

## KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 702/2007

2007 m. birželio 21 d.

**iš dalies keičiantis Reglamentą (EEB) Nr. 2568/91 dėl alyvuogių aliejaus ir maišyto alyvuogių išspaudų aliejaus savybių ir dėl atitinkamų analizės metodų**

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 2004 m. balandžio 29 d. Tarybos reglamentą (EB) Nr. 865/2004 dėl bendro alyvuogių aliejaus ir valgomųjų alyvuogių rinkos organizavimo ir iš dalies keičiantį Reglamentą (EEB) Nr. 827/68 <sup>(1)</sup>, ypač į jo 5 straipsnio 3 dalį,

kadangi:

- (1) Komisijos reglamente (EEB) Nr. 2568/91 <sup>(2)</sup> nustatytos alyvuogių aliejaus ir maišyto alyvuogių išspaudų aliejaus savybės ir jų analizės metodai. Tuos metodus ir aliejų savybėms taikomus ribinius dydžius reikia atnaujinti, atsižvelgiant į chemijos ekspertų nuomonę ir Tarptautinės alyvuogių aliejaus tarybos atliktus darbus.
- (2) Chemijos ekspertai ypatingai palaikė nuomonę, kad esterinto aliejaus kiekis tiksliau nustatomas, nustatčius procentinį 2-glicerilo monopalmitato kiekį. Gryname alyvuogių aliejuje sumažinus ribinę stigmastadieno vertę, galima geriau atskirti gryną alyvuogių aliejų nuo rafinuoto alyvuogių aliejaus.
- (3) Tam, kad būtų įgyvendintos naujam metodui taikyti reikalingos priemonės ir siekiant nesutrikdyti prekybos, šio reglamento įsigaliojimo terminą reikėtų atidėti iki 2008 m. sausio 1 d. Dėl tų pačių priežasčių reikėtų nustatyti, kad iki minėtos datos alyvuogių ir alyvuogių išspaudų aliejais teisėtai pagamintais ir paženklintais etiketėmis Bendrijoje arba teisėtai importuotais į ją ir

esančiais rinkoje būtų galima prekiauti, kol baigsis jų atsargos.

- (4) Šiame reglamente numatytos priemonės atitinka Alyvuogių aliejaus ir valgomųjų alyvuogių vadybos komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

## 1 straipsnis

Reglamentas (EEB) Nr. 2568/91 iš dalies keičiamas taip:

- 1) 2 straipsnio 1 dalies šešta įtrauka keičiama taip:

„— procentiniam 2-glicerilo monopalmitato kiekiui nustatyti – VII priede nurodytą metodą“,

- 2) Priedai iš dalies keičiami pagal šio reglamento priedą.

## 2 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja trečią dieną nuo jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Šis reglamentas taikomas nuo 2008 m. sausio 1 d.

Tačiau iki 2008 m. sausio 1 d. teisėtai Bendrijoje pagamintais ir etiketėmis paženklintais arba į ją teisėtai importuotais ir esančiais rinkoje gaminiais gali būti prekiaujama, kol baigsis jų atsargos.

Šis reglamentas yra privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje, 2007 m. birželio 21 d.

*Komisijos vardu*

Mariann FISCHER BOEL

*Komisijos narė*

<sup>(1)</sup> OL L 161, 2004 4 30, p. 97.

<sup>(2)</sup> OL L 248, 1991 9 5, p. 1. Reglamentas su paskutiniais pakeitimais, padarytais Reglamentu (EB) Nr. 1989/2003 (OL L 295, 2003 11 13, p. 57).

*PRIEDAS*

Reglamento (EEB) Nr. 2568/91 priedai iš dalies keičiami taip:

1. Turinys iš dalies keičiamas taip:

a) II priedo pavadinimas keičiamas taip:

„Laisvųjų riebalų rūgščių kiekio nustatymas, naudojant šaltąjį metodą“;

b) VII priedo pavadinimas keičiamas taip:

„2-glicerilo monopalmitato procentinio kiekio nustatymas“

2. I priedas pakeičiamas taip:

## „I PRIEDAS

## ALYVUOGIŲ ALIEJAUS SAVYBĖS

| Kategorija                                                       | Rūgštingumas (%) (*) | Peroksidų skaičius, mEq O <sub>2</sub> /kg (*) | Vaškai mg/kg (**) | 2-glicerilo monopalmitatas (%)                                                                   | Stigma-stadienai mg/kg (1) | Skirtumas tarp HPLC ECN42 ir teorinio ECN42 | K <sub>232</sub> (*) | K <sub>270</sub> (*) | Delta-K (*) | Organoleptinis trukmų vidurkio įvertinimas (Md) (*) | Organoleptinis vaisių likučių vidurkio įvertinimas (Mf) (*) |
|------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------|----------------------|----------------------|-------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1. Aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus       | ≤ 0,8                | ≤ 20                                           | ≤ 250             | ≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14 %<br>≤ 1,0, jei bendras palmitino rūgšties % > 14 % | ≤ 0,10                     | ≤ 0,2                                       | ≤ 2,50               | ≤ 0,22               | ≤ 0,01      | Md = 0                                              | Mf > 0                                                      |
| 2. Pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus                            | ≤ 2,0                | ≤ 20                                           | ≤ 250             | ≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14 %<br>≤ 1,0, jei bendras palmitino rūgšties % > 14 % | ≤ 0,10                     | ≤ 0,2                                       | ≤ 2,60               | ≤ 0,25               | ≤ 0,01      | Md ≤ 2,5                                            | Mf > 0                                                      |
| 3. Pirmojo spaudimo klasikinis alyvuogių aliejus <i>lampante</i> | > 2,0                | —                                              | ≤ 300 (3)         | ≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14 %<br>≤ 1,1, jei bendras palmitino rūgšties % > 14 % | ≤ 0,50                     | ≤ 0,3                                       | —                    | —                    | —           | Md > 2,5 (2)                                        | —                                                           |
| 4. Rafinuotas alyvuogių aliejus                                  | ≤ 0,3                | ≤ 5                                            | ≤ 350             | ≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14 %<br>≤ 1,1, jei bendras palmitino rūgšties % > 14 % | —                          | ≤ 0,3                                       | —                    | ≤ 1,10               | ≤ 0,16      | —                                                   | —                                                           |
| 5. Maišytas rafinuoto ir pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus      | ≤ 1,0                | ≤ 15                                           | ≤ 350             | ≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14 %<br>≤ 1,1, jei bendras palmitino rūgšties % > 14 % | —                          | ≤ 0,3                                       | —                    | ≤ 0,90               | ≤ 0,15      | —                                                   | —                                                           |
| 6. Neapdorotas alyvuogių išspaudų aliejus                        | —                    | —                                              | > 350 (4)         | ≤ 1,4                                                                                            | —                          | ≤ 0,6                                       | —                    | —                    | —           | —                                                   | —                                                           |
| 7. Rafinuotas alyvuogių išspaudų aliejus                         | ≤ 0,3                | ≤ 5                                            | > 350             | ≤ 1,4                                                                                            | —                          | ≤ 0,5                                       | —                    | ≤ 2,00               | ≤ 0,20      | —                                                   | —                                                           |
| 8. Alyvuogių išspaudų aliejus                                    | ≤ 1,0                | ≤ 15                                           | > 350             | ≤ 1,2                                                                                            | —                          | ≤ 0,5                                       | —                    | ≤ 1,70               | ≤ 0,18      | —                                                   | —                                                           |

(1) Izomerų, kurie (ne)galėtų būti atskirti kapiliarine kolonėle, suma.

