

Šis tekstas yra skirtas tik informacijai ir teisinės galios neturi. Europos Sąjungos institucijos nėra teisiškai atsakingos už jo turinį. Autentiškos atitinkamų teisės aktų, įskaitant jų preambules, versijos skelbiamos Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje ir pateikiamos svetainėje „EUR-Lex“. Oficialūs tekstai tiesiogiai prerinami naudojantis šiuo dokumente pateikiamomis nuorodomis

► **B****KOMISIJOS REGLAMENTAS (EEB) Nr. 2568/91**

1991 m. liepos 11 d.

dėl maišyto alyvuogių aliejaus ir maišyto alyvuogių išspaudų aliejaus savybių ir dėl atitinkamų analizės metodų

(OL L 248, 1991 9 5, p. 1)

iš dalies keičiamas:

		Oficialusis leidinys		
		Nr.	puslapis	data
► <u>M1</u>	1991 m. gruodžio 17 d. Komisijos Reglamentas (EEB) Nr. 3682/91	L 349	36	1991 12 18
► <u>M2</u>	1992 m. gegužės 26 d. Komisijos Reglamentas (EEB) Nr. 1429/92	L 150	17	1992 6 2
► <u>M3</u>	Commission Regulation (EEC) No 1683/92 of 29 June 1992 (*)	L 176	27	1992 6 30
► <u>M4</u>	Commission Regulation (EEC) No 1996/92 of 15 July 1992 (*)	L 199	18	1992 7 18
► <u>M5</u>	1992 m. lapkričio 12 d. Komisijos reglamentas (EEB) Nr. 3288/92	L 327	28	1992 11 13
► <u>M6</u>	1993 m. sausio 29 d. Komisijos reglamentas (EEB) Nr. 183/93	L 22	58	1993 1 30
► <u>M7</u>	iš dalies pakeistas 1993 m. balandžio 6 d. Komisijos reglamentu (EEB) Nr. 826/93	L 87	6	1993 4 7
► <u>M8</u>	Commission Regulation (EEC) No 620/93 of 17 March 1993 (*)	L 66	29	1993 3 18
► <u>M9</u>	1994 m. sausio 28 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 177/94	L 24	33	1994 1 29
► <u>M10</u>	Commission Regulation (EC) No 2632/94 of 28 October 1994 (*)	L 280	43	1994 10 29
► <u>M11</u>	1995 m. kovo 28 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 656/95	L 69	1	1995 3 29
► <u>M12</u>	Commission Regulation (EC) No 2527/95 of 27 October 1995 (*)	L 258	49	1995 10 28
► <u>M13</u>	Commission Regulation (EC) No 2472/97 of 11 December 1997 (*)	L 341	25	1997 12 12
► <u>M14</u>	1998 m. vasario 3 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 282/98	L 28	5	1998 2 4
► <u>M15</u>	Commission Regulation (EC) No 2248/98 of 19 October 1998 (*)	L 282	55	1998 10 20
► <u>M16</u>	1999 m. vasario 19 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 379/1999	L 46	15	1999 2 20
► <u>M17</u>	Commission Regulation (EC) No 455/2001 of 6 March 2001 (*)	L 65	9	2001 3 7
► <u>M18</u>	Commission Regulation (EC) No 2042/2001 of 18 October 2001 (*)	L 276	8	2001 10 19
► <u>M19</u>	Commission Regulation (EC) No 796/2002 of 6 May 2002 (*)	L 128	8	2002 5 15
► <u>M20</u>	2003 m. lapkričio 6 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 1989/2003	L 295	57	2003 11 13
► <u>M21</u>	2007 m. birželio 21 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 702/2007	L 161	11	2007 6 22
► <u>M22</u>	2008 m. liepos 4 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 640/2008	L 178	11	2008 7 5
► <u>M23</u>	2011 m. sausio 24 d. Komisijos reglamentas (ES) Nr. 61/2011	L 23	1	2011 1 27
► <u>M24</u>	2012 m. liepos 19 d. Komisijos įgyvendinimo reglamentas (ES) Nr. 661/2012	L 192	3	2012 7 20

(*) Šis aktas nebuvo skelbtas lietuvių kalba.

► <u>M25</u>	2013 m. kovo 26 d. Komisijos įgyvendinimo reglamentas (ES) Nr. 299/2013	L 90	52	2013 3 28
► <u>M26</u>	2013 m. gruodžio 16 d. Komisijos įgyvendinimo reglamentas (ES) Nr. 1348/2013	L 338	31	2013 12 17
► <u>M27</u>	2015 m. liepos 8 d. Komisijos deleguotasis reglamentas (ES) 2015/1830	L 266	9	2015 10 13
► <u>M28</u>	2015 m. spalio 12 d. Komisijos įgyvendinimo reglamentas (ES) 2015/1833	L 266	29	2015 10 13
► <u>M29</u>	2016 m. liepos 27 d. Komisijos įgyvendinimo reglamentas (ES) 2016/1227	L 202	7	2016 7 28

pataisytas:

- **C1** Klaidų ištaisymas, OL L 111, 2011 4 30, p. 48 (61/2011)

▼B**KOMISIJOS REGLAMENTAS (EEB) Nr. 2568/91****1991 m. liepos 11 d.****dėl maišyto alyvuogių aliejaus ir maišyto alyvuogių išspaudų aliejaus savybių ir dėl atitinkamų analizės metodų****▼M20***1 straipsnis*

1. Aliejai, kurių charakteristikos atitinka šio reglamento I priedo 1, 2 punktuose nustatytas charakteristikas, laikomi pirmojo spaudimo alyvuogių aliejumi, kaip apibrėžta Reglamento (EEB) Nr. 136/66 priedo 1 punkto a ir b papunkčiuose.

2. Aliejus, kurio charakteristikos atitinka šio reglamento I priedo 3 punkte nustatytas charakteristikas, laikomas pirmojo spaudimo klasišiniu alyvuogių aliejumi *lampante*, kaip apibrėžta Reglamento (EEB) Nr. 136/66 priedo 1 punkto c papunktyje.

