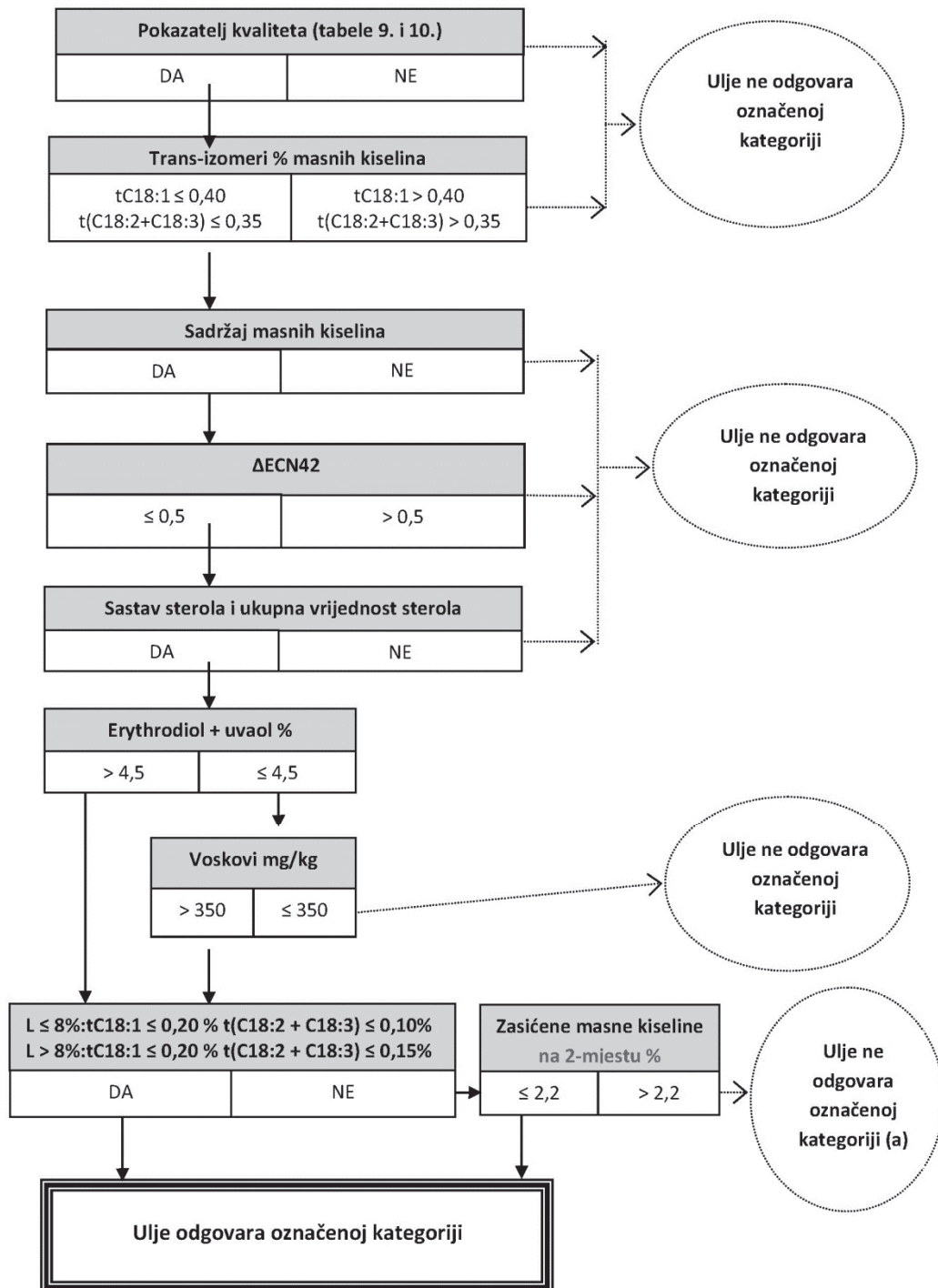
UV spektrometrija	
$\Delta K \leq 0,18$	$\Delta K > 0,18$

**Ulje odgovara označenoj kategoriji s obzirom
na pokazatelje kvaliteta
*Vidjeti Tabelu 11. (Pokazatelj čistoće)***

**Ulje ne odgovara
označenoj
kategoriji**

Tabela 11.

Prečišćeno ulje komine masline i ulje komine masline
(Pokazatelj čistoće)



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

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

DODATAK 2

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

1. SVRHA

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

1.1. Princip

Uzorak se otopi u smjesi rastvora, a prisutne slobodne masne kiseline titiraju se etanolnim rastvorom kalij hidroksida.

1.2. Reagensi

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

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

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

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

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

1.2.2. Kalij hidroksid, standardizirani etanolni rastvor c(KOH) oko 0,1 mol/l ili, ako je potrebno, c(KOH) oko 0,5 mol/l.

Tačna koncentracija etanolnog rastvora kalijevog hidroksida mora biti poznata i provjerena neposredno prije upotrebe. Treba se koristiti rastvor pripremljen bar pet dana prije upotrebe i dekantiran u bocu od smeđeg stakla s gumenim čepom. Rastvor treba da bude bezbojan ili blijedožute boje.

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

Tabela 1.

- Vidjeti djevičansko maslinovo ulje ili maslinovo ulje lampante (pokazatelji kvaliteta Tabela 2., ili pokazatelji kvaliteta i čistoće Tabela 4.)
- Vidjeti maslinovo ulje lampante (pokazatelji kvaliteta i čistoće Tabela 4.)

Tabela 2.

- Vidjeti maslinovo ulje lampante (pokazatelji kvaliteta i čistoće Tabela 4.)
- Vidjeti ekstra djevičansko maslinovo ulje (pokazatelji kvaliteta Tabela 1.)

Tabela 3.

- Prisustvo rafiniranih ulja (maslinovog ili drugih)
- Prisustvo ulja komine maslina

Tabela 4.

- Vidjeti ekstra djevičansko maslinovo ulje i djevičansko maslinovo ulje (pokazatelji kvaliteta Tabela 1. i Tabela 2.)
- Prisustvo rafiniranih ulja (maslinovog ili drugih)
- Prisustvo ulja komine maslina
- Prisustvo esterificiranih ulja

Tabela 7.

- Prisustvo ulja komine maslina
- Prisustvo esterificiranih ulja

Tabela 8.

- Prisustvo rafiniranih ulja (maslinovog ili drugih)
- Vidjeti maslinovo ulje lampante (pokazatelji kvaliteta i čistoće Tabela 4.)

- Prisustvo esterificiranih ulja

Tabela 11.

- Prisustvo esterificiranih ulja

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

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

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

1.3. Aparatura

- Uobičajena laboratorijska aparatura koja uključuje:
- 1.3.1. Analitičku vagu;
- 1.3.2. Erlenmeyerovu tikvicu od 250 ml;
- 1.3.3. Biretu od 10 ml, s podjelom na 0,05 ml.

1.4. Postupak

1.4.1. Priprema uzorka za analizu

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

1.4.2. Uzorak

Količina uzorka zavisi od očekivane kiselosti, prema sljedećoj tabeli:

Očekivana kiselost	Masa uzorka (g)	Tačnost vaganja (g)
< 1	20	0,05
1 do 4	10	0,02
4 do 15	2,5	0,01
15 do 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Uzorak se odvaže u Erlenmeyerovu tikvicu (1.3.2.)

1.4.3. Određivanje

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

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

Napomena 1. Standardizirani etanolni rastvor kalijevog hidroksida (1.2.2.) može se zamijeniti vodenim rastvorom kalijevog ili natrijevog hidroksida, pod uslovom da volumen vode dodate prilikom titracije ne izazove razdvajanje faza.

Napomena 2. Ako potrebna količina 0,1 mol/l rastvora kalijevog hidroksida prelazi 10 ml, upotrijebiti rastvor koncentracije 0,5 mol/l.

Napomena 3. Ako se rastvor zamuti tokom titracije, dodati dovoljno smjese rastvarača (1.2.1.) da se dobije bistar rastvor.

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

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

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

gdje je:

V = volumen standardiziranog rastvora kalijevog hidroksida upotrijebljen pri titraciji, u ml;

c = tačna koncentracija standardiziranog rastvora kalijevog hidroksida, u mol/l;

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

m = masa uzorka u g.

Rezultat predstavlja aritmetičku sredinu dva određivanja.

ANEKS III.

ODREĐIVANJE PEROKSIDNOG BROJA

1. SVRHA

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

2. OBLAST PRIMJENE

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

3. DEFINICIJA

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

4. PRINCIP

Tretiranje uzorka, otopljenog u sirćetnoj kiselini i hlороformu, rastvorom kalijevog jodida. Titriracija oslobođenog joda standardnom rastvorom natrijevog tiosulfata.

5. APARATURA

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

Napomena: Brušene površine ne smiju se masiti.

5.1. Staklena kapsula od 3 ml.

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

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

6. REAGENSI

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

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

6.3. Kalijev jodid, zasićeni vodenі rastvor, svježe pripremljen, bez prisutnog joda i jodata.

6.4. Natrijev tiosulfat, standardni vodenі rastvor koncentracije 0,01 mol/l ili 0,002 mol/l, precizno standardiziranog vodenog rastvora, standardiziran neposredno prije upotrebe.

6.5. Rastvor škroba, koncentracije 10 g/l, svježe pripremljen od prirodnog topljivog škroba.

7. UZORAK

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

8. POSTUPAK

Ispitivanje se treba vršiti pod difuznim dnevnim ili umjetnim svjetlom. U staklenu kapsulu (5.1.) ili, u nedostatku kapsule, u tikvicu (5.2.), odvaga se uz tačnost od 0,001 g masa uzorka prema sljedećoj tabeli, zavisno od očekivanog peroksidnog broja:

Očekivani peroksidni broj		Masa uzorka (g)
(mmol O2/kg)	(meq O2/kg)	
0 do 6	0 do 12	5,0 do 2,0
6 do 10	12 do 20	2,0 do 1,2
10 do 15	20 do 30	1,2 do 0,8
15 do 25	30 do 50	0,8 do 0,5
25 do 45	50 do 90	0,5 do 0,3

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

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

Za svaki uzorak provode se dva određivanja.

Istovremeno se provodi slijepa proba. Ako volumen utrošen za titraciju slijepe probe prelazi 0,05 ml rastvora natrijevog tiosulfata koncentracije 0,01 mol/l (6.4.), potrebno je zamijeniti nečiste reagentse.

9. IZRAŽAVANJE REZULTATA

Peroxidni broj (PV), izražen u milimolima aktivnog kisika po kilogramu, dat je izrazom:

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

Peroxidni broj, izražen u miliekivalentima aktivnog kisika po kilogramu, dat je izrazom:

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

gdje je:

V = volumen standardiziranog rastvora natrijevog tiosulfata u ml (6.4.), korigiran za vrijednost slijepe probe;

T = tačna molarost upotrijebljenog rastvora natrijevog tiosulfata (6.4.);

m = masa uzorka u g.

Rezultat predstavlja aritmetičku sredinu dva određivanja.

ANEKS IV.

ODREĐIVANJE UDJELA VOSKOVA KAPILARNOM PLINSKOM HROMATOGRAFIJOM

1. OBIM I OBLAST PRIMJENE

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

2. PRINCIP

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

3. APARATURA

3.1. Erlenmeyerova tikvica od 25 ml.

3.2. Staklena kolona za plinsku hromatografiju, unutrašnjeg promjera 15,0 mm i dužine 30-40 cm sa slavinom.

3.3. Plinski hromatograf s kapilarnom kolonom, opremljen sistemom za direktno injektiranje uzorka u kolonu, koji se sastoji od:

3.3.1. Termostatske komore za kolone, opremljene regulatorom temperature.

3.3.2. Hladnog injektora za direktno unošenje uzorka u kolonu.

3.3.3. Plameno-jonizacijskog detektora s pretvaračem – pojačalom.

3.3.4. Pisača-integratora koji se može povezati s pretvaračem-pojačalom (3.3.3.), s vremenom odziva manjim od 1 sekunde, s promjenjivom brzinom papira. (Također je moguće koristiti kompjuterizirane sisteme koji omogućavaju dobivanje podataka o plinskoj hromatografiji putem računara.)

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

3.4. Mikrošprica od 10 μl za direktno unošenje uzorka u kolonu, s čvrsto fiksiranom iglom

3.5. Elektrovibrator

3.6. Rotacioni vakuum-uparivač

3.7. Visokotemperaturna peč (mufolna peč)

3.8. Analitička vaga osjetljivosti od ± 0,1 mg

3.9. Uobičajeno laboratorijsko stakleno suđe.

4. REAGENSI

4.1. Silikagel veličine zrna 60 – 200 μm.

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

4.2. n-heksan, za hromatografiju,

4.3. etil eter, za hromatografiju,

4.4. n-heptan, za hromatografiju.

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

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

4.6. Plin nosilac: vodik ili helij, čistoće za plinsku hromatografiju,

4.7. pomoćni plinovi:

– čisti vodik, za plinsku hromatografiju,

– čisti zrak, za plinsku hromatografiju

5. POSTUPAK

5.1. Priprema hromatografske kolone

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

Rastvarač ispuštati dok ne dostigne 1 mm iznad gornjeg nivoa absorbenta, potom s daljnjih 70 ml n-heksana ispirati da se uklone prirodno prisutni n-alkani. Potom započeti hromatografsko eluiranje dok se ne sakupi 180 ml mješavine n-heksana/etil etera (omjer 99:1, v/v), pri brzini protoka od oko 15 kapi svakih 10 sekundi na sobnoj temperaturi, 22 ± 4°C.

Napomena:

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

- Za vizuelnu provjeru ispravnog eluiranja voskova, uzorku u rastvoru može se dodati 100 μl 1%-tnog rastvora sudana u mješavini n-heksana/etil etera (omjer 99:1, v/v). S obzirom da bojilo ima retenciju

između voskova i triglicerida, kada obojenje dostigne dno kolone, eluiranje treba obustaviti jer su svi voskovi eluirali.

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

5.2. Analiza plinskom hromatografijom

5.2.1. Pripremni radovi

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

Ako se kolona koristi prvi put, potrebno ju je najprije kondicionirati. Pustiti da kroz kolonu prođe malo plina, potom uključiti plinski 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 plina, zapaliti plamen, povezati na elektronski pisač (3.3.4.), postaviti temperaturu komore za kolonu, regulirati detektor, itd.) i zabilježiti signal pri osjetljivosti koja je najmanje dvostruka od one koju zahtijeva analiza. Bazna linija mora biti linearna, bez pikova ili odstupanja.

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

5.2.2. Izbor radnih uslova

Radni uslovi općenito su sljedeći:

- temperatura kolone:

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

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

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

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

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

5.3. Provođenje analize

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

5.4. Identifikacija pikova

Identifikacija pojedinačnih pikova mora se zasnivati na vremenu zadržavanja, poređenjem s vremenima zadržavanja poznatih mješavina voskova analiziranih pod istim uslovima.

Na slici je hromatogram voskova djevičanskog maslinovog ulja.

5.5. Određivanje udjela

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

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

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

gdje je:

A_x = površina pika pojedinog estera u kvadratnim milimetrima;

A_s = površina pika internog standarda u kvadratnim milimetrima;

m_s = masa dodatog internog standarda, u miligramima;

m = masa uzorka za analizu, u gramima.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

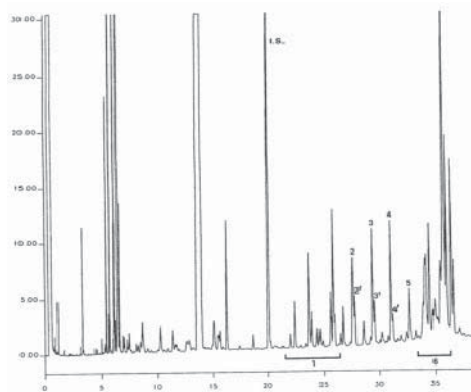
Ukupan udio različitih voskova, tj. alifatskih estera C₄₀ do C₄₆ izražava se u mg/kg (ppm).

