PROVEDBENA UREDBA KOMISIJE (EU) 2015/1833

od 12. listopada 2015.

o izmjeni Uredbe (EEZ) br. 2568/91 o karakteristikama maslinova ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize

EUROPSKA KOMISIJA,

uzimajući u obzir Ugovor o funkcioniranju Europske unije,

uzimajući u obzir Uredbu (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća od 17. prosinca 2013. o uspostavljanju zajedničke organizacije tržišta poljoprivrednih proizvoda i stavljanju izvan snage uredbi Vijeća (EEZ) br. 922/72, (EEZ) br. 234/79, (EZ) br. 1037/2001 i (EZ) br. 1234/2007 ([1]), a posebno njezin članak 91. prvi stavak točku (d) i drugi stavak,

budući da:

(1) Uredbom Komisije (EEZ) br. 2568/91 ([2]) određena su fizikalno-kemijska i organoleptička svojstva maslinova ulja i ulja komine maslina te su utvrđene metode procjene tih svojstava. Te metode redovito se ažuriraju na temelju mišljenja kemijskih stručnjaka i u skladu s obavljenim radom u okviru Međunarodnog vijeća za masline („IOC").

(2) Kako bi se na razini Unije osigurala provedba najnovijih međunarodnih standarda koje je utvrdio IOC, trebalo bi ažurirati određene metode analize utvrđene u Uredbi (EEZ) br. 2568/91.

(3) Na temelju stečenog iskustva čini se da metoda za određivanje stranih biljnih ulja u maslinovim uljima može dati lažno pozitivne rezultate. Stoga bi trebalo izbrisati upućivanja na tu metodu.

(4) Uredbu (EEZ) br. 2568/91 treba stoga na odgovarajući način izmijeniti.

(5) Mjere predviđene ovom Uredbom u skladu su s mišljenjem Odbora za zajedničku organizaciju poljoprivrednih tržišta,

DONIJELA JE OVU UREDBU:

Članak 1.

Uredba (EEZ) br. 2568/91 mijenja se kako slijedi:

1. Članak 2. stavak 1. mijenja se kako slijedi:

   (a) prvi podstavak mijenja se kako slijedi:

      i. točka (g) zamjenjuje se sljedećim:

         „(g) za određivanje sastava masnih kiselina, metoda utvrđena u Prilogu X.;";

      ii. točka (l) zamjenjuje se sljedećim:

         „(l) za određivanje sadržaja alifatskih i triterpenskih alkohola, metoda utvrđena u Prilogu XIX.;";

   (b) drugi podstavak briše se;

2. Sažetak Prilogâ mijenja se kako slijedi:

   (a) upućivanje na Prilog X.A i Prilog X.B, uključujući naslove tih Priloga, zamjenjuju se sljedećim:

      „Prilog X.: Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom";

([1]) SL L 347, 20.12.2013., str. 671.
([2]) Uredba Komisije (EEZ) br. 2568/91 od 11. srpnja 1991. o karakteristikama maslinova ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize (SL L 248, 5.9.1991., str. 1.).

(b) u upućivanju na Prilog XIX., naslov se zamjenjuje sljedećim:

„Određivanje sadržaja alifatskih i triterpenskih alkohola kapilarnom plinskom kromatografijom";

(c) upućivanje na Prilog XX.a briše se;

3. Dodatak 1. Prilogu I.b mijenja se u skladu s Prilogom I. ovoj Uredbi;

4. Prilog V. mijenja se u skladu s Prilogom II. ovoj Uredbi;

5. Prilog IX. zamjenjuje se tekstom iz Priloga III. ovoj Uredbi;

6. Prilozi X.A i X.B zamjenjuju se tekstom iz Priloga IV. ovoj Uredbi;

7. Prilog XII. izmjenjuje se u skladu s Prilogom V. ovoj Uredbi;

8. Prilog XIX. izmjenjuje se u skladu s Prilogom VI. ovoj Uredbi;

9. Prilog XX.a briše se.

Članak 2.

Ova Uredba stupa na snagu trećeg dana od dana objave u *Službenom listu Europske unije*.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje u svim državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 12. listopada 2015.

Za Komisiju
Predsjednik
Jean-Claude JUNCKER

PRILOG I.

U Dodatku 1. Priloga I.b Uredbi (EEZ) br. 2568/91 tablica podudarnosti mijenja se kako slijedi:

1. retci koji se odnose na trans-izomere masnih kiselina i sadržaj masnih kiselina zamjenjuju se sljedećim:

„— Trans-izomeri masnih kiselina	Prilog X.	Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom
— Sadržaj masnih kiselina	Prilog X.	Određivanje metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom”

2. redak koji se odnosi na alifatske alkohole zamjenjuje se sljedećim:

„— Alifatski i triterpenski alkoholi	Prilog XIX.	Određivanje sadržaja alifatskih i triterpenskih alkohola kapilarnom plinskom kromatografijom”

PRILOG II.

U Prilogu V. Uredbi (EEZ) br. 2568/91 točka 6.2. zamjenjuje se sljedećim:

„6.2. Izračunati postotak svakog pojedinačnog sterola iz omjera površine relevantnog pika prema ukupnoj površini pikova za sterole:

$$sterol_x = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

pri čemu je:

A_x = površina pika za x;

ΣA = ukupna površina pikova za sterole.”

PRILOG III.

„PRILOG IX.

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ISPITIVANJE U ULTRALJUBIČASTOM PODRUČJU

UVOD

Spektrofotometrijskim ispitivanjem u ultraljubičastom području mogu se dati informacije o kvaliteti masti, njezinoj očuvanosti i promjenama koje su uzrokovane tehnološkim procesima. Do apsorpcija na valnim duljinama utvrđenima u ovoj metodi dolazi zbog prisutnosti konjugiranih dienskih i trienskih sustava koji nastaju kao posljedica oksidacijskih procesa i/ili postupaka rafiniranja. Te se apsorpcije iskazuju kao specifične ekstinkcije $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ (ekstinkcija 1 %-tnog masenog udjela otopine masti u određenom otapalu, u kiveti od 10 mm) što se uobičajeno označava s K (naziva se i ‚koeficijentom ekstinkcije').

1. OPSEG

U ovom se Prilogu opisuje postupak provođenja spektrofotometrijske analize maslinovog ulja u ultraljubičastom području.

2. PRINCIP METODE

Uzorak se otapa u propisanom otapalu, a sposobnost apsorpcije otopine mjeri se na utvrđenim valnim duljinama u odnosu na čisto otapalo.

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

3. OPREMA

3.1. Spektrofotometar pogodan za mjerenja na valnim duljinama ultraljubičaste svjetlosti (220 nm do 360 nm), s mogućnošću očitavanja pojedinačnih nanometrijskih jedinica. Preporučuju se redovite provjere radi postizanja točnosti i obnovljivosti sposobnosti apsorpcije i ljestvica valnih duljina te za rasipnu svjetlost.