3. Aliejus, kurio charakteristikos atitinka šio reglamento I priedo 4 punkte nustatytas charakteristikas, laikomas rafinuotu alyvuogių aliejumi, kaip apibrėžta Reglamento (EEB) Nr. 136/66 priedo 2 punkte.

4. Aliejus, kurio charakteristikos atitinka šio reglamento I priedo 5 punkte nustatytas charakteristikas, laikomas alyvuogių aliejumi, sudarytu iš rafinuotų ir pirmojo spaudimo alyvuogių aliejų, kaip apibrėžta Reglamento (EEB) Nr. 136/66 priedo 3 punkte.

5. Aliejus, kurio charakteristikos atitinka šio reglamento I priedo 6 punkte nustatytas charakteristikas, laikomas neapdorotu alyvų išspaudų aliejumi, kaip apibrėžta Reglamento (EEB) Nr. 136/66 priedo 4 punkte.

6. Aliejus, kurio charakteristikos atitinka šio reglamento I priedo 7 punkte nustatytas charakteristikas, laikomas rafinuotu alyvų išspaudų aliejumi, kaip apibrėžta Reglamento (EEB) Nr. 136/66 priedo 5 punkte.

7. Aliejus, kurio charakteristikos atitinka šio reglamento I priedo 8 punkte nustatytas charakteristikas, laikomas alyvų išspaudų aliejumi, kaip apibrėžta Reglamento (EEB) Nr. 136/66 priedo 6 punkte.

▼ M26*2 straipsnis*

1. I priede nustatytos aliejų savybės nustatomos šiais analizės metodais:

- a) laisvosioms riebalų rūgštims, išreiškiamoms oleino rūgšties procentine dalimi, nustatyti – II priede nustatytu metodu;
- b) peroksidų skaičiui nustatyti – III priede nustatytu metodu;
- c) vašků kiekiui nustatyti – IV priede nustatytu metodu;
- d) sterolių ir triterpeno dialkoholių sudėčiai ir kiekiui kapiliarinės dujų chromatografijos metodu nustatyti – V priede nustatytu metodu;
- e) procentinei 2-glicerilo monopalmitato daliai nustatyti – VII priede nustatytu metodu;
- f) spektrofotometrinei analizei atlikti – IX priede nustatytu metodu;

▼ M28

- g) riebalų rūgščių sudėčiai nustatyti – X priede nustatytu metodu;

▼ M26

- h) lakiųjų halogenintų tirpiklių kiekiui nustatyti – XI priede nustatytu metodu;
- i) organoleptinėms pirmojo spaudimo alyvuogių aliejaus savybėms įvertinti – XII priede nustatytu metodu;
- j) stigmastadienų kiekiui nustatyti – XVII priede nustatytu metodu;
- k) trigliceridų su ECN42 kiekiui nustatyti – XVIII priede nustatytu metodu;

▼ M28

- l) alifatinių ir triterpeno alkoholių kiekiui nustatyti – XIX priede nustatytu metodu;

▼ M26

- m) vašků, riebalų rūgščių metilesterių ir riebalų rūgščių etilo esterių kiekiui nustatyti – XX priede nustatytu metodu.

▼ M28**▼ M26**

2. Organoleptinių pirmojo spaudimo alyvuogių aliejų savybių tikrinimą, pavestą nacionalinėms institucijoms ar jų atstovams, atlieka valstybių narių patvirtintos degustuotojų grupės.

▼ **M26**

Pirmoje pastraipoje nurodytos organoleptinės aliejaus savybės laikomos darančiomis su deklaruota kategorija, jeigu valstybės narės patvirtinta degustuotojų grupė patvirtina nustatytą rūšį.

Jeigu degustuotojų grupė, įvertinusi organoleptines savybes, nepatvirtina deklaruotos kategorijos, suinteresuotosios šalies prašymu nacionalinės institucijos arba jų atstovai nedelsdami organizuoja du priešpriešinius vertinimus, kuriuos atliktų kitos patvirtintos degustuotojų grupės, įskaitant bent vieną vertinimą, kurį atliktų susijusios valstybės narės gamintojos patvirtinta degustuotojų grupė. Atitinkamos savybės laikomos darančiomis su deklaruotomis savybėmis, jeigu deklaruota rūšis patvirtinama atlikus bent du iš šių priešpriešinių vertinimų. Priešingu atveju priešpriešinių vertinimų išlaidas padengia suinteresuotoji šalis.

3. Nacionalinėms institucijoms arba jų atstovams tikrinant aliejaus savybes, kaip nustatyta 1 dalyje, mėginiai imami pagal tarptautinius standartus EN ISO 661 dėl tiriamųjų mėginių paruošimo ir EN ISO 5555 dėl mėginių ėmimo. Tačiau, neatsižvelgiant į standarto EN ISO 5555 6.8 punktą, jeigu tokių aliejų partijos tikrinamos pirminėje pakuotėje, mėginys imamas pagal šio reglamento Ia priedą. Jeigu tikrinami neišpilstyti aliejai, kurių mėginių pagal EN ISO 5555 negalima paimti, mėginiai imami pagal valstybės narės kompetentingos institucijos pateiktus nurodymus.

Nepažeidžiant standarto EN ISO 5555 ir standarto EN ISO 661 6 skyriaus, paimti mėginiai kuo greičiau perkeliama į tamsią vietą atokiau nuo didelio karščio šaltinių ir ne vėliau kaip penktą darbo dieną nuo jų paėmimo nusiunčiami į laboratoriją analizei, priešingu atveju mėginiai saugomi taip, kad juos vežant ar saugant prieš išsiunčiant į laboratoriją nesuprastėtų jų kokybė arba jie nebūtų pažeisti.

4. Atliekant 3 dalyje nustatytą tikrinimą, analizės, nurodytos II, III, IX, XII ir XX prieduose, ir, jei daromos, bet kokios pagal nacionalinės teisės aktus reikalaujamos kontraanalizės atliekamos prieš pasibaigiant minimaliam supakuotų produktų galiojimo laikui. Jeigu imami neišpilstyti aliejaus mėginiai, tos analizės atliekamos ne vėliau kaip šeštąjį mėnesį nuo atitinkamo mėginio paėmimo mėnesio.