(2) Arba kai trūkumų mediana mažesnė arba lygi 2,5; „vaisių“ požymio mediana lygi 0.

(3) Aliejai, kuriuose yra nuo 300 mg/kg iki 350 mg/kg vaškų, laikomi *lampante* aliejais, jei bendras alifatinių alkoholių kiekis yra nedidesnis nei 350 mg/kg arba eritrodioolio ir uvaolio procentinė dalis yra ne didesnė nei 3,5.

(4) Aliejai, kuriuose yra nuo 300 mg/kg iki 350 mg/kg vaškų, alyvuogių išspaudų aliejais, jei bendras alifatinių alkoholių kiekis yra didesnis nei 350 mg/kg arba eritrodioolio ir uvaolio procentinė dalis yra didesnė nei 3,5.

| Kategorija                                                       | Rūgščių sudėtis (1) |              |              |            |               |                                  | Trans-oleitinių izomerų suma (%) | Sterolių sudėtis   |                      |                    |                     |                    |                         | Bendras sterolių kiekis (mg/kg) | Eritrodolis ir uvaolis (%) (**) |
|------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------|--------------|------------|---------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                                                                  | Miristo (%)         | Linoleno (%) | Eikozano (%) | Beheno (%) | Lignocero (%) | Trans-oleitinių izomerų suma (%) |                                  | Cholest-erolis (%) | Brasikas-terolis (%) | Kampes-terolis (%) | Stigmaste-rolis (%) | β-sterolis (%) (1) | Δ-7 stigma-sterolis (%) |                                 |                                 |
| 1. Aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus       | ≤ 0,05              | ≤ 1,0        | ≤ 0,6        | ≤ 0,4      | ≤ 0,2         | ≤ 0,05                           | ≤ 0,05                           | ≤ 0,5              | ≤ 0,1                | ≤ 4,0              | < Camp.             | ≥ 93,0             | ≤ 0,5                   | ≥ 1 000                         | ≤ 4,5                           |
| 2. Pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus                            | ≤ 0,05              | ≤ 1,0        | ≤ 0,6        | ≤ 0,4      | ≤ 0,2         | ≤ 0,05                           | ≤ 0,05                           | ≤ 0,5              | ≤ 0,1                | ≤ 4,0              | < Camp.             | ≥ 93,0             | ≤ 0,5                   | ≥ 1 000                         | ≤ 4,5                           |
| 3. Pirmojo spaudimo klasikinio alyvuogių aliejus <i>lampante</i> | ≤ 0,05              | ≤ 1,0        | ≤ 0,6        | ≤ 0,4      | ≤ 0,2         | ≤ 0,10                           | ≤ 0,10                           | ≤ 0,5              | ≤ 0,1                | ≤ 4,0              | —                   | ≥ 93,0             | ≤ 0,5                   | ≥ 1 000                         | ≤ 4,5 (3)                       |
| 4. Rafinuotas alyvuogių aliejus                                  | ≤ 0,05              | ≤ 1,0        | ≤ 0,6        | ≤ 0,4      | ≤ 0,2         | ≤ 0,20                           | ≤ 0,30                           | ≤ 0,5              | ≤ 0,1                | ≤ 4,0              | < Camp.             | ≥ 93,0             | ≤ 0,5                   | ≥ 1 000                         | ≤ 4,5                           |
| 5. Maišytas rafinuoto ir pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus      | ≤ 0,05              | ≤ 1,0        | ≤ 0,6        | ≤ 0,4      | ≤ 0,2         | ≤ 0,20                           | ≤ 0,30                           | ≤ 0,5              | ≤ 0,1                | ≤ 4,0              | < Camp.             | ≥ 93,0             | ≤ 0,5                   | ≥ 1 000                         | ≤ 4,5                           |
| 6. Neapdorotas alyvuogių išspaudų aliejus                        | ≤ 0,05              | ≤ 1,0        | ≤ 0,6        | ≤ 0,4      | ≤ 0,2         | ≤ 0,20                           | ≤ 0,10                           | ≤ 0,5              | ≤ 0,2                | ≤ 4,0              | —                   | ≥ 93,0             | ≤ 0,5                   | ≥ 2 500                         | > 4,5 (4)                       |
| 7. Rafinuotas alyvuogių išspaudų aliejus                         | ≤ 0,05              | ≤ 1,0        | ≤ 0,6        | ≤ 0,4      | ≤ 0,2         | ≤ 0,40                           | ≤ 0,35                           | ≤ 0,5              | ≤ 0,2                | ≤ 4,0              | < Camp.             | ≥ 93,0             | ≤ 0,5                   | ≥ 1 800                         | > 4,5                           |
| 8. Alyvuogių išspaudų aliejus                                    | ≤ 0,05              | ≤ 1,0        | ≤ 0,6        | ≤ 0,4      | ≤ 0,2         | ≤ 0,40                           | ≤ 0,35                           | ≤ 0,5              | ≤ 0,2                | ≤ 4,0              | < Camp.             | ≥ 93,0             | ≤ 0,5                   | ≥ 1 600                         | > 4,5                           |

(1) Kiro riebiosios rūgštys (%): palmitino: 7,5–20,0; palmitoleino: 0,3–3,5; heptadecano: ≤ 0,3; heptadeceno: ≤ 0,3; stearino: 0,5–5,0; oleino: 55,0–83,0; linolo: 3,5–21,0.

(2) Suma : Δ-5,23-stigmastadienolis + klerosterolis + β-sitosterolis + sitosterolis + sitostanolis + Δ-5-avenasterolis + Δ-5,24-stigmastadienolis.

(3) Aliejai, kuriuose yra nuo 300 mg/kg iki 350 mg/kg vašku, laikomi lampante aliejais, jei bendras alifatinių alkoholių kiekis yra nedidesnis nei 350 mg/kg arba eritrodolio ir uvaolio procentinė dalis yra ne didesnė nei 3,5.

(4) Aliejai, kuriuose yra nuo 300 mg/kg iki 350 mg/kg vašku, alyvuogių išspaudų aliejais, jei bendras alifatinių alkoholių kiekis yra didesnis nei 350 mg/kg arba jei eritrodolio ir uvaolio procentinė dalis yra didesnė nei 3,5.

Pastabos:

(a) Analizės rezultatai turi būti pateikti tokiu pat tikslumu po kablelio, kaip nustatyta kiekvienai charakteristikai.

Apvalinant rezultatus nustatyti tikslumu, paskutinytis skaitmuo yra didinamas vienetu, jei po jo sekantis skaitmuo didesnis už 4.

(b) Aliejus turi būti priskirtas kitai kategorijai arba paskelbtas neatitinkančiu šiam reglamente jam keliamų grynumo kriterijų net ir tuo atveju, jei vienintelės charakteristikos vertė nesutampa su nustatyta ribine verte.

(c) Žvaigždute (\*) pažymėtos aliejus kokybės charakteristikos reišia:

— *lampante* alyvuogių aliejus nebūtinai vienu metu turi atitikti visas ribines vertes;

— pirmojo spaudimo alyvuogių aliejai net ir tuo atveju, jei vienintelės charakteristikos vertė nesutampa su nustatyta ribine verte, yra priskiriami kitai aliejaus kategorijai, tačiau vis tiek klasifikuojami kaip pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus.