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

Rezultati treba da budu izraženi na jednu decimalu.

Slika

Hromatogram voskova maslinovog ulja⁽¹⁾



Legenda:

I.S. = lauril arahidat

1. = diterpenski estser

2 + 2' = esteri C₄₀

3 + 3' = esteri C₄₂

4 + 4' = esteri C₄₄

5. = esteri C₄₆

6. = sterolni esteri i triterpenski alkohol

⁽¹⁾ Nakon eluiranja sterolnih estera, hromatogram ne smije pokazivati signifikantne pikove (trigliceridi)

DODATAK

ODREĐIVANJE LINEARNE BRZINE PLINA

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

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

ODREĐIVANJE SASTAVA I UDJELA STEROLA KAPILARNOM PLINSKOM HROMATOGRAFIJOM **1. OBIM I OBLAST PRIMJENE**

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

2. PRINCIP METODE

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

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

3. APARATURA

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

3.2. Lijeveći za odjeljivanje od 500 ml.

3.3. Tikvice od 250 ml.

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

3.5. Ultraljubičasta svjetiljka s talasnim dužinama od 366 ili 254 nm.

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

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

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

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

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

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

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

3.10.3. Plameno-jonizacijski detektor i pretvarač s pojačalom;

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

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

3.12. Mikrošprica za plinsku hromatografiju od 10 μ l, s čvrsto fiksiranom iglom.

4. REAGENSI

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

4.2. Dietil eter, analitičke čistoće.

4.3. Bezvodni natrijev sulfat, analitičke čistoće.

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

4.5. Kalijev hidroksid, etanolni rastvor koncentracije 0,2 mol/l. Otopi se 13 g kalijevog hidroksida u 20 ml destilirane vode i nadopuni etanolom do jednog litra.

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. Dietil eter, za hromatografiju (Vidjeti 5.2.2.)

4.10. Hloroform, analitičke čistoće (Vidjeti 5.2.2.)

4.11. Referentni rastvor za tankoslojnu hromatografiju: kolesterol ili fitosteroli, 2%-tni rastvor u hloroformu.

4.12. 2,7-diklorfluorescein, 0,2%-ni rastvor u etanolu. Doda se nekoliko kapi etanolnog rastvora kalijevog hidroksida koncentracije 2 mol/l, radi postizanja bazične reakcije.

4.13. Bezvodni piridin, za hromatografiju.

4.14. Heksametil disilazan.

4.15. Trimetilklorosilan.

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

4.17. α – kolestanol, 0,2%-tni rastvor (m/V) u hloroformu (interni standard).

4.18. Plin nosilac: vodik ili helij, plinsko-hromatografske čistoće.

4.19. Pomoćni plinovi:

– vodik, plinsko-hromatografske čistoće,

– zrak, plinsko-hromatografske čistoće.

5. POSTUPAK

5.1. Priprema neosapunjivog.

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

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

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

5.1.2. Doda se 50 ml etanolnog rastvora kalijevog hidroksida koncentracije 2 mol/l, tikvica se spoji na povratno hladilo te se zagrijava u vodenog kupki do laganog vrenja uz stalno snažno miješanje, do pojave osapunjenja (rastvor postaje bistar). Nakon toga nastavi se sa zagrijavanjem još 20 minuta, a zatim se doda 50 ml destilirane vode kroz hladilo, odvoji hladilo i tikvica, ohladi na približno 30°C.

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

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

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

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

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

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

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

5.2. Odjeljivanje sterolne frakcije.

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

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

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

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

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

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

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

5.2.5. Ploča se lagano i ravnomjerno poprskava rastvorom 2,7-diklorofluoresceina. Kada se ploča posmatra pod ultraljubičastim svjetlom, može se identificirati traka sterola poređenjem s mrljom referentnog rastvora. Rubovi trake uzduž ruba fluorescencije označe se crnom olovkom.

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

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

Ostatak u epruveti sastoji se od sterolne frakcije.

5.3. Priprema trimetilsilil etera.

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

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

5.3.2. Epruveta se začepi i pažljivo protrese (bez preokretanja) do potpunog otapanja sterola. Ostavi se bar 15 minuta na sobnoj temperaturi te zatim centrifugira nekoliko minuta. Bistar rastvor spreman je za analizu plinskom hromatografijom.

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

5.4. Plinsko-hromatografska analiza.

5.4.1. Priprema kolone.

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

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

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

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

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

5.4.2. Izbor radnih uslova.

5.4.2.1. Opći radni uslovi su sljedeći:

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

Ovi uslovi mogu se prilagođavati svojstvima kolone i plinskog hromatografa tako da se dobiju hromatogrami koji ispunjavaju sljedeće zahtjeve:

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

vremenu zadržavanja od 1,02 može kvantificirati pomoću okomice.

3.3.3. Postupak analize

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

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

5.4.4. Identifikacija pikova

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

Steroli se eluiraju sljedećim redoslijedom: holesterol, brasikasterol, 24-metilenholesterol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, Δ7-kampesterol, Δ5,23-stigmastadienol, klerosterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ5-avenasterol, Δ5,24-stigmastadienol, Δ7-stigmastenol, Δ7-avenasterol.

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

Slike 1 i 2 prikazuju tipične hromatograme nekih ulja.

5.4.5. Kvantitativno određivanje

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

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

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

Gdje je:

A_x = površina pika sterola x;

A_s = površina pika α-kolestanola;

m_s = masa dodanog α-kolestanola, u mg;

m = masa uzorka upotrijebljena za analizu, u g.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

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

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

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

gdje je:

A_x = površina pika za x;

ΣA = ukupna površina pikova za sterole.

DODATAK

ODREĐIVANJE LINEARNE BRZINE PLINA

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

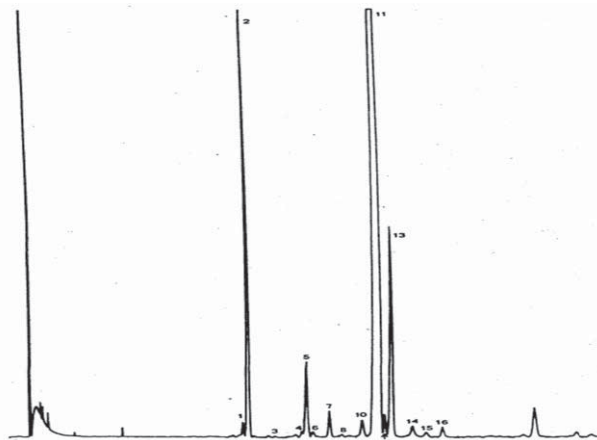
Linearna brzina u cm/s dana je s L/ tM, gdje je L dužina kolone u cm, a tM izmjereno vrijeme u sekundama.

Tabela 1.

Relativna vremena zadržavanja sterola

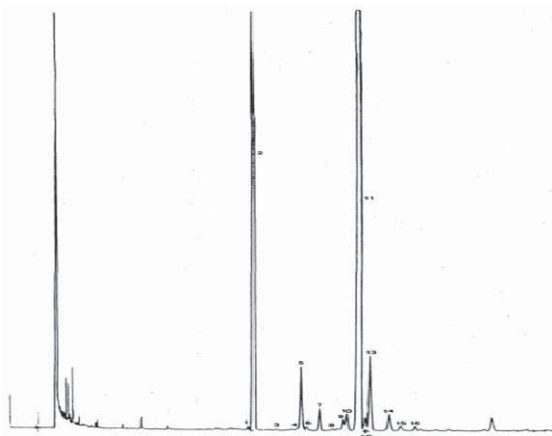
Pik	Identifikacija		Relativno vrijeme zadržavanja	
			Kolona SE-54	Kolona SE-52
1	holesterol	Δ-5-kolesten-3β-ol	0,67	0,63
2	kolestanol	5α-kolestan-3β-ol	0,68	0,64
3	brasikasterol	[24S]-24-metil-Δ-5,22-kolestadien-3β-ol	0,73	0,71
4	24-metilenholesterol	24-metilen-Δ-5,24-kolesten-3β-ol	0,82	0,80
5	kampesterol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

Slika 1
Plinski hromatogram sterolne frakcije nerafiniranog maslinovog ulja



Slika 2

Plinski hromatogram sterolne frakcije rafiniranog maslinovog ulja



ANEKS VI. ODREĐIVANJE ERITRODIOLA I UVAOLA UVOD

Eritrodiole (pod čim se uobičajeno podrazumijevaju glikoli eritrodiole i uvaol zajedno) je sastojak neosapunjive frakcije, karakterističan za neke vrste masti. U maslinovom ulju ekstrahiranom rastvorima nalazi se u znatno većim koncentracijama nego u drugim uljima, kao što je presovano maslinovo ulje ili ulje grožđanih sjemenki, koja ga također sadrže, tako da njegovo prisustvo može potvrditi prisustvo maslinovog ulja ekstrahiranom rastvorima.

1. OBIM I OBLAST PRIMJENE

Ova metoda opisuje postupak određivanja eritrodiole u mastima.

2. PRINCIP METODE

Mast se saponificira etanolnim rastvorom kalijevog hidroksida. Neosapunjiva frakcija ekstrahira se dietil eterom i pročisti propuštanjem kroz kolonu napunjenu aluminijevim oksidom.

Neosapunjivo se podvrgava tankoslojnoj hromatografiji na ploči sa silikagelom dok se ne izdvoje trake koje odgovaraju frakcijama sterola i eritrodiole. Dobiveni steroli i eritrodiole prevode se u trimetilsilil eter (TMSE) te se smjesa analizira plinskom hromatografijom.

Rezultat se izražava kao procenat eritrodiole u smjesi eritrodiole i sterola.

3. APARATURA

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

4. REAGENSI

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

4.2. Referentni rastvor eritrodiole, 0,5%-tni rastvor u hloroformu.

5. POSTUPAK

5.1. Priprema neosapunjivog

Kako je opisano u tački 5.1.2. Aneksa V.

5.2. Izdvajanje eritrodiole i sterola.

5.2.1. Vidjeti tačku 5.2.1. Aneksa V.

5.2.2. Vidjeti tačku 5.2.2. Aneksa V.

5.2.3. Priprema 5%-tnog rastvora neosapunjivog u hloroformu.

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

Na jednom kraju ploče nanese se nekoliko mikrolitara rastvora holesterola i eritrodiole, koje služe kao referentne mrlje.

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

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

5.2.5. Ploča se lagano i ravnomjerno popraska alkoholnim rastvorom 2,7-diklorofluoresceina.

Posmatranjem ploče pod ultraljubičastim svjetlom i poređenjem s referentnim mrljama mogu se identificirati trake sterola i eritrodiole, koje se označe tačkom malo van područja fluorescencije.

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

5.3. Priprema trimetilsilil etera

Kako je opisano u tački 5.3. Aneksa V.

5.4. Analiza plinskom hromatografijom

Kako je opisano u tački 5.4. navedene metode. Radni uslovi plinsko-hromatografske analize moraju biti tako podešeni tako da se pored razdvajanja sterola odvoje i TMSE eritrodiole i uvaole.

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

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

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

Gdje je: A_1 = površina pika eritrodiole; A_2 = površina pika uvaole; $\sum A_{\text{sterola}}$ = ukupna površina pikova sterola. Rezultat se izražava na jedno decimalno mjesto.

ANEKS VII. ODREĐIVANJE UDJELA 2 – GLICERIL MONOPALMITATA

1. OBIM I OBLAST PRIMJENE

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

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

2. PRINCIP

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

3. APARATURA I PRIBOR

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

4. REAGENSI

- 4.1. Silikagel veličine zrnaca od 0,063 – 0,200 mm (70/280 mesha) pripremljen na sljedeći način:
staviti silikagel u porculansku posudu i sušiti u sušioniku na 160°C , 4 sata, ohladiti u eksikatoru na sobnoj temperaturi. Dodati 5% vode na masu silikagela kako slijedi: odvagati 152 g silikagela u tikvicu i dodati 8 g destilirane vode, čep i lagano protresti da se voda ravnomjerno rasporedi.
Ostaviti da stoji najmanje 12 sati prije upotrebe.
- 4.2. n-heksan (za hromatografiju)
- 4.3. Isopropanol
- 4.4. Vodeni rastvor isopropanola, 1/1 (v/v)
- 4.5. Pankreasna lipaza. Mora imati aktivnost između 2,0 i 10 lipaznih jedinica po mg. (Pankreasna lipaza, s aktivnošću od 2,0 – 10 lipaznih jedinica po mg enzima su dostupne na tržištu)
- 4.6. Puferski rastvor tris-hidroksimetilaminometana; 1 M vodeni rastvor, podešen s konc. HCl (1/1 v/v) na pH 8 (provjeriti potencijometrom)
- 4.7. Natrijev holat, 0,1% vodeni rastvor enzimskog kvaliteta (rastvor se mora uoptrijebiti u roku od dvije sedmice od izrade)
- 4.8. Kalcijev hlorid, 22%-tni vodeni rastvor
- 4.9. Dietil eter za hromatografiju
- 4.10. Rastvor za razvijanje: mješavina n-heksana/dietil etera (87:13 v/v)
- 4.11. Natrijev hidroksid, 12% masenog rastvora
- 4.12. Fenolfalein, 1% rastvor u etanolu
- 4.13. Plin nosilac: vodik ili helij, za plinsku hromatografiju
- 4.14. Pomoćni plinovi: vodik, čistoće najmanje 99%, bez vlage i organskih tvari, i zrak, za plinsku hromatografiju, isto čisto
- 4.15. Reagens za silaniziranje: mješavina piridina/heksame-tilsilazane, trimetilklorosilan 9/3/1 (v/v/v). (Rastvori pripremljeni

za upotrebu dostupni su na tržištu. Mogu se upotrebljavati i drugi reagensi za silaniziranje, posebno bistri metilsilil trifloracetamid + 1% trimetilklorosilan, razrijeđen jednakim volumenom bezvodnog piridina.)