Kitoms šiame reglamente numatytoms analizėms netaikomi jokie laiko apribojimai.

Išskyrus atvejus, kai mėginys buvo paimtas likus mažiau nei dviem mėnesiams iki minimalaus galiojimo laiko pabaigos, jeigu analizių rezultatai neatitinka deklaruotos alyvuogių ar alyvuogių išspaudų aliejaus kategorijos savybių, susijusiai šaliai apie tai pranešama ne vėliau kaip likus mėnesiui iki pirmoje pastraipoje nurodyto laikotarpio pabaigos.

▼ **M26**

5. Alyvuogių aliejų savybes nustatant 1 dalies pirmoje pastraipoje nurodytais metodais, analizės rezultatai tiesiogiai lyginami su šiame reglamente nustatytomis ribomis.

▼ **M25***2a straipsnis*

1. Šiame straipsnyje „parduodamas alyvuogių aliejus“ – visas atitinkamos valstybės narės alyvuogių aliejaus ir alyvuogių išspaudų aliejaus kiekis, suvartojamas toje valstybėje narėje arba eksportuojamas iš tos valstybės narės.

2. Valstybės narės užtikrina, kad atitikties patikros būtų atliekamos atrankiai, remiantis rizikos analize, ir tinkamu dažnumu, taip užtikrinant, kad pardudamas alyvuogių aliejus atitiktų deklaruojamą kategoriją.

3. Rizikos vertinimo kriterijai gali būti šie:

- a) aliejaus kategorija, gamybos laikotarpis, aliejaus kaina palyginti su kitokio aliejaus kaina, maišymo ir pakavimo veiksmai, laikymo įrenginiai ir sąlygos, kilmės šalis, paskirties šalis, gabenimo būdas arba partijos apimtis;
- b) veiklos vykdytojų padėtis prekybos grandinėje, jų parduodamo aliejaus kiekis ir (arba) vertė, jų parduodamo aliejaus kategorijų įvairovė, vykdomo verslo rūšis, pvz., malimas, laikymas, rafinavimas, maišymas, pakavimas arba mažmeninė prekyba;
- c) anksčiau atliktų patikrų rezultatai, įskaitant nustatytų defektų skaičių ir pobūdį, įprastą parduodamo aliejaus kokybę, naudojamos techninės įrangos darbinis parametras;
- d) veiklos vykdytojų taikomų kokybės užtikrinimo sistemų arba savi-kontrolės sistemų, susijusių su atitiktimi prekybos standartams, patikimumas;
- e) vieta, kurioje atliekama patikra, ypač jei tai pirmasis patekimo į Sąjungą taškas, paskutinis taškas prieš išgabenant iš Sąjungos arba vieta, kurioje aliejus gaminamas, pakuojamas, kraunamas arba parduodamas galutiniam vartotojui;
- f) bet kokia kita informacija, iš kurios būtų galima įžvelgti neatitikties riziką.

4. Valstybės narės iš anksto nustato:

- a) partijų neatitikties reikalavimams rizikos vertinimo kriterijus;
- b) remdamosi rizikos analize pagal kiekvieną rizikos kategoriją – mažiausią veiklos vykdytojų arba partijų ir (arba) kiekio, kurių atitikties patikra bus atliekama, kiekį.

▼ M25

Per metus atliekama bent viena kiekvieno tūstančio tonų alyvuogių aliejaus, parduodamo valstybėje narėje, atitikties patikra.

5. Valstybės narės atitiktį tikrina:

- a) bet kokia eilės tvarka atlikdamos I priede nurodytas analizes arba
- b) laikydamosi Ib priedo schemoje sprendimams priimti nustatytos eilės tvarkos, kol gaunamas vienas šioje schemoje įrašytų atsakymų.

▼ M19**▼ M25***3 straipsnis*

Jei nustatoma, kad aliejus neatitinka jo kategorijos aprašymo, suinteresuota valstybė narė, nedarydama poveikio bet kokioms kitoms bausmėms, taiko veiksmingas, proporcingas ir atgrasias bausmes, atsižvelgdama į nustatyto pažeidimo sunkumą.

Jei atlikus patikras nustatoma didelių pažeidimų, valstybės narės padidina patikrų, susijusių su prekybos etapu, aliejaus kategorija, kilme ar kitais kriterijais, dažnumą.

▼ M5*4 straipsnis***▼ M19**

1. The Member States may approve assessment panels so that national authorities or their representatives can assess and verify organoleptic characteristics.

The terms of approval shall be set by Member States and ensure that:

- the requirements of Annex XII.4 are met,
- the panel head is given training recognised for this purpose by the Member State,
- continued approval depends on performance in annual checks arranged by the Member State.

Member States shall notify to the Commission a list of approved panels and the action taken under this paragraph.

▼ M5

2. Jei valstybės narės jos teritorijoje kuriant degustatorių grupes susiduria su sunkumais, jos gali pasikviesti kitoje valstybėje narėje patvirtintą degustatorių grupę.

3. Kiekviena valstybė narį pateikia degustatorių grupių, sukurtų profesinių arba tarpšakinių organizacijų pagal šio straipsnio 1 dalyje nustatytas sąlygas, sąrašą ir užtikrina, kad tų sąlygų būtų laikomasi.

▼ M19**▼ B***6 straipsnis*

1. Aliejaus kiekis aliejaus išspaudose ir kitose alyvuogių aliejaus ekstrahavimo atliekose (KN kodai 2306 90 11 ir 2306 90 19) nustatomas, taikant XV priede nurodytą metodą.

▼B

2. Straipsnio 1 dalyje minimas aliejaus kiekis skaičiuojamas aliejaus masės procentais sausos medžiagos masei.

▼M20*7 straipsnis*

Taikomos Bendrijos nuostatos dėl nepageidaujamų medžiagų.

