

**KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 702/2007,****21. juuni 2007,****millega muudetakse määrust (EMÜ) nr 2568/91 oliiviõlide ja pressimisjääkide omaduste ja asjakohaste analüüsimeetodite kohta**

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

lubatud oliiviõli ja oliivijääkõli võib turustada kuni asjao-  
maste laovarude lõppemiseni.

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

(4) Käesoleva määrusega ettenähtud meetmed on kooskõlas  
oliiviõli ja lauaoliivide korralduskomitee arvamusega,võttes arvesse nõukogu 29. aprilli 2004. aasta määrust (EÜ) nr  
865/2004 (mis käsitleb oliiviõli- ja lauaoliivide turu ühist  
korraldust ja millega muudetakse määrust (EMÜ) nr  
827/68),<sup>(1)</sup> eriti selle artikli 5 lõiget 3,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

ning arvestades järgmist:

*Artikkel 1*

Määrust (EMÜ) nr 2568/91 muudetakse järgmiselt.

(1) Komisjoni määruses (EMÜ) nr 2568/91<sup>(2)</sup> on määrat-  
letud oliiviõlide ja oliivijääkõlide füüsikalised ja keemi-  
lised omadused ning nende hindamise meetodid. Neid  
meetodeid ning õlide teatavate omaduste piirväärtusi  
tuleb ajakohastada vastavalt keemiaekspertide seisukohta-  
dele ning lähtudes rahvusvahelise oliiviõlinõukogu  
raames läbiviidud uurimustest.

1. Artikli 2 lõike 1 kuues taane asendatakse järgmisega:

„— 2-glütserüülmonopalmitaadi protsendiline sisaldus  
määratakse kindlaks VII lisas sätestatud meetodil.”(2) Keemiaekspertid on leidnud, et 2-glütserüülmonopalmitaadi  
sisalduse määramine on täpsem meetod esterdatud  
õlide sisalduse iseloomustamiseks. Stigmastadieni piir-  
väärtuse vähendamine neitsioliiviõlides võimaldab ka  
paremini eraldada neitsioliiviõlid ja rafineeritud oliiviõlid  
teineteisest.

2. Lisasid muudetakse vastavalt käesoleva määruse lisale.

*Artikkel 2*Käesolev määrus jõustub kolmandal päeval pärast avaldamist  
*Euroopa Liidu Teatajas*.(3) Uute normidega kohanemise võimaldamiseks ja nende  
rakendusmeetmete kehtestamiseks ning häirimatu kauple-  
mise tagamiseks on otstarbekas lükata käesoleva määruse  
kohaldamine edasi kuni 1. jaanuarini 2008. Samadel  
põhjustel tuleks ette näha, et enne nimetatud kuupäeva  
ühenduses seaduslikult valmistatud ja märgistatud või  
ühenduses õiguspäraselt imporditud ja vabasse ringlusse

Käesolevat määrust kohaldatakse alates 1. jaanuarist 2008.

Samas võib tooteid, mis on ühenduses õiguspäraselt valmistatud  
ja märgistatud või mis on ühenduses õiguspäraselt imporditud  
ja lubatud vabasse ringlusse enne 1. jaanuari 2008, turustada  
kuni laovarude lõppemiseni.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 21. juuni 2007

Komisjoni nimel

komisjoni liige

Mariann FISCHER BOEL

<sup>(1)</sup> ELT L 161, 30.4.2004, lk 97.<sup>(2)</sup> EÜT L 248, 5.9.1991, lk 1. Määrust on viimati muudetud määrusega  
(EÜ) nr 1989/2003 (ELT L 295, 13.11.2003, lk 57).

## LISA

Määruse (EMÜ) nr 2568/91 lisasid muudetakse järgmiselt.

1. Kokkuvõtet muudetakse järgmiselt:

a) II lisa pealkiri asendatakse järgmise pealkirjaga:

„Vabade rasvhapete määramine külmeetodil”;

b) VII lisa pealkiri asendatakse järgmise pealkirjaga:

„2-glütserüülmonopalmitaadi protsendilise sisalduse määramine”.

2. I lisa asendatakse järgmise tekstiga:

„L LISA

## OLIVIÖLIDE OMADUSED

Liik	Happesus (%) (*)	Peroksiidid mekv O <sub>2</sub> /kg (*)	Vahad mg/kg (**)	2-glütserüülmopolpalmitaat (%)	Stigmatadien mg/kg (1)	ECN42 HPLC ja ECN42 vaheteoreetiline arvutus	K <sub>232</sub> (*)	K <sub>270</sub> (*)	Δ-K (*)	Organoleptiline hindamine puuduse mediaan (Md) (*)	Organoleptiline hindamine viljale iseloomulikkuse mediaan (Mf) (*)
1. Ekstra neitsioliiviõli	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 kui palmitiinhappe % kokku ≤ 14 % ≤ 1,0 kui palmitiinhappe % kokku > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Neitsioliiviõli	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 kui palmitiinhappe % kokku ≤ 14 % ≤ 1,1 kui palmitiinhappe % kokku > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Lambiõli	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 kui palmitiinhappe % kokku ≤ 14 % ≤ 1,1 kui palmitiinhappe % kokku > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 2,5 (2)	—
4. Rafineeritud oliiviõli	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 kui palmitiinhappe % kokku ≤ 14 % ≤ 1,1 kui palmitiinhappe % kokku > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Rafineeritud oliiviõlidest ja neitsioliiviõlidest koosnev oliiviõlisegu	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 kui palmitiinhappe % kokku ≤ 14 % ≤ 1,0 kui palmitiinhappe % kokku > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Töötlemta oliivjääkõli	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Rafineeritud oliivjääkõli	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Oliivjääkõli	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Isomeeride summa, mida on (või ei ole) võimalik eraldada kapillaarkolonnabi.

(2) Või kui puuduse mediaan on kuni 2,5 ning viljale iseloomulikkuse mediaan on 0.

(3) Õlisid, mille vahasisaldus on 300–350 mg/kg, käsitletakse lambiõlidenä juhul, kui alifaatsere alkoholid üldsisaldus on kuni 350 mg/kg ja kui eritrodiooli ja üvaooli sisaldus on kuni 3,5 %.

(4) Õlisid, mille vahasisaldus on 300–350 mg/kg, käsitletakse töötlemata oliivjääkõlidenä juhul, kui alifaatsere alkoholid üldsisaldus on suurem kui 350 mg/kg ja kui eritrodiooli ja üvaooli sisaldus on suurem kui 3,5 %.