3.1.1. *Ljestvica valnih duljina:* Ona se može provjeriti upotrebom referentnog materijala koji se sastoji od filtra od optičkog stakla koje sadržava holmijev oksid ili otopinu holmijevog oksida (zapečaćen ili nezapečaćen) s jasnim apsorpcijskim frekvencijama. Referentni materijali namijenjeni su provjeri i baždarenju ljestvica valnih duljina vidljivih i ultraljubičastih spektrofotometara s nominalnim spektralnim frekvencijskim širinama od 5 nm ili manje. Mjerenja se provode u odnosu na zrak kao slijepu probu u intervalu valnih duljina od 640 do 240 nm, u skladu s uputama priloženim referentnim materijalima. Provodi se ispravljanje bazne linije s praznim putem snopa pri svakoj promjeni širine procjepa. Standardne valne duljine navedene su u certifikatu referentnog materijala.

3.1.2. *Ljestvica apsorpcije:* Ona se može provjeriti upotrebom komercijalno dostupnog zapečaćenog referentnog materijala koji se sastoji od kisele otopine kalijeva dikromata u određenim koncentracijama i potvrđenim vrijednostima apsorpcije pri njihovim λmax (četiri otopine kalijeva dikromata u perklornoj kiselini zapečaćenog u četiri UV kvarcne kivete za mjerenje referentne vrijednosti linearnosti i fotometrijske točnosti u UV-području). Otopine kalijevog dikromata mjere se u odnosu na slijepu probu kiseline koja se primjenjuje nakon ispravljanja bazne linije u skladu s uputama priloženim referentnom materijalu. Vrijednosti apsorpcije navedene su u certifikatu referentnog materijala.

U cilju provjeravanja odziva fotoćelije i fotomultiplikatora druga je mogućnost postupiti na sljedeći način: odvagnuti 0,2000 g čistog kalijevog kromata za spektrofotometriju i otopiti ga u 0,05 mol/l otopini kalijevog hidroksida u graduiranoj tikvici volumena 1 000 ml i nadopuniti do oznake. Uzeti točno 25 ml dobivene otopine, staviti ju u graduiranu tikvicu volumena 500 ml i razrijediti do oznake upotrebljavajući istu otopinu kalijevog hidroksida.

Izmjeriti ekstinkciju tako dobivene otopine na 275 nm, upotrebljavajući otopinu kalijevog hidroksida kao referentnu. Ekstinkcija izmjerena upotrebom kivete od 1 cm treba biti 0,200 ± 0,005.

3.2. Pravokutne kvarcne kivete, s poklopcima, pogodne za mjerenja na valnim duljinama ultraljubičaste svjetlosti (220 do 360 nm) s duljinom optičke putanje od 10 mm. Kivete napunjene vodom ili drugim prikladnim otapalom ne bi trebale pokazivati međusobne razlike u ekstinkciji veće od 0,01 ekstinkcijskih jedinica.

3.3. Odmjerne tikvice od 25 ml s jednom oznakom, klase A.

3.4. Analitička vaga s mogućnošću očitanja uz odstupanje do 0,0001 g

4. REAGENSI

Tijekom analize, osim ako nije drukčije navedeno, upotrebljavati isključivo reagense priznate analitičke čistoće te destiliranu ili demineraliziranu vodu ili vodu jednakovrijedne čistoće.

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

5. POSTUPAK

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

5.2. Od tako pripremljenog uzorka precizno odvagnuti približno 0,25 g (uz odstupanje do 1 mg) tako pripremljenog uzorka u graduiranoj tikvici od 25 ml, nadopuniti propisanim otapalom do oznake i homogenizirati. Dobivena otopina mora biti savršeno bistra. Ako je došlo do opalescencije ili zamućenosti, brzo profiltrirati kroz papir.

NAPOMENA: U pravilu je masa od 0,25 – 0,30 g dostatna za mjerenja sposobnosti apsorpcije djevičanskog ili ekstra djevičanskog maslinovog ulja na 268 nm i 270 nm. Za mjerenja na 232 nm uobičajeno je potrebno 0,05 g uzorka te se tako u pravilu pripremaju dvije različite otopine. Za mjerenja sposobnosti apsorpcije ulja komine maslina, rafiniranih maslinovih ulja i krivotvorenih maslinovih ulja, a zbog njihove veće sposobnosti apsorpcije, u pravilu je potrebna manja količina uzorka, npr. 0,1 g.

5.3. Prema potrebi ispraviti baznu liniju (220 – 290 nm) otapalom u obje kvarcne kivete (uzorak i referenca), potom napuniti kvarcnu kivetu uzorka dobivenom ispitnom otopinom i izmjeriti ekstinkcije na 232, 268 ili 270 nm u odnosu na otapalo koje je upotrijebljeno kao referenca.

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

5.4. Nakon mjerenja sposobnosti apsorpcije na 268 ili 270 nm izmjeriti sposobnost apsorpcije pri λmax, λmax + 4 i λmax – 4. Te se vrijednosti sposobnosti apsorpcije upotrebljavaju radi određivanja odstupanja u specifičnoj ekstinkciji (ΔK).

NAPOMENA: smatra se da λmax iznosi 268 nm za izo-oktan koji se upotrebljava kao otapalo te 270 nm za cikloheksan.

6. ISKAZIVANJE REZULTATA

6.1. Zabilježiti specifične ekstinkcije (koeficijente ekstinkcije) na različitim valnim duljinama, izračunate kako slijedi:

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

pri čemu je:

Kλ = specifična ekstinkcija na valnoj duljini λ;

Eλ = ekstinkcija mjerena na valnoj duljini λ;

c = koncentracija otopine u g/100 ml;

s = duljina puta kvarcne kivete u cm;

iskazano s dva decimalna mjesta.

6.2. Odstupanje specifične ekstinkcije (ΔK)

Odstupanje apsolutne vrijednosti ekstinkcije (ΔK) iskazuje se kao:

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

pri čemu je Km specifična ekstinkcija na valnoj duljini za maksimalnu apsorpciju na 270 nm i 268 nm ovisno o upotrijebljenom otapalu.

Rezultati trebaju biti iskazani s dva decimalna mjesta.”

PRILOG IV.

„PRILOG X.

ODREĐIVANJE METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. OPSEG

Ovim se Prilogom daju smjernice za određivanje plinskom kromatografijom slobodnih i vezanih masnih kiselina u biljnim mastima i uljima nakon njihovog pretvaranja u metilne estere masnih kiselina (engl. *fatty acid methyl esters* – FAME).

Vezane masne kiseline triacilglicerola (engl. *triacylglycerols* – TAGs) te, ovisno o metodi esterifikacije, slobodne masne kiseline (engl. free *fatty acids* – FFA) pretvaraju se u metilne estere masnih kiselina (FAME) koji se određuju kapilarnom plinskom kromatografijom.

Metodom koja je opisana u ovom Prilogu dozvoljava se određivanje FAME-a od C_{12} do C_{24}, uključujući zasićene, *cis*- i *trans*-jednostruko nezasićene i cis- i *trans*-višestruko nezasićene metilne estere masnih kiselina.