Tirpikliams, kurių sudėtyje yra halogenų, visų kategorijų alyvuogių aliejams nustatytos šios ribinės vertės:

- maksimalus bet kurio aptikto tirpiklio, kurio sudėtyje yra halogenų, kiekis: 0,1 mg/kg,
- maksimalus bendras visų tirpiklių, kurių sudėtyje yra halogenų, kiekis: 0,2 mg/kg.

▼M25*7a straipsnis*

Fiziniai arba juridiniai asmenys ir asmenų grupės, laikantys alyvuogių aliejų ir alyvuogių išspaudų aliejų nuo ekstrahavimo malūne iki išpilstymo į butelius (imtina), nesvarbu, kokiais profesiniais ar komerciniais tikslais, turi registruoti kiekvienos tokio kategorijos aliejaus priėmimą ir išdavimą.

Valstybė narė užtikrina, kad būtų tinkamai laikomasi pirmojoje pastraipoje nustatyto įpareigojimo.

8 straipsnis

1. Valstybės narės praneša Komisijai apie priemones, kuriomis įgyvendinamas šis reglamentas. Jos praneša Komisijai apie visus vėlesnius jų pakeitimus.

2. Ne vėliau kaip iki kiekvienų metų gegužės 31 d. valstybės narės perduoda Komisijai šio reglamento įgyvendinimo praėjusiais kalendoriniais metais ataskaitą. Ataskaitoje pateikiami bent jau atliktų alyvuogių aliejaus atitikties patikrų rezultatai, kaip nurodyta XXI priede pateiktuose šablonuose.

3. Šiame reglamente nurodyti pranešimai teikiami remiantis Komisijos reglamentu (EB) Nr. 792/2009 ⁽¹⁾.

▼B*9 straipsnis*

Šiuo dokumentu Reglamentas (EEB) Nr. 1058/77 yra panaikinamas.

10 straipsnis

1. Šis reglamentas įsigalioja trečią dieną po jo paskelbimo *Europos Bendrijų oficialiajame leidinyje*.

Tačiau XII priede nurodytas metodas taikomas nuo ►**M1** 1992 m. lapkričio 1 d. ◀, išskyrus atvejus, susijusius su intervencinės sistemos operacijomis.

⁽¹⁾ OL L 228, 2009 9 1, p. 3.

▼ **M5**

Tas metodas netaikomas pirmo spaudimo alyvuogių aliejui, paruoštam parduoti iki 1992 m. lapkričio 1 d.

▼ **B**

2. Šis reglamentas netaikomas alyvuogių aliejui ir alyvuogių išspaudų aliejui, įpakuotam iki šio reglamento įsigaliojimo ir parduotam iki 1992 m. spalio 31 d.

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

▼ B*PRIEDAI***Turinys**

I priedas	Alyvuogių aliejaus savybės
Ia priedas	Alyvuogių aliejaus arba alyvuogių išspaudų aliejaus, pristatyto pirminėje pakuotėje, mėginių ėmimas
Ib priedas	Sprendimų schema siekiant patikrinti, ar alyvuogių aliejaus mėginys atitinka deklaruotą kategoriją
II priedas	Laisvųjų riebalų rūgščių kiekio nustatymas šaltuoju metodu
III priedas	Peroksidų skaičiaus nustatymas
IV priedas	Vaškų kiekio nustatymas dujų chromatografijos metodu kapiliarinėje kolonėlėje
V priedas	Sterolių ir triterpeno dialkolių sudėties ir kiekio nustatymas kapiliarinės dujų chromatografijos metodu
VII priedas	► M21 2-glicerilo monopalmitato procentinio kiekio nustatymas ◀

▼ M20**▼ B**

IX priedas	Spektrofotometrinis tyrimas ultravioletinėje spektro dalyje
------------	---

▼ M28

X priedas	Riebalų rūgščių metilesterių nustatymas dujų chromatografijos metodu
-----------	--

▼ B

XI priedas	Lakiųjų halogenintų tirpiklių kiekio alyvuogių aliejuje nustatymas
XII priedas	Tarptautinės alyvuogių aliejaus tarybos pirmojo spaudimo alyvuogių aliejaus organoleptinio vertinimo metodas

▼ M20**▼ M19****▼ B**

XV priedas	Aliejaus kiekio alyvuogių atliekose nustatymas
XVI priedas	Jodo skaičiaus nustatymas
XVII priedas	Augaliniuose aliejuose esančių stigmastadienų nustatymo metodas
XVIII priedas	Skirtumo tarp faktinio ir teorinio triacilglicerolių kiekio su ECN 42 nustatymas
Annex XIX	► M28 Alifatinių ir triterpeno alkoholių kiekio nustatymas kapiliarinės dujų chromatografijos metodu ◀

▼ M23

XX priedas	vaškų, riebiųjų rūgščių metilo esterių ir riebiųjų rūgščių etilo esterių kiekio nustatymo kapiliarinės dujų chromatografijos būdu metodika
------------	--

▼ M28**▼ M25**

XXI priedas	8 straipsnio 2 dalyje nurodytų alyvuogių aliejaus atitikties patikrų rezultatai
-------------	---

I PRIEDAS

ALYVUOGIŲ ALIEJAUS SAVYBĖS

Kategorija	Riebalų rūgščių etilo esteriai (FAEE) (*)	Rūgštingumas (%) (*)	Peroksidų skaičius, mEq O ₂ /kg (*)	Vaškai mg/kg (**)	2-glicerilo monopalmitatas (%)	Stigmastadienai mg/kg ⁽¹⁾	Skirtumas: ECN42 (HPLC) ir ECN42 (teorinis apskaičiavimas)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ arba K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptinis trūkumų medianos įvertinimas (Md) (*)	Organoleptinis trūkumų medianos įvertinimas (Mf) (*)
1. Aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus	FAEE ≤ 40 mg/kg (2013–2014 derliaus metai) ⁽²⁾ FAEE ≤ 35 mg/kg (2014–2016 derliaus metai) FAEE ≤ 30 mg/kg (po 2016 derliaus metų)	≤ 0,8	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
					≤ 1,0, jei bendras palmitino rūgšties % > 14 %							
2. Pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus	—	≤ 2,0	≤ 20	C42 + C44 + C46 ≤ 150	≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
					≤ 1,0, jei bendras palmitino rūgšties % > 14 %							