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

5. METODA

- 5.1. Priprema uzorka
 - 5.1.1. Ulje sa slobodnim masnim kiselinama manjim od 3% prije hromatografije nije potrebno neutralizirati na silikagel koloni. Ulje sa slobodnim masnim kiselinama većim od 3% mora se neutralizirati kao u tački 5.1.1.1.
 - 5.1.1.1. Staviti 50 g ulja i 200 ml n-heksana u lijevak zapremine 1 000 ml (3.13.). Dodati 100 ml izopropanola i količinu rastvora 12% natrijevog nitroksida (4.11) koja odgovara udjelu slobodnim masnim kiselinama (SMK) u ulju uvećanom za 5%. Jednu minutu snažno tresti. Dodati 100 ml destilirane vode, ponovo protresti i ostaviti da stoji.
Nakon razdvajanja slojeva, ukloni se donji sloj sapuna, kao i međuslojevi (sluz, netopive tvari). Heksanski rastvor neutraliziranog ulja ispirati dodavanjem rastvora 1/1 (v/v) izopropanol/voda (4.4.) u obrocima od 50-60 ml do nestanka ljubičaste boje fenolfaleina.
Najveći dio heksana ukloniti vakuum destilacijom (koristeći se rotacionim vakuum-uparivačem, naprimjer) i ulje prenijeti u tikvicu od 100 ml (3.5.). Sušiti ulje u vakuumu dok se rastvarač potpuno ne ukloni.
Nakon okončanja postupka, kiselost ulja treba biti manja od 0,5%.
 - 5.1.2. Staviti 1,0 g ulja pripremljenog kao što je već navedeno u Erlenmeyerovu tikvicu zapremine 25 ml (3.1.) i otopiti u 10 ml rastvora za razvijanje (4.10.). Ostaviti rastvor da stoji najmanje 15 minuta prije kolonske hromatografije sa silikagelom.
Ako je rastvor mutan, centrifugirati ga kako bi se osigurali optimalni uslovi za hromatografiju. (Mogu se koristiti gotova pakiranja 500 mg silikagela SPE pripremljena za upotrebu).
 - 5.1.3. Priprema hromatografska kolone
Staviti oko 30 ml rastvora za razvijanje (4.10.) u kolonu (3.3.), u donji dio kolone staviti komad vate i sa staklenim štapićem istisnuti zrak.
U čaši pripremiti rastvor 25 g silikagela (4.1.) u oko 80 ml rastvora za razvijanje i pomoću lijevka naliti u kolonu.
Provjeriti da li je sav silikagel prenesen u kolonu; isprati rastvorom za razvijanje (4.10.), otvoriti slavinu i ispustiti tekućinu do nivoa oko 2 mm iznad silikagela.
 - 5.1.4. Kolonska hromatografija
U Erlenmeyerovu tikvicu volumena 25 ml (3.1.) tačno odvagati 1,0 g uzorka pripremljenog kao u tački 5.1.
Otopiti uzorak u 10 ml rastvora za razvijanje (4.10.). Naliti rastvor u hromatografsku kolonu pripremljenu kao u tački 5.1.3. Izbjegavati "uzburkavanje" površine kolone.
Otvoriti slavinu i pustiti rastvor uzorka kroz kolonu dok ne dostigne nivo silikagela. Eluirati s 150 ml rastvora za razvijanje. Podesiti brzinu protoka na 2 ml/min (tako da 150 ml prođe kroz kolonu za oko 60-70 min).
Eluat sakupiti u prethodno izvaganu tikvicu od 250 ml. Rastvarač upariti pod vakuumom, tragove rastvarača ukloniti u struji dušika.
Izvagati i izračunati dobiveni ekstrakt.
(Ako se koristi komercijalni silikagel SPE pripremljen za upotrebu, primijeniti sljedeću metodu: staviti 1 ml rastvora (5.1.2.) u pripremljene patrone s 3 ml n-heksana).
Nakon filtriranja rastvora, razviti s 4 ml n-heksana/dietil etera 9/1(v/v).

Sakupiti eluat u epruvetu zapremine 10 ml i upariti do suhog u struji dušika.

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

5.2. Hidroliza pankreasnom lipazom

5.2.1. U epruvetu za centrifugiranje odvagati 0,1 g ulja pripremljenog kao u tački 5.1. Dodati 2 ml puferkog rastvora (4.6.), 0,5 ml rastvora natrijevog holata (4.7.) i 0,2 ml rastvora kalcijevog hlorida, dobro promućkati nakon svakog dodavanja. Zatvoriti epruvetu čepom od brušenog stakla i staviti u termostat pri 40 ± 0,5°C.

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

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

5.3. Priprema silaniziranih derivata i plinska hromatografija

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

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

5.3.3. Nakon 20 minuta dodati 1 do 5 ml n-heksana (zavisno od hromatografskih uslova): dobiveni rastvor spreman je za plinsku hromatografiju.

5.4. Plinska hromatografija

Radni uslovi:

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

5.4.1. Identifikacija pikova

Pojedini monogliceridi identifikiraju se prema retencijom vremenu i poređenjem s dobivenim vremenom za standardne monogliceridne smjese pod istim uslovima.

5.4.2. Kvantitativna ocjena

Površina svakog pika izračunava se korištenjem elektronskog integratora.

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

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

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

gdje je:

A_x = površina pika koja odgovara gliceril monopalmitatu

$\sum A$ = zbroj površina pikova svih monoglicerida

Rezultat mora biti izražen na jednu decimalu.

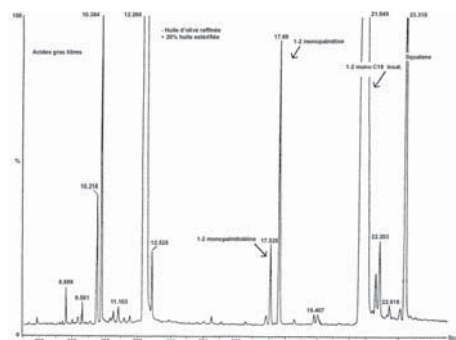
7. IZVJEŠTAJ O ANALIZI

Izvještaj o analizi mora navoditi:

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

Slika 1.

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



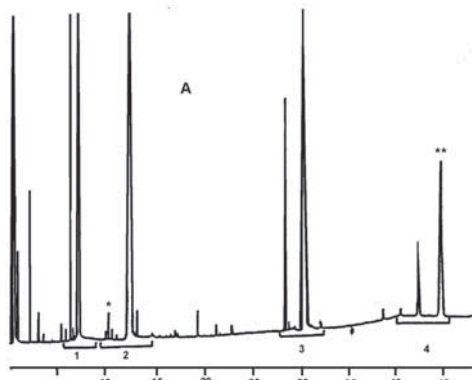
Legenda: "acides gras libres" = slobodne masne kiseline; "Huile d'olive raffinée + 20% huile estérifiée" = rafinirano maslinovo ulje + 20% esterificirano ulje; "1-2 monopalmitoléine" = 1-2 monopalmitolein; "1 2 mono C18 insat." = nezasićeni 1-2 mono C18

Slika 2.

Hromatogram:

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

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



Legenda:

- 1 = Slobodne masne kiseline
- 2 = Monogliceridi
- 3 = Digliceridi

4 = Trigliceridi

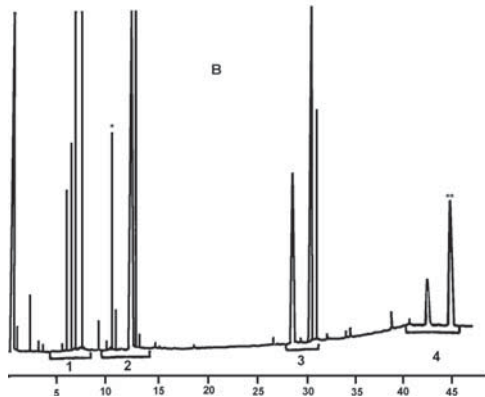
* = 2-monopalmitin

** = Triglicerid C₅₄

hromatogram:

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

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



Legenda:

1 = Slobodne masne kiseline

2 = Monogliceridi

3 = Digliceridi

4 = Trigliceridi

* = 2-monopalmitin

** = Triglicerid C₅₄

8. BILJEŠKE

Bilješka 1. PRIPREMA LIPAZE

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

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

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

Bilješka 2. PRAĆENJE AKTIVNOSTI LIPAZE

Pripraviti emulziju maslinovog ulja kako slijedi:

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

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

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

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

Dodati alikvot rastvora praha lipaze u vodu (0,1 g/ml lipaze). čim pH metar očita 8,3, pokrenuti hronometar i dodavati rastvor natrijevog hidroksida kap po kap brzinom kojim se održava pH na 8,3. Očitavati svake minute potrošenu zapreminu rastvora.

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

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

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

gdje je:

A aktivnost u jedinicama lipaze /mg

V mililitri rastvora natrijevog hidroksida koncentracije 0,1 mol/l u minuti (izračunato na osnovu dijagrama)

N titar rastvora natrijevog hidroksida

m masa u mg ispitne lipaze.

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

ANEKS VIII.

SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA U ULTRALJUBIČASTOM PODRUČJU

PREDGOVOR

Spektrofotometrijsko određivanje u ultraljubičastom području može pružiti podatke o kvalitetu masti, njenom stanju očuvanosti i promjenama uzrokovanim tehnološkim procesima.

Do apsorbancije na talasnim dužinama navedenim u metodi dolazi zbog prisustva konjugiranih dienskih i trienskih sustava. Te apsorbancije izražene su kao specifične ekstinkcije E1% 1 cm (ekstinkcija 1%-tnog rastvora masti u specficiranom rastvaraču, debljine od 1 cm) i dogovorno se označavaju s K (također i kao "koeficijent ekstinkcije").

1. OBIM

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

2. PRINCIP METODE

Mast se otopi u predviđenom rastvoru te se izmjeri ekstinkcija rastvora na određenim talasnim dužinama u odnosu na čisti rastvarač. Iz spektrofotometrijskih očitavanja računaju se specifične ekstinkcije.

3. OPREMA

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

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

3.3. Odmjerne tikvice od 25 ml.

3.4. Hromatografska kolona s gornjim dijelom dužine 270 mm i promjera 35 mm i donjim dijelom dužine 270 mm i promjera približno 10 mm.

4. REAGENSI

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

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

4.2. Bazični aluminijev oksid za hromatografiju na koloni, pripremljen i provjeren kako je opisan u Dodatku 1.

4.3. n-heksan, za hromatografiju.

5. POSTUPAK

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

5.2. Od tako pripremljenog uzorka tačno se odvaga oko 0,25 g u odmjernu tikvicu od 25 ml, nadopuni do oznake specificiranim rastvaračem i homogenizira. Dobiveni rastvor treba biti savršeno bistar. U slučaju da se uoči opalescencija ili mutnoća, potrebno je rastvor brzo filtrirati preko filter-papira.

5.3. Kiveta se napuni pripremljenim rastvorom te se mjere ekstinkcije pri odgovarajućim talasnim dužinama između 232 i 276 nm, koristeći upotrijebljeni rastvarač kao referencu.

Očitane vrijednosti ekstinkcija treba da se kreću u intervalu od 0,1 do 0,8. U suprotnom, treba ponoviti mjerenja radeći prema potrebi s koncentriranijim ili razrijeđenijim rastvorima.

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

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

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

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

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

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

gdje je:

K_{λ} = specifična ekstinkcija pri talasnoj dužini λ ;

E_{λ} = izmjerena ekstinkcija pri talasnoj dužini λ ;

c = koncentracija rastvora u g/100 ml;

s = debljina kivete u cm.

Rezultati se izražavaju s dva decimalna mjesta.

6.2. Spektrofotometrijska analiza maslinovog ulja u skladu sa službenom metodom u važećim propisima specificira određivanje specifične ekstinkcije u rastvoru izo-okтана pri talasnim dužinama 232 i 270 nm i određivanje K prema sljedećem izrazu:

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

gdje je K_m specifična ekstinkcija pri talasnoj dužini m , tj. talasnoj dužini oko 270 nm na kojoj je zabilježena maksimalna apsorbanacija.

DODATAK I.

PRIPREMA ALUMINIJEVOG OKSIDA I PROVJERA NJEGOVE AKTIVNOSTI

A.1.1. Priprema aluminijevog oksida

Aluminijev oksid, prethodno osušen u peći pri temperaturi 380-400°C u trajanju od 3 sata, prenese se u posudu koja se može hermetički zatvoriti, doda destilirana voda u količini od 5 ml na

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

A.1.2. Provjera aktivnosti aluminijevog oksida

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

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

Ako nakon prolaska kroz kolonu smjesa ima specifičnu ekstinkciju veću od 0,11 pri 268 nm, aluminijev oksid je prihvatljiv, a ako ne, treba povećati nivo dehidracije.

DODATAK II.

KALIBRACIJA SPEKTROFOTOMETRA

A.2. Redovno se mora provjeravati podešavanje talasne dužine i tačnost odziva uređaja (najmanje svakih šest mjeseci).

A.2.1. Talasna dužina može se provjeravati pomoću živine vakuum svjetiljke ili prikladnim filterima.

A.2.2. Kako bi se provjerio odziv fotoćelije i fotomultiplikatora, postupa se na sljedeći način: izvaga se 0,2000 g čistog kalijevog hromata za spektrometriju i otopi u rastvoru kalijevog hidroksida, koncentracije 0,05 mol/l u odmjernoj tikvici od 1000 ml te nadopuni do oznake. Uzme se tačno 25 ml dobivenog rastvora, prenese u odmjernu tikvicu od 500 ml i razrijedi do oznake istim rastvorom kalijevog hidroksida.

Mjeri se ekstinkcija tako dobivenog rastvora pri 275 nm, koristeći rastvor kalijevog hidroksida kao referencu. Ekstinkcija izmjerena uz korištenje kivete od 1 cm treba biti $0,200 \pm 0,005$.

ANEKS IXa.

ODREĐIVANJE METIL ESTERA MASNIH KISELINA PLINSKOM HROMATOGRAFIJOM

1. OBIM

Ovom metodom daju se opća uputstva za primjenu plinske hromatografije, uz upotrebu punjenih ili kapilarnih kolona, za određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava smjese metil estera masnih kiselina dobivenih u skladu s metodom opisanom u Aneksu IXb.

Ova metoda ne može se primijeniti na polimerizirane masne kiseline.

2. REAGENSI

2.1. Plin nosilac

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

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

2.2. Pomoćni plinovi

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

2.2.2. Zrak ili kisik, bez organskih nečistoća.

2.3. Referentni standard

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

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

3. APARATURA

Data uputstva odnose se na uobičajenu opremu koja se koristi za plinsku hromatografiju, uz upotrebu punjenih i/ili kapilarnih kolona i plameno-jonizacijskog detektora. Pogodna je svaka aparatura kojom se postižu tačnost i rezolucija u skladu s tačkom 4.1.2.

3.1. Plinski hromatograf

Plinski hromatograf treba sadržavati sljedeće elemente:

3.1.1. Sistem za injektiranje

Koristi se sistem za injektiranje:

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

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

3.1.2. Pečnica

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

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

3.1.3. Punjena kolona

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

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

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

Napomena 4. Može se koristiti sistem s dvostrukim kolonama.

3.1.3.2. Punjenje, koje sadrži sljedeće elemente:

- (a) čvrsti nosač: dijatomejska zemlja, isprana kiselinom i silanizirana ili drugi prikladni inertni čvrsti nosač sa uskim rasponom veličine čestica (raspon od 25 μm u granicama od 125 do 200 μm), pri čemu prosječna veličina čestica zavisi od unutrašnjeg promjera i dužine kolone;
- (b) stacionarna faza: poliesterni tip polarne tekućine (npr. dietilenglikol polisukcinat, butandiol polisukcinat, etilenglikol poliadiipat itd.), cijanosilikoni ili bilo koja druga tekućina koja omogućava traženo hromatografsko razdvajanje (vidjeti tačku 4.). Stacionarna faza treba činiti 5 do 20% (m/m) punjenja. Za neka razdvajanja može se koristiti nepolarna stacionarna faza.

3.1.3.3. Kondicioniranje kolone

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

3.1.4. Kapilarna kolona

3.1.4.1. Kapilara, od materijala inertnog prema tvarima koje se analiziraju (obično se koristi staklena ili kvarna kapilara). Unutrašnji promjer treba biti između 0,2 i 0,8 mm. Unutrašnja površina treba da bude odgovarajuće obrađena (npr. priprema

površine, inaktivacija) prije nanošenja sloja stacionarne faze. U većini slučajeva dovoljna je dužina od 25 mm.

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

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

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

3.1.4.3. Umetanje i podešavanje kolone

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

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

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

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

3.2. Šprica

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

3.3. Pisač

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

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

3.4. Integrator

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

4. POSTUPAK

Postupci opisani u tačkama 4.1. do 4.3. odnose se na upotrebu plameno-jonizacijskog detektora.

Alternativno se može koristiti plinski hromatograf s katarometrom (detektorom toplotne vodljivosti). Radni uslovi moraju se u tom slučaju izmijeniti kako je opisano u tački 6.