2. PRINCIP

Plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography* – GC) upotrebljava se za kvantitativnu analizu FAME-a. Metilne estere masnih kiselina (FAME) priprema se u skladu s dijelom A. Zatim ih se injektira u injektor u kojem isparavaju. Odjeljivanje FAME-a izvršava se na analitičkoj koloni specifičnog polariteta i duljine. Plameno-ionizacijski detektor (engl. *Flame Ionisation Detector* – FID) upotrebljava se za uočavanje FAME-a. Uvjeti analize navedeni su u dijelu B.

Vodik ili helij mogu se upotrebljavati kao plin nosač (mobilna faza) u plinskoj kromatografiji FAME-a s FID-om. Vodik ubrzava odjeljivanje i daje oštrije pikove. Stacionarna faza je mikroskopski sloj tankog tekućeg filma na inertnoj čvrstoj površini od kvarca.

Kako prolaze kroz kapilarnu kolonu, hlapivi spojevi koje se analizira međusobno djeluju sa stacionarnom fazom ostavljajući premaz na unutarnjoj površini kolone. Zbog takvog različitog međusobnog djelovanja različitih spojeva oni eluiraju u različito vrijeme koje se naziva retencijskim vremenom spoja za dani skup analitičkih parametara. Usporedba retencijskih vremena upotrebljava se za identifikaciju različitih spojeva.

DIO A.

PRIPREMA METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA IZ MASLINOVOG ULJE I ULJA KOMINE MASLINA

1. OPSEG

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

2. PODRUČJE PRIMJENE

Priprema metilnih estera masnih kiselina iz maslinovog ulja i ulja komine maslina vrši se postupkom transesterifikacije s otopinom kalijevog hidroksida u metanolu na sobnoj temperaturi. Pitanje potrebe za pročišćavanjem uzorka prije transesterifikacije ovisi o sadržaju slobodnih masnih kiselina u uzorku i analitičkom parametru koji treba odrediti, a koji je moguće odabrati u skladu sa sljedećom tablicom:

Kategorija ulja	Metoda
Djevičansko maslinovo ulje kiselosti ≤ 2,0 %	1. Masne kiseline 2. Trans-masne kiseline 3. ΔECN42 (nakon pročišćavanja silikagelom ekstrakcijom na čvrstoj fazi)
Rafinirano maslinovo ulje	
Maslinovo ulje koje se sastoji od rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja	

Kategorija ulja	Metoda
Rafinirano ulje komine maslina	
Ulje komine maslina	
Djevičansko maslinovo ulje kiselosti > 2,0 % Sirovo ulje komine maslina	1. Masne kiseline (nakon pročišćavanja silikagelom ekstrakcijom na čvrstoj fazi) 2. Trans-masne kiseline (nakon pročišćavanja silikagelom ekstrakcijom na čvrstoj fazi) 3. ΔECN42 (nakon pročišćavanja silikagelom ekstrakcijom na čvrstoj fazi)

3. METODOLOGIJA

3.1. **Transesterifikacija s otopinom kalijevog hidroksida u metanolu na sobnoj temperaturi**

3.1.1. *Princip*

Metilni esteri formiraju se transesterifikacijom s otopinom kalijevog hidroksida u metanolu, kao međuprodukti prije nego što nastupi saponifikacija.

3.1.2. *Reagensi*

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

3.1.2.2. Heksan, kromatografske čistoće.

3.1.2.3. Heptan, kromatografske čistoće.

3.1.2.4. Dietilni eter, stabiliziran za analizu.

3.1.2.5. Aceton, kromatografske čistoće.

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

3.1.2.7. Kalijev hidroksid, otopina u metanolu koncentracije oko 2 mol/l: otopiti 11,2 g kalijevog hidroksida u 100 ml metanola.

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

3.1.3. *Oprema*

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

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

3.1.4. *Pročišćavanje uzoraka ulja*

Prema potrebi se uzorak pročišćava prolaskom ulja kroz silikagel uloške za ekstrakciju na čvrstu fazu. Silikagel uložak (3.1.2.8.) se stavi u vakuumski instrument za eluaciju i ispere pod vakuumom sa 6 ml heksana (3.1.2.2.); ispiranje se odvija bez vakuuma. Zatim se otopina ulja (približno 0,12 g) u 0,5 ml heksana (3.1.2.2.) stavi u kolonu. Kad otopina prodre u silikagel, eluira se pod vakuumom s 10 ml smjese heksana/dietil etera (87:13 v/v) (3.1.2.6.). Ukupni eluat se homogenizira i podjeli na dva po volumenu približno jednaka dijela. Alikvot se upari do suhoće rotirajućim isparivačem pod sniženim tlakom na sobnoj temperaturi. Ostatak se otopi u 1 ml heptana te je otopina spremna za analizu masnih kiselina plinskom kromatografijom. Drugi alikvot se upari, a ostatak otopi u 1 ml acetona za analizu triglicerida HPLC metodom, ako je potrebno.

3.1.5. *Postupak*

U epruvetu s navojnim čepom volumena 5 ml (3.1.3.1.) odvagati oko 0,1 g uzorka ulja. Dodati 2 ml heptana (3.1.2.2.) i protresti. Dodati 0,2 ml otopine kalijevog hidroksida u metanolu (3.1.2.7.), zatvoriti čepom s PTFE spojem, čvrsto zatvoriti i jako tresti 30 sekundi. Ostaviti da se slegne dok se gornja otopina ne razbistri. Dekantirati gornji sloj koji sadržava metilne estere. Heptanska otopina spremna je za injektiranje u plinski kromatograf. Preporučuje se čuvanje otopine u hladnjaku do plinsko-kromatografske analize. Ne preporučuje se čuvanje otopine dulje od 12 sati.

DIO B.

ANALIZA METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

1. OPSEG

U ovom se dijelu daju opće smjernice za primjenu kapilarne plinske kromatografije radi utvrđivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava smjese metilnih estera masnih kiselina dobivenih u skladu s metodom utvrđenom u dijelu A.

Ovaj se dio ne primjenjuje na polimerizirane masne kiseline.

2. REAGENSI

2.1. **Plin nosač**

Inertni plin (helij ili vodik), temeljito osušen, sa sadržajem kisika manjim od 10 mg/kg.

Napomena 1.: Vodikom se može udvostručiti brzina analize, no opasan je. Dostupni su sigurnosni uređaji.

2.2. **Pomoćni plinovi**

2.2.1. Vodik (čistoće ≥ 99,9 %), bez organskih nečistoća.

2.2.2. Zrak ili kisik, bez organskih nečistoća.

2.2.3. Dušik (čistoće > 99 %).

2.3. **Referentni standard**

Smjesa metilnih estera čistih masnih kiselina ili metilnih estera masti poznatog sastava, po mogućnosti nalik onoj masne tvari koju se analizira. Cis-izomeri i trans-izomeri oktadecenoičnih, oktadekadienoičnih i oktadekatrienoičnih metilnih estera korisni su za identifikaciju trans-izomera nezasićenih kiselina.

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

3. OPREMA

Navedene upute odnose se na uobičajenu opremu koja se upotrebljava za plinsku kromatografiju, uključujući kapilarne kolone i plameno-ionizacijski detektor.

3.1. **Plinski kromatograf**

Plinski kromatograf treba sadržavati sljedeće elemente.