▼ M27

Kategorija	Riebalų rūgščių etilo esteriai (FAEE) (*)	Rūgštingumas (%) (*)	Peroksidų skaičius, mEq O ₂ /kg (*)	Vaškai mg/kg (**)	2-glicerilo monopalmitatas (%)	Stigmastadienai mg/kg (¹)	Skirtumas: ECN42 (HPLC) ir ECN42 (teorinis apskaičiavimas)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ arba K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptinis trūkumų medianos įvertinimas (Md) (*)	Organoleptinis trūkumų medianos įvertinimas (Mf) (*)
3. Pirmojo spaudimo klasikinės alyvuogių aliejus <i>lampante</i>	—	> 2,0	—	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 300 (³)	≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (⁴)	—
					≤ 1,1, jei bendras palmitino rūgšties % > 14 %							
4. Rafinuotas alyvuogių aliejus	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1, jei bendras palmitino rūgšties % > 14 %							
5. Maišytas rafinuoto ir pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 ≤ 350	≤ 0,9, jei bendras palmitino rūgšties % ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0, jei bendras palmitino rūgšties % > 14 %							

▼ M27

Kategorija	Riebalų rūgščių etilo esteriai (FAEE) (*)	Rūgštingumas (%) (*)	Peroksidų skaičius, mEq O ₂ /kg (*)	Vaškai mg/kg (**)	2-glicerilo monopalmitatas (%)	Stigmastadienai mg/kg ⁽¹⁾	Skirtumas: ECN42 (HPLC) ir ECN42 (teorinis apskaičiavimas)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ arba K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptinis trūkumų medianos įvertinimas (Md) (*)	Organoleptinis trūkumų medianos įvertinimas (Mf) (*)
6. Neapdorotas alyvuogių išspaudų aliejus	—	—	—	C40 + C42 + C44 + C46 > 350 ⁽⁵⁾	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Rafinuotas alyvuogių išspaudų aliejus	—	≤ 0,3	≤ 5	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Alyvuogių išspaudų aliejus	—	≤ 1,0	≤ 15	C40 + C42 + C44 + C46 > 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

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

⁽²⁾ Ši riba taikoma alyvuogių aliejams, pagamintiems nuo 2014 m. kovo 1 d.

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

⁽⁴⁾ Trūkumų mediana gali būti mažesnė arba lygi 3,5; vaisių požymio mediana lygi 0.

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

▼ M27

Kategorija	Riebalų rūgščių sudėtis ⁽¹⁾						Trans-oleinių izomerų suma (%)	Trans-linolo ir trans-linolenolizomerų suma (%)	Sterolių sudėtis						Bendras sterolių kiekis (mg/kg)	Eritrodiolis ir uvaolis (%) ^(**)
	Miristo (%)	Linoleno (%)	Eikozano (%)	Eikozeno (%)	Beheno (%)	Lignocero (%)			Cholesterolis (%)	Brasi-kasterolis (%)	Kampes-terolis ⁽²⁾ (%)	Stigmaste-rolis (%)	Tariamasis βsitoste-rolis ⁽³⁾ (%) ^(**)	Delta-7-stigmaste-nolis ⁽²⁾ (%)		
1. Aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Pirmojo spaudimo klasikinis alyvuogių aliejus <i>lampante</i>	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽⁴⁾
4. Rafinuotas alyvuogių aliejus	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Maišytas rafinuoto ir pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Neapdorotas alyvuogių išspaudų aliejus	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁵⁾
7. Rafinuotas alyvuogių išspaudų aliejus	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5

▼ M27

Kategorija	Riebalų rūgščių sudėtis ⁽¹⁾						Trans-oleinių izomerų suma (%)	Trans-linolo ir trans-linolenoleno izomerų suma (%)	Sterolių sudėtis						Bendras sterolių kiekis (mg/kg)	Eritrodiolis ir uvaolis (%) ^(**)
	Miristo (%)	Linoleno (%)	Eikozano (%)	Eikozeno (%)	Beheno (%)	Lignocero (%)			Cholesterolis (%)	Brasi-kasterolis (%)	Kampes-terolis ⁽²⁾ (%)	Stigmaste-rolis (%)	Tariamasis βsitosterolis ⁽³⁾ (%) ^(**)	Delta-7-stigmaste-nolis ⁽²⁾ (%)		
8. Alyvuogių išspaudų aliejus	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Kitų riebalų rūgščių kiekis (%): palmitino: 7,50–20,00; palmitoleino: 0,30–3,50; heptadekano: ≤ 0,30; heptadeceno: ≤ 0,30; stearino: 0,50–5,00; oleino: 55,00–83,00; linolo: 2,50–21,00.

⁽²⁾ Žr. šio priedo priedėlį.

⁽³⁾ Tariamasis β-sitosterol: Δ-5,23-stigmastadienolis + klerosterolis + β-sitosterolis + sitostanolis + Δ-5-avenasterolis + Δ-5,24-stigmastadienolis.

⁽⁴⁾ Aliejai, kuriuose yra nuo 300 mg/kg iki 350 mg/kg vaškų, laikomi pirmojo spaudimo klasikiniiais alyvuogių aliejais *lampante*, jei bendras alifatinių alkoholių kiekis yra ne didesnis nei 350 mg/kg arba jei eritrodiolio ir uvaolio procentinė dalis yra ne didesnė nei 3,5.

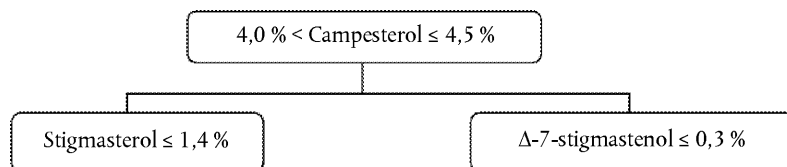
⁽⁵⁾ Aliejai, kuriuose yra nuo 300 mg/kg iki 350 mg/kg vaškų, laikomi neapdorotais alyvuogių išspaudų aliejais, jei bendras alifatinių alkoholių kiekis yra didesnis nei 350 mg/kg arba jei eritrodiolio ir uvaolio procentinė dalis yra didesnė nei 3,5.