(d) Dviem žvaigždutėmis (\*\*) pažymėtos aliejaus kokybės charakteristikos reišia, kad alyvuogių išspaudų aliejus nebūtinai vienu metu turi atitikti visas ribines vertes."

3. 1 priedėlis iš dalies keičiamas taip:

a) pirmoji įtrauka pakeičiama taip:

|                 |            |                                                                        |
|-----------------|------------|------------------------------------------------------------------------|
| „— Rūgštingumas | II priedas | Laisvųjų riebalų rūgščių kiekio nustatymas, naudojant šaltąjį metodą“; |
|-----------------|------------|------------------------------------------------------------------------|

b) trylikta įtrauka pakeičiama taip:

|                                                |             |                                                           |
|------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------------------------|
| „— 2 pozicijoje prisotintos riebiosios rūgštys | VII priedas | 2-glicerilo monopalmitato procentinio kiekio nustatymas“. |
|------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------------------------|

4. II priedo antraštė pakeičiama taip:

**„LAISVŲJŲ RIEBALŲ RŪGŠČIŲ KIEKIO NUSTATYMAS, NAUDOJANT ŠALTĄJĮ METODĄ“.**

5. IV priedas pakeičiamas taip:

#### **„IV PRIEDAS**

#### **VAŠKŲ KIEKIO NUSTATYMAS DUJŲ CHROMATOGRAFIJOS METODU KAPILIARINĖJE KOLONĖLĖJE**

##### **1. TIKSLAS IR TAIKymo SRITIS**

Šiuo metodu nustatomi vaškų kiekiai alyvuogių aliejuje. Vaškai identifikuojami pagal anglies atomų skaičių. Metodas taikomas atskirti spaudimo būdu gautą alyvuogių aliejų nuo alyvuogių aliejaus, gauto ekstrahavimo būdu (maišytas alyvuogių išspaudų aliejus).

##### **2. METODO ESMĖ**

Į riebalus arba aliejų pridedama atitinkamo vidinio etalono ir chromatografiškai frakcionuojama kolonėlėje, užpildytoje hidratuotu silikageliu. Frakcija, kuri bandymo sąlygomis išplaunama pirmoji (jos poliškumas yra mažesnis kaip trigliceridų), tiesiogiai tiriama dujų chromatografijos metodu kapiliarinėje kolonėlėje.

##### **3. ĮRANGA**

3.1. 25 ml Erlenmejerio kolba.

3.2. Stiklinė dujų chromatografijos kolonėlė su čiaupu, kurios vidinis skersmuo 15 mm, ilgis 30–40 cm.

3.3. Tinkamas dujų chromatografas su kapiliarine kolonėle ir mėginio tiesioginio įpurškimo įtaisais. Chromatografą sudaro:

3.3.1. Kolonėlių termostatas su temperatūros programavimo įrenginiu.

3.3.2. Šaltas inžektorius mėginiui tiesiogiai į kolonėlę įpurkšti.

3.3.3. Liepsnos jonizacinis detektorius ir konverteris stiprintuvas.

3.3.4. Kintamo popieriaus tiekimo greičio savirašis integratorius, dirbantis su konverteriu stiprintuvu (3.3.3), kurio atsako sparta ne didesnė kaip viena sekundė. (Taip pat galima naudoti kompiuterizuotas sistemas, leidžiančias kompiuteriu gauti dujų chromatografijos duomenis.).

3.3.5. 8–12 m ilgio ir 0,25–0,32 mm vidinio skersmens stiklinė arba kvarcinio stiklo kapiliarinė kolonėlė, iš vidaus padengta lygia 0,10–0,30 μm storio stacionarios fazės plėvele. (Naudoti paruoštos plėvelės parduodamos kaip SE-52 arba SE-54.).

3.4. 10 μl mikrošvirkštas su kietinta adata, pritaikytas mėginiui tiesiogiai įpurkšti į kolonėlę.

- 3.5. Elektrinė purtyklė.
- 3.6. Sukamasis garintuvas.
- 3.7. Mufelinė krosnis.
- 3.8. Analizinės svarstyklės, kurių svėrimo tikslumas  $\pm 0,1$  mg.
- 3.9. Įprasti laboratoriniai stikliniai indai.

#### 4. REAGENTAI

- 4.1. Silikagelis, kurio granulių dydis 60–200  $\mu\text{m}$ .

Jis paruošiamas taip: silikagelis dedamas į krosnį ir ne trumpiau kaip keturias valandas kaitinamas 500 °C temperatūroje. Leidžiama atvėsti ir įpilama 2 % (silikagelio masės) vandens. Gauta suspensija homogenizuojama gerai sumaišant. Prieš naudojimą laikoma tamsoje ne mažiau kaip 12 valandų.

- 4.2. n-heksanas, tinkamas chromatografijai.
- 4.3. Etileteris, tinkamas chromatografijai.
- 4.4. n-heptanas, tinkamas chromatografijai.
- 4.5. Etaloninis 0,1 % (m/v) laurileikozanato tirpalas heksane (vidinis etalonas). *(Taip pat galima naudoti palmitilo palmitatą arba miristilstearatą).*
  - 4.5.1. *Sudanas I (1-fenilazo-2-naftolis).*
- 4.6. Nešančiosios dujos: vandenilis arba helis, kurių grynumas atitinka dujų chromatografijos reikalavimus.
- 4.7. Pagalbinės dujos:
  - grynas vandenilis, tinkamas dujų chromatografijai,
  - grynas oras, tinkamas dujų chromatografijai.

#### 5. DARBO EIGA

##### 5.1. Chromatografinės kolonėlės paruošimas.

15 g silikagelio (4.1.) suspenduojama n-heksane (4.2.) ir supilama į kolonėlę (3.2.). Silikageliui leidžiama savaime nusėsti. Kad chromatografinis sluoksnis būtų homogeniškesnis, nusodinimas baigiamas, naudojant elektrinę purtyklę (3.5.). Priemaišos pašalinamos per silikagelį praleidžiant 30 ml n-heksano. Į 25 ml talpos Erlenmejerio kolbą (3.1) svarstyklėmis (3.8) tiksliai pasveriami 500 mg mėginio ir pridodamas reikiamas vidinio etalono (4.5) kiekis, atsižvelgiant į numatomą vaško kiekį mėginyje. Pvz.: analizuojant alyvuogių aliejų įdedama 0,1 mg laurileikozanato, analizuojant maišytą alyvuogių išspaudų aliejų – 0,25–0,5 mg. Paruoštas mėginys dviem 2 ml n-heksano (4.2.) porcijomis supilamas į chromatografijos kolonėlę.

Tirpikliui leidžiama ištekti iki 1 mm lygio virš absorbento viršutinio paviršiaus, tuomet per silikagelį praleidžiama 70 ml n-heksano natūraliai tirpaluose esantiems n-alkanams pašalinti. Chromatografinis išplovimas pradedamas palaikant 15 lašų per 10 sekundžių srauto greitį, surenkama 180 ml n-heksano/etileterio mišinio, paruošto santykiu 99:1. Mėginio išplovimas turi būti atliekamas kambario, t. y.  $22 \pm 4$  °C, temperatūroje.