4.1. Uslovi analize

4.1.1. Odabir optimalnih radnih uslova

4.1.1.1. Punjena kolona

Pri izboru radnih uslova potrebno je uzeti u obzir:

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

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

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

U pravilu, odnos protoka vodika u plameno-jonizacijskom detektoru prema protoku plina nosioca varira od 1:2 do 1:1, zavisno od promjera kolone. Protok kisika je 5 – 10 puta veći od protoka vodika.

Tabela 1.

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

Tablica 2

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

4.1.1.2. Kapilarna kolona

Svojstva kapilarnih kolona (učinkovitost i propusnost) znače da razdvajanje spojeva i trajanje analize u velikoj mjeri zavise od protoka plina nosioca u koloni. Stoga je neophodno optimizirati radne uslove podešavanjem ovog parametra (ili jednostavnije promjene pritiska), zavisno od toga da li se želi poboljšati razdvajanje ili postići veća brzina analize.

4.1.2. Određivanje broja teoretskih učinkovitosti i rezolucije (vidjeti sliku 1.).

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

Temperatura kolone i protok plina nosioca odaberu se tako da maksimum pika metil stearata bude zabilježen oko 15 minuta nakon pika rastvarača. Upotrijebi se dovoljna količina smjese metil estera, tako da pik metil stearata dostiže oko ¾ pune skale.

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

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

i rezolucija, R, koristeći izraz:

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

gdje je:

dr₁ zadržavanje udaljenosti u milimetrima od početka hromatograma do maksimuma pika metil stearata;

ω₁ i ω₂ su širine, u milimetrima, pikova metil stearata odnosno metil oleata, mjereno između sjecišta tangenti u tačkama infleksije krivulje s baznom linijom;

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

i indeks rezolucije, I_r, prema izrazu

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

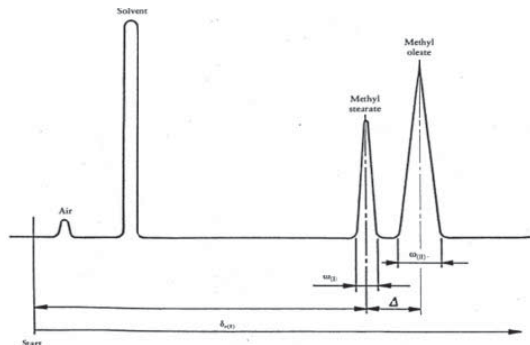
gdje je:

a = visina najmanjeg pika, mjerena od bazne linije;

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

Slika 1.

Hromatogram za određivanje broja teoretskih tavana (učinkovitosti) i rezolucije



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

4.2. Količina uzorka za ispitivanje

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

U slučaju estera koji nisu otopljeni, pripremi se rastvor od približno 100 mg/ml u heptanu hromatografskog kvaliteta, i injektira 0,1 do 1 ml tog rastvora.

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

4.3. Analiza

Općenito, radni uslovi treba da budu oni definirani u tački 4.1.1.

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

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

Ako je potrebno, preporučuje se da se analiza izvrši na dvije faze različitih polarnosti kako bi se potvrdilo odsustvo maskiranih pikova, naprimjer u slučaju istovremenog prisustva C_{18:3} i C_{20:0}, ili konjugiranih C_{18:3} i C_{18:2}.

4.4. Priprema referentnog hromatograma i referentnih grafova

Analizira se referentni standard mješavine (2.3.) u istim radnim uslovima kao i za uzorak, i izmjeri se vrijeme zadržavanja udaljenosti za masne kiseline u standardu. Na polulogaritamskom papiru konstruiraju se, za svaki stepen nezasićenosti posebno,

grafovi koji prikazuju visnost logaritma vremena ili zadržavanja udaljenosti kao funkcije broja C-atoma. U izotermalnim uslovima, grafovi za ravnolančane kiseline istog stepena nezasićenosti treba da budu ravne linije. Ove linije treba da budu približno paralelne.

Potrebno je izbjegavati uslove koji bi mogli dovesti do »maskiranih pikova«, tj. gdje je rezolucija nedovoljna za razdvajanje dvije komponente.

5. IZRAŽAVANJE REZULTATA

5.1. Kvalitativna analiza

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

5.2. Kvantitativna analiza

5.2.1. Određivanje sastava

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

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

5.2.2. Način izračunavanja

5.2.2.1. Opći slučaj

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

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

gdje je:

A_i površina ispod pika koji odgovara komponenti i ;

$\sum A$ suma površina ispod svih pikova.

Rezultat se izražava na jedno decimalno mjesto.

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

5.2.2.2. Upotreba faktora korekcije

U određenim slučajevima, naprimjer u prisustvu masnih kiselina s manje od osam C-atoma ili masnih kiselina sa sekundarnim grupama, kada se koriste detektori toplotne vodljivosti ili kada se zahtijeva najveći stepen tačnosti, treba da se koriste faktori korekcije za pretvorbu procenata površine pika u masene udjele komponenata.

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

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

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

gdje je:

m_i masa komponente i , u referentnoj smjesi;

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

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

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

gdje je:

A_i površina ispod pika koji odgovara komponenti i ;

$\sum A$ suma površina ispod svih pikova.

Faktor korekcije tada se računa kao:

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

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

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

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

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

Rezultati se izražavaju na jedno decimalno mjesto.

5.2.2.3. Upotreba internog standarda

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

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

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

gdje je:

A_i površina ispod pika koji odgovara komponenti i ;

A_s površina ispod pika koji odgovara internom standardu;

K'_i je faktor korekcije za komponentu i (u odnosu na K_{C1});

K'_s je faktor korekcije za interni standard (u odnosu na K_{C16});

m je masa uzorka u mg;

m_s je masa internog standarda u mg.

Rezultati se izražavaju na jedno decimalno mjesto.

6. POSEBAN SLUČAJ - ODREĐIVANJE TRANS-IZOMERA

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

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

6.2. Metil esteri pripremaju se prema postupku B opisanom Aneksu IXb. Kao mjera predostrožnosti, masne tvari s više od 3% slobodnih masnih kiselina moraju se neutralizirati u skladu s tačkom 5.1.1 Aneksa VII.

6.3. Radni uslovi za plinsku hromatografiju općenito su sljedeći:

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

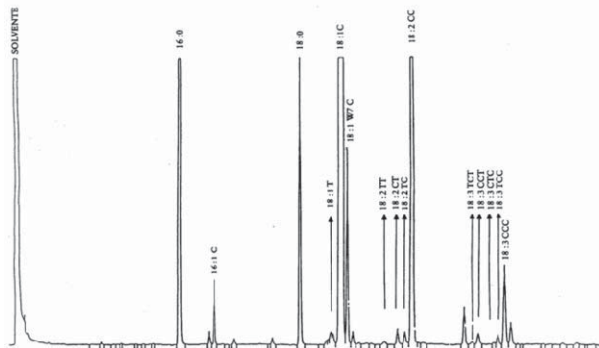
Injektirana količina mora biti takva da je u datim uslovima osjetljivosti visina pika koji odgovara metil esteru arahidonske kiseline jednaka ili veća od 20 % na dnu skale.

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

Esteri trans-masnih kiselina eluiraju se prije odgovarajućih cis-izomera. Primjer hromatograma dat je na slici 2.

Slika 2.

Plinski hromatogram trans izomera masnih kiselina uz upotrebu kapilarne kolone.



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

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

U obzir se uzimaju procenti:

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

TCC) 18:3], navedenih u Aneksu I. ovog pravilnika kao suma trans-izomera linolenske kiseline.

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

7. POSEBAN SLUČAJ UPOTREBA KATAROMETRA (DETEKTORA TOPLOTNE PROVODLJIVOSTI)

Plinski hromatograf s detektorom koji radi na principu promjena toplotne vodljivosti (katarometar) također se može koristiti za određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sastava smjese metil estera masnih kiselina. Kada se koristi, uslovi iz tač. 3. i 4. treba da se modificiraju kako je prikazano u Tabeli 3.

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

Tabela 3.

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

8. ANALITIČKI IZVJEŠTAJ

U analitičkom izvještaju treba da budu navedene metode pripreme metil estera i plinsko hromatografske analize te dobiveni rezultati. Također, treba navesti sve radne uslove koji nisu specifikirani u ovom pravilniku, ili su navedeni kao neobavezni, zajedno s detaljima o bilo kakvim nepredviđenim događajima koji bi mogli uticati na rezultate.

Analitički izvještaj treba da uključuje sve potrebne podatke za potpunu identifikaciju uzorka.

ANEKS IXb.

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

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

Metoda A:	Transesterifikacija hladnim metanolnim rastvorom kalijevog hidroksida
Metoda B:	Metilacija zagrijavanjem s natrijevim metilatom u metanolu, iza čega slijedi esterifikacija u kiselom mediju

Izbor metode zavisi od analitičkog parametra koji se određuje i kategoriji ulja, kako je navedeno:

- određivanje razlike između stvarnog i teoretskog udjela triglicerida s ECN42 ($\Delta\text{ECN}42$):
 - metoda A primjenjuje se na uzorke svih kategorija ulja nakon prečišćavanja ulja prolaskom kroz kolonu silikagela;
- određivanje sastava masnih kiselina:
 - metoda A primjenjuje se direktno na uzorke sljedećih kategorija ulja:
 - djevičansko maslinovo ulje s kiselosti višom od 3,3%,
 - rafinirano maslinovo ulje,
 - maslinovo ulje (mješavina djevičanskih maslinovih ulja i rafiniranog maslinovog ulja),

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

PREČIŠĆAVANJE UZORAKA ULJA

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

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

3. METODE PRIPREME METIL ESTERA MASNIH KISELINA

1. Metoda A: Transesterifikacija hladnim metanolnim rastvorom kalijevog hidroksida

1.1. Svrha

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

1.2. Princip

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

1.3. Reagensi

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

Heptan, hromatografskog kvaliteta.

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

1.4. Aparatura

Epruvete od 5 ml s navojnim čepom s PTFE spojem
Graduirane ili automatske pipete od 2 ml i 0,2 ml.

1.5. Postupak

U epruvetu s navojnim čepom od 5 ml odvaga se oko 0,1 g uzorka ulja. Doda se 2 ml heptana i protrese. Doda se 0,2 ml 2 mol/l metanolnog rastvora kalijevog hidroksida, čvrsto zatvori i jako trese 30 sekundi. Ostavi se da se slegne dok se rastvor ne razbistri. Dekantira se gornji sloj koji sadrži metil estere. Heptanski rastvor pogodan je za injektiranje u plinski hromatograf. Preporučuje se čuvanje rastvora u hladnjaku do plinsko-hromatografske analize i ne duže od 12 sati.

2. Metoda B: Metilacija zagrijavanjem s metanolnim rastvorom natrijevog metilata, iza čega slijedi esterifikacija u kiselom mediju

2.1. Svrha

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

2.2. Princip

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

2.3. Reagensi

- Heptan, hromatografskog kvaliteta.
- Metanol koji ne sadrži više od 0,05% (m/m) vode.
- 0,2 mol/l metanolni rastvor natrijevog metilata: otopi se 5 g natrija u 1000 ml metanola (može se pripremiti od rastvora dostupnih na tržištu),
- Fenolftealein, 0,2%-tni metanolni rastvor,
- Sulfatna kiselina, 0,5 mol/l u metanolnom rastvoru: u 100 ml metanola doda se 3 ml 96%-tne sulfatne kiseline,
- Zasićeni rastvor natrijevog hlorida u vodi.

2.4. Aparatura

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

2.5. Postupak

Oko 0,25 g uzorka ulja prenese se u volumetrijsku tikvicu s brušenim grlom od 50 ml. Uz pomoć lijevka doda se 10 ml 0,2 mol/l rastvora natrijevog metilata u metanolu i kuglice za vrenje. Spoji se povratno hladilo, protrese i zagrije do vrenja. Rastvor treba postati bistar, što se obično dogodi za oko 10 minuta. Reakcija je završena nakon 15 minuta. Tikvica se ukloni s izvora toplote, pričekaj da prestane vraćanje kondenzata, ukloni hladilo i dodaju dvije kapi rastvora fenolftealeina. Doda se nekoliko ml 0,5 mol/l metanolnog rastvora sulfatne kiseline, sve dok rastvor ne postane bezbojan, a zatim doda 1 ml u suvišku. Spoji se hladilo i stavi da ponovo vrije 20 minuta. Ukloni se sa izvora toplote i tikvica ohladi pod mlazom tekuće vode. Ukloni se hladilo, doda 20 ml zasićenog rastvora natrijevog hlorida i protrese. Doda se 5 ml heptana. Tikvica se začepi i snažno trese 15 sekundi.

Ostavi se da se slegne dok se faze ne razdvoje. Ponovo se dodaje zasićeni rastvor natrijevog hlorida dok vodeni sloj ne dosegne donji rub grla tikvice. Gornji sloj koji sadrži metil estere ispunjava grlo tikvice. Ovaj rastvor spreman je za injektiranje u plinski hromatograf.

Upozorenje: Metilacija metodom B mora se raditi u digestoru.

2.6. Alternative metodije prema Metodi B

2.6.1. Metoda C

2.6.1.1. Princip

Masna tvar koja se analizira tretira se metanolnim rastvorom hloridne kiseline, u zatvorenoj kapsuli, pri 100°C.

2.6.1.2. Aparatura

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

2.6.1.3. Reagensi

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

Heksan, hromatografskog kvaliteta.

Napomena 1. Mogu se koristiti rastvori hlorovodonika u metanolu dostupni na tržištu. Male količine plinovite hloridne kiseline mogu se lako pripremiti u laboratoriju iz komercijalnog rastvora ($p = 1,18$), dodavanjem nekoliko kapi koncentrirane sulfatne kiseline. Budući da metanol vrlo brzo apsorbira hloridnu kiselinu, preporučuju se uobičajene mjere opreza pri otapanju, npr. plin se uvodi kroz mali naopako okrenuti lijevak čiji rub dodiruje površinu tekućine. Moguće je unaprijed pripremiti velike količine metanolnog rastvora hloridne kiseline, jer se može dobro čuvati na tamnom mjestu u staklenim bocama sa staklenim čepom. Kao druga mogućnost, ovaj reagens može se pripremiti otapanjem acetil hlorida u bezvodnom metanolu.

2.6.1.4. Postupak

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

2.6.2. Metoda D

2.6.2.1. Princip

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

2.6.2.2. Aparatura

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

2.6.2.3. Reagensi

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

2.6.2.4. Postupak

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

Spoji se povratno hladilo i zagrijava 30 minuta u kipućej vodenoj kupki (Napomena 2.).

Smjesa se kvantitativno prenese u lijevak za odjeljivanje od 50 ml, uz pomoć 10 ml destilirane vode i 10 ml petroletera. Snažno se protrese i ostavi da se razdvoje faze, ukloni vodena faza i dvaput ispere eterski sloj s po 20 ml destilirane vode. U lijevak za odjeljivanje doda se mala količina bezvodnog

natrijevog sulfata, protrese, ostavi da se slegne nekoliko minuta i filtrira, skupljajući filtrat u epruvetu od 15 ml s konusnim dnom.

Rastvarač se ispari u vodenoj kupki u struji dušika.

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

3. Parametri preciznosti

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

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

1. Postupak

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

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

2. Izračunavanje

2.1. Za izračunavanje sastava masnih kiselina i ΔECN42 u obzir se uzimaju sve navedene masne kiseline:

Miristinska (C14:0).

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

Palmitoleinska (C16:1). Suma površina pikova koji odgovaraju ω9 i ω7 izomerima metil estera.

Heptadekanska/Margarinska (C17:0).

Heptadecenska/Margaroleinska (C17:1).

Stearinska (C18:0).

Oleinska (C18:1). Suma površina pikova koji odgovaraju ω9 i ω7 izomerima metil estera, etil esterima i *trans* izomerima metil estera.

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

Arahinska (C20:0).