Liik	Hapete sisaldus (%)						Linool- ja linoleen- happe trans- isomeeride summa (%)	Teerolide Koostis						Steroolid kokku (mg/kg)	Erütrodiool ja uvaool (%) (**)
	Müris- türhape (%)	Linoleen- hape (%)	Arahiin- hape (%)	Eikosen- hape (%)	Behreen- hape (%)	Lignotseriin- hape (%)		Olein- happe trans- isomeeride summa (%)	Kolesterool (%)	Brassi- kasterool (%)	Kampes- terool (%)	Stigmaste- rool (%)	$\beta$ -sitosterool (%) (†)		
1. Ekstra netisoliivioli	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	$\leq 0,05$	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	$< \text{kamp.}$	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$
2. Netisoliivioli	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	$\leq 0,05$	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	$< \text{kamp.}$	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$
3. Lambioli	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	$\leq 0,10$	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	—	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$ (‡)
4. Rafineeritud oliivioli	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	$\leq 0,20$	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	$< \text{kamp.}$	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$
5. Rafineeritud oliiviolidest ja netisoliiviolidest koosnev oliiviõlisegu	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	$\leq 0,20$	$\leq 0,5$	$\leq 0,1$	$\leq 4,0$	$< \text{kamp.}$	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 000$	$\leq 4,5$
6. Töödlemata oliivjääkõli	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,3$	$\leq 0,2$	$\leq 0,20$	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	—	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 2\ 500$	$> 4,5$ (‡)
7. Rafineeritud oliivjääkõli	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,3$	$\leq 0,2$	$\leq 0,40$	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	$< \text{kamp.}$	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 800$	$> 4,5$
8. Oliivjääkõli	$\leq 0,05$	$\leq 1,0$	$\leq 0,6$	$\leq 0,4$	$\leq 0,3$	$\leq 0,2$	$\leq 0,40$	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 4,0$	$< \text{kamp.}$	$\geq 93,0$	$\leq 0,5$	$\geq 1\ 600$	$> 4,5$

(†) Muud sisalduvad rasvhapped (%): palmitiinhape: 7,5–20,0; palmitoleinhape: 0,3–3,5; heptadekaanhape:  $\leq 0,3$ ; heptadeseenhape:  $\leq 0,3$ ; steariinhape: 0,5–5,0; oleiinhape: 55,0–83,0; linoohlhape: 3,5–21,0.

(‡)  $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -stigmastadienool + klerosterool +  $\beta$ -sitosterool + sitostanol +  $\Delta^5$ -avenasterool +  $\Delta^5$ - $\Delta^7$ -stigmastadienool.

(§) Oliidid, mille vahasisaldus on 300–350 mg/kg, käsitletakse lambiolidena juhul, kui alifaatsete alkoholidel üldsisaldus on kuni 350 mg/kg või kui erütrodiooli ja uvaooli sisaldus on suurem kui 3,5 %.

(¶) Oliidid, mille vahasisaldus on 300–350 mg/kg, käsitletakse töödlemata oliivjääkõlidena juhul, kui alifaatsete alkoholidel üldsisaldus on suurem kui 350 mg/kg ja kui erütrodiooli ja uvaooli sisaldus on suurem kui 3,5 %.

#### Märkused.

a) Analüüside tulemused peavad olema väljendatud sama arvu kümnendkohtadega, nagu iga omaduse puhul on ette nähtud.

b) Viimast numbrit tuleb suurendada ühe ühiku võrra, kui järgmine number on suurem kui 4.

c) Olii kategooriat võib muuta või deklareerida selle käesoleva määruse osas mittepuhtaks, kui ainult üks omadus ei vasta märgitud väärtusele.

d) Kui omadus on märgistatud tärniga (\*), osutades oli kvaliteedile, tähendab see järgmist:

— lambioli puhul ei tarvitse kõik asjaomased näitajad korraga vastata märgitud piirmääradele;

— netisoliivioli puhul muudetakse olii kategooriat, kui kas või ainult üks piirmääradest erineb märgitud väärtusest, olgugi et oli liigitatakse ikkagi ühte netisoliivioli kategooriasse.

d) Kui omadus on tähistatud kahe tärniga (\*\*), osutab see sellele, et kõikide oliivjääkõli liikide puhul ei tarvitse kõik asjaomased näitajad korraga vastata märgitud piirmääradele.

3. 1. liidet muudetakse järgmiselt:

a) esimene taane asendatakse järgmise tekstiga:

„— Happelisuus II lisa Vabade rasvhapete määramine külmeetodil”;

b) kolmeteistkümnes taane asendatakse järgmise tekstiga:

„— Küllastunud rasvhapped 2. VII lisa 2-glütserüülmonopalmitaadi protsendilise sisalduse määramine”.

4. II lisa pealkiri asendatakse järgmise tekstiga:

**„VABADE RASVHAPETE MÄÄRAMINE KÜLMMEETODIL”.**

5. IV lisa asendatakse järgmiselt:

„IV LISA

#### VAHADE SISALDUSE MÄÄRAMINE KAPILLAARGAASIKROMATOGRAAFIA ABIL

1. EESMÄRK

Käesoleva meetodiga määratakse vahade sisaldust oliiviõlides. Vahade eraldamine toimub süsinikuaatomite arvu alusel. Meetodit võib eeskätt kasutada pressimisega saadud oliiviõlide eristamiseks ekstraheerimisega saadud õlidest (oliivijääkõlidest).

2. PÕHIMÕTE

Rasvainele lisatakse sobivat sisestandardit, seejärel fraktsioneeritakse kromatograafiliselt, kasutades hüdrateeritud silikageelkolonni; katse tingimustes esimesena elueeritav fraktsioon ainetega, mis on triglütseriididest vähem polaarsed, eraldatakse ning seda analüüsitakse kapillaargaasikromatograafia abil.

3. SEADMED

3.1. 25milliliitrine Erlenmeyeri kolb.

3.2. Klaasist gaasikromatograafiakolonn sisediameetriga 15,0 mm ja pikkusega 30–40 cm, mis on varustatud kraaniga.

3.3. Sobiv kapillaarkolonniga gaasikromatograaf, mis on varustatud süsteemiga, mis võimaldab otse kolonni süstist ja koosneb järgmistest osadest:

3.3.1. programmeeritava temperatuuriga termostaatkapp kolonnide jaoks;

3.3.2. külminjektor proovi viimiseks otse kolonni;

3.3.3. leekionisatsioonidetektor ja muundurvõimend;

3.3.4. integraatormeerik, mida saab kasutada koos muundurvõimendiga (3.3.3), mille reageerimisaeg on alla 1 sekundi ning mille paberi kiirust saab muuta; (võib kasutada ka infotehnoloogiasüsteeme, milles gaasikromatograafia andmed edastatakse arvuti vahendusel);

3.3.5. klaasist või sulatatud ränidioksiidist kapillaarkolonn pikkusega 8–12 m ja sisediameetriga 0,25–0,32 mm, mis on seestpoolt kaetud jaotusvedelikuga, mille kihi paksus on ühtlaselt 0,10–0,30 mm (võib kasutada müügilo-levaid SE 52 või SE 54 tüüpi jaotusvedelikke).