3.1.1. *Sustav za injektiranje*

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

3.1.2. *Peć*

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

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

3.1.3. *Kapilarna kolona*

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

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

Napomena 2.: Postoji opasnost od mogućnosti da polarni polisiloksani prouzroče poteškoće pri identificiranju i odjeljivanju linolenske kiseline i C_{20} kiselina.

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

3.1.3.3. Sastavljanje i kondicioniranje kolone

Uvažavati normalne mjere predostrožnosti pri sastavljanju kapilarnih kolona, odnosno namještanje kolone u peći (nositelj), odabir i sastavljanje priključaka (čvrsto zabrtvljeni da ne bi došlo do curenja), pozicioniranje krajeva kolone u injektoru i na detektoru (smanjivanje slobodnog (neiskorištenog) volumena). Kolonu staviti pod struju plina nosača (na primjer 0,3 bar (30 kPa) za kolonu duljine 25 m i unutarnjeg promjera 0,3 mm).

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

Napomena 3.: Odgovarajuće unaprijed kondicionirane kolone dostupne su u slobodnoj trgovini.

3.1.4. *Plameno-ionizacijski detektor i pretvarač s pojačalom*

3.2. **Štrcaljka**

Štrcaljka ima maksimalni volumen 10 μl i graduirana je s podjelom po 0,1 μl.

3.3. **Sustav prikupljanja podataka**

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

4. POSTUPAK

Aktivnosti opisane u točkama od 4.1. do 4.3. odnose se na upotrebu plameno-ionizacijskog detektora.

4.1. **Uvjeti ispitivanja**

4.1.1. *Odabir optimalnih radnih uvjeta za kapilarne kolone*

Zbog učinkovitosti i propusnosti kapilarne kolone odjeljivanje sastojaka i trajanje analize uvelike ovise o brzini protoka plina nosača kroz kolonu. Stoga je potrebno optimizirati radne uvjete djelovanjem na ovaj parametar (ili, jednostavnije, na glavni gubitak kolone), ovisno o tome želi li se poboljšati odjeljivanje ili ubrzati analiza.

Sljedeći su se uvjeti pokazali prikladni za odjeljivanje FAME-ova (C_4 do C_{26}). Primjeri kromatograma prikazani su u Dodatku B:

Temperatura injektora:	250 °C
Temperatura detektora:	250 °C
Temperatura peći:	165 °C (8 min) do 210 °C na 2 °C/min
Plin nosač vodik:	pritisak na vrhu kolone, 179 kPa
Ukupni protok:	154,0 ml/min
Omjer razdvajanja:	1:100
Volumen injektiranja:	1 µl

4.1.2. *Određivanje rezolucije (vidi Dodatak A)*

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

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

ili

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

pri čemu je:

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

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

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

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

$\omega_{(I)}$ širina baze pika I;

$\omega_{(II)}$ širina baze pika II;

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

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

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

pri čemu je:

σ standardno odstupanje (vidi Dodatak A, sliku 1.).

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

Ako dva pika nisu u potpunosti razdvojena, tangente na točkama infleksije dva pika križaju se u točki C. Radi potpunog razdvajanja dva pika udaljenost između dva pika mora biti jednaka:

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

5. ISKAZIVANJE REZULTATA

5.1. **Kvalitativna analiza**

Identificirati pikove metilnog estera za uzorak iz kromatograma u Dodatku B., slici 1., ako je potrebno interpolacijom ili njihovom usporedbom s referentnim mješavinama smjesa metilnih estera (kako je navedeno u točki 2.3.).

5.2. **Kvantitativna analiza**

5.2.1. *Određivanje sastava*

Izračunati odlomke mase w_i pojedinačnih metilnih estera masnih kiselina, iskazane kao maseni udio metilnih estera, kako slijedi:

5.2.2. *Metoda izračunavanja*

5.2.2.1. Općeniti slučaj

Izračunati sadržaj danog sastojka i, iskazan kao maseni udio metilnih estera, određivanjem postotka kojega predstavlja površina odgovarajućeg pika u odnosu na zbroj površina svih pikova, upotrebljavajući sljedeću formulu:

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

pri čemu je:

A_i površina ispod pika pojedinačnih metilnih estera masnih kiselina *i*;

ΣA zbroj površina pod svim pikovima svih pojedinačnih metilnih estera masnih kiselina.

Rezultate se iskazuje s dva decimalna mjesta.

Napomena 4.: Za masti i ulja odlomak mase metilnih estera masnih kiselina jednak je odlomku mase triacilglicerola u gramima na 100 g. U slučajevima u kojima ova pretpostavka nije dopuštena, vidi točku 5.2.2.2.

5.2.2.2. Upotreba korekcijskih faktora

U određenim slučajevima, na primjer kad su prisutne masne kiseline s manje od osam atoma ugljika ili kiselina sa sekundarnim skupinama, vrše se korekcije površine s pomoću specifičnih korekcijskih faktora (Fci). Te se faktore određuje za svaki pojedinačni instrument. U tu se svrhu upotrebljavaju prikladni referentni materijali čiji je sastav masnih kiselina odgovarajućeg raspona.

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

Za ovu referentnu smjesu maseni udio FAME *i* zadan je sljedećom formulom:

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

pri čemu je:

$\mathbf{m_i}$ masa FAME *i* u referentnoj smjesi;

Σm zbroj masa raznih sastojaka kao FAME-ovi referentne smjese.

Iz kromatograma referentne smjese izračunati postotak po površini za FAME *i* kako slijedi:

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

pri čemu je:

A_i površina FAME *i* u referentnoj smjesi;

ΣA zbroj svih površina svih FAME-ova referentne smjese.

Korekcijski faktor F_c tada je

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

Za uzorak maseni udio svakog FAME *i* je:

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

Rezultate se iskazuje s dva decimalna mjesta.

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

5.2.2.3. Upotreba internog standarda

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

Maseni udio sastojka i, iskazan kao metilni esteri, zadan je formulom:

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

pri čemu je:

A_i je površina FAME *i*;

A_{IS} je površina internog standarda;

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

F_{IS} je korekcijski faktor internog standarda;

m je masa uzorka za ispitivanje u miligramima;

m_{IS} je masa internog standarda u miligramima.

Rezultate se iskazuje s dva decimalna mjesta.

6. IZVJEŠĆE O ISPITIVANJU

U izvješću o ispitivanju navode se metode upotrijebljene za pripremu metilnih estera i za plinsku kromatografsku analizu. Sadržava i sve pojedinosti djelovanja koje nisu navedene u ovoj standardnoj metodi ili se smatraju opcionalnima zajedno s pojedinostima o bilo kojem događaju koji je mogao utjecati na rezultate.

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

7. PRECIZNOST

7.1. **Rezultati međulaboratorijskog ispitivanja**

Pojedinosti međulaboratorijskog ispitivanja o preciznosti metode navedene se u Prilogu C normi IOC/T.20/dok. br. 33. Vrijednosti izvedene iz ovog međulaboratorijskog ispitivanja možda neće biti primjenjive na raspone koncentracija i matrice koji se razlikuju od zadanih.