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

Gadoleinska (C20:1).

Behenska (C22:0).

Lignocerinska (C24:0).

Skvalen se ne uzima u obzir za izračunavanje ukupne površine.

2.2. Za izračunavanje procenta *trans*-C18:1 koristi se pik koji odgovara metil esterima ove masne kiseline. Za sumu [*trans*-C18:2 + *trans*-C18:3] sabiraju se svi pikovi koji odgovaraju *trans*-izomerima ove dvije masne kiseline. Za izračunavanje ukupne površine uzimaju se u obzir svi pikovi navedeni u tački 2.1. (vidjeti COI/T.20/Doc. br. 17).

Procent svake masne kiseline izračunava se prema formuli:

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

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

ANEKS X.

ODREĐIVANJE UDJELA HLAPLJIVIH HALOGENIRANIH RASTVORA U MASLINOVOM ULJU 1. METODA

Analiza plinskom hromatografijom i primjenom tehnike nadprostora (head space).

2. OPREMA

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

2.2. Oprema za *head space* tehniku.

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

2.4. Plin nosilac i pomoćni plin: dušik za plinsku hromatografiju, prikladan za ECD detektor.

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

2.6. Kliješta za hermetičko zatvaranje.

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

3. REAGENSI

Standard: halogenirani rastvor čistoče prikladne za plinsku hromatografiju.

4. POSTUPAK

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

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

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

4.2. Referentni rastvorji: standardni rastvorji pripravljajo se koristeči rafinirano maslinovo olje bez tragova rastvorjača, u koncentracijama između 0,05 i 1 ppm (mg/kg), zavisno od predviđenog udjela halogeniranih rastvorjača u uzorku. Halogenirani rastvorjači mogu se po potrebi razrijediti pentanom.

4.3. Kvantitativno određivanje: uspostavi se korelacija između površina ili visina pikova uzorka i površina/visina pikova standardnog rastvora čija je koncentracija najbliža očekivanoj koncentraciji. Ako je odstupanje veće od 10%, potrebno je ponoviti analizu poređenjem s drugim standardnim rastvorom dok se ne postigne odstupanje manje od 10%. Udio se određuje na osnovu prosjeka pojedinačnih injektiranja.

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

ANEKS XI.
METODA MEĐUNARODNOG VIJEĆA ZA MASLINU ZA
ORGANOLEPTIČKO OCJENJIVANJE DJEVIČANSKOG
MASLINOVOG ULJA

1. SVRHA I PRIMJENA

Ovim aneksom propisuje se postupak ocjene organoleptičkih svojstava dječvčanskih maslinovih ulja u smislu člana 2. stav (2) 4ačke a) ovog pravilnika, te postupak njihove klasifikacije na osnovu tih svojstava. Ovaj aneks sadrži i uputstva za neobavezno označavanje proizvoda.

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

2. OPĆENITO

U pogledu definicija osnovnih pojmova, prostorijsa za ocjenjivanje, čaša za degustaciju te bilo kojeg drugog pitanja vezanog za ovu metodu, preporučuje se usklađenost s odredbama posebnog propisa o reviziji metode za organoleptičko ocjenjivanje dječičanskih maslinovih ulja.

3. SPECIFIČNI RJEČNIK

3.1. Pozitivna svojstva

Vočno: skupnost mirisnih svojstev (zavisno od sorte) karakterističnih za ulje od zdravih i svježih plodova, bilo zelenih ili zrelih, zapaženih direktno ili indirektno (retronazalno).

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

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

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

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

3.2. Negativna svojstva

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

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

Vinski-sirćečno/kiselo: prepoznatljiv okus i miris nekih ulja koji podsjeća na vino ili sirće. Uzrokovan je prvenstveno aerobnom fermentacijom maslina ili ostataka maslinovog tijesta na neodgovarajuće očišćenim slojnicama, što dovodi do stvaranja sirćetne kiseline, etil acetata i etanola. Metalno: okus i miris koji podsjeća na metal. Svojestven je uljima koja su duže vrijeme bila u dodiru s metalnim površinama tokom mljevenja, miješenja, presovanja ili skladištenja.

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

Kuhano ili prekuhano: prepoznatljiv okus i miris uzrokovan pretjeranim i/ili predugim zagrijavanjem tokom prerade, a posebno miješenjem maslinovog tijesta u termički nepovoljnim uslovima.

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

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

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

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

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

Slojnice: okus i miris karakterističan za ulja dobivena od maslina presovanih na novim slojnicama od biljnih vlakana, a različit je zavisno od toga da li su slojnice sačinjene od zelenih ili suhih vlakana.

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

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

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

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

3.3. Neobavezna terminologija kod označavanja proizvoda

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

- a) za svako od pozitivnih svojstava iz tačke 3.1. (voćno, eventualno definirano kao nedozrelo ili zrelo, te pikantno i gorko):
 - i) pojam *intenzivno* može se koristiti kad je medijan svojstva veći od 6;
 - ii) pojam *srednje* može se koristiti kad je medijan svojstva između 3 i 6;
 - iii) pojam *blago* može se koristiti kad je medijan svojstva manji od 3;
 - iv) pojedina svojstva mogu se označiti na proizvodu i bez pojmova pod i), ii) i iii) kad je medijan dotičnog svojstva veći ili jednak 3;
- b) pojam *skladno* može se koristiti za ulje koje nije neuravnoteženo. Pod neuravnoteženim se podrazumijevaju okusno-mirisna i taktilna svojstva ulja čiji je medijan intenziteta za gorko i/ili pikantno za dvije i više tačaka veći od medijana intenziteta voćnog.
- c) pojam *blago ulje* može se koristiti za ulje čiji su medijani intenziteta za gorko i pikantno manji ili jednaki 2.

4. PANEL

Panel čine voditelj panela i 8 do 12 ocjenjivača.

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

Voditelj bira ocjenjivače, brine za njihovu obuku i provjerava njihovu sposobnost ocjenjivanja s ciljem održavanja na prikladnom nivou.

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

Panel mora učestvovati u organoleptičkim analizama na nacionalnom, nivou EU i međunarodnom nivou, organiziranim u svrhu redovnog nadzora i usklađivanja kriterija opažanja.

Također mora svake godine dostaviti državi članici potpune informacije o sastavu panela i broju analiza objavljenih u svojstvu odobrenog panela.

5. POSTUPAK ORGANOLEPTIČKE ANALIZE I KLASIFICIRANJE

5.1. Upotreba ocjenjivačkog listića od strane ocjenjivača

Listić koji koriste ocjenjivači prikazan je u Dodatku A.

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

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

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

5.2. Obrada podataka od strane voditelja panela

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

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

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

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

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

5.3. Klasificiranje uzoraka ulja

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

Klasificiranje uzorka ulja provodi se uspoređivanjem vrijednosti medijana negativnih svojstava i medijana voćnog mirisa s niže navedenim rasponima. Rasponi su određeni uzevši u obzir grešku metode, pa se smatraju apsolutnim. Pomoću računarskog programa klasifikaciju je moguće predočiti u formi tabele i grafičkog prikaza.

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

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

5.4. Poseban slučaj

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

DODATAK A

OBRAZAC ZA OCJENJIVANJE DJEVIČANSKOG MASLINOVOG ULJA

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

DODATAK B

METODA IZRAČUNAVANJA MEDIJANA I INTERVALA POUZDANOSTI

Medijan

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

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

Gruba standardna devijacija

S ciljem pouzdanog procjenjivanja varijabilnosti oko medijana koristi se procjena grube standardne devijacije prema Stuartu i Kendallu. Sljedeća jednačina prikazuje asimptotsku standardnu devijaciju, tj. grubu procjenu varijabilnosti posmatranih podataka, gdje N predstavlja broj podataka a IQR je međukvartilni interval. IQR obuhvata tačno 50% slučajeva u bilo kojoj distribuciji vjerovatnosti.

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

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

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

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

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

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

Grubi koeficijent varijacije (%)

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

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

Interval pouzdanosti od 95% u odnosu na medijan

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

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

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

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

ANEKS XII.

ODREĐIVANJE STIGMASTADIENA U BILJNIM ULJIMA

1. SVRHA

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

2. PRIMJENA

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

3. PRINCIP

Izdvajanje neosapunjivog. Odjeljivanje steroidne ugljikovodonične frakcije hromatografijom na koloni sa silikagelom te analiza kapilarnom plinskom hromatografijom.

4. APARATURA

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

4.2. Lijeveći za odjeljivanje od 500 ml.

4.3. Tikvice s okruglim dnom od 100 ml.

4.4. Rotacioni vakuum-uparivač.

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

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

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

Napomena 1.

Mogu se upotrijebiti i druge kolone slične ili niže polarnosti.

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

4.9. Mikrolitarska šprica za plinsku hromatografiju od 5 do 10 ml sa čvrsto fiksiranom iglom.

4.10. Električni grijači plašt ili ploča.

5. REAGENSI

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

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

Napomena 2.

Rastvarač se mora destilirati kako bi se uklonile nečistoće.

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

5.3. Bezvodni natrijev sulfat.

5.4. Alkoholni rastvor kalijevog hidroksida, 10%-tna. 10 ml vode doda se u 50 g kalijevog hidroksida, promiješa i nadopuni do 500 ml etanolom.

Napomena 3.

Ovaj rastvor tokom stajanja mijenja boju u smeđu pa ga treba svježe pripremati svakog dana i čuvati u dobro začepljenim bocama od tamnog stakla.

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

Napomena 4.

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

Serije silikagela koje dovode do interferencije pikova hromatograma moraju se obraditi kako je opisano. Kao

alternativa, može se upotrijebiti ekstra čisti silikagel 60 (Merck, ref. 7754).

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

5.7. Standardni rastvor kolesta-3,5-diena u heksanu koncentracije 20 ppm, pripremljen razrjeđivanjem početnog rastvora.

Napomena 5.

Rastvori 5.6. i 5.7. ostaju stabilni bar četiri mjeseca ako se čuvaju na temperaturi ispod 4°C .

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

5.9. Plin nosilac za plinsku hromatografiju: vodik ili helij čistoće 99,9990%.

5.10. Pomoćni plinovi za plameno-jonizacijski detektor: vodonik čistoće 99,9990% i prečišćeni zrak.

6. POSTUPAK

6.1. Priprema neosapunjivih tvari

6.1.1. Odvaga se $20 \pm 0,1$ g ulja u tikvicu od 250 ml (4.1.), doda 1 ml standardnog rastvora kolesta-3,5-diena (20 μg) i 75 ml 10%-tnog alkoholnog rastvora kalijevog hidroksida. Priključi se povratno hladilo i 30 minuta lagano kuha. Tikvica sa uzorkom se ohladi (ne sasvim, jer se tada sadržaj zgusne) te se doda 100 ml vode i prebaci u lijevak za odjeljivanje (4.2.) pomoću 100 ml heksana. Sadržaj se snažno miješa 30 sekundi i zatim ostavi da miruje radi razdvajanja faza.

Napomena 6.

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

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

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

6.2. Izdvajanje frakcije steroidnih ugljikovodonika

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

Napomena 7.

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

6.2.2. Druga frakcija otparava se do suhog pomoću rotacionog vakuum-uparivača pri 30°C , a ostatak se odmah otopi

u 0,2 ml heksana. U ovom obliku, rastvor se do analize može čuvati u hladnjaku.

Napomena 8.

Ostaci iz tačaka 6.1.3. i 6.2.2. ne smiju se čuvati suhi ni na sobnoj temperaturi. Čim se dobiju, treba dodati rastvarač i čuvati rastvore u hladnjaku.

6.3. Plinska hromatografija

6.3.1. Uslovi rada za sistem injektiranja s razdvajanjem protoka:

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

Ovi uslovi mogu se prilagoditi svojstvima plinskog hromatografa i kolone tako da se dobiju hromatogrami koji udovoljavaju sljedećim zahtjevima: pik internog standarda mora se pojaviti uz odstupanje od približno 5 minuta u odnosu na vrijeme navedeno u tački 6.3.2.; visina pika internog standarda mora dosežati najmanje 80% pune skale hromatograma.

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

6.3.2. Identifikacija pikova

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

Napomena 9.

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

6.3.3. Kvantitativna analiza

Udio stigmastadiena određuje se pomoću sljedećeg izraza:

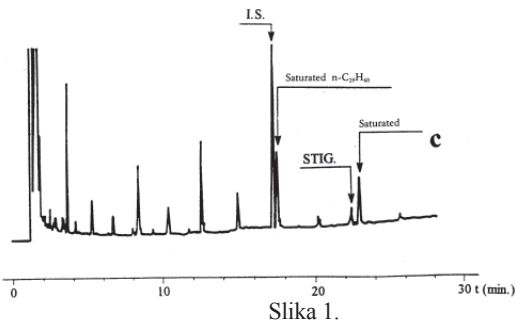
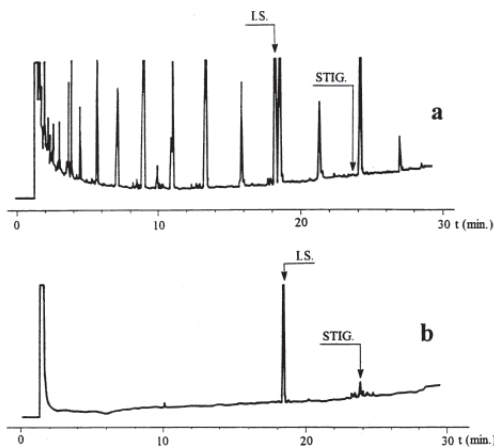
$$\text{mg/kg stigmastadiena} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

gdje je:

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

Ac = površina internog standarda (kolestadien)

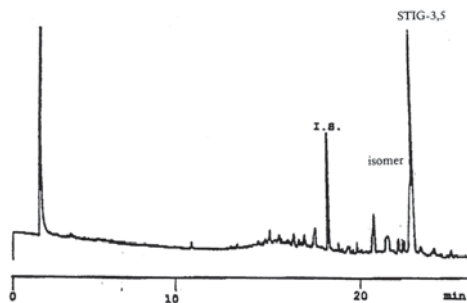
Mc = masa dodatog standarda, u mikrogramima
Mo = masa ulja, u gramima
Granica detekcije: oko 0,01 mg/kg.



Slika 1.

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

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



Slika 2.

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

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

1. OBIM

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

2. OBLAST PRIMJENE

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

4. METODA

Metoda izračunavanja teoretskog udjela triacilglicerola s ECN 42 te razlike između teoretskog udjela i rezultata dobivenih HPLC metodom u osnovi predstavlja upoređivanje analitičkih podataka dobivenih pomoću drugih metoda. Moguće je razlikovati tri faze: određivanje sastava masnih kiselina kapilarnom plinskom 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 od 250 i 500 ml.

4.1.2. Laboratorijske čaše od 100 ml.

4.1.3. Staklena hromatografska kolona unutrašnjeg promjera 21 mm, dužine 450 mm, sa slavinom i konusnim nastavkom od brušenog stakla (s unutrašnje strane) pri vrhu.

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

4.1.5. Stakleni štapić dužine 600 mm.

4.1.6. Stakleni lijevak promjera 80 mm.

4.1.7. Odmjerne tikvice od 50 ml.

4.1.8. Odmjerne tikvice od 20 ml.

4.1.9. Rotacioni vakuum-uparivač.

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

4.1.11. Jedinica za injektiranje volumena 10 μ l.

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

4.1.13. Kolona: kolona od nehrđajućeg čelika dužine 250 mm i unutrašnjeg promjera 4,5 mm, punjena zncima silikagela promjera 5 μ m, s 22 do 23% ugljika u obliku oktaedecilsilana (vidjeti Napomenu 2.).