##### Pastabos:

- n-heksano/etileterio mišinys (99:1) turi būti ruošiamas kasdien.
- Siekiant vizualiai sekti, ar vaškas tinkamai išplaunami, į skystą mėginio išplovimo mišinį galima įpilti 100  $\mu\text{l}$  1 % sudano tirpalo. Kadangi dažiklio sulaikymo trukmė yra tarpinė, lyginant su vašku ir trigliceridų sulaikymo trukme, todėl dažikliui pasiekus chromatografinės kolonėlės dugną, išplovimo procesas nutraukiamas, nes visi vašakai jau būna išplauti.

Gauta frakcija džiovinama sukamajame garintuve (3.6.), kol išgarinamas beveik visas tirpiklis. Paskutiniai 2 ml tirpiklio pašalinami silpna azoto srove; tuomet įpilama 2–4 ml n-heptano.

## 5.2. Dujų chromatografinė analizė

### 5.2.1. Paruošiamieji darbai

Kolonėlė prijungiama prie dujų chromatografo (3.3), kolonėlės pradžią sujungiant su tiesioginio įpurškimo įtaisų, galą – su detektoriumi. Patikrinamas dujų chromatografijos įrenginys (dujų kilpų, detektoriaus, ir savirašio veikimas ir t. t.).

Jei kolonėlė naudojama pirmą kartą, patartina ją kondicionuoti. Per kolonėlę paleidžiama nestipri dujų srovė, tuomet įjungiamas dujų chromatografas. Palaipsniui kaitinama, kol temperatūra per apytiksliai 4 valandas pakyla iki 350 °C. Ši temperatūra palaikoma ne mažiau kaip 2 valandas, po to nustatomos įrenginio darbo sąlygos (sureguliuojamas dujų srauto greitis, uždegama liepsna, prijungiamas elektroninis savirašis (3.3.4.), nustatoma termostato kameros temperatūra, sureguliuojamas detektorius ir t. t.) ir esant bent du kartus didesniai jautriui nei tas, kuris reikalingas analizei atlikti, užrašomas signalas. Bazinė linija turi būti tiesi, be jokių smailių ir nukrypimų.

Neigiamas tiesinis nuokrypis rodo, kad nesandarūs kolonėlės sujungimai; teigiamas nuokrypis – kad kolonėlė nepakankamai kondicionuota.

### 5.2.2. Darbo sąlygų parinkimas

Paprastai turi būti laikomasi tokių darbo sąlygų:

— kolonėlės temperatūra:

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

— detektoriaus temperatūra: 350 °C,

— įpurškamas medžiagos kiekis: 1 µl (2–4 ml) n-heptano tirpalo,

— nešančiosios dujos: helis arba vandenilis, naudojamas pasirinktoms dujoms optimalus linijinis greitis (žr. priedėlį),

— prietaiso jautris: atitinkantis toliau nurodytas sąlygas:

šios sąlygos gali būti keičiamos, atsižvelgiant į kolonėlės bei dujų chromatografo savybes, kad būtų pasiektas visų vaškų atskyrimas, pakankama smailių skiriamoji geba (žr. paveikslą). Vidinio etalono C<sub>32</sub> sulaikymo trukmė turi būti 18 ± 3 minutės. Būdingiausios vaškų smailės aukštis turi sudaryti ne mažiau kaip 60 % visos skalės aukščio.

Smailių integravimo parametrai nustatomi taip, kad būtų gautas teisingas nagrinėjamų smailių plotų įvertinimas.

*Pastaba.* Kadangi galutinė temperatūra aukšta yra leidžiamas teigiamas nuokrypis, neviršijantis 10 % visos skalės aukščio.

## 5.3. Analizė

10 µl mikrošvirkštu įsiurbiami 1 µl mėginio tirpalo; stūmoklis traukiamas, kol adata ištuštėja. Adata įkišiama į įpurškimo įtaisą ir po vienos-dviejų sekundžių tirpalas greitai išvirkščiamas. Maždaug po penkių sekundžių adata lėtai ištraukiama.

Užrašinėjama, kol vaškai visiškai išplaunami.

Bazinė linija turi visuomet atitikti nustatytas sąlygas.

#### 5.4. Smailių identifikavimas

Smailės identifikuojamos pagal sulaikymo trukmes, lyginant jas su žinomas sulaikymo trukmes turinčiais vaškų mišiniais, analizuotais tomis pačiomis sąlygomis.

Gryno alyvuogių aliejaus vaškų chromatograma parodyta paveiksle.

#### 5.5. Kiekybinis vertinimas

Integratoriumi išmatuojami vidinio etalono ir C<sub>40</sub>–C<sub>46</sub> alifatinių esterių smailių plotai.

Kiekvieno vašką sudarančio esterio kiekis mg/kg riebalų, apskaičiuojamas pagal formulę:

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

kurioje:

A<sub>x</sub> = kiekvieno esterio smailės plotas, kvadratiniais milimetrais

A<sub>s</sub> = kiekvieno vidinio etalono esterio smailės plotas, kvadratiniais milimetrais

m<sub>s</sub> = pridėto vidinio etalono masė, miligramais

m = tyrimui paimto mėginio masė, gramais.

#### 6. REZULTATŲ PATEIKIMAS

Pateikiami atskirų C<sub>40</sub>–C<sub>46</sub> vaškų kiekiai ir šių kiekių suma, mg/kg riebalų (ppm).

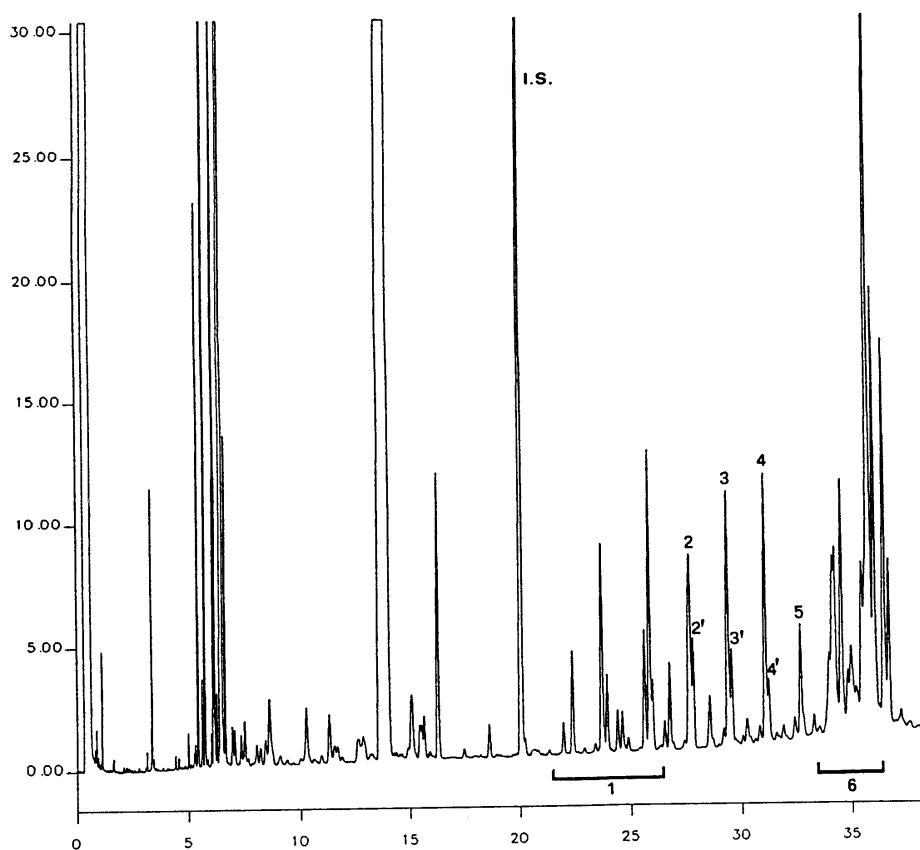
*Pastaba.* Vaškų sudedamųjų dalių kiekiai nustatomi remiantis alyvuogių aliejaus chromatogramos esterių porinių anglių skaičiaus smailių C<sub>40</sub>–C<sub>46</sub> pavyzdžiu, patektu paveiksle. Jei C<sub>46</sub> esteris matomas du kartus, jam identifikuoti rekomenduojama analizuoti maišytą alyvuogių išspaudų aliejų, kuriame C<sub>46</sub> lengvai nustatomas, nes šiame aliejuje jo yra daugiausia.