7.2. **Ponovljivost**

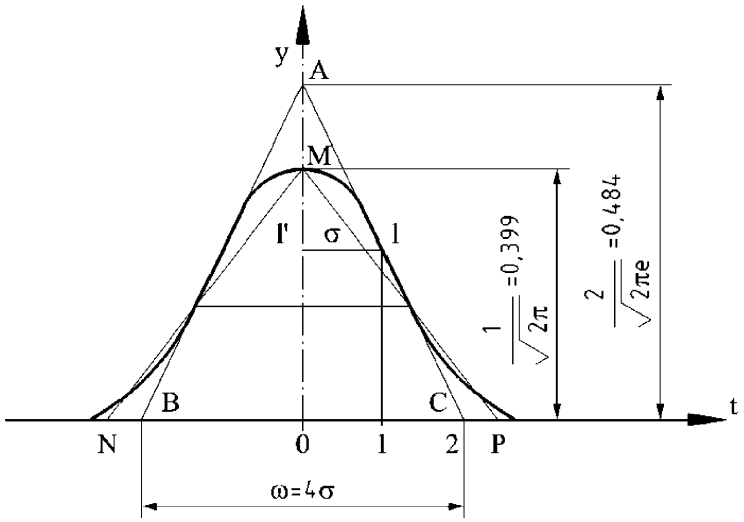
Apsolutna razlika između rezultata dvaju nezavisnih pojedinačnih ispitivanja koje je primjenom iste metode na jednakom ispitnom materijalu u istom laboratoriju u kratkom vremenskom intervalu izvršio isti analitičar upotrebljavajući istu opremu ne smije u više od 5 % slučajeva biti veća od r zadanog u tablicama 1. do 14. u Prilogu C normi IOC/T.20/dok. br. 33.

7.3. **Obnovljivost**

Apsolutna razlika između rezultata dvaju nezavisnih pojedinačnih ispitivanja koja su primjenom iste metode na jednakom ispitnom materijalu u različitim laboratorijima izvršili različiti analitičari upotrebljavajući različitu opremu ne smije u više od 5 % slučajeva biti veća od R zadanog u tablicama 1. do 14. u Prilogu C normi IOC/T.20/dok. br. 33.

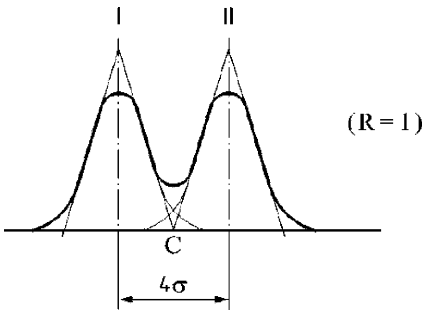
Dodatak A

Slika 1.

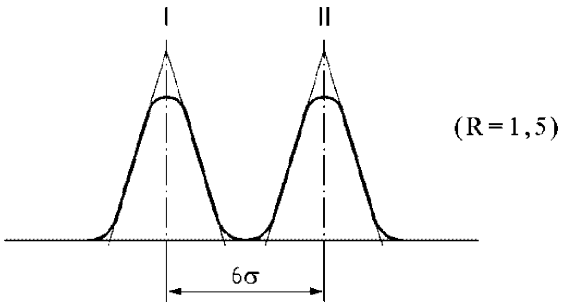


$\omega_{0,5}$ širinom na pola visine trokuta (ABC) i b širinom na pola visine trokuta (NPM).

Slika 2.



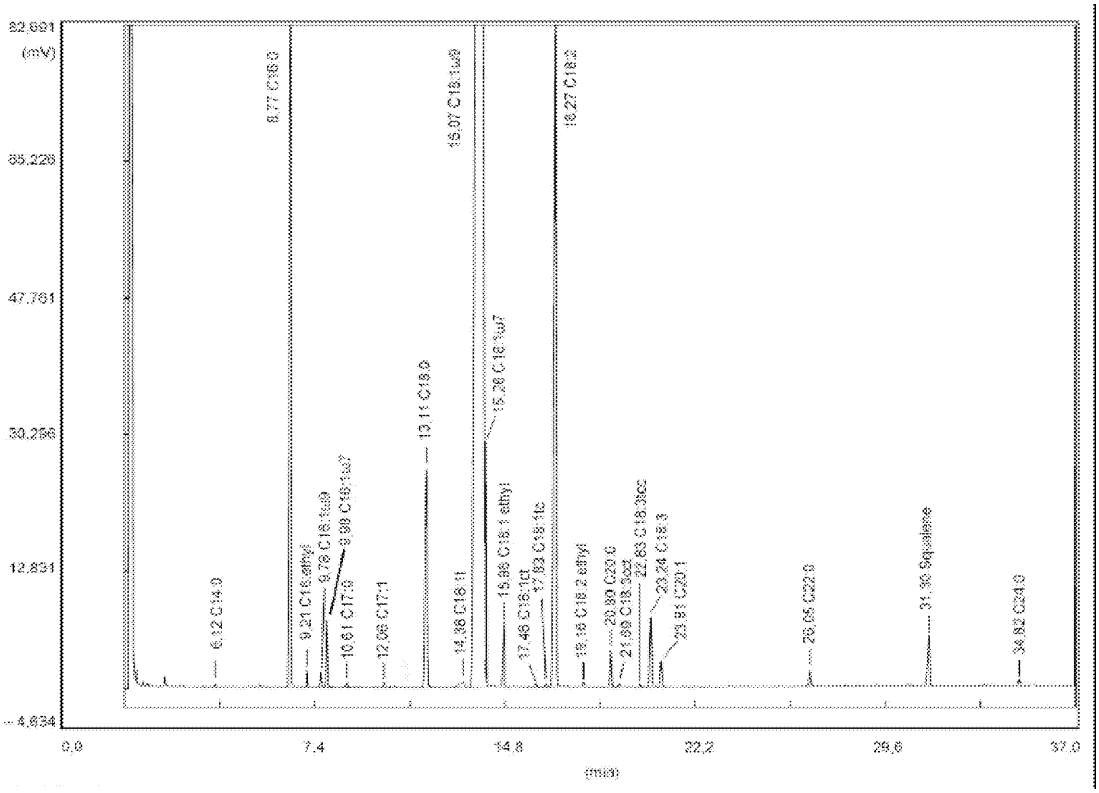
Slika 3.



Dodatak B

Slika 1.

Plinsko-kromatografski profil dobiven metodom hladne metilacije iz ulja komine maslina



Kromatografski pikovi odgovaraju metilnim i etilnim esterima, osim ako nije drukčije navedeno.”

PRILOG V.

Prilog XII. Uredbi (EEZ) br. 2568/91 mijenja se kako slijedi:

1. Točka 1. zamjenjuje se sljedećim:

„1. SVRHA I OPSEG

Svrha je međunarodne metode, koja je opisana u ovom Prilogu, određivanje postupka ocjenjivanja organoleptičkih svojstava djevičanskog maslinova ulja u smislu točke 1. dijela VIII. Priloga VII. Uredbi (EZ) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća (*) te utvrđivanje metode za njegovu klasifikaciju na temelju tih svojstava. Sadržava i upute za neobvezno označivanje.