4.1.14. Pisač i/ili integrator.

4.2. Reagensi

Reagensi treba da budu analitičke čistoće. Iz rastvarača za eluiranje treba biti uklonjen plin, a mogu se reciklirati nekoliko puta bez uticaja na razdvajanje.

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

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

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

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

4.2.5. Staklena vuna.

4.2.6. Aceton.

4.2.7. Acetonitril.

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

4.2.9. Rastvarač: aceton.

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

4.3. Priprema uzorka

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

4.3.1. Priprema hromatografske kolone

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

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

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

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

4.3.2. Hromatografija na koloni

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

Trbušastom pipetom unese se 20 ml rastvora u kolonu pripremljenu kako je opisano u tački 4.3.1., otvori slavinu i rastvarač propusti do površine silikagela.

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

Eluat se sakuplja u tikvici od 250 ml (4.1.1.), prethodno tariranoj u peći i tačno izvaganoj. Rastvarač se ukloni na rotacionom vakuum-uparivaču te zatim izvaga 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 ekstra djevičansko, djevičansko, obično rafinirano i maslinovo ulje te najmanje 80% za lampante i ulje komine maslina.

4.4. Analiza HPLC metodom

4.4.1. Priprema uzoraka za hromatografiju

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

4.4.2. Postupak

Uključi se hromatograf. Rastvarač za eluiranje (4.2.8.) pumpa se kroz kolonu protokom od 1,5 ml/min, s ciljem ispiranja čitavog sistema. Pričeka se da bazna linija postane stabilna. Injektira se 10 μ l uzorka pripremljenog prema tački 4.3.

4.4.3. Izračunavanje i izražavanje rezultata

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

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

Rezultati se izražavaju na najmanje dva decimalna mjesta.

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

$$ECN = CN - d_o n_o - d_i n_i - d_{ln} n_{ln}$$

gdje se koeficijenti d_o , d_i i d_{ln} mogu izračunati na osnovu referentnih triglicerida. U uslovima propisanim ovom metodom, približno važi sljedeći odnos:

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

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

Lichrosphere (Merck) 100 CH18 Art. 50377.

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

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

Graf log α u zavisnosti od f (broj dvostrukih veza) omogućava određivanje vremena zadržavanja za sve trigliceride masnih kiselina koji su prisutni u referentnim trigliceridima – vidjeti sliku 2.

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

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

4.5. Izračunavanje udjela triacilglicerola

4.5.1. Određivanje sastava masnih kiselina

Sastav masnih kiselina određuje se plinskom hromatografijom prema metodi opisanoj u Aneksu IXa. ovog pravilnika, uz upotrebu kapilarne kolone. Metil esteri masnih kiselina pripremaju se prema Aneksu Xb. ovog pravilnika (alkoholni rastvor natrijevog metilata).

4.5.2. Masne kiseline koje se uzimaju u obzir za izračunavanje

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

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

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

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

4.5.4. Normalizacija masnih kiselina na 100%

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

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

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

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

(2)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(5)

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

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

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

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

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

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

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

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

(6)

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

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

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

4.5.6. Izračunavanje triacilglicerola

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

(7)

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

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

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

(8)

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

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

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

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

(9)

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

4.5.6.4. Triacilgliceroli s ECN 42

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

LLL

PoLL i pozicijski izomer LPoL

OLLn i pozicijski izomeri OLnL i LnOL

PoPoL i pozicijski izomer PoLPo

PoOLn i pozicijski izomeri OPoLn i OLnPo

PLLn i pozicijski izomeri LLnP i LnPL

PoPoPo

SLnLn i pozicijski izomer LnSLn

PPoLn i pozicijski izomeri PLnPo i PoPLn

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

5. OCJENJIVANJE REZULTATA

Izračunati teoretski udio navedenih triacilglicerola upoređuje se s udjelom koji je utvrđen HPLC metodom. Ako je razlika između ova dva podatka veća od vrijednosti propisane uredbom za tu kategoriju ulja, uzorak sadrži sjemenska ulja.

Napomena: Rezultati se izražavaju na jedno decimalno mjesto.

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

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

Plinskom hromatografijom dobivaju se sljedeći podaci o sastavu masnih kiselina:

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

4.5.3. Preračunavanje % površina u molove za sve masne kiseline

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

Vidjeti jednačinu (1)

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

Vidjeti jednačinu (1)

$$\text{mol } Po = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ mol } Po$$

Vidjeti jednačinu (1)

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

Vidjeti jednačinu (1)

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

Vidjeti jednačinu (1)

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

Vidjeti jednačinu (1)

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

4.5.4. Normalizacija masnih kiselina na 100%

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

Vidjeti jednačinu (2)

$$\begin{aligned} \text{mol \% } S(1,2,3) &= \frac{0,01054 \text{ mol } S \times 100}{0.35822 \text{ mol}} \\ &= 2,944 \% \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednačinu (2)}$$

$$\begin{aligned} \text{mol \% } Po(1,2,3) &= \frac{0,00393 \text{ mol } Po \times 100}{0.35822 \text{ mol}} \\ &= 1,097 \% \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednačinu (2)}$$

$$\begin{aligned} \text{mol \% } O(1,2,3) &= \frac{0,26549 \text{ mol } O \times 100}{0.35822 \text{ mol}} \\ &= 74,113 \% \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednačinu (2)}$$

$$\begin{aligned} \text{mol \% } L(1,2,3) &= \frac{0,03566 \text{ mol } L \times 100}{0.35822 \text{ mol}} \\ &= 9,956 \% \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednačinu (2)}$$

$$\begin{aligned} \text{mol \% } Ln(1,2,3) &= \frac{0,00359 \text{ mol } Ln \times 100}{0.35822 \text{ mol}} \\ &= 1,003 \% \end{aligned} \quad \text{Vidjeti jednačinu (2)}$$

$$\text{Ukupno Mol \%} = 100,0 \%$$

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

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

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

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

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

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

$$\begin{aligned} \text{mol \% } S(2) &= 2,944\% \cdot 0,06 \\ &= 0,177 \text{ mol \%} \end{aligned}$$

Vidjeti jednačinu (4)

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

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

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

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

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

Vidjeti jednačinu (5)

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

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

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

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

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

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

Vidjeti jednačinu (6)

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

Vidjeti jednačinu (6)

Vidjeti jednačinu (6)

4.5.6. Izračunavanje triacilglicerola:

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

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

Izračunavaju se sljedeći triacilgliceroli:

LLL

PoPoPo

PoLL s jednim pozicijskim izomerom

SLnLn s jednim pozicijskim izomerom

PoPoL s jednim pozicijskim izomerom

PPoLn s dva pozicijska izomera

OLLn s dva pozicijska izomera

PLLn s dva pozicijska izomera

PoOLn s dva pozicijska izomera

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

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

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

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

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

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

$$0,03211 \text{ mol PoLL}$$

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

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

$$0,00095 \text{ mol SLnLn}$$

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

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

$$0,00354 \text{ mol PoPoL}$$

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

Vidjeti jednadžbu (9)

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

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

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

0,00762 mol P₂OLn

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

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

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

0,43671 mol OLLn

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

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

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

$$0,06911 \text{ mol PLLn}$$

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

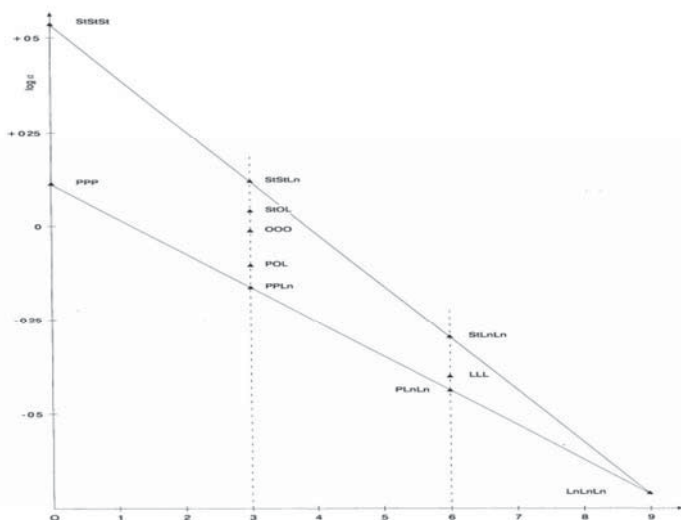
$$\text{mol \% LnPoO} = \frac{0,927 \% \times 1,263 \% \times 68,522 \% \times 2}{10000} = 0,01605$$

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

$$0,04815 \text{ mol PoOLN}$$

$$\text{ECN} = 0,69540 \text{ mol TAG}$$

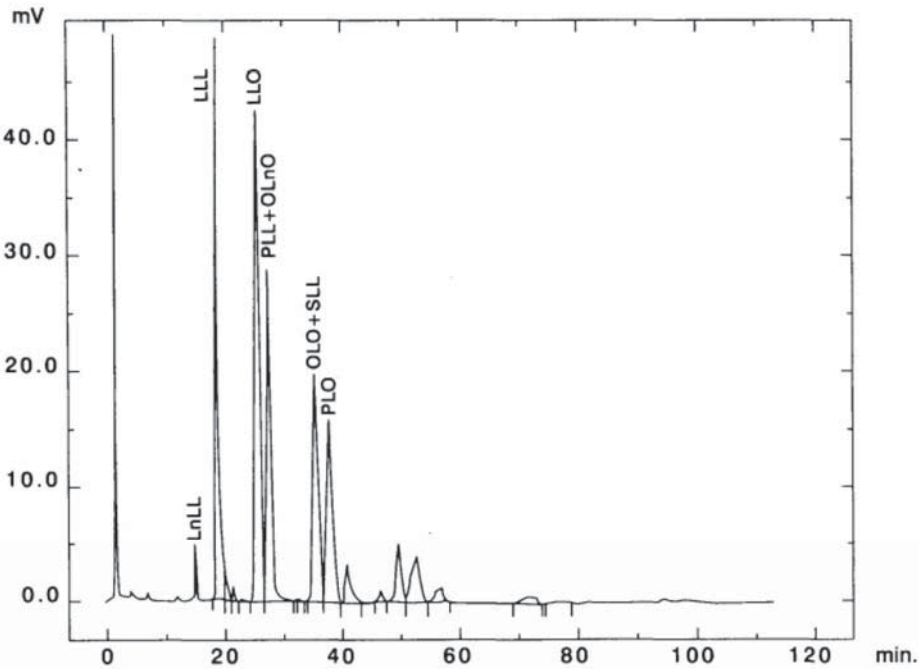
Slika 1. Graf ovisnosti log α o f (broj dvostrukih veza)



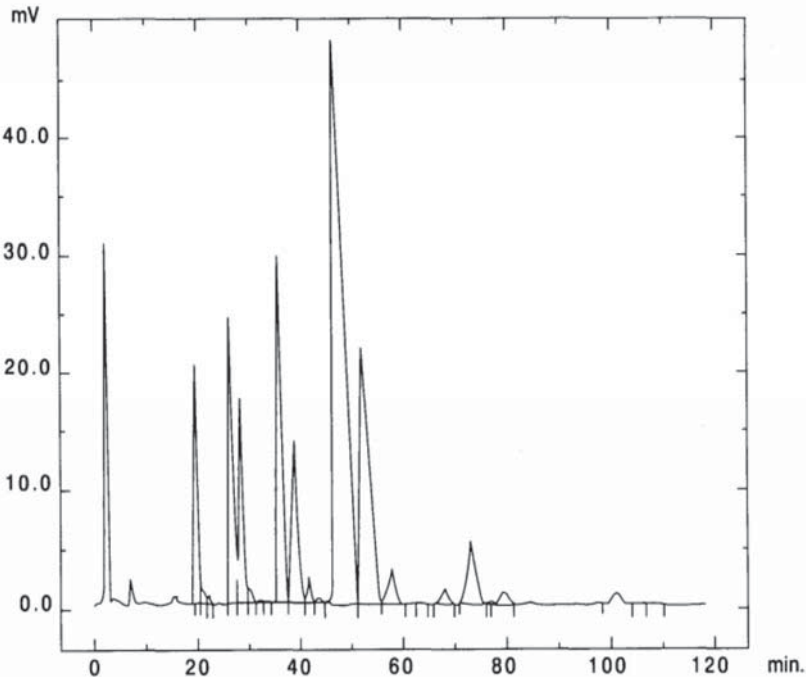
Broj dvostrukih veza (n)

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

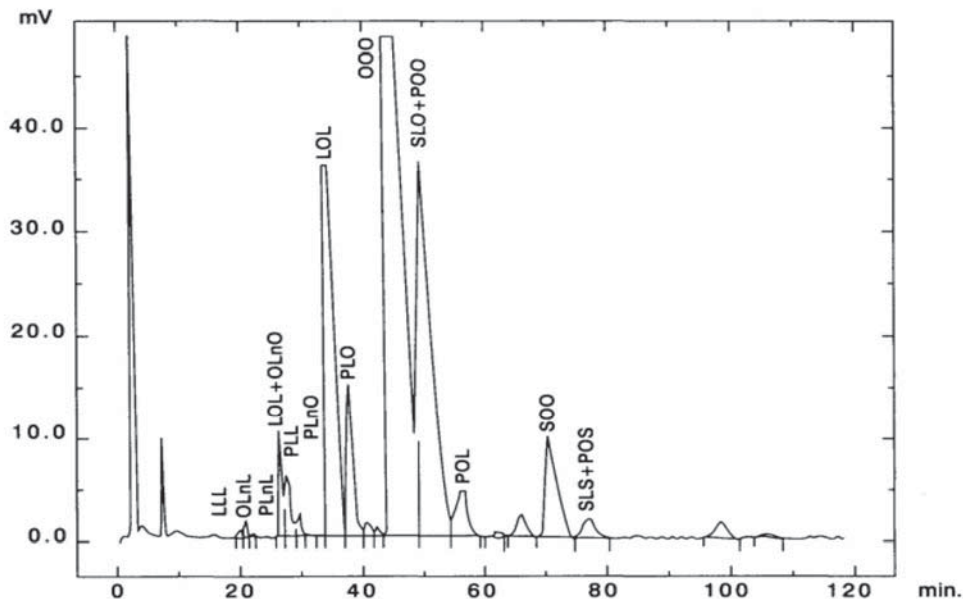
Slika 2. Sojino ulje



Slika 3. Sojino ulje / maslinovo ulje 30/70



Slika 4. Maslinovo ulje



ANEKS XIV.

ODREĐIVANJE UDJELA ALIFATSKIH ALKOHOLA KAPILARNOM PLINSKOM HROMATOGRAFIJOM

1. OBLAST PRIMJENE

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

2. PRINCIP METODE

Masna tvar, s dodatim 1-eikosanolom kao internim standardom, saponificira se etanolnim rastvorom kalijevog hidroksida, nakon čega se neosapunjiva tvar ekstrahira etil eterom. Alkoholna frakcija odjeljuje se od neosapunjive tvari tankoslojnom hromatografijom na bazičnoj silikagel ploči. Alkoholi zadržani na silikagelu prevode se u trimetilsilil eteri i analiziraju kapilarnom plinskom hromatografijom.

3. OPREMA

- 3.1. Tikvica sa zaobljenim dnom od 250 ml, s povratnim hladilom s brušenim spojevima.
- 3.2. Lijevak za odjeljivanje od 500 ml.
- 3.3. Tikvice sa zaobljenim dnom od 250 ml.
- 3.4. Staklena kada za razvijanje ploča za tankoslojnu hromatografiju, za staklene ploče dimenzija 20 x 20 cm.
- 3.5. Ultraljubičasta svjetiljka s talasnim dužinama od 366 ili 254 nm.
- 3.6. Mikrošprice od 100 μ l i 500 μ l.
- 3.7. Cilindrični lijevak za filtriranje s G3 porama filtera (poroznost 15-40 μ m), promjera približno 2 cm i dubine približno 5 cm, s nastavkom prikladnim za vakuum filtraciju i priključkom 12/21 s vanjskim brušenim staklom.
- 3.8. Boca sisaljka od 50 ml, s priključkom 12/21 s unutrašnjim brušenim staklom, prikladna za priključak na lijevak za filtriranje (3.7.).
- 3.9. Epruveta od 10 ml s koničnim dnom i nepropusnim čepom.