Pastabos

- Analizės rezultatai turi būti pateikti tokiu pat tikslumu po kablelio, kaip nustatyta kiekvienai savybei. Apvalinant rezultatą nustatytu tikslumu, paskutinis skaitmuo yra didinamas vienetu, jei po jo einantis skaitmuo didesnis už 4.
- Aliejus gali būti priskirtas kitai kategorijai arba paskelbtas neatitinkančiu šiame reglamente jam keliamų grynumo kriterijų net ir tuo atveju, jei nustatytų verčių neatitinka tik viena savybė.
- Žvaigždute (*) pažymėtos aliejaus kokybės savybės reiškia: – pirmojo spaudimo klasikinis alyvuogių aliejus *lampante* nebūtinai vienu metu turi atitikti visas ribines vertes; pirmojo spaudimo alyvuogių aliejai net ir tuo atveju, jei su nustatyta ribine verte nesutampa vienintelė savybė, yra priskiriami kitai aliejaus kategorijai, nors vis tiek klasifikuojami kaip pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus.
- Dviem žvaigždutėmis (**) pažymėta savybė reiškia, kad visų rūšių alyvuogių išspaudų aliejus nebūtinai vienu metu turi atitikti visas ribines vertes.

▼ **M27***Priedėlis***SPRENDIMO SCHEMA**

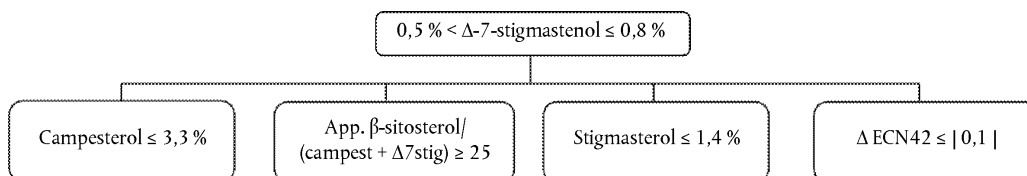
Kampesterolis. Sprendimų schema. Pirmojo spaudimo ir aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo alyvuogių aliejai



Kiti parametrai turi atitikti šiame reglamente nustatytas ribines vertes.

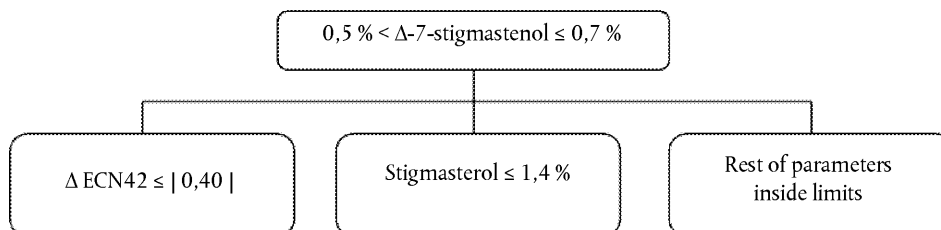
Delta-7-stigmasterolis. Sprendimų schema.

— Aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo ir pirmojo spaudimo alyvuogių aliejai



Kiti parametrai turi atitikti šiame reglamente nustatytas ribines vertes.

— Alyvuogių išspaudų aliejai (neapdoroti ir rafinuoti):



▼ **M26***Ia PRIEDAS***ALYVUOGIŲ ALIEJAUS ARBA ALYVUOGIŲ IŠSPAUDŲ ALIEJAUS, PRISTATYTO PIRMINĖJE PAKUOTĖJE, MĖGINIŲ ĖMIMAS**

Šis mėginių ėmimo metodas taikomas alyvuogių arba alyvuogių išspaudų aliejaus, pristatyto pirminėje pakuotėje, partijoms. Atsižvelgiant į tai, ar pirminės pakuotės tūris yra didesnis nei 5 litrai, ar ne, taikomi įvairūs mėginių ėmimo metodai.

Partija – prekės vienetų, kurie buvo pagaminti ir supakuoti tokiomis aplinkybėmis, kad kiekviename prekės vienetu esantis aliejus pagal visas analitines savybes yra laikomas homogenišku, rinkinys. Partija turi būti individualiai pažymėta pagal Europos Parlamento ir Tarybos direktyvą 2011/91/ES ⁽¹⁾.

Ėminys – pirminėje pakuotėje esančio aliejaus kiekis, paimtas iš atsitiktine tvarka parinktos partijos vietos.

1. PIRMINIO MĖGINIO SUDĖTIS**1.1. Ne didesnė nei 5 litrų pirminė pakuotė**

Pirminis mėginys, kai pirminė pakuotė yra ne didesnė nei 5 litrų, – keletas ėminių, paimtų iš partijos vadovaujantis 1 lentelę.

*1 lentelė***Būtiniausias pirminio mėginio dydis**

Jeigu pirminės pakuotės tūris	Pirminį mėginį turi sudaryti aliejus iš
a) 1 litras ar daugiau	a) vienos pirminės pakuotės;
b) mažiau nei 1 litras	b) minimalaus pakuočių, kurių bendras tūris yra bent 1,0 litras, skaičiaus

Kiekviena valstybė narė, atsižvelgdama į savo poreikius (pavyzdžiui, jeigu organoleptinį vertinimą atlieka kita nei atlikusioji cheminę analizę, kontraanalizę ir t. t. laboratorija), gali padidinti 1 lentelėje nurodytą pakuočių skaičių, iš kurio būtų sudarytas pirminis mėginys.

1.2. Didesnė nei 5 litrų pirminė pakuotė

Pirminis mėginys, kai pirminė pakuotė yra didesnė nei 5 litrų, – visų ėminių dalis, atspindinti jų visumą, gauta juos redukuojant ir vadovaujantis 2 lentelę. Pirminį mėginį turi sudaryti įvairūs pavyzdžiai.

Pirminio mėginio „pavyzdys“ – kiekviena iš pirminį mėginį sudarančių pakuočių.