Opisana metoda primjenjuje se samo na djevičanska maslinova ulja i na klasifikaciju ili označivanje takvog ulja na temelju intenziteta uočenih mana i voćnosti koje je utvrdila skupina odabranih, obučenih i praćenih ocjenjivača koji sačinjavaju komisiju.

Norme IOC-a navedene u ovom Prilogu upotrebljavaju se u njihovoj posljednjoj dostupnoj verziji.

(*) Uredba (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i Vijeća od 17. prosinca 2013. o uspostavljanju zajedničke organizacije tržišta poljoprivrednih proizvoda i stavljanju izvan snage uredbi Vijeća (EEZ) br. 922/72, (EEZ) br. 234/79, (EZ) br. 1037/2001 i (EZ) br. 1234/2007 (SL L 347, 20.12.2013., str. 671.).”

2. Točke 3.2., 3.3. i 3.4. zamjenjuju se sljedećim:

„3.1.1. *Ostala negativna svojstva*

Zagrijano ili zagoreno	Aroma karakteristična za ulja koja su bila izložena pretjeranom i/ili dugotrajnom zagrijavanju tijekom prerade, posebno u slučaju kad se miješanje provodilo u neprikladnim temperaturnim uvjetima.
Sijeno-drvo	Aroma karakteristična za neka ulja proizvedena od maslina koje su se posušile.
Grubo	Osjećaj gustoće i pastoznosti u ustima koji daju pojedina stara ulja.
Strojno ulje	Aroma ulja koja podsjeća na naftu, ulje za podmazivanje ili mineralno ulje.
Biljna voda	Aroma kakvu ulje poprima zbog dužeg dodira s biljnom vodom koja je podvrgnuta fermentacijskim procesima.
Salamura	Aroma ulja dobivenog iz maslina koje su čuvane u salamuri.
Metalno	Aroma koja podsjeća na metal. Karakteristična je za ulja koja su bila u dužem dodiru s metalnim površinama tijekom drobljenja, miješanja, prešanja ili skladištenja.
Oporo	Aroma karakteristična za ulje dobiveno iz maslina koje su prešane na novim filtar-slojnicama. Aroma se može razlikovati ovisno o tome jesu li filtar-slojnice napravljene od zelene trave esparto ili sušene trave esparto.
Crvljivo	Aroma karakteristična za ulje dobiveno iz maslina koje su napale ličinke maslinine muhe (*Bactrocera oleae*).
Krastavac	Aroma koja nastaje kad je ulje predugo hermetički zatvoreno, posebno u limenim spremnicima, a pripisuje se stvaranju 2,6 nonadienala.

3.2. **Pozitivna svojstva**

Voćno	Skup mirisnih osjeta koji ovisi o sorti karakterističan za ulje od zdravih i svježih maslina, bilo dozrelih ili nedozrelih. Zapaža se izravno i/ili u stražnjem dijelu nosa.
Gorko	Primarni okus karakterističan za ulje dobiveno od zelenih maslina ili maslina koje su tek počele mijenjati boju. Opaža se putem okruženih papila poredanih na jeziku u obliku slova ‚V'.
Oštro	Taktilni osjećaj peckanja svojstven uljima proizvedenima na početku godine usjeva, uglavnom još od nedozrelih maslina. Može se raspoznati po cijeloj usnoj šupljini, a posebno u grlu.

3.3. **Neobvezna terminologija u svrhe označivanja**

Predsjednik komisije može na zahtjev izdati potvrdu da ocjenjivana ulja odgovaraju definicijama i rasponima koji na temelju intenziteta i percepcije svojstava odgovaraju sljedećim pridjevima.

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

— *Intenzivno*, kad je medijan svojstva veći od 6,

— *Srednje*, kad je medijan svojstva između 3 i 6,

— *Blago*, kad je medijan svojstva manji od 3.

Voćno	Skup mirisnih osjećaja karakterističan za ulja, koji ovisi o sorti masline i nastaje od zdravih i svježih maslina u kojima ne prevladava ni zelena ni zrela voćnost. Zapaža se izravno i/ili u stražnjem dijelu nosa.
Zeleno voćno	Skup mirisnih osjećaja karakterističan za ulja, koji podsjeća na zeleno voće, ovisi o sorti masline i nastaje od zelenih, zdravih i svježih maslina. Zapaža se izravno i/ili u stražnjem dijelu nosa.
Zrelo voćno	Skup mirisnih osjećaja karakterističan za ulja, koji podsjeća na zrelo voće, ovisi o sorti masline i nastaje od zdravih i svježih maslina. Zapaža se izravno i/ili u stražnjem dijelu nosa.
Skladno	Ulje koje ne pokazuje neuravnoteženost, čime se misli na mirisno-okusno i taktilno svojstvo gdje je medijan za svojstva gorčine i/ili oštrine za dvije točke veći od medijana voćnosti.
Blago ulje	Ulje čiji je medijan za svojstva gorčine i oštrine 2 ili manji.”

3. U točki 7. sljedeća točka umeće se nakon točke 7.1.:

„7.1.1. *Zamjenik predsjednika komisije*

Zbog opravdanih razloga predsjednika komisije može zamijeniti njegov zamjenik koji može preuzeti zadatke koji se odnose na provedbu ocjenjivanja. Taj zamjenik mora posjedovati sve bitne vještine koje su potrebne za obavljanje funkcije predsjednika komisije.”

4. Točka 7.2. zamjenjuje se sljedećim:

„7.2. **Ocjenjivači**

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

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

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

5. Točka 9.3. zamjenjuje se sljedećim:

„9.3. **Način na koji predsjednik komisije upotrebljava podatke**

Predsjednik komisije skuplja obrasce za ocjenjivanje koje je ispunio svaki ocjenjivač i pregledava intenzitete označene za pojedina svojstva. Ako uoče ikakvu nepravilnost, pozivaju ocjenjivača da ponovno pregleda svoj obrazac za ocjenjivanje i, ako je potrebno, ponovi ocjenjivanje.

Predsjednik komisije unosi podatke ocjenjivanja od svakog člana komisije u računalni program poput onoga propisanog normom IOC/T.20/dok. br. 15 radi statističkog izračunavanja rezultata analize, na temelju izračuna njihovog medijana. Vidi točku 9.4. i Dodatak ovom Prilogu. Podaci za dotični uzorak upisuju se s pomoću matrice koja se sastoji od 9 stupaca koji predstavljaju 9 senzornih svojstava i n linija koje predstavljaju n članova komisije.

Kad se zamijeti mana i nju pod naslov ‚Ostalo' navede najmanje 50 % članova komisije, predsjednik komisije izračunava medijan te mane i izrađuje odgovarajuću klasifikaciju.

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

U suprotnom predsjednik komisije mora ponoviti ocjenjivanje specifičnog uzorka u drugoj sesiji ocjenjivanja.

Ako se to često događa, predsjedniku komisije preporučuje se da ocjenjivačima pruži dodatnu obuku (IOC/T.20/dok. br. 14, § 5) i da upotrijebi indeks ponovljivosti i indeks odstupanja kako bi provjerio rad komisije (IOC/T.20/dok. br. 14, § 6)."