3.10. Plinski hromatograf s kapilarnom kolonom i "split" sistemom razdvajanja protoka, koji čine:

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

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

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

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

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

3.12. Mikrolitarska šprica za plinsku hromatografiju od 10 μ l, s čvrsto fiksiranom iglom.

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

4. REAGENSI

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

4.2. Etil eter, analitičke čistoće.

4.3. Bezvodni natrijev sulfat, analitičke čistoće.

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

4.5. Kalijev hidroksid, približno 0,2 mol/l etanolni rastvor: 13 g kalijevog hidroksida otopi se u 20 ml destilirane vode i zatim nadopuni etanolom do jednog litra.

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. Etil eter, za hromatografiju (vidjeti 5.2.2.).

4.10. Hloroform, za hromatografiju.

4.11. Referentni rastvor za tankoslojnu hromatografiju: kolesterol ili fitosteroli, 5%-tni rastvor u hloroformu.

4.12. 0,2%-tni rastvor 2',7'-diklorfluoresceina u etanolu. Dodaje mu se nekoliko kapi 2 mol/l etanolnog rastvora kalijevog hidroksida kako bi se dobila bazična reakcija.

4.13. Bezvodni piridin, za hromatografiju.

4.14. Heksametil disilazan.

4.15. Trimetilklorosilan.

4.16. Standardni rastvori trimetilsilil etera alifatskih alkohola od C₂₀ do C₂₈. Mogu se pripremiti iz smjesa čistih alkohola, neposredno prije upotrebe.

4.17. 0,1%-tni (m/v) rastvor 1-eikosanola u hloroformu (interni standard).

4.18. Plin nosilac: vodik ili helij, hromatografske čistoće.

4.19. Pomoćni plin: dušik, hromatografske čistoće.

5. POSTUPAK

5.1. Priprema neosapunjivog

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

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

5.1.2. Doda se 50 ml 2 mol/l etanolnog rastvora kalijevog hidroksida, pričvrsti povratno hladilo i zagrijava na parnoj kupki do laganog vrenja, uz stalno miješanje tokom zagrijavanja dok ne nastupi saponifikacija (rastvor postaje bistar). Nastavi se sa zagrijavanjem tokom sljedećih 20 minuta i zatim kroz hladilo doda 50 ml destilirane vode. Hladilo se zatim odvoji i tikvica ohladi na približno 30°C.

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

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

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

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

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

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

5.2. Odjeljivanje alkoholnih frakcija

5.2.1. Priprema bazičnih ploča za tankoslojnu hromatografiju: ploče sa slojem silikagela (4.4.) potpuno se uranjaju u rastvor kalijevog hidroksida, koncentracije 0,2 mol/l (4.5.) na 10 sekundi te zatim ostave da se suše dva sata u digestoru i konačno stave u peć na 100°C 1 sat.

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

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

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

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

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%-tni rastvor neosapunjivih tvari (5.1.5) u hloroformu i, pomoću mikrolitarske šprice od 100 µl, nanese 0,3 ml tog rastvora u što tanjoj i ravnomjernijoj liniji, na TSK ploču približno 2 cm od donjeg ruba TSK ploče. U ravni originalne mrlje, nanese se 2 do 3 µl referentnog rastvora alifatskih alkohola (4.11.) kako bi se mogle identificirati trake alifatskih alkohola po završetku razvijanja.

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

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

5.2.5. Ploča se lagano i ravnomjerno popraska rastvorom 2',7'-diklorfluoresceina te posmatra pod ultraljubičastim svjetlom. Traka alifatskih alkohola može se identificirati poređenjem s mrljom dobivenom od referentnog rastvora: rubovi trake označe se crnom olovkom, označavajući zajedno traku alifatskih alkohola i traku terpenkih alkohola neposredno iznad nje.

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

Napomena 4. Trake alifatskih alkohola i terpenkih alkohola uzimaju se zajedno zbog mogućih migracija nekih alifatskih alkohola u traku triterpenkih alkohola.

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

Ostatak u boci ispere se tri puta etil eterom (oko 10 ml svaki put), skupljajući filtrat u istu bocu spojenu na lijevak. Filtrat se upari do volumena od 4 do 5 ml, preostali rastvor prenese se u prethodno izvaganu epruvetu od 10 ml (3.9.), upari do suha laganim zagrijavanjem u laganjoj struji dušika, doda nekoliko kapi acetona, ponovo upari do suha, smjesti u peć na 105°C približno 10 minuta, ostavi da se ohladi u eksikatoru i vaga.

Ostatak u epruveti čini alkoholna frakcija.

5.3. Priprema trimetilsilil etera

Reagens za silaniziranje, koji se sastoji od smjese piridina, heksametildisilazana i trimetilklorosilana u omjeru 9:3:1 (v/v/v) (Napomena 5.), doda se u epruvetu koja sadrži alkoholnu frakciju

u količini od 50 μ l za svaki miligram alifatskih alkohola, izbjegavajući apsorpciju vlage (Napomena 6.).

Napomena 5. Na tržištu su dostupni rastvori spremni za upotrebu. Također su dostupni drugi reagensi za silaniziranje kao što su npr. bis-trimetilsililtrifluoracetamid + 1% trimetil hlorosilan, koji se mora razrijediti jednakim volumenom bezvodnog piridina.

Napomena 6. Lagano zamućenje koje se može pojaviti normalno je i ne uzrokuje smetnje. Stvaranje bijelog flokulata ili pojava ružičaste boje upućuju na prisustvo vode ili nečiste reage. U tom slučaju, analiza se mora ponoviti.

5.3.2. Epruveta se začepi, pažljivo protrese (bez preokretanja) dok se alifatski alkoholi potpuno ne otope. Ostavi se da stoji najmanje 15 minuta na sobnoj temperaturi i zatim centrifugira nekoliko minuta. Bistri rastvor spreman je za plinsko-hromatografsku analizu.

5.4. Plinsko-hromatografska analiza

5.4.1. Preliminarni postupci, punjenje kolone

5.4.1.1. Kolona se učvrsti u plinski hromatograf, priključujući početak kolone na injektor sa sistemom razdvajanja, a kraj kolone na detektor. Izvrše se opće provjere plinskog hromatografa (dovod plina, efikasnost detektora, efikasnost sistema razdvajanja i pisača itd.).

5.4.1.2. Ako se kolona koristi prvi put, preporučuje se njeno kondicioniranje. Lagani tok plina se propusti kroz kapilarnu kolonu, a zatim uključi plinski hromatograf i započne postupno zagrijavanje do temperature najmanje 20°C više od radne temperature (vidjeti Napomenu 7.). Ta temperatura održava se najmanje dva sata, a zatim se cijeli uređaj namjesti na radne uslove (podešavanje protoka plina i razdvajanja, paljenje plamena, priključivanje na elektronski rekorder, podešavanje peći za kolonu, temperature detektora i injektora) i potom snimi signal s osjetljivošću najmanje dvostruko većom od one koja će se koristiti za analizu. Bazna linija mora biti linearna, bez bilo kakvih pikova, i ne smije imati otklon. Negativni otklon bazne linije upućuje na neispravno priključenu kolonu; pozitivni otklon upućuje na nepravilno kondicioniranje kolone.

Napomena 7. Temperatura kondicioniranja mora biti najmanje 20°C niža od maksimalne temperature određene za upotrijebljenu stacionarnu fazu.

5.4.2. Izbor radnih uslova

5.4.2.1. Okviri radni uslovi su sljedeći:

- temperatura kolone: početno 180°C osam minuta, a zatim se programira na povećanje od 5°C/min do 260°C te konačno 15 minuta pri 260°C,
- temperatura isparivača: 280°C
- temperatura detektora: 290°C
- linearna brzina plina nosioca: helij 20 do 35 cm/s, vodik 30 do 50 cm/s,
- omjer razdvajanja protoka: 1:50 do 1:100,
- osjetljivost uređaja: 4 do 16 x veća od najmanjeg prigušenja,
- osjetljivost snimanja: 1 do 2 mV pune skale,
- brzina papira: 30 do 60 cm/h,
- količina injektirane tvari: 0,5 do 1 μ l TMSE rastvora,

Navedeni uslovi mogu se modificirati prema karakteristikama kolone i plinskog hromatografa kako bi se dobili hromatogrami koji zadovoljavaju sljedeće uslove:

- vrijeme zadržavanja alkohola C26 treba biti 18 ± 5 minuta,
- pik alkohola C22 treba biti 80 ± 20 % pune vrijednosti skale za maslinovo ulje, odnosno 40 ± 20 % za ulje iz sjemenki.

5.4.2.2. Navedeni zahtjevi provjeravaju se ponovljenim injektiranjem standardne smjese TMSE alkohola te se radni uslovi podešavaju kako bi se postigli najbolji mogući rezultati.

5.4.2.3. Parametri integracije pikova moraju biti postavljeni tako da se omogući ispravna ocjena površina pikova.

5.4.3. Postupak analize

5.4.3.1. Pomoću mikrolitarske šprice od 10 μ l uvuče se 1 μ l heksana, zatim 0,5 μ l zraka te potom 0,5 do 1 μ l rastvora uzorka. Pritom se klip šprice povuče tako da se igla isprazni. Igla se uvede kroz membranu injektora te se nakon 1-2 sekunde brzo injektira, a nakon približno 5 sekundi igla lagano izvuče.

5.4.3.2. Nastavi se sa snimanjem dok se TMSE prisutnih alifatskih alkohola u potpunosti ne eluira. Bazna linija mora sve vrijeme zadovoljavati uslove 5.4.1.2.

5.4.4. Identifikacija pikova

Identifikacija pojedinačnih pikova vrši se na osnovu vremena zadržavanja i poređenjem sa standardnom smjesom TMSE analiziranom u istim uslovima.

Hromatogram alkoholne frakcije djevičanskog maslinovog ulja prikazan je na slici 1.

5.4.5. Kvantitativna ocjena

5.4.5.1. Površine pikova 1-eikosanola i alifatskih alkohola C₂₂, C₂₄, C₂₆ i C₂₈ računaju se elektronskom integracijom.

5.4.5.2. Količina pojedinog alifatskog alkohola, izražena u mg/1000 g masne tvari, izračunava se na sljedeći način:

$$\text{alkohol x} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

gdje je:

A_x = površina pika alkohola x

A_s = površina 1-eikosanola

m_s = masa 1-eikosanola u miligramima

m = masa uzorka u gramima

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

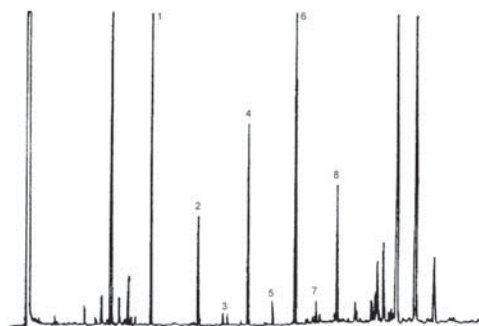
Izražava se podatak o udjelu pojedinih alifatskih alkohola u mg/1000 g masne tvari. Njihovim sabiranjem dobivaju se "ukupni alifatski alkoholi".

DODATAK

Određivanje linearne brzine plina

U plinski hromatograf podešen na normalne radne uslove injektira se 1 do 3 μ l metana ili propana i pomoću zapornog sata mjeri vrijeme potrebno plinu da prođe kroz kolonu od trenutka injiciranja do trenutka pojave pika (tM).

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



Slika 1. Hromatogram alkoholne frakcije djevičanskog ulja
1 = eikosanol
2 = dekosanol
3 = trikosanol

- 4 = tetrakosanol
- 5 = pentakosanol
- 6 = heksakosanol
- 7 = heptakosanol
- 8 = oktakosanol

ANEKS XV.

METODA UTVRĐIVANJA SADRŽAJA VOSKOVA, METIL ESTERA MASNIH KISELINA I ETIL ESTERA MASNIH KISELINA POMOĆU KAPILARNE PLINSKE HROMATOGRAFIJE

1. SVRHA

Ova metoda služi za utvrđivanje sadržaja voskova, metil estera masnih kiselina i etil estera masnih kiselina u raznim vrstama maslinovog ulja. Pojedini voskovi i alkil esteri su izdvojeni su u skladu s brojem atoma ugljika. Metoda se preporučuje kao alat za razlikovanje između maslinovog ulja i ulja komine maslina, te kao parametar kvaliteta za ekstra djevičansko maslinovo ulje koji omogućava otkrivanje neovlaštenog miješanja ekstra djevičanskog maslinovog ulja s uljima nižeg kvaliteta bilo da se radi o djevičanskom ulju, ulju lampante ili dezodoriranim uljima.

2. POSTUPAK

Dodavanje odgovarajućih internih standarda ulju te frakcioniranje pomoću hromatografije na koloni hidriranog silikagela. Oporavak frakcije izlučene u testnim uslovima (s nižim polaritetom od polariteta triacilglicerola) i direktna analiza pomoću kapilarne plinske hromatografije.

3. APARATURA

3.1. Erlenmeyerova tikvica, 25 ml

3.2. Staklena kolona za tečnu hromatografiju, unutrašnjeg promjera 15 mm, dužine 30 - 40 cm, opskrbljena odgovarajućom slavinom.

3.3. Plinski hromatograf pogodan za upotrebu s kapilarnom kolonom, opremljen sistemom za direktno uštrcavanje na kolonu.

3.3.1. Termostatski kontrolirana peć s temperaturnim programiranjem

3.3.2. Hladni injektor s direktnim uštrcavanjem na kolonu

3.3.3. Detektor jonizacije plamena i pretvarač-pojačivač

3.3.4. Pisač-integrator (Napomena 1.) za upotrebu s pretvaračem-pojačivačem (tačka 3.3.3) s vremenom odgovora ne dužim od 1 sekunde i varijabilnom brzinom papira.

Napomena: Kompjuterizirani sistemi se također mogu koristiti tamo gdje su podaci plinske hromatografije uneseni pomoću računara.

3.3.5. Kapilarna kolona, srašteni silicij (za analizu voskova i metil i etil estera) dužine 8 – 12 m, unutrašnjeg promjera 0.25 – 0.32 mm, interno presvučen tečnom fazom (Napomena 2.) do uniformne debljine 0.10 – 0.30 μ m.

Napomena 2. Odgovarajuće komercijalne tečne faze dostupne su za ove svrhe, poput SE₅₂, SE₅₄ itd.

3.4. Mikrošprica 10 μ l, sa čvrstom iglom, za direktno uštrcavanje na kolonu.

3.5. Elektrovibrator

3.6. Rotacioni evaporator

3.7. Omotana peć

3.8. Analitička vaga za vaganje do tačnosti od ± 0.1 mg.

3.9. Standardni laboratorijski stakleni predmeti

4. REAGENSI

4.1. Silikagel, 60 – 200 μ m mreža. Postavite silikagel u omotanu peć na 500 °C najmanje 4 sata. Pustite da se ohladi pa dodajte 2% vode u odnosu na upotrijebljenu količinu silikagela.

Dobro protresite kako bi se emulzija homogenizirala te držite u eksikatoru najmanje 12 sati prije upotrebe.

4.2. n-heksan, hromatografskog razreda ili razreda ostatka (čistoća se mora provjeriti).