Rezultatai pateikiami vieno ženklų po kablelio (dešimtųjų) tikslumu.



## Paveikslas

## Alyvuogių aliejaus vaškų chromatograma (\*)



## Paaiškinimas:

I.S. = Laurileikozanatas

1. = Diterpeniniai esteriai

2 + 2' = Esteris  $C_{40}$

3 + 3' = Esteris  $C_{42}$

4 + 4' = Esteris  $C_{44}$

5. = Esteris  $C_{46}$

6. = Steroliniai esteriai ir triterpeninis alkoholis

(\*) Atlikus sterolinių esterių išplovimą, chromatografinėje linijoje ryškių smailių (trigliceridų) neturi būti.

## Priedėlis

## Dujų linijinio greičio nustatymas

Į dujų chromatografą, nustatytą normalioms darbo sąlygoms, įpurškiama 1–3  $\mu$ l metano arba propano ir matuojamas laikas, kurį dujos užtruks tekėdamos per kolonėlę nuo įpurškimo momento iki smailės iškilimo momento ( $t_M$ ).

Linijinis greitis, cm/s, gaunamas pagal formulę  $L/t_M$ , kurioje L yra kolonėlės ilgis, centimetrais,  $t_M$  yra išmatuotas laikas sekundėmis.“

6. VII priedas pakeičiamas taip:

„VII PRIEDAS

**2-GLICERIL MONOPALMITATO PROCENTINIO KIEKIO NUSTATYMAS**

1. TIKSLAS IR TAIKYMO SRITIS

Aprašyti analitinę procedūrą 2-oje triglicerido padėtyje esančios palmitino rūgšties procentinei daliai apskaičiuoti, nustatant 2-glicerilo monopalmiato kiekį.

Šis metodas taikomas aplinkos temperatūros (20 °C) skystiems augaliniams aliejams.

2. METODO ESMĖ

Paruoštas aliejaus mėginys veikiamas kasos lipaze: dėl dalinės ir specifinės 1 bei 3 padėties triglicerido molekulių hidrolizės monogliceridai atsiranda 2-oje padėtyje. Procentinis 2-glicerilo monopalmiato kiekis monoglicerido frakcijoje nustatomas kapiliarinės dujų chromatografijos metodu, prieš tai atlikus sililimą.

3. ĮRANGA IR MEDŽIAGOS

3.1. 25 ml Erlenmejerio kolba

3.2. 100, 250 ir 300 ml cheminės stiklinės

3.3. Stiklinė chromatografijos kolonėlė su deginto stiklo disku ir čiaupu, kurios vidinis skersmuo 21–23 mm, ilgis 400 mm.

3.4. 10, 50, 100 ir 200 ml matavimo cilindrai

3.5. 100 ir 250 ml kolbos

3.6. Sukamasis garintuvas

3.7. 10 ml centrifugavimo mėgintuvėliai su kūginės formos dugnu, uždaromi matinio stiklo kamščiu

3.8. Centrifuga 10 ir 100 ml mėgintuvėliams

3.9. Termostatas, kuriame galima palaikyti 40 + 0,5 °C temperatūrą

3.10. 1 ir 2 ml graduotos pipetės

3.11. 1 ml poodinis švirkštas

3.12. 100 µl mikrošvirkštas

3.13. 1 000 ml talpos piltuvas

3.14. Kapiliarinis dujų chromatografas su šalto tiesioginio įpurškimo įtaisų mėginiui tiesiogiai į kolonėlę patalpinti, ir krosnis, kurioje norimą temperatūrą galima palaikyti apytiksliai 1 °C tikslumu

3.15. Šalto tiesioginio įpurškimo įtaisas mėginiui tiesiogiai į kolonėlę patalpinti

3.16. Liepsnos jonizacinis detektorius ir elektrometras

3.17. Kintamo popieriaus tiekimo greičio savaraisis integratorius, dirbantis su elektrometru, kurio atsako sparta ne didesnė kaip viena sekundė

3.18. 8–12 m ilgio ir 0,25–0,32 mm vidinio skersmens stiklinė arba kvarcinio stiklo kapiliarinė kolonėlė, padengta 0,10–0,30 µm storio metilpolisiloksano arba 5 % fenil metilpolisiloksano plėvele. Kolonėlė gali būti naudojama 370 °C temperatūroje.

3.19. 10 µl mikrošvirkštas su ne trumpesne kaip 7,5 cm kietinta adata, pritaikytas mėginiui tiesiogiai įšvirkšti į kolonėlę.

## 4. REAGENTAI

- 4.1. Silikagelis, kurio granulių dydis 0,063–0,200 mm (70/280 mešų), paruoštas taip: silikagelis dedamas į porcelianinį indą, 4 valandas džiovinamas 160 °C džiovinimo spintoje, po to eksikatoriuje vėsinaamas iki kambario temperatūros. Įpilama 5 % (silikagelio masės) vandens: Erlenmejerio kolboje pasveriamas 152 g silikagelio ir įpilama 8 g distiliuoto vandens, kolba užkemšama ir atsargiai pakratoma, kad vanduo tolygiai pasiskirstytų. Prieš naudojant paliekama nusistovėti ne mažiau kaip 12 valandų.
- 4.2. n-heksanas, tinkamas chromatografijai
- 4.3. Izopropanolis
- 4.4. Izopropanolis, 1/1 vandeninis tirpalas (v/v)
- 4.5. Kasos lipazė. Naudojamos lipazės aktyvumas turi būti nuo 2,0 iki 10 lipazės vienetų/mg (*Rinkoje prekiaujama kasos lipazė, kurios aktyvumas nuo 2 iki 10 vienetų 1 mg fermento*).
- 4.6. Buferinis tri(hidroksimetil)aminometano tirpalas: 1 M vandeninis tirpalas parūgštinamas iki pH 8 (potenciometrinis patikrinimas) koncentruotu HCl (1:1 v/v)
- 4.7. Natrio choliato (fermentų kokybės) 0,1 % vandeninis tirpalas (šis tirpalas turi būti sunaudotas per 15 dienų nuo jo paruošimo)
- 4.8. Kalcio chlorido 22 % vandeninis tirpalas
- 4.9. Dietileteris, tinkamas chromatografijai
- 4.10. Judančioji fazė: n-heksano ir dietileterio (87/13) (v/v) mišinys
- 4.11. Natrio hidroksido 12 % (svorio procentais) tirpalas
- 4.12. Fenoltaleino 1 % tirpalas etanolyje
- 4.13. Nešančiosios dujos: helis arba vandenilis, tinkamas dujų chromatografijai
- 4.14. Pagalbinės dujos: ne mažesnis kaip 99 % grynumo vandenilis, išvalytas nuo drėgmės ir organinių medžiagų, ir tokio pat grynumo oras, tinkamas dujų chromatografijai.
- 4.15. Sililinizavimo reagentas: piridino, heksametildisilazano ir trimetilchlorsilano mišinys santykiu 9:3:1 (v/v/v). (*Rinkoje prekiaujama naudoti paruoštais tirpalais. Gali būti naudojami kiti sililino reagentai, pvz., N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamido + 1 % trimetilchlorsilano mišinys, praskiestas tuo pačiu sauso piridino tūriu*).
- 4.16. Etaloniniai tirpalai: grynieji monogliceridai arba monogliceridų mišiniai, kurių procentinė sudėtis yra artima tiriamų mėginių sudėčiai.