*2 lentelė***Būtiniausias ėminių skaičius**

Pakuočių partijoje skaičius	Būtiniausias ėminių skaičius
Iki 10	1
Nuo ... 11 iki 150	2

⁽¹⁾ 2011 m. gruodžio 13 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2011/91/ES dėl nuorodų arba žymų maisto produkto partijai identifikuoti (OL L 334, 2011 12 16, p. 1).

▼ **M26**

Pakuočių partijoje skaičius	Būtiniausias ėminių skaičius
Nuo ... 151 iki 500	3
Nuo ... 501 iki 1 500	4
Nuo ... 1 501 iki 2 500	5
Daugiau kaip 2 500 kiekvienam 1 000 pakuočių	1 papildomas ėminys

Siekiant sumažinti iš pirminių pakuočių paimtų mėginių tūrį, pirminiam mėginiui parengti paimtų ėminių turinys homogenizuojamas. Įvairių ėminių dalys supilamos į bendrą talpyklą, kurioje sumaišomos, kad būtų homogenizuotos, užtikrinant kuo geriausią apsaugą nuo oro.

Pirminio mėginio turinys turi būti išpilstytas į keletą bent 1,0 litro tūrio pakuočių, kurių kiekviena sudaro pirminio mėginio pavyzdį.

Kiekviena valstybė narė, atsižvelgdama į savo poreikius (pavyzdžiui, jeigu organoleptinį vertinimą atlieka kita nei atlikusioji cheminę analizę, kontraanalizę ir t. t. laboratorija), gali padidinti pirminių mėginių skaičių.

Kiekviena pakuotė turi būti užpildyta taip, kad oro sluoksnis viršuje būtų kuo mažesnis, ir paskui tinkamai uždaryta ir užsandarinta, kad produktas nebūtų sugadintas.

Šie pavyzdžiai turi būti paženklinami etiketėmis, kad juos būtų galima teisingai identifikuoti.

2. ANALIZĖS IR REZULTATAI

2.1. Kiekvienas pirminis mėginys pagal standarto EN ISO 5555 2.5 punktą turi būti padalytas į laboratorinius mėginius ir išanalizuotas Ib priede pateikiamose sprendimų schemoje nurodyta tvarka arba bet kokia kita atsitiktine tvarka.

2.2. Jeigu deklaruotos aliejaus kategorijos savybės atitinka visi analizės rezultatai, derančia turi būti pripažinta visa partija.

Jeigu bent vienas analizės rezultatas neatitinka deklaruotos aliejaus kategorijos savybių, visa partija turi būti pripažinta nederančia.

3. PARTIJOS KATEGORIJOS TIKRINIMAS

3.1. Partijos kategorijai patikrinti kompetentinga institucija gali padidinti įvairiose partijos vietose imamų pirminių mėginių skaičių pagal šią lentelę:

3 lentelė

Pirminių mėginių skaičius, nustatomas pagal partijos dydį

Partijos dydis (litrais)	Pirminių mėginių skaičius
Mažiau nei 7 500	2
Nuo 7 500 iki mažiau nei 25 000	3
Nuo 25 000 iki mažiau nei 75 000	4
Nuo 75 000 iki mažiau nei 125 000	5
125 000 arba daugiau	6 + 1 kiekvienam papildomam 50 000 litrų kiekiui