6. Točka 9.4. zamjenjuje se sljedećim:

„9.4. **Klasifikacija ulja**

Ulje se razvrstava kako slijedi u skladu s medijanom mana i medijanom svojstva voćnosti. Medijan mana definiran je kao medijan mane koja se osjeća najvećim intenzitetom. Medijan mana i medijan svojstva voćnosti iskazuju se do jednog decimalnog mjesta.

Ulje se razvrstava uspoređujući vrijednost medijana mana i medijana svojstva voćnosti s referentnim intervalima navedenima u nastavku. U obzir je uzeta i pogreška metode pri utvrđivanju ograničenja tih intervala koji se stoga smatraju apsolutnima. Programskim paketima omogućuje se prikaz razvrstavanja u obliku statističke tablice ili grafa.

(a) Ekstra djevičansko maslinovo ulje: medijan mana je 0, a medijan svojstva voćnosti je iznad 0;

(b) Djevičansko maslinovo ulje: medijan mana je iznad 0, ali ne veći od 3,5, a medijan svojstva voćnosti je iznad 0;

(c) Maslinovo ulje lampante: medijan mana je iznad 3,5 ili medijan mana je 3,5 ili manji, a medijan voćnosti je jednak 0.

Napomena 1.: Kad je medijan svojstva oštrine i/ili gorčine veći od 5,0, predsjednik komisije to navodi na potvrdi o ocjenjivanju.

Za ocjenjivanja koja su namijenjena nadziranju sukladnosti provodi se jedno ispitivanje. U slučaju protu-ocjenjivanja predsjednik komisije mora organizirati dva ponavljanja ocjenjivanja u različitim sesijama, medijan svojstava izračunat će se na bazi svih podataka iz obrasca za ocjenjivanje za oba ispitivanja."

7. Slika 1. zamjenjuje se sljedećim:

„Slika 1.

OBRAZAC ZA OCJENJIVANJE DJEVIČANSKOG MASLINOVA ULJA

Intenzitet percepcije mana

Pljesnivo/blatno _____

Ustajalo/vlažno/zemljasto _____

Vinski/octikavo kiselo/kiselkasto _____

Smrznute masline (mokro drvo) _____

Užeglo _____

Ostala negativna svojstva: _____

Opis: Metalno ☐ Suho sijeno ☐ Crvljivo ☐ Grubo ☐
Salamura ☐ Zagrijano ili zagoreno ☐ Biljna voda ☐
Oporo ☐ Krastavac ☐ Strojno ulje ☐

Intenzitet percepcije pozitivnih svojstava

Voćno _____

Zeleno ☐ Zrelo ☐

Gorko _____

Oštro _____

Ime ocjenjivača: Šifra ocjenjivača:

Oznaka uzorka:

Datum: Potpis:

Napomene:"

PRILOG VI.

Prilog XIX. Uredbi (EEZ) br. 2568/91 mijenja se kako slijedi:

1. Naslov se zamjenjuje sljedećim:

„ODREĐIVANJE SADRŽAJA ALIFATSKIH I TRITERPENSKIH ALKOHOLA KAPILARNOM PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM"

2. Točka 1. zamjenjuje se sljedećim:

„1. PREDMET

Ovim se Prilogom opisuje metoda za određivanje sadržaja alifatskih i triterpenskih alkohola u uljima i mastima."

3. Točka 4.11. zamjenjuje se sljedećim:

„4.11. Referentna otopina za tankoslojnu kromatografiju: C_{20}-C_{28} alkohola 0,5 % u kloroformu ili alkoholna frakcija dobivena kako je navedeno u točki 5.2. od neosapunjivih tvari ulja komine maslina."

4. Točke 5.2.5. i 5.2.6. zamjenjuju se sljedećim:

„5.2.5. Ploča se blago i jednoliko pošprica otopinom 2′,7′diklorfluoresceina kad se promatra pod ultraljubičastim svjetlom. Vrpcu alifatskih alkohola moguće je identificirati usporedbom sa slojem dobivenim od referentne otopine: rubovi vrpce označe se crnom olovkom; označavajući zajedno vrpcu alifatskih alkohola i vrpcu terpenskih alkohola neposredno iznad nje (napomena 4.)

Napomena 4.: Vrpce alifatskih alkohola i terpenskih alkohola uzimaju se zajedno zbog mogućih migracija nekih alifatskih alkohola u vrpcu triterpenskih alkohola. Primjer odjeljivanja tankoslojnom kromatografijom prikazan je na slici 1. Dodatka.

5.2.6. Silikagel koji se nalazi u označenom području sastrugati s pomoću metalne spatule. Tako dobiveni fino usitnjeni materijal unijeti u lijevak za filtriranje (3.7.). Dodati 10 ml vrućeg kloroforma, pažljivo izmiješati metalnom spatulom i filtrirati pod vakuumom, skupljajući filtrat u Erlenmeyerovu tikvicu (3.8.) spojenu na lijevak za filtriranje.

Silikagel u tikvici isprati tri puta dietilnim eterom (približno 10 ml svaki put), skupljajući filtrat u istu tikvicu spojenu na lijevak. Filtrat ispariti do volumena od 4 do 5 ml, prenijeti preostalu otopinu u prethodno izvaganu epruvetu volumena 10 ml (3.9.), sušiti laganim zagrijavanjem pod blagom strujom dušika, otopiti s nekoliko kapi acetona, ponovo sušiti, staviti u peć na 105 °C približno 10 minuta, ostaviti da se ohladi u eksikatoru i izvagati.

Ostatak unutar epruvete sastoji se od alkoholne frakcije."

5. Točka 5.4.4. zamjenjuje se sljedećim:

„5.4.4. *Identificiranje pikova.*

Identificiranje pojedinačnih pikova provodi se u skladu s retencijskim vremenima i uspoređivanjem sa standardnom TMSE smjesom koju se analizira pri jednakim uvjetima.

Primjeri kromatograma alkoholne frakcije rafiniranog maslinovog ulja prikazani su na slikama 2. i 3. Dodatka."

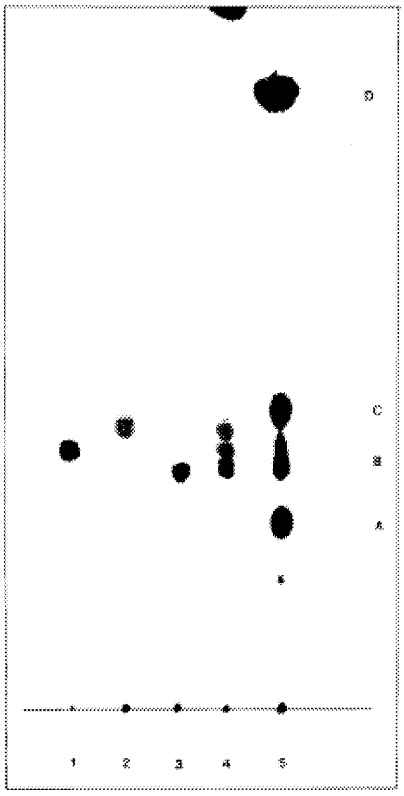
6. Dodatak se zamjenjuje sljedećim:

„*Dodatak*

Primjer odjeljivanja tankoslojnom kromatografijom i primjeri kromatograma

Slika 1.