## 5. DARBO EIGA

## 5.1. Mėginio paruošimas

- 5.1.1. Taikant silikagelio kolonelinę chromatografiją aliejams, kuriuose laisvųjų rūgščių kiekis mažesnis kaip 3 %, jų neutralizuoti nereikia. Aliejai, kuriuose laisvųjų rūgščių kiekis didesnis kaip 3 %, turi būti neutralizuojami pagal 5.1.1.1. punktą.
- 5.1.1.1. Į 1 000 ml talpos piltuvą (3.13) įpilama 50 g aliejaus ir 200 ml n-heksano. Įpilama 100 ml izopropanolio ir 12 % natrio hidroksido tirpalo (4.11). Įpilamas natrio hidroksido tirpalo kiekis, atitinka aliejaus laisvųjų rūgščių kiekį, padidintą 5 %. Vieną minutę stipriai kratoma. Įpilama 100 ml distiliuoto vandens, vėl kratoma ir paliekama nusistovėti.

Atlikus dekantavimą, apatinis muilo sluoksnis pašalinamas. Išleidžiamas tarpinis sluoksnis (gleivės, netirpios medžiagos). Neutralizuoto aliejaus tirpalas heksane plaunamas izopropanolio ir vandens tirpalo (1:1 (v/v)) (4.4) 50–60 ml porcijomis, kol pranyksta rožinė fenoltaleino spalva.

Didesnioji heksano dalis pašalinama distiliuojant vakuume (pvz., naudojant sukamąjį garintuvą) ir aliejus perpilamas į 100 ml kolbą (3.5). Aliejus džiovinamas vakuume, kol tirpiklio visiškai nebelieka.

Baigus šią procedūrą, aliejaus rūgštingumas turi būti ne didesnis kaip 0,5 %.

- 5.1.2. Į 25 ml talpos Erlenmejerio kolbą (3.1) įpilama 1,0 g aliejaus, paruošto anksčiau minėtu būdu, ir ištirpinama 10 ml judančiosios fazės (4.10) mišinio. Tirpalas, prieš atliekant silikagelio kolonėlinę chromatografiją, paliekamas nusistovėti ne trumpiau kaip 15 minučių.

Jei tirpalas drumstas, jis centrifuguojamas, siekiant sudaryti optimalias sąlygas chromatografijai. (Gali būti naudojama 500 mg naudoti paruoštų SPE silikagelio kapsulių).

5.1.3. *Chromatografinės kolonėlės paruošimas*

Į kolonėlę (3.3) įpilama apie 30 ml judančiosios fazės (4.10), stikline lazdele į kolonėlės apačią įkišamas ir paspaudžiamas gabalėlis vatos, kad išeitų oras.

Cheminėje stiklinėje paruošiama 80 g judančiosios fazės ir 25 g silikagelio (4.1) suspensija ir naudojant piltuvą supilama į kolonėlę.

Patikrinama, ar į kolonėlę supiltas visas silikagelio kiekis; išplaunama judančiąja faze (4.10), atsukamas čiaupas ir skystis turi pasiekti 2 mm lygį virš silikagelio.

5.1.4. *Kolonėlinė chromatografija*

25 ml talpos Erlenmejerio kolboje (3.1.) tiksliai pasveriamas 1,0 g pagal 5.1 punktą paruošto mėginio.

Mėginys ištirpinamas 10 ml judančiosios fazės (4.10). Tirpalas supilamas į chromatografinę kolonėlę, paruoštą pagal 5.1.3 punktą. Kolonėlės paviršiaus stengiamasi nejudinti.

Atsukamas čiaupas ir mėginio tirpalui leidžiama tekėti, kol jis pasiekia silikagelio lygį. Procesas tęsiamas, naudojant 150 ml judančiosios fazės. Nustatomas 2 ml/min tekėjimo greitis (taip, kad 150 ml iš kolonėlės ištektų per 60–70 min).

Į iš anksto pasvertą 250 ml talpos kolbą surenkamas eliuatas. Tirpiklis išgarinamas vakuume ir jo likučiai pašalinami azoto srove.

Kolba pasveriamas ir apskaičiuojamas išgautas ekstrakto kiekis.

Jei naudojamos naudoti paruoštos SPE silikagelio kapsulės, į iš anksto su 3 ml n-heksano paruoštas kapsules įpilama 1 ml tirpalo (5.1.2.).

Tirpalas filtruojamas ir veikiamas 4 ml n-heksano ir dietileterio (9/1) (v/v) mišiniu.

Eliuatas surenkamas į 10 ml talpos mėgintuvėlį ir išdžiovinamas azoto srovėje.

Sausas likutis apdorojamas kasos lipaze (5.2). Prieš ir po SPE kapsulių naudojimo labai svarbu patikrinti riebiųjų rūgščių sudėtį.).

5.2. **Hidrolizė kasos lipaze**

- 5.2.1. Centrifugavimo mėgintuvėlyje pasveriamas 0,1 g pagal 5.1. punktą paruošto aliejaus. Įpilama 2 ml buferinio tirpalo (4.6), 0,5 ml natrio choliato tirpalo ir 0,2 ml kalcio chlorido tirpalo (4.7), įpylus kiekvieną iš šių tirpalų, gerai išmaišoma. Mėgintuvėlis uždaromas matinio stiklo kamščiu ir dedamas į termostatą, kuriame palaikoma  $40 \pm 0,5$  °C temperatūra.

- 5.2.2. Įdedama 20 mg lipazės, atsargiai pakratoma (taip, kad nesudrėktų kamštis) ir mėgintuvėlis įdedamas į termostatą lygiai 2 min, po to iš jo išimamas, stipriai kratomas lygiai 1 min ir paliekamas atvėsti.

- 5.2.3. Įpilama 1 ml dietileterio, užkemsama ir smarkiai kratoma, po to centrifuguojama ir eterio tirpalas mikrošvirkštu perpilamas į švarų ir sausą mėgintuvėlį.