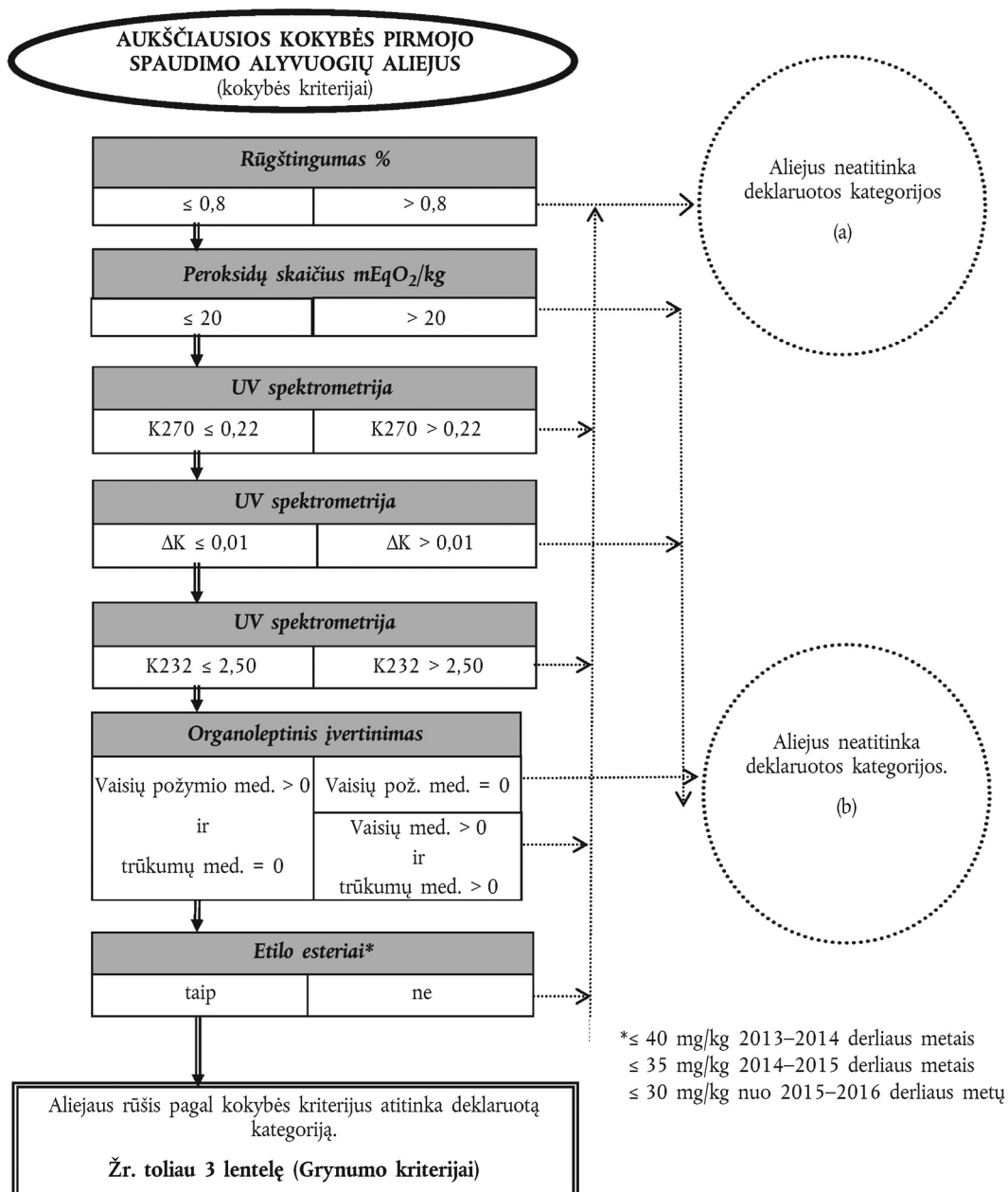
▼ M26

Kiekvienas į pirminį mėginį įtraukiamas ėminys turi būti imamas šalia tos partijos vietos, kurioje paimtas ankstesnis ėminys; būtina įsidėmėti vietą, iš kurios paimtas kiekvienas pirminis mėginys, ir aiškiai ją pažymėti.

Kiekvienas pirminis mėginys turi būti formuojamas 1.1 ir 1.2 punktuose nurodyta tvarka.

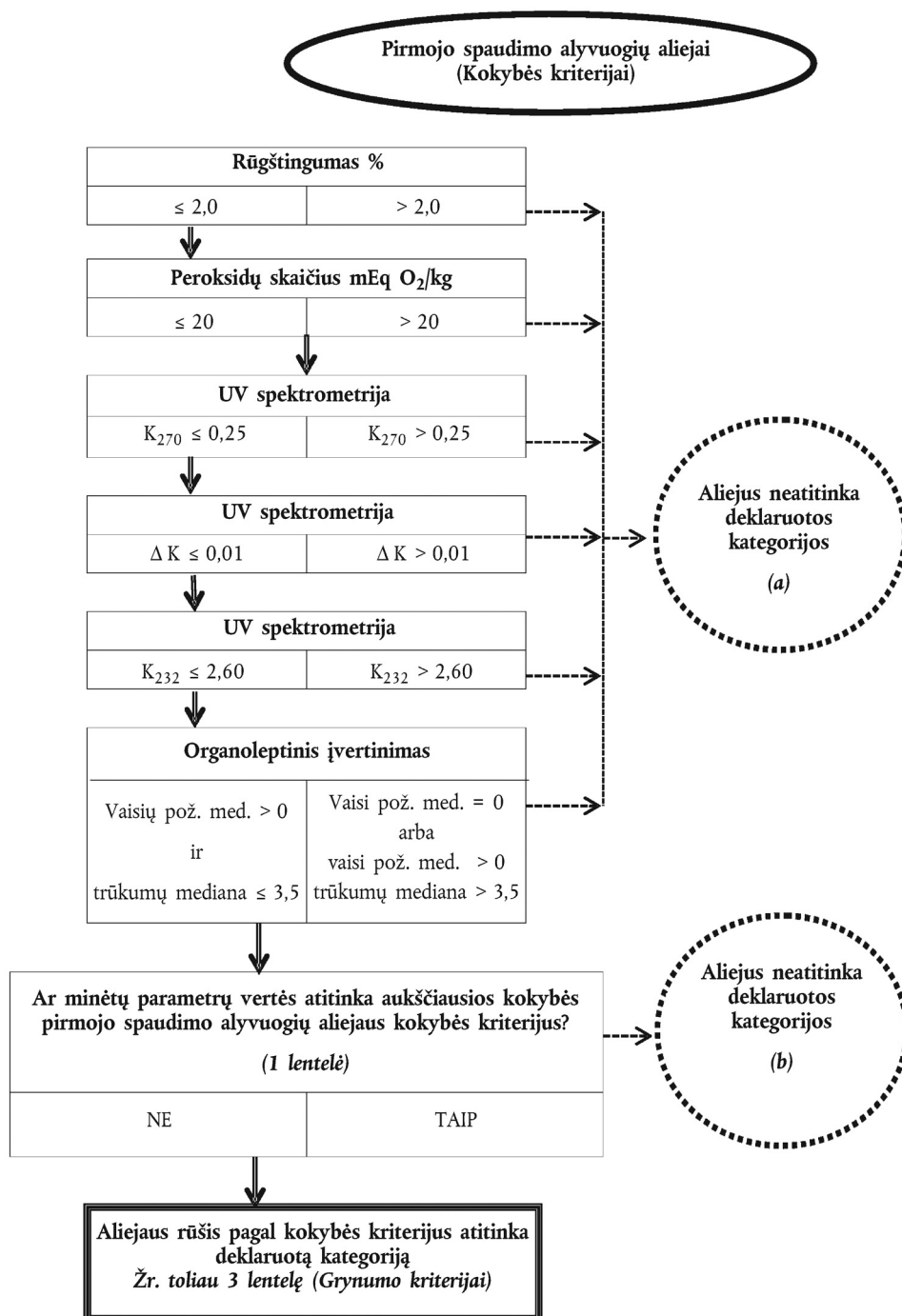
Paskui atliekamos kiekvieno pirminio mėginio analizės, nurodytos 2 straipsnio 1 dalyje.

- 3.2. Jeigu vienas iš bent vieno pirminio mėginio analizių, nurodytų 2 straipsnio 1 dalyje, rezultatų neatitinka deklaruotos aliejaus kategorijos savybių, nederančia pripažįstama visa partija, iš kurios paimti tie mėginiai.

▼ **M26***Ib PRIEDAS***SPRENDIMŲ SCHEMA SIEKiant PATIKRINTI, AR ALYVUOGIŲ ALIEJAUS MĖGINYS ATITINKA DEKLARUOTĄ KATEGORIJĄ***1 lentelė*