UPOZORENJE: Dim se može zapaliti. Držite se podalje od toplote, iskri i plamena. Pobrinite se da su boce uvijek zatvorene. Osigurajte odgovarajuću ventilaciju tokom upotrebe. Izbjegavajte naslage dima te uklonite sve moguće rizike od vatre, kao što su grijalice ili električne aparate koji nisu proizvedeni od nezapaljivog materijala. Ako se udahne, dim može biti poguban, jer može oštetiti nervne ćelije. Izbjegavajte udisanje dima. Koristite odgovarajuću respiratornu aparaturu ako je potrebno. Izbjegavajte kontakt s kožom i očima.

4.3. Etil eter, hromatografskog razreda

UPOZORENJE: Jako zapaljivo i umjereno otrovno. Iritira kožu. Pogubno ako se udahne. Može oštetiti oči. Može doći do zakašnjelih učinaka. Može formirati eksplozivne peroksidge. Dim se može zapaliti. Držite se podalje od toplote, iskri i plamena. Pobrinite se da su boce uvijek zatvorene. Osigurajte odgovarajuću ventilaciju tokom upotrebe. Izbjegavajte naslage dima te uklonite sve moguće rizike od vatre, kao što su grijalice ili električne aparate koji nisu proizvedeni od nezapaljivog materijala. Ne evaporirajte do suhoće. Dodavanje vode ili odgovarajućeg reagensa reduciranja može reducirati formiranje peroksidge. Ne pijte. Izbjegavajte udisanje dima. Izbjegavajte duži ili ponavljani kontakt s kožom.

4.4. n-heptan, hromatografskog razreda ili izo-oktan

UPOZORENJE: Zapaljivo. Pogubno ako se udahne. Držite se podalje od toplote, iskri i plamena. Pobrinite se da su boce uvijek zatvorene. Osigurajte odgovarajuću ventilaciju tokom upotrebe. Izbjegavajte udisanje dima. Izbjegavajte duži ili ponavljani kontakt s kožom.

4.5. Standardni rastvor lauril – arahidat (Napomena 3.) na 0.05 % (m/V) u heptanu (interni standard za voskove).

Napomena 3. Mogu se koristiti i palmitil palmitat, miristil stearat i arahidat laureat.

4.6. Standardni rastvor metil heptadekanoat na 0.02 % (m/V) u heptanu (interni standard za metil i etil estere)

4.7. Sudan 1 (1-fenilazo-2-naftol)

4.8. Plin nosilac: vodik ili helij, čisti plin hromatografskog razreda.

UPOZORENJE:

Vodik. Pod pritiskom jako zapaljiv. Držite se podalje od toplote, iskri i plamena, te uklonite sve moguće rizike od vatre, kao što su grijalice ili električne aparate koji nisu proizvedeni od nezapaljivog materijala. Pobrinite se da su boce uvijek zatvorene, ako se ne koriste. Prije otvaranja ventila boce, otpustite napetost elastičnog podešivača. Nemojte stajati ispred otvora boce prilikom otvaranja ventila. Osigurajte odgovarajuću ventilaciju tokom upotrebe. Nemojte premještati vodik iz jedne u drugu bocu. Ne miješajte plin u boci. Osigurajte da se bocu ne mogu prevrnuti. Držite ih podalje od sunčeve svjetlosti i izvora toplote. Skladištite u nekorzivnom okruženju. Nemojte koristiti oštećene ili neoznačene boce.

Helij. Komprimiran plin pod visokim pritiskom. Smanjuje dostupnu količinu kisika. Bocu držite zatvorenom. Osigurajte odgovarajuću ventilaciju tokom upotrebe. Uvijek koristite sa smanjivačem pritiska. Prije otvaranja ventila boce, otpustite napetost elastičnog podešivača. Ne premještajte plin iz jedne boce u drugu. Osigurajte da se bocu ne mogu prevrnuti. Nemojte stajati ispred otvora boce prilikom otvaranja ventila. Držite ih podalje od sunčeve svjetlosti i izvora toplote. Skladištite u nekorzivnom okruženju. Nemojte koristiti oštećene ili neoznačene boce. Ne udišite. Koristite samo za tehničke svrhe.

4.9. Pomoćni plinovi:

- Vodik, čisti plin hromatografskog razreda

- Zrak, čisti plin hromatografskog razreda
UPOZORENJE:

Zrak. Komprimiran plin pod visokim pritiskom. Oprezno rukujte u prisustvu zapaljivih supstanci, jer je temperatura samozapaljivosti većine organskih tvari u zraku značajno niža pod pritiskom. Pobrinite se da je ventil boce zatvoren kada se boca ne koristi. Uvijek koristite sa smanjivačem pritiska. Prije otvaranja ventila boce, otpustite napetost elastičnog podešivača. Nemojte stajati ispred otvora boce prilikom otvaranja ventila. Ne premještajte plin iz jedne boce u drugu. Nemojte miješati plin u boci. Osigurajte da se boce ne mogu prevrnuti. Držite ih podalje od sunčeve svjetlosti i izvora topline. Skladištite u nekorzivnom okruženju. Nemojte koristiti oštećene ili neoznačene boce. Zrak namijenjen za tehničke svrhe se ne smije koristiti za udisanje ili za respirativne aparate.

5. POSTUPAK

5.1. Priprema hromatografske kolone

Otopite 15 g silika gela (tačka 4.1.) u n-heksanu (tačka 4.2.) i unesite u kolonu (3.2.). ostavite da se istaloži. Dovršite taloženje pomoću elektrovibratora da se dobije ujednačeniji hromatografski sloj. Propustite 30 ml n-heksana da se uklone sve nečistoće. Na vagi odvagati tačno 500 mg uzorka u tikvicu zapremine 25 ml, dodati odgovarajući udio internog standarda (tačka 4.5.) prema pretpostavljenom udjelu voska. Naprimjer, za maslinovo ulje dodati 0.1 mg lauril arahidata, a za ulje komine masline 0.25 do 0.5 mg.

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

Rastvor ispuštati dok ne stigne 1 mm iznad gornje granice absorbenta. Potom započeti hromatografsko eluiranje dok se ne skupi 180 ml mješavine n-heksana/etil etera (omjer 99:1 v/v) pri brzini protoka od oko 15 kapi svakih 10 sekundi (Ova frakcija sadrži metil i etil estere i voskove). (napomene 4. i 5.).

Napomena 4. Mješavina n-heksana/etil etera (99:1) mora se pripremiti svakodnevno.

Napomena 5. Za vizuelnu provjeru ispravnog eluiranja voskova, uzorku u rastvoru može se dodati 100 µm 1% rastvora sudana u mješavini n-heksana/etil etera.

S obzirom da bojilo ima retenciju između voskova i triglicerida, kada bojenje dostigne dno kolone eluiranje treba obustaviti, jer su svi voskovi eluirali.

Tako dobivenu frakciju osušiti u rotacionom evaporatoru, dok se gotovo sav rastvarač ne ukloni. Preostala 2 ml rastvarača treba odstraniti pomoću slabe struje dušika, te dodati 2-4 ml n-heptana ili izo-oktana.

5.2. Analiza plinskom hromatografijom

5.2.1. Pripremni postupak

Postaviti kolonu na plinski hromatograf (3.3.) povezivanjem ulaznog otvora na sistem neposredno na kolonu i izlaznog otvora na detektor. Obaviti provjeru plinskog hromatografa (protok plina, rad detektora, rad pisaa itd.).

Ako se kolona koristi prvi put, potrebno je prvo kondicionirati. Pustite da kroz kolonu prođe malo plina, zatim uključite plinski hromatograf. Postepeno zagrijavati tako da se za 4 sata postigne temperatura od 350°C. Održavati temperaturu najmanje 2 sata, a zatim uređaj podesiti na radne uslove (postaviti protok plina, zapaliti plamen, povezati na elektronski pisaa (tačka 3.3.4), postaviti temperaturu komore za kolonu, regulirati detektor itd.) i zabilježiti signal pri osjetljivosti koja je najmanje dvostruka od one koju zahtijeva analiza. Bazna linija mora biti linearna, bez pikova i 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 estere (Napomena 6.)

Radni uslovi su općenito sljedeći:

- Temperatura kolone:

20°C / min 5°C / min

Početo 80 °C (1 min) ----- 140°C ----- 335°C (20)

- Temperatura detektora: 350 °C

- Količina injektiranog uzorka: 1 µl rastvora n-hektana (2-4 ml)

- Plin nosilac: helij ili vodik pri optimalnoj linearnoj brzini za odabrani plin (vidjeti Dodatak A)

- Osjetljivost instrumenata: pogodno ispunjavanje nabrojanih uslova.

Napomena 6. Zbog visoke konačne temperature, dozvoljeno je pozitivno odstupanje od najviše 10% pune skale.

Ovi uslovi mogu se promijeniti prema karakteristikama kolone i plinskog hromatografa kako bi se postiglo razdvajanje svih voskova i zadovoljavajuće razdvajanje plinova (vidjeti tač. 2., 3. i 4). Vrijeme zadržavanja internog standarda C₃₂ mora biti 18 ± 3 minute. Glavni pik koji pripada voskovima mora dostizati najmanje 60% pune skale.

5.3. Provođenje analize

Mikrošpricom od µl uzeti 1µl rastvora. Povuci klip šprice tako da igla bude prazna. Staviti iglu u injektor i nakon 1-2 sekunde brzo ubrizgati. Nakon 5 sekundi polagano izvući iglu.

Registrirati hromatograf dok voskovi potpuno ne eluiraju.

Bazna linija mora stalno zadovoljavati tražene uslove.

5.4. Identifikacija pikova

Identifikacija pojedinačnih pikova mora se zasnivati na vremenu zadržavanja poređenjem s vremenima zadržavanja poznatih mješavina voskova analiziranih pod istim uslovima. Alkil esteri su identificirani iz smjese metil i etil estera glavnih masnih kiselina u maslinovom ulju (palminska i oleinska).

Slika 1. prikazuje hromatograf voskova u djevičanskom maslinovom ulju. Slike 2. i 3. prikazuju hromatograf dva maloprodajna ekstra djevičanska malinova ulja, jedno s metil i etil esterima, a drugo bez njih. Slika 4. prikazuje hromatograf ekstra djevičanskog maslinovog ulja najvećeg kvaliteta te isto ulje poprskano s 20% dezodoriranog ulja.

5.5. Kvantitativna analiza voskova

Izračunajte područja pikova lauril arahidata internog standarda i alifatskih estera iz C₄₀ do C₄₆ pomoću integratora.

Izračunajte ukupni sadržaj voskova dodavanjem svakog pojedinog voska u mg/kg ulja, koristeći izraz:

$$\text{Voskovi, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

gdje je:

A_x = površina pika pojedinog estera u kvadratnim milimetrima

A_s = površina pika lauril arahidata i internog standarda u kvadratnim milimetrima

m_s = masa dodatnog lauril arahidata i internog standarda u miligramima

m = masa uzorka za analizu u gramima

5.5.1. Kvantitativna analiza metil i etil estera

Pomoću integratora, izračunajte područja pikova metil heptadekanoata internog standarda, metil estere C₁₆ i C₁₈ masnih kiselina, te etil estere C₁₆ i C₁₈ masnih kiselina.

Izračunajte sadržaj svakog alkil estera u mg/kg ulja koristeći izraz:

$$\text{mg/kg} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

Ester

gdje je:

Ax = površina pika pojedinih C₁₆ i C₁₈ estera u kvadratnim milimetrima

As = površina pika metil heptadekanoata internog standarda u kvadratnim milimetrima

ms = masa metil heptadekanoata internog standarda u miligramima

m = masa uzorka za analizu u gramima

6. IZRAŽAVANJE REZULTATA

Ukupan udio različitih voskova od C₄₀ do C₄₆ (Napomena 7.) izražava se u miligramima po kilogramu ulja.

Izrazite ukupan udio metil estera i etil estera od C₁₆ do C₁₈ i sumu oba.

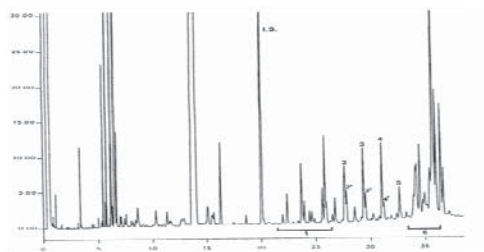
Rezultati se izražavaju najbliže do mg/kg.

Napomena 7. Komponente koje treba kvantificirati odnose se na pikove u parnim brojevima ugljika između alifatskih estera C₄₀ i C₆₀. Kao primjer može se koristiti hromatogram voskova prikazan na donjoj slici. Ako se C₄₆ pojavi dva puta, preporučuje se da se za njegovu identifikaciju analizira frakcija voskova ulja kome masline gdje je pik C₄₆ jednostavno identificirati, jer je očigledno najveći.

Izrazite omjer etil estera i metil estera.

Slika 1

Primjer plinskog hromatograma frakcije voskova maslinovog ulja (*)



Pikovi s vremenom zadržavanja od 5 do 8 minuta masnih kiselina metil i etil estera

Legenda:

IS = lauril arahidat

1 = diterpetski ester

2 + 2' = esteri C₄₀

3 + 3' = esteri C₄₂

4 + 4' = esteri C₄₄

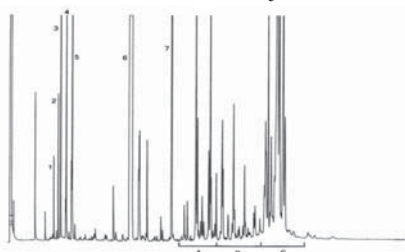
5 = esteri C₄₆

6 = sterolni esteri i triterpenski alkohol

(*) = nakon eluiranja sterolnih estera hromatogram ne smije pokazivati signifikantne pikove (trigliceridi)

Slika 2.

Metil esteri, etil esteri i voskovi u djevičanskom maslinovom ulju



Legenda:

1 – metil C₁₆

2 – etil C₁₆

3 – metil heptadekanoat IS

4 – metil C₁₈

5 – etil C₁₈

6 – squalen

7 – lauril arahidat

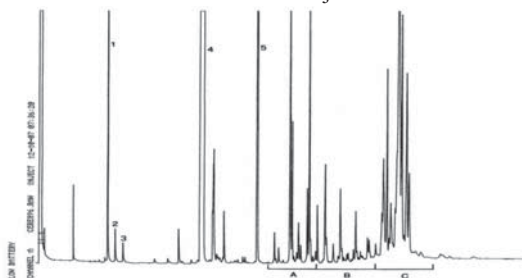
A – diterpetski ester

B – voskovi

C – sterolni esteri i triterpenski esteri

Slika 3.

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



Oznake:

1. Metil heptadekanoat I.S.

2. Metil C₁₈

3. Etil C₁₈

4. Skvalen

5. Lauril arahidat I.S.

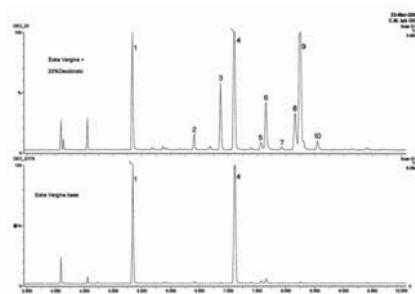
A. Diterpenični estri

B. Voskovi

C. Estri sterola i triterpenični estri

Slika 4.

Dio hromatograma ekstra djevičanskog maslinovog ulja i istog ulja kojem je dodato bazmirisno ulje



Legenda:

1 – metil miristat IS

2 – metil palmitat

3 – etil palmitat

4 – metil heptadekanoat IS

5 – metil limoleat

6 – metil oleat

7 – metil stearat

8 – etil linoleat

9 – etil oleat

10 – etil stearat

Dodatak A

Određivanje linearne brzine plina

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

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