5.3. **Sililinizuotų darinių ir dujų chromatografijos paruošimas**

- 5.3.1. Į 10 ml talpos mėgintuvėlį su kūginės formos dugnu mikrošvirkštu įšvirkščijama 100 µl tirpalo (5.2.3).

- 5.3.2. Tirpiklis pašalinamas nestipria azoto srove, įpilama 200 µl sililinizavimo reagento (4.15), mėgintuvėlis užkemsamas ir 20 minučių paliekamas nusistovėti.

- 5.3.3. Po 20 minučių, įpilama 1–5 ml n-heksano (atsižvelgiant į chromatografines sąlygas): gautas tirpalas yra paruoštas dujų chromatografiniai analizei.

#### 5.4. Dujų chromatografija

Darbo sąlygos:

- inžektoriaus (tiesioginio įpurškimo įtaiso) temperatūra žemesnė nei tirpiklio virimo temperatūra (68 °C),
- detektoriaus temperatūra: 350 °C,
- kolonėlės temperatūra: krosnies temperatūros nustatymas: 60 °C 1 minutę, po to kas minutę didinama po 15 °C, kol pasiekama 180 °C, po to kas minutę didinama po 5 °C, kol pasiekama 340 °C, tuomet 340 °C temperatūra palaikoma 13 minučių,
- nešančiosios dujos: vandenilis arba helis, naudojami nustačius atitinkamą linijinį greitį, kad būtų pasiekta 1 paveikslė pavaizduota skiriamoji geba. Triglicerido C<sub>54</sub> sulaikymo trukmė turi būti 40 ± 5 minutės (žr. 2 paveikslą). (Nurodytos sąlygos yra orientacinės. Operatoriai turi jas optimizuoti, kad būtų pasiekta pakankama skiriamoji geba. Glicerino monopalmitatą atitinkančios smailės minimalus aukštis turi būti ne mažesnis kaip 10 % savirašio skalės),
- įpurškamas medžiagos kiekis: 0,5–1 µl (5 ml) n-heptano tirpalo (5.3.3.).

##### 5.4.1. Smailių identifikavimas

Monogliceridai identifikuojami pagal sulaikymo trukmes ir šias trukmes lyginant su standartinių monogliceridų mišinių sulaikymo trukmėmis, analizuojamomis tomis pačiomis sąlygomis.

##### 5.4.2. Kiekybinis vertinimas

Kiekvienos smailės plotas apskaičiuojamas elektroniniu integratoriumi.

#### 6. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

Procentinis glicerilo monopalmitato kiekis apskaičiuojamas pagal atitinkamos smailės ploto santykį su visų monogliceridų smailių plotu (žr. 2 paveikslą), taikant tokią formulę:

$$\text{glicerilo monopalmitatas (\%)} = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

kurioje:

$A_x$  = Glicerino monopalmitatą atitinkančios smailės plotas

$\Sigma A$  = visų monoglicerido smailių plotų suma.

Rezultatai pateikiami vieno ženkle po kablelio (dešimtųjų) tikslumu.

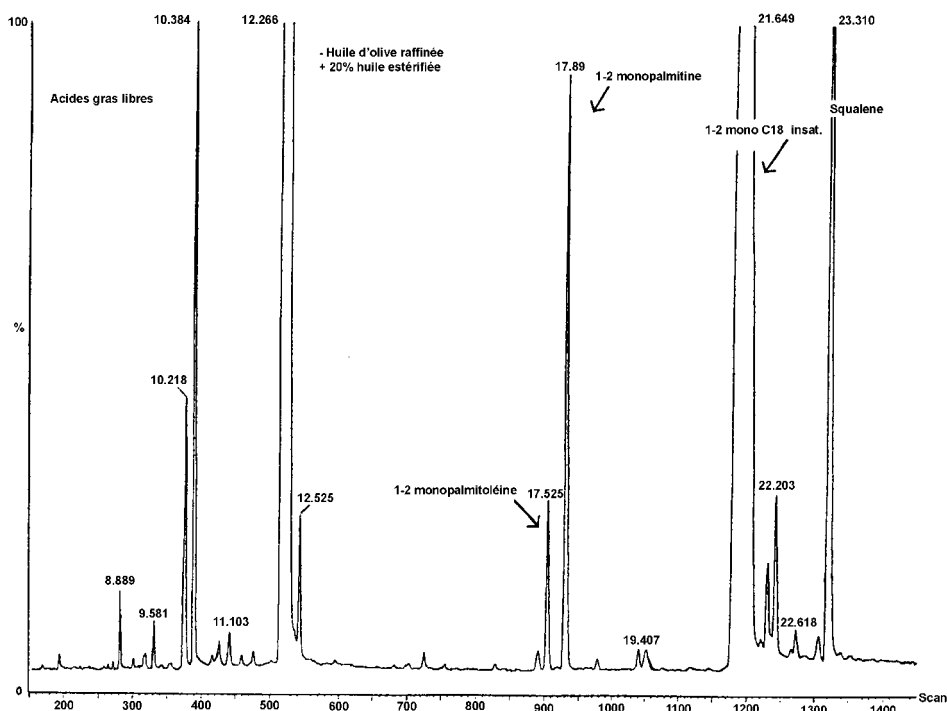
#### 7. ANALIZĖS ATASKAITA

Analizės ataskaitoje pateikiama:

- nuoroda į šį metodą,
- išsami pilnam mėginio identifikavimui reikalinga informacija,
- analizės rezultatas,
- bet kokie nukrypimai nuo metodo, padaryti atitinkamoms šalims nusprendus ar dėl kitų priežasčių,
- laboratorijos identifikavimo duomenys, analizės atlikimo data ir už analizę atsakingo asmens parašas.

## 1 paveikslas

Sililinizavimo reakcijos produktų, gautų rafinuotą alyvuogių aliejų su 20 % esterifikuoto aliejaus (100 %) priedu, paveikus lipaze, chromatograma



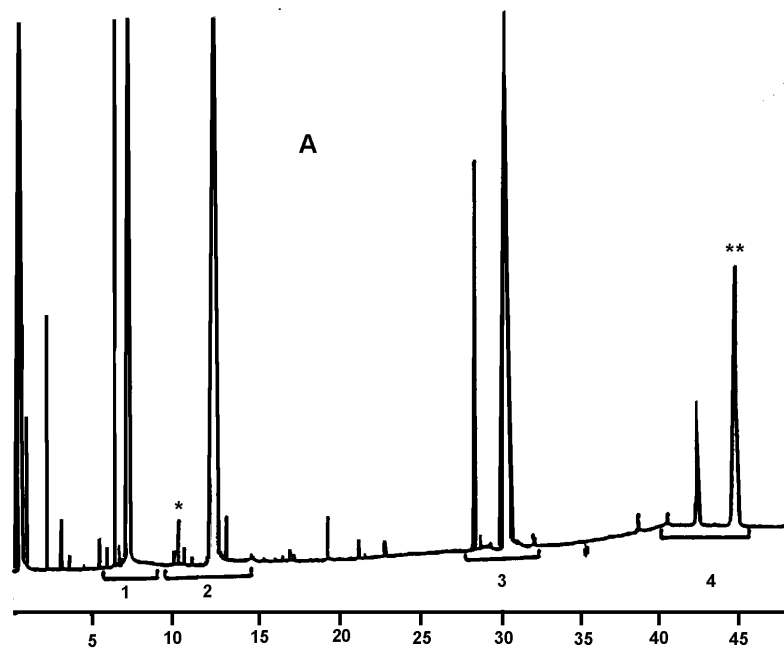
Paaiškinimas: Acides gras libres – Laisvosios riebalų rūgštys; Huile d'olives raffinée + 20 % huile estérifiée – Rafinuotas alyvuogių aliejus + 20 % esterifikuoto aliejaus; 1-2 monopalmitoléine – 1-2 monopalmitoleinas; 1-2 monopalmitine – 1-2 monopalmitinas; 1-2 mono C<sub>18</sub> insat. – 1-2 mono C<sub>18</sub> neprisot; Squalene – Skvalenas.