Ploče za tankoslojnu kromatografiju neosapunjive frakcije maslinovog ulja eluirane heksanom/dietilnim eterom (65/35)

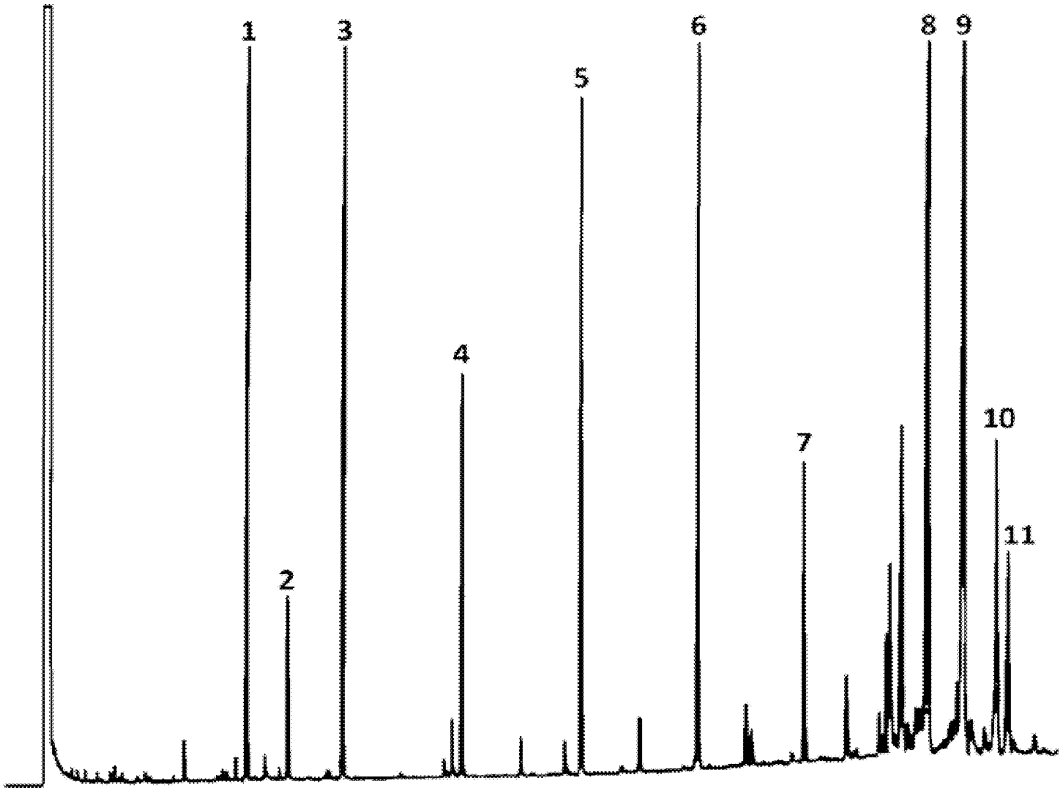


1 Alkohol C_{26}
2 Alkohol C_{30}
3 Alkohol C_{20}
4 Alkoholne mješavine $C_{20\text{-}22\text{-}26\text{-}30}$
5 Ekstra djevičansko neosapunjivo

A Steroli
B Alifatski alkoholi
C Triterpenski alkoholi
D Skvalen

Slika 2.

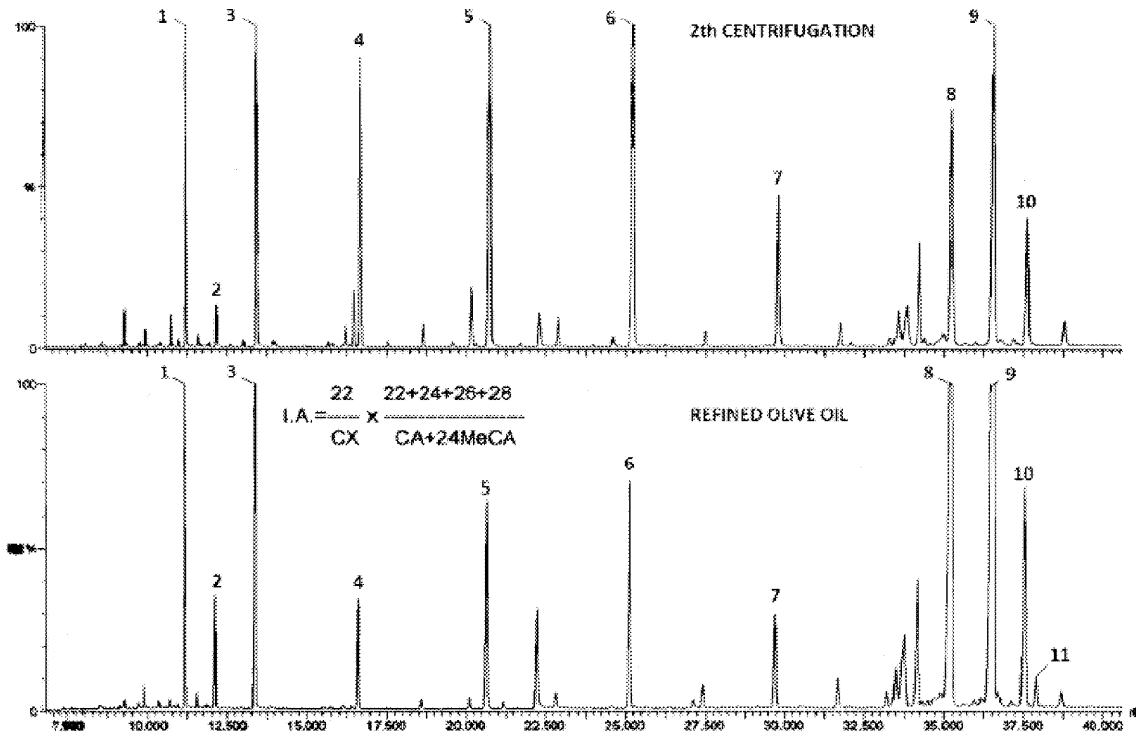
Kromatogram alkoholne frakcije rafiniranog maslinovog ulja



1 = Fitol
2 = Geranilgeraniol
3 = Alkohol C_{20} (IS)
4 = Alkohol C_{22}
5 = Alkohol C_{24}
6 = Alkohol C_{26}
7 = Alkohol C_{28}
8 = Cikloartenol
9 = 24-metilencikloartenol
10 = Citrostadienol
11 = Ciklobranol

Slika 3.

Alifatski i triterpenski alkoholi u rafiniranom maslinovom ulju i maslinovom ulje koje je podvrgnuto dvostrukom centrifugiranju



1 = Fitol

2 = Geranilgeraniol (CX)

3 = Alkohol C_{20}

4 = Alkohol C_{22}

5 = Alkohol C_{24}

6 = Alkohol C_{26}

7 = Alkohol C_{28}

8 = Cikloartenol (CA)

9 = 24-metilencikloartenol (24MeCA)

10 = Citrostadienol

11 = Ciklobranol”