3.4. 10mikroliitrine mikrosüstal otse kolonni süstimiseks, mille nõelal on tugevdatud pinnakiht.

- 3.5. Elektriline vibraator.
- 3.6. Pöördaurusti.
- 3.7. Muhvelahi.
- 3.8. Analüütiline kaal, kaalumistäpsus  $\pm 0,1$  mg.
- 3.9. Tavalised klaasist laborinõud.

#### 4. REAKTIIVID

- 4.1. Silikageel, tera suurus 60–200  $\mu\text{m}$ .

Geel pannakse vähemalt neljaks tunniks ahju temperatuuriga 500 °C. Lastakse jahtuda, seejärel lisatakse vett koguses, mis vastab 2 %le silikageeli massist. Segatakse korralikult ühtlase massi saamiseni. Hoitakse pimedas vähemalt 12 tundi enne kasutamist.

- 4.2. *n*-heksaan, kromatograafias kasutamiseks.
- 4.3. Etüüleeter, kromatograafias kasutamiseks.
- 4.4. *n*-heptaan, kromatograafias kasutamiseks.
- 4.5. Laurüülarahidaadi 0,1 % (m/V) standardlahus heksaanis (sisestandard) (võib kasutada ka palmitüülpalmiitaati või müristüülstearaati).

##### 4.5.1. Sudaan 1 (1-fenüül-*aso*-2-naftool).

- 4.6. Kandegaas: puhas vesinik või heelium, gaasikromatograafias kasutamiseks.
- 4.7. Abigaasid:

- puhas vesinik, gaasikromatograafias kasutamiseks;
- puhas õhk, gaasikromatograafias kasutamiseks.

#### 5. TÖÖ KÄIK

##### 5.1. Kromatograafiakoloni valmistamine

*n*-heksaanis (4.2) suspendeeritakse 15 g silikageeli (4.1) ning viiakse kolonni (3.2). Lastakse settida. Homogeen-  
sema kromatograafilise kolonni saamiseks töödeldakse settinud kolonni elektrilise vibraatoriga (3.5) ja lisandite  
eemaldamiseks voolutatakse kolonni 30 ml *n*-heksaaniga. 25 milliliitrisesse Erlenmeyeri kolbi (3.1) kaalutakse  
täpselt kaalu (3.8) abil 500 mg proovi ning lisatakse sobiv kogus sisestandardit (4.5), arvestades eeldatavat  
vahasisaldust; nt oliiviõli puhul lisatakse 0,1 mg ja oliivijääkõli puhul 0,25–0,5 mg laurüülarahidaati. Eelkirjel-  
datud viisil ettevalmistatud proov kantakse kromatograafiakoloni, kasutades kahte *n*-heksaani (4.2) kogust  
mahuga à 2 ml.

Lahustil lastakse voolata, kuni absorbendi ülemise pinna kohale jääb 1 mm vedelikku, seejärel voolutatakse  
kolonni veel 70 ml *n*-heksaaniga, et eemaldada proovis tavaliselt sisalduvad *n*-alkaanid. Seejärel alustatakse  
voolutamist; kogutakse 180 ml *n*-heksaani-etüüleetri segu (vahekorras 99:1) voolukiirusel umbes 15 tilka 10  
sekundi jooksul. Proovi elueerimine toimub toatemperatuuril  $22 \pm 4$  °C.

NB:

— *n*-heksaani-dietüüleetri segu (99:1) tuleb valmistada igal päeval uuesti.

— Vahade nõuetekohase elueerimise visuaalseks kontrollimiseks võib proovi lahusele lisada 100  $\mu\text{l}$  1 % sudaani lahust  
elueerimises. Värvaine retentsiooniaeg on vahade ja triglütseriidide retentsiooniaegade vahel; kui värvaine jõuab kroma-  
tograafiakoloni põhjani, tuleb elueerimine peatada, sest kõik vahad on elueeritud.

Niimoodi saadud fraktsiooni aurustatakse pöördaurustis (3.6), kuni peaaegu kogu lahusti on eemaldatud. Viimased 2 ml lahustit eemaldatakse nõrga lämmastikuvoolu abil, seejärel lisatakse 2–4 ml *n*-heptaani.

## 5.2. Gaasikromatograafiline analüüs

### 5.2.1. Ettevalmistustööd

Kolonn pannakse gaasikromatograafi (3.3); sisselaskekoht ühendatakse *on-column*-süsteemiga ja väljalaskekoht detektoriga. Kontrollitakse, et gaasikromatograafiaseade oleks töökorras (gaasijuhtmete lekkekindlus, detektori tundlikkus, meerik jne).

Kui kolonni kasutatakse esimest korda, on soovitatav see tasakaalustada. Läbi kolonni hakatakse nõrga joana juhtima gaasi, seejärel lülitatakse gaasikromatograafiaseade sisse. Järk-järgult, 4 tunni jooksul, tõstetakse temperatuur 350 °C-ni. Sellist temperatuuri hoitakse vähemalt kaks tundi, seejärel reguleeritakse seade töörežiimile (reguleeritakse gaasivoolu kiirust, leegi süüdet, ühendatakse elektrilise meerikuga (3.3.4), reguleeritakse kolonni termostaatkapi temperatuuri, detektorit jne). Registreeritakse signaal vähemalt kaks korda suuremal tundlikkusel, kui on vaja analüüsi läbiviimiseks. Saadav nulljoon peaks olema sirge, ilma igasuguste piikideta, ning see ei tohiks kummalegi poole triivida.

Negatiivne sirge triiv näitab, et kolonn ei ole korralikult ühendatud; positiivne triiv osutab kolonni puudulikule tasakaalustamisele.

### 5.2.2. Töötingimuste valimine

Töötingimused on reeglina järgmised:

— kolonni temperatuur:

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

— detektori temperatuur: 350 °C;

— sisestatava aine kogus: 1 µl lahust *n*-heptaanis (2–4 ml);

— kandegaas: heelium või vesinik asjaomase gaasi optimaalsel voolukiirusel (vt liide);

— seadme tundlikkus peab vastama järgmistele tingimustele:

Olenevalt kolonni ja gaasikromatograafi omadustest võib tingimusi muuta, et saavutada kõikide vahade eraldumine, piikide rahuldav lahutus (vt joonis) ja et C<sub>32</sub> sisestandardi retentsiooniaeg oleks 18 ± 3 minutit. Vaha kõige tüüpilisem piik peab olema vähemalt 60 % täisskaalast.

Piigi integreerimisparameetrid määratakse kindlaks nii, et uuritavate piikide pindalad oleks võimalik õigesti hinnata.

NB: Arvesse võttes kõrget lõpptemperatuuri, on lubatav positiivne triiv, mis ei tohi ületada 10 % skaala ulatusest.

## 5.3. Analüüsi läbiviimine

10mikroliitrisesse mikrosüstlasse võetakse 1 µl lahust; kolb tõmmatakse tagasi, kuni nõel on tühi. Nõel viiakse injektioonisüsteemi ning 1–2 sekundi pärast tehakse kiire süst. Umbes 5 sekundi pärast tõmmatakse nõel ettevaatlikult välja.

Detektori signaali registreeritakse seni, kuni vahad on täielikult elueeritud.

Nulljoon peab kogu aeg vastama nõuetele.

#### 5.4. Piikide määramine

Piigid määratakse retentsiooniaja põhjal, võrdlusest samadel tingimustel analüüsitud teadaoleva retentsioonijaga vahade segudega.

Joonisel on esitatud neitsioliiviõli vahade kromatogramm.

#### 5.5. Kvantitatiivne hindamine

Sisestandardile ja alifaatsetele estritele C<sub>40</sub>–C<sub>46</sub>vastavate piikide pindalad arvutatakse integraatori abil.

Iga estri vahasisaldus milligrammides rasvaine kilogrammi kohta arvutatakse järgmiselt:

$$\text{ester, mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1\,000}{A_s \times m}$$

kus:

A<sub>x</sub> = iga estri piigi pindala ruutmillimeetrites;

A<sub>s</sub> = sisestandardi piigi pindala ruutmillimeetrites;

m<sub>s</sub> = lisatud sisestandardi mass milligrammides;

m = määramisel kasutatud proovi mass grammides.

#### 6. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

Märgitakse erinevate C<sub>40</sub>- kuni C<sub>46</sub>-vahade sisalduste summa milligrammides rasva kilogrammi kohta (ppm).

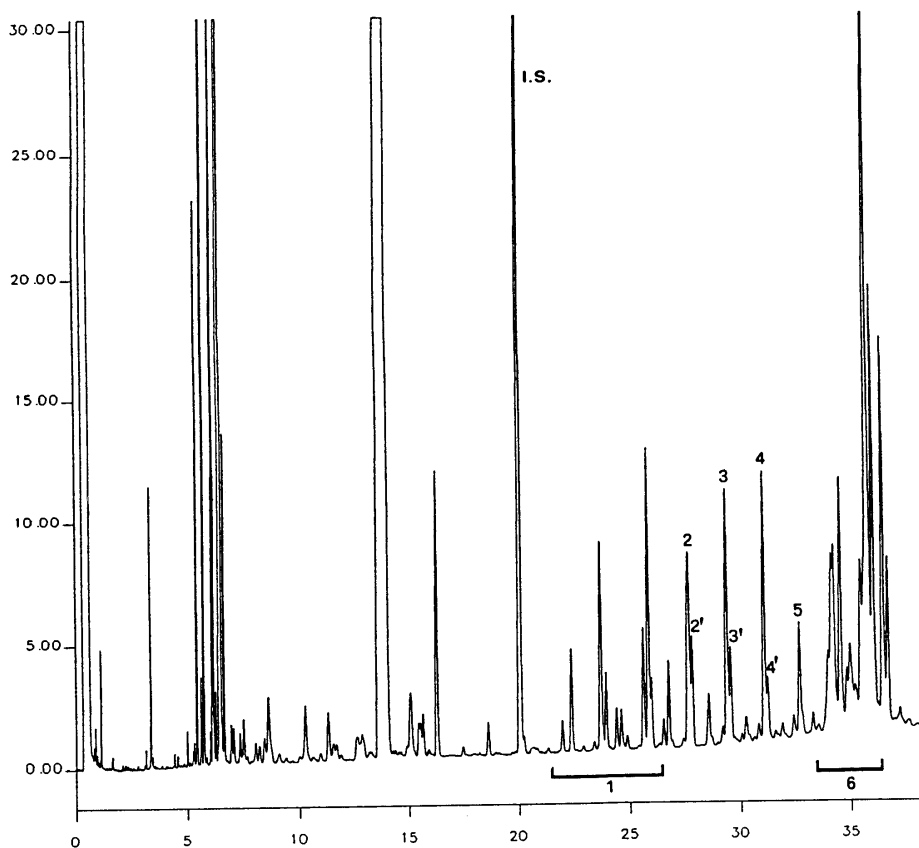
NB. Määratavate koostisosade puhul osutatakse vahade piikidele, mis paiknevad paarisarvulise süsinikuaatomite arvuga estrite C<sub>40</sub> ja C<sub>46</sub> vahel, vastavalt järgneval joonisel esitatud oliiviõli vahade kromatogrammile. Kui ester C<sub>46</sub> esineb kahekordsena, on soovitatav selle identifitseerimiseks analüüsida pressimisjääkide õli vahafraktsiooni, kus C<sub>46</sub> piiki on kerge ära tunda, sest see on oluliselt suurem.

Tulemused väljendatakse ühe kümnendkoha täpsusega.



Joonis

## Oliiviõli vahade kromatogramm (\*)



Tähistused:

I.S. = laurülarahidaat

1. = diterpeenestrid

2 + 2' = estrid C<sub>40</sub>3 + 3' = estrid C<sub>42</sub>4 + 4' = estrid C<sub>44</sub>5. = estrid C<sub>46</sub>

6. = steroolestrid ja triterpeenalkoholid.

(\*) Pärast steroolestrite väljumist ei tohi kromatogrammil enam ilmuda märkimisväärseid piike (triglütseriide).

Liide

## Gaasi voolukiiruse määramine

Kui gaasikromatograaf on viidud tavapärasesse töörežiimi, süstitakse kolonni 1–3 µl metaani või propaani ning mõõdetakse stopperiga aeg süstimise hetkest kuni piigi alguseni ( $t_M$ ); selle ajaga läks metaan või propaan läbi kolonni.

Voolukiirus (cm/s) määratakse valemiga  $L/t_M$ , kus L on kolonni pikkus sentimeetrites ja  $t_M$  on stopperiga mõõdetud aeg sekundites.”

6. VII lisa asendatakse järgmiselt:

„VII LISA

**2-GLÜTSEERÜÜLMONOPALMITAADI PROTSENDILISE SISALDUSE MÄÄRAMINE**

1. EESMÄRK JA RAKENDAMISALA  
Käesoleva meetodiga määratakse triglütseriidide 2. positsioonis oleva palmitiinhappe protsendilist sisaldust 2-glütserüülmonopalmitaadi hindamise abil.  
  
Seda meetodit saab kasutada toatemperatuuril (20 °C) vedelate taimeõlide puhul.
2. PÕHIMÕTE  
Pärast õliproovi ettevalmistamist lastakse proovil reageerida pankrease lipaasiga – toimub triglütseriidi molekuli spetsiifiline osaline hüdrolyüs 1. ja 3. positsioonis, mille tulemusena tekivad 2-monoglütseriidid. 2-glütserüülmonopalmitaadi sisaldus monoglütseriidi fraktsioonis määratakse pärast silaanimist kapillaar-kolonn-gaasikromatograafia abil.
3. KASUTATAVAD SEADMED JA MATERJALID
  - 3.1. 25milliliitrine Erlenmeyeri kolb
  - 3.2. 100-, 250- ja 300milliliitrised keeduklaasid
  - 3.3. Klaasist kromatograafikolonn sisediameetriga 21–23 mm ja pikkusega 400 mm, mis on varustatud klaasfilterketta ja kraaniga
  - 3.4. Gradueeritud 10-, 50-, 100- ja 200milliliitrised mõõtesilindrid
  - 3.5. 100- ja 250milliliitrised ümarkolvid
  - 3.6. Pöördaurusti
  - 3.7. 10milliliitrised lihvorgiga tsentrifuugitopsid, millel on kooniline põhi
  - 3.8. Tsentrifuug tööks 10- ja 100milliliitriste tsentrifuugitopsidega
  - 3.9. Termostaat, mis võimaldab hoida temperatuuri  $40 \pm 0,5$  °C
  - 3.10. Gradueeritud 1- ja 2milliliitrised pipetid
  - 3.11. 1milliliitrine hüpodermiline süstal
  - 3.12. 100mikroliitrine mikrosüstal
  - 3.13. 1 000 milliliitrine jaotuslehter
  - 3.14. Kapillaarkolonniga gaasikromatograaf, mis on varustatud süsteemiga, mis võimaldab proovi otse külmalt kolonni süstimist, ja ahjuga, mis hoiab soovitud temperatuuri 1 °C täpsusega
  - 3.15. Külminjektor proovi viimiseks otse kolonni
  - 3.16. Leekionisatsioonidetektor ja elektromeeter
  - 3.17. Koos elektromeetriga kasutatav integraatormeerik, mille reageerimisaeg on kuni 1 sekund ning mille paberi kiirust saab muuta
  - 3.18. Klaasist või sulatatud ränidioksiidist kapillaarkolonn pikkusega 8–12 m ja sisediameetriga 0,25–0,32 mm, mis sobib tööks kuni 370 °C juures ja mis on seestpoolt kaetud 5 % metüülpolüsiloksaani või fenüül-metüülpolüsiloksaani kihiga, mille paksus on 0,10–0,30 µm
  - 3.19. Vähemalt 7,5 cm pikkune 10mikroliitrine mikrosüstal otse kolonni süstimiseks, mille nõelal on tugevdatud pinnakiht

4. REAKTIIVID
- 4.1. Silikageel tera suurusega 0,063–0,200 mm (sõelaava 70–280), mis on ette valmistatud järgmisel viisil. Silikageel pannakse portselankaussi, kuivatatakse kuivatuskapis 160 °C juures 4 tundi, lastakse eksikaatoris jahtuda toatemperatuurini. Lisatakse vett koguses, mis vastab 5 % le silikageeli massist, tehes seda järgmisel viisil: 500milliliitrisesse Erlenmeyeri kolbi kaalutakse 152 g silikageeli ja lisatakse 8 g destilleeritud vett, suletakse korgiga ja segatakse ettevaatlikult, et tagada vee ühtlane jaotumine. Enne kasutamist lastakse seista vähemalt 12 tundi.
- 4.2. *n*-heksaan, kromatograafias kasutamiseks
- 4.3. Isopropanool
- 4.4. Isopropanooli vesilahus (mahusuhe 1:1)
- 4.5. Pankrease lipaas. Kasutatava lipaasi aktiivsus peab olema vahemikus 2,0–10 lipaasiühikut mg kohta (müügilolevate lipaaside aktiivsus on 2–10 ühikut ensüümi mg kohta)
- 4.6. Puhverlahus: 1 M tris-hüdroksümetüülaminometaani lahuse pH reguleeritakse potentsiomeetriga kontrollides väärtusele 8, lisades selleks kontsenteeritud soolhapet (mahusuhe 1:1)
- 4.7. Naatriumkolaat, ensüümikvaliteediga, 0,1 % vesilahus (lahus tuleb ära kasutada 15 päeva jooksul pärast valmistamist)
- 4.8. Kaltsiumkloriid, 22 % vesilahus
- 4.9. Dietüüleeter, kromatograafias kasutamiseks
- 4.10. Elueerimislahus: *n*-heksaani ja dietüüleetri segu (mahusuhe 87:13)
- 4.11. Naatriumhüdroksiid, 12massiprotsendiline lahus
- 4.12. Fenoolftaleiin, 1 % lahus etanoolis
- 4.13. Kandegaas: vesinik või heelium gaasikromatograafias kasutamiseks
- 4.14. Abigaasid: kuiv vesinik, vähemalt 99 % puhtusega, ei tohi sisaldada orgaanilisi aineid; õhk kromatograafias kasutamiseks, sama puhtusastmega
- 4.15. Silaanimisreaktiiv: püridiini, heksametüüldisilasaani ja trimetüülklorosilaani segu (mahusuhe 9:3:1). (Müügil on vastavad valmissegud. Kasutada võib ka muid silaanimisreaktiive, näiteks bistrimetüülsilüültrifluorootsetamiid + 1 % trimetüülklorosilaani, mis on lahustatud samas koguses veevabas püridiinis.)
- 4.16. Standardproovid: puhtad monoglütseriidid või proovile sarnaste mahusuhetega monoglütseriidide segud, mille teadaolevad mahusuhetud on samad kui proovil.
5. TÖÖ KÄIK
- 5.1. **Proovi ettevalmistamine**
- 5.1.1. Õlisid, milles vabade hapete sisaldus on alla 3 %, ei ole vaja neutraliseerida enne kromatografeerimist silikageelkolonnis. Õlid, mille vabade hapete sisaldus on suurem kui 3 %, tuleb neutraliseerida vastavalt punktile 5.1.1.1.
- 5.1.1.1. 1 000 milliliitrisesse jaotuslehtrisse (3.13) kallatakse 50 g õli ja 200 ml *n*-heksaani. Lisatakse 100 ml isopropanooli ja selline kogus 12 % naatriumhüdroksiidi (4.11), mis on 5 % suurem kui vabade hapete kogus õlis. Loksutatakse tugevasti 1 minuti jooksul. Lisatakse 100 ml destilleeritud vett, loksutatakse uuesti ja lastakse seista.
- Pärast kihistumist eemaldatakse alumine kiht, mis sisaldab seepe. Eemaldatakse ka võimalikud vahepealsed kihid (lima ja mittelahustuvad ained). Neutraliseeritud õli lahust heksaanis pestakse järjestikuste 50–60milliliitriste isopropanooli vesilahuse (mahusuhe 1:1) (4.4) kogustega kuni fenoolftaleiini roosa värvuse kadumiseni.
- Vaakumdestilleerimisega (näiteks pöördaurusti abil) eemaldatakse suurem osa heksaanist ja õli kantakse üle 100milliliitrisesse ümarkolbi (3.5). Õli kuivatatakse vaakumis kuni lahusti täieliku eemaldamiseni.
- Selle toimingu tulemusena peab õli happelisus jääma alla 0,5 %.

- 5.1.2. 1,0 g eespool kirjeldatud viisil ettevalmistatud õli pannakse 25milliliitrisesse Erlenmeyeri kolbi (3.1) ja lahustatakse 10 ml elueerimislahuses (4.10). Enne kromatografeerimist silikageelkolonnis lastakse lahusel vähemalt 15 minutit seista.

Kui lahus on hägune, tsentrifuugitakse see, et luua optimaalsed tingimused kromatograafia jaoks. (On lubatud kasutada müügilolevaid valmis SPE silikageelipadruneid (500 mg)).

- 5.1.3. *Kromatograafiakolonna valmistamine*

Kolonna (3.3) kallatakse ligikaudu 30 ml elueerimislahust (4.10), kolonna alumisse otsa viiakse klaaspulga abil vatitükk ja pressitakse seda õhu eemaldamiseks.

Keeduklaasis valmistatakse suspensioon 25 g silikageelist (4.1) ja ligikaudu 80 ml elueerimislahusest; suspensioon kallatakse lehtri abil kolonna.

Kontrollitakse, et kogu silikageel oleks viidud kolonna, loputatakse seda elueerimislahusega (4.10), avatakse kraan ja lastakse vedelikul voolata, kuni silikageeli kohale jääb ligikaudu 2 mm vedelikku.

- 5.1.4. *Kolonnkromatograafia*

25 milliliitrisesse Erlenmeyeri kolbi (3.1) kaalutakse täpselt 1,0 g punkti 5.1 kohaselt ettevalmistatud proovi.

Proov lahustatakse 10 ml elueerimislahuses (4.10). Lahus kantakse üle punkti 5.1.3 kohaselt valmistatud kromatograafiakolonna. Tuleb vältida kolonniäidise pinna liigutamist.

Avatakse kraan ja proovi lahusel lastakse välja voolata seni, kuni tase jõuab silikageeli tasemeni. Elueeritakse 150 ml elueerimislahusega. Elueerimislahust lisatakse kiirusega 2 ml/min (150 ml lisamine kolonna võtab aega ligikaudu 60–70 min).

Eluaat kogutakse eelnevalt kaalutud 250milliliitrisesse ümarkolbi. Lahusti aurustatakse vaakumis, viimased lahusti jäljed eemaldatakse lämmastikuvoolus.

Ümarkolb kaalutakse ja arvutatakse eraldatud aine kogus.

(Juhul kui kasutatakse müügilolevaid valmis SPE silikageelipadruneid, toimitakse järgmiselt: 1 ml lahust (5.1.2) viiakse padrunitesse, mis on eelnevalt ette valmistatud 3 ml *n*-heksaaniga.

Pärast lahuse nõrgumist kolonna elueeritakse 4 ml *n*-heksaani-dietüüleetri lahusega (mahusuhe 9:1).

Eluaat kogutakse 10milliliitrisesse katseklaasi ja aurustatakse lämmastikuvoolus kuivaks.

Kuivaine hüdrolüüsitakse pankrease lipaasiga (5.2). Oluline on kontrollida rasvainete sisaldust enne ja pärast SPE-padrundi kasutamist).

- 5.2. **Hüdrolüüs pankrease lipaasiga**

- 5.2.1. Tsentrifuugitopsi kaalutakse 0,1 g punkti 5.1 kohaselt ettevalmistatud proovi. Lisatakse 2 ml puhverlahust (4.6), 0,5 ml naatriumkoolaadi lahust (4.7) ja 0,2 ml kaltsiumkloriidi lahust; pärast iga lahuse lisamist segatakse hoolikalt. Tops suletakse lihvkorriga ja asetatakse termostaati temperatuuriga 40 + 0,5 °C.

- 5.2.2. Lisatakse 20 mg lipaasi, segatakse hoolikalt (vältides korgi kokkupuutumist lahusega) ning asetatakse tops täpselt 2 minutiks termostaati, seejärel võetakse see termostaadist välja, loksutatakse tugevasti täpselt ühe minuti jooksul ning lastakse jahtuda.

- 5.2.3. Lisatakse 1 ml dietüüleetrit, suletakse tops korgiga ja loksutatakse tugevasti, seejärel segu tsentrifuugitakse ning eetri lahust kantakse mikrosüstla abil puhtasse ja kuiva topsi.

- 5.3. **Silaanitud ühendite valmistamine ja gaasikromatograafia**

- 5.3.1. Mikrosüstla abil viiakse 100 µl lahust (5.2.3) 10milliliitrisesse koonilise põhjaga topsi.

- 5.3.2. Lahusti eemaldatakse nõrga lämmastikuvoolu all, lisatakse 200 µl silaanimisreaktiivi (4.15), tops suletakse korgiga ja lastakse seista 20 minuti jooksul.

- 5.3.3. 20 minuti pärast lisatakse 1–5 ml *n*-heksaani (sõltuvalt kromatograafia läbiviimise tingimustest) – saadav lahus on valmis gaasikromatograafia läbiviimiseks.

#### 5.4. Gaasikromatograafia

Töö pühitingimused on järgmised:

- injektori (*on-column*-injektor) temperatuur on madalam lahusti keemistemperatuurist (68 °C);
- detektori temperatuur: 350 °C;
- kolonni temperatuur: ahju temperatuuri muudetakse järgmise programmi kohaselt: 60 °C 1 minuti jooksul, temperatuuri tõstetakse 15 °C minutis kuni temperatuurini 180 °C, seejärel 5 °C minutis kuni temperatuurini 340 °C, 340 °C 13 minuti jooksul;
- kandegaas: vesinik või heelium, mille lineaarkirrust reguleeritakse nii, et saada joonisel 1 kujutatud lahutus; triglütseriidi C<sub>54</sub> retentsiooniaeg peab olema 40 + 5 minutit (vt joonis 2); (*Need töö pühitingimused on ligikaudsed. Töö teostaja peab neid soovitud tulemuste saamiseks kohandama. 2-glütseriülmonopalmitaadi piigi kõrgus peab olema vähemalt 10 % registreerimisseadme skaala ulatusest.*);
- kolonni süstitava aine kogus on 0,5–1 µl n-heksaani lahust (5 ml) (5.3.3).

##### 5.4.1. Piikide määramine

Piigid määratakse retentsiooniaja põhjal, võrdlusest samadel tingimused analüüsitud monoglütseriidide standardsegude puhul saadud tulemustega.

##### 5.4.2. Kvantitatiivne hindamine

Elektroonilise integraatori abil leitakse iga piigi pindala.

#### 6. TULEMUSTE VÄLJENDAMINE

Glütseriülmonopalmitaadi protsendiline sisaldus arvutatakse vastava piigi pindala ja monoglütseriidide piikide kogupindala suhtena (vt joonis 2) vastavalt järgmisele valemile:

$$\text{Gycéril monopalmitate (\%)} = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

kus:

$A_x$  = glütseriülmonopalmitaadi piigi pindala;

$\Sigma A$  = monoglütseriidide piikide kogupindala.

Tulemus esitatakse ühe kümnendkoha täpsusega.

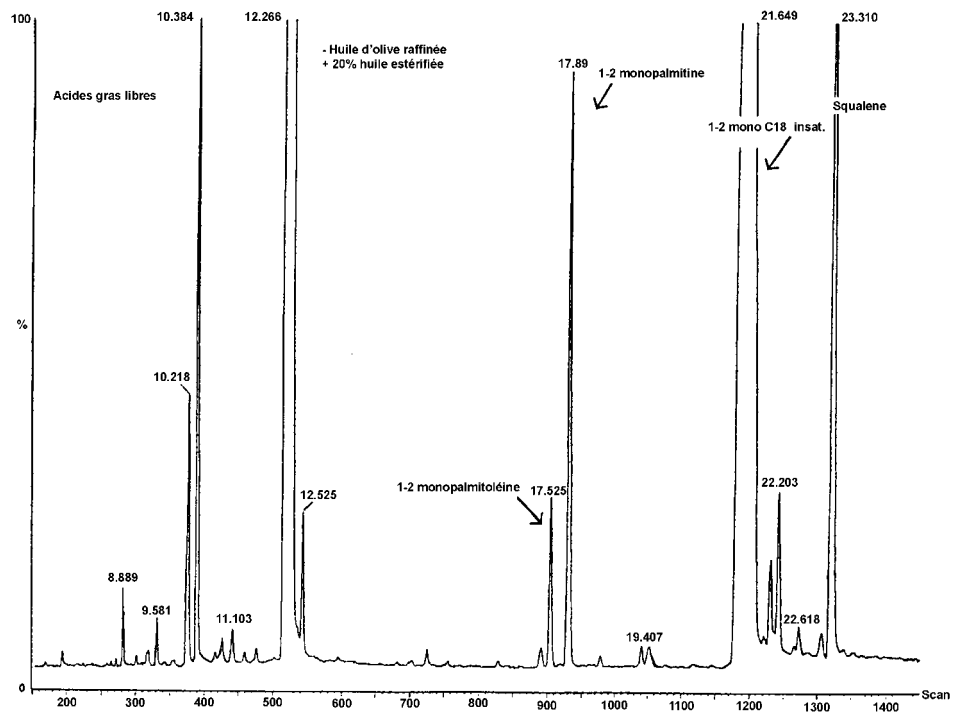
#### 7. ANALÜÜSI PROTOKOLL

Analüüsi protokollis tuleb esitada järgmine teave:

- viide käesolevale meetodile;
- kogu teave, mis on vajalik proovi täielikuks identifitseerimiseks;
- analüüsi tulemus;
- kõik kõrvalekaldumised käesolevast meetodist, kas asjaomaste poolte kokkuleppe tõttu või muudel põhjustel;
- andmed laboratooriumi kohta, analüüsi läbiviimise kuupäev ja analüüsi läbiviimise eest vastutavate isikute allkirjad.

Joonis 1

Silaanimisreaktsiooni saaduste kromatogramm (rafineeritud oliiviõlile on lisatud 20 % täielikult esterdatud õli, segu on töödeldud lipaasiga ja reaktsioonisaadused on silaanitud)



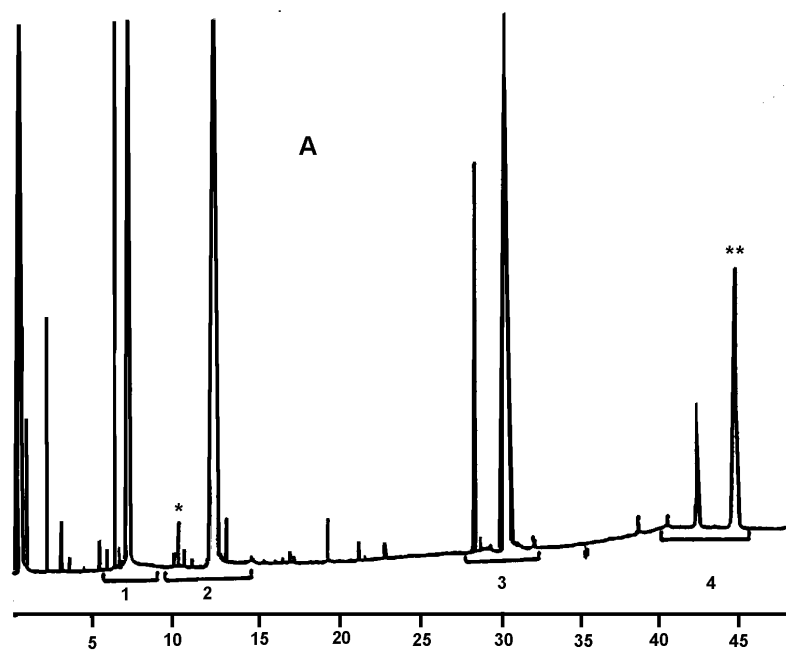
Kirjad joonisel: Acides gras libres = vabad rasvhapped Huile d'olive raffinée + 20 % huile estérifiée = rafineeritud oliiviõli + 20 % esterdatud õli 1-2 monopalmitoléine = 1-2 monopalmitoleiin 1-2 monopalmitine = 1-2 monopalmitiin 1-2 monoC<sub>18</sub> insat. = 1-2 monoC<sub>18</sub> küllastamata Squalene = skvaleen]

Joonis 2

## Kromatogramm:

A) esterdamata oliiviõli pärast lipaasiga töötlemist; pärast silüülimist; kõnealuste tingimuste juures (kapillaarkoloni pikkus 8–12 m) elueeritakse vahafraktsioon samaaegselt diglütseriidi fraktsiooniga või veidi hiljem.

Pärast lipaasiga töötlemist ei tohi triglütseriidide sisaldus ületada 15 %.



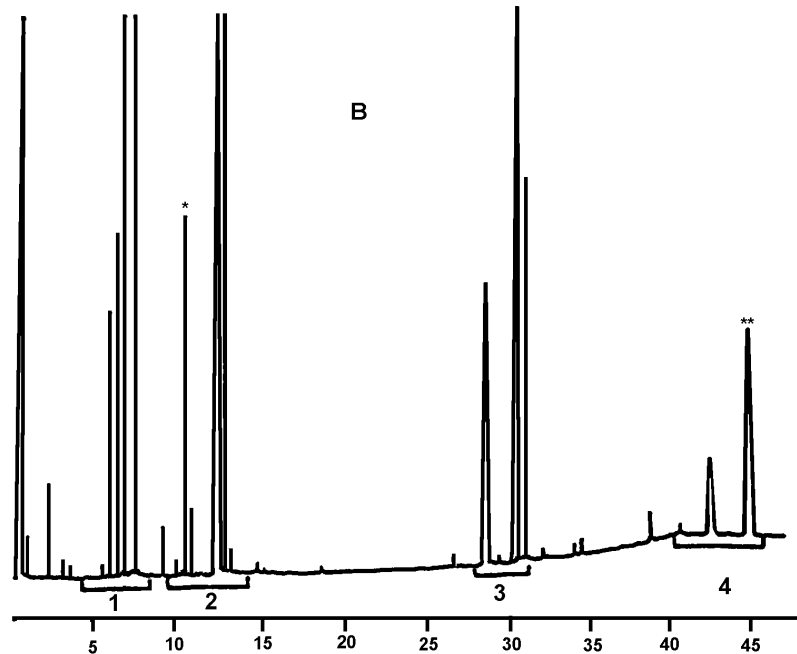
## Tähistused:

- 1 = vabad rasvhapped
- 2 = monoglütseriidid
- 3 = diglütseriidid
- 4 = triglütseriidid
- \* = 2-monopalmitiin
- \*\* = triglütseriid C<sub>54</sub>

**Kromatogramm:**

B) esterdatud õli pärast lipaasiga töötlemist; pärast silaanimist; kõnealuste tingimuste juures (kapillaarkolonni pikkus 8–12 m) elueeritakse vahafraktsioon samaaegselt diglütseriidi fraktsiooniga või veidi hiljem.

Pärast lipaasiga töötlemist ei tohi triglütseriidide sisaldus ületada 15 %.

**Tähistused:**

- 1 = vabad rasvhapped
- 2 = monoglütseriidid
- 3 = diglütseriidid
- 4 = triglütseriidid
- \* = 2-monopalmitiin
- \*\* = triglütseriid C<sub>54</sub>

**8. MÄRKUSED****Märkus 1. LIPAASI VALMISTAMINE**

Müügil on rahuldava aktiivsusega lipaase. Lipaasi saab valmistada ka laboris järgmisel viisil:

5 kg värsket seapankreast jahutatakse temperatuurini 0 °C. Eemaldatakse tahke rasvkude ja seda ümbritsev sidekude ning pankreas peenestatakse löikenugadega peenestajas kuni ühtlase vedela massi saamiseni. Saadud massi segatakse 4–6 tunni jooksul 2,5 liitri veevaba atsetooniga, seejärel tsentrifugeeritakse. Saadud jääki ekstraheeritakse veel kolm korda sama koguse veevaba atsetooniga, seejärel kaks korda sama koguse atsetooni/dietüüleetri seguga (mahusuhe 1:1) ning veel kaks korda dietüüleetriga.

Saadud jääki kuivatatakse 48 tunni jooksul vaakumis; tulemusena saadakse stabiilne pulber, mida on võimalik külmkapis kuivas pikemaajaliselt hoida.



**Märkus 2. LIPAASI AKTIIVSUSE KONTROLLIMINE**

Valmistatakse oliiviõli emulsioon järgmisel viisil:

Mikseris segatakse 10 minuti jooksul järgmist segu: 165 ml kummiaraabiku lahust kontsentratsiooniga 100 g/l, 15 g purustatud jääd ja 20 ml eelnevalt neutraliseeritud oliiviõli.

50milliliitrisesse keeduklaasi viiakse 10 ml saadud emulsiooni, seejärel 0,3 ml naatriumkoolaadi lahust kontsentratsiooniga 0,2 g/ml ja 20 ml destilleeritud vett.

Keeduklaas asetatakse termostaati temperatuuriga 37 °C, lahusesse viiakse pH-meetri elektroodid ja spiraalsegaja.

Büreti abil lisatakse tilkhaaval naatriumhüdroksiidi 0,1 N lahust, kuni pH saavutab väärtuse 8,3.

Lisatakse teatav kogus lipaasi suspensiooni vees (0,1 g/ml lipaasi). Kui pH-meeter näitab pH väärtust 8,3, käivitatakse stopper ja hakatakse tilkhaaval lisama naatriumhüdroksiidi lahust sellise kiirusega, et hoida pH-d väärtusel 8,3. Iga minuti möödudes märgitakse üles selleks kulunud lahuse kogus.

Andmed kantakse graafikule, võttes abstsisseljeks ajatelje ja kandes ordinaatteljele 0,1 N leelise lahuse kogused milliliitrites, mis on kulunud pH väärtuse hoidmiseks konstantsena. Graafik peab olema lineaarne.

Lipaasi aktiivsus, mida väljendatakse lipaasi ühikutes mg kohta, arvutatakse järgmise valemi abil:

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

kus:

A aktiivsus lipaasi ühikutes mg kohta;

V 0,1 N naatriumhüdroksiidi lahuse kulu milliliitrites minuti kohta (arvutatud graafiku alusel);

N naatriumhüdroksiidi lahuse normaalsus;

m prooviks võetud lipaasi mass, mg.

Lipaasi ühik on määratletud kui ensüümi kogus, mis vabastab 10 mikroekvivalenti hapet ühe minuti jooksul."

7. XA lisa punkt 6.2 asendatakse järgmisega:

„6.2. Metüülestrid valmistatakse XB lisa kirjeldatud meetodi B kohaselt. Rasvained, milles vaba happe sisaldus on suurem kui 3 %, tuleb eelnevalt neutraliseerida VII lisa punkti 5.1.1 kohaselt.”