## 2 paveikslas

Chromatograma:

A) neesterifikuotas alyvuogių aliejus po poveikimo lipaze; po sililinizavimo; tokiomis sąlygomis (8–12 m ilgio kapiliarinė kolonėlė) vaškų frakcija išplaunama tuo pačiu metu arba truputį vėliau nei digliceridų frakcija.

Paveikus lipaze trigliceridų kiekis neturėtų viršyti 15 %



Paaiškinimas:

1 = Laisvosios riebalų rūgštys

2 = Monogliceridai

3 = Digliceridai

4 = Trigliceridai

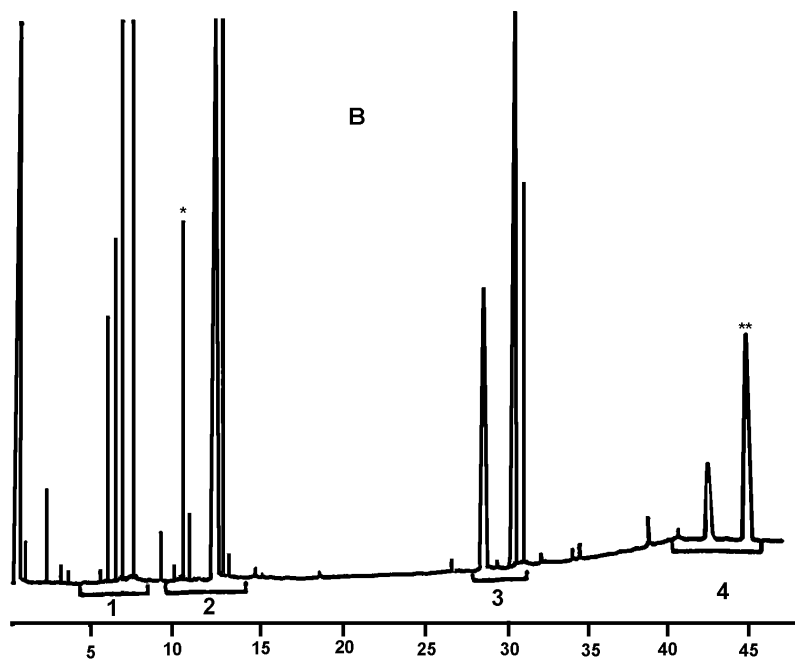
\* = 2-monopalmitinas

\*\* = Trigliceridas C<sub>54</sub>

**Chromatograma:**

- B) esterifikuotas aliejus po poveikio lipaze; po sililinizavimo; tokiomis sąlygomis (8–12 m ilgio kapiliarinė kolonėlė) vaškų frakcija išplaunama tuo pačiu metu arba truputį vėliau nei digliceridų frakcija.

Paveikus lipaze trigliceridų kiekis neturėtų viršyti 15 %

**Paaiškinimas:**

- 1 = Laisvosios riebalų rūgštys
- 2 = Monogliceridai
- 3 = Digliceridai
- 4 = Trigliceridai
- \* = 2-monopalmitinas
- \*\* = Trigliceridas C<sub>54</sub>

## 8. PASTABOS

### 1 pastaba. LIPAZĖS RUOŠIMAS

Rinkoje prekiaujama naudoti paruošta pakankamo aktyvumo lipaze. Lipazę taip pat galima paruošti laboratorijoje:

0 °C temperatūroje atšaldoma 5 kg šviežios kiaulių kasos. Pašalinami aplinkui esantys kieti riebalai bei apie juos esantis jungiamasis audinys, sumalama, kad susidarytų pastos pavidalo skysta masė. Ši pasta keturias-šešias valandas kratoma su 2,5 l absoliučiojo acetono ir centrifuguojama. Likutis dar tris kartus ekstrahuojamas tuo pačiu acetono tūriu, paskui du kartus 1:1 (v/v) acetono ir dietileterio mišiniu ir du kartus dietileteriu.

Likutis 48 valandas džiovinamas vakuume, tam kad gauti milteliai būtų patvarūs. Tokie milteliai, apsaugant juos nuo drėgmės, gali būti laikomi ilgą laiką šaldytuve.



2 pastaba. LIPAZĖS AKTYVUMO TIKRINIMAS

Alyvuogių aliejaus emulsija ruošama taip:

Maišytuve 10 minučių plakamas mišinys, sudarytas iš 165 ml gumiarabiko tirpalo (100 g/l), 15 g smulkinto ledo ir 20 ml neutralizuoto alyvuogių aliejaus.

Į 50 ml talpos cheminę stiklinę įpilama 10 ml šios emulsijos, po to 0,3 ml natrio choliato tirpalo (0,2 g/ml) ir 20 ml distiliuoto vandens.

Cheminė stiklinė dedama į termostatą, kuriame palaikoma 37 °C temperatūra; įstatomi pH matuoklio elektrodai ir sraigtinis maišiklis.

Biurete lašinamas natrio hidroksido tirpalas, kol pH pasiekia 8,3.

Į vandenį įpilama lipazės miltelių suspensijos (0,1 g/ml lipazės). Kai tik pH matuoklis parodo 8,3, paleidžiamas chromometras ir natrio hidroksido tirpalas lašinamas tokiu greičiu, kad pH visą laiką būtų 8,3. Kas minutę pasizymimas sunaudoto tirpalo tūris.

Matavimai pavaizduojami x/y koordinačių sistemoje, abscisėje nurodant laiką, o ordinatėje – sunaudoto 0,1 N natrio hidroksido tūrį (mililitrais), kuris sunaudotas pastoviam pH išlaikyti. Turi būti gaunamas linijinis grafikas.

Lipazės aktyvumas, matuojamas lipazės vienetais/mg, apskaičiuojamas pagal tokią formulę:

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

kurioje:

A aktyvumas, išreikštas lipazės vienetais/mg

V 0,1 N natrio hidroksido tirpalo mililitrų skaičius per minutę (apskaičiuotas pagal grafiką)

N natrio hidroksido tirpalo molinė ekvivalentų koncentracija

m analizuojamos lipazės mėginio masė, mg.

Lipazės vienetas yra apibrėžiamas kaip fermento kiekis, kuris išskiria 10 mikroekvivalentų rūgšties per minutę.“

7. X „A“ priedo 6.2 punktas pakeičiamas taip:

„6.2. Metilesteriai ruošiami, taikant X B priede nurodytą B metodiką. Atsargumo dėlei riebalinės medžiagos, kuriose laisvųjų rūgščių kiekis didesnis kaip 3 %, turi būti neutralizuojamos pagal VII priedo 5.1.1 punktą.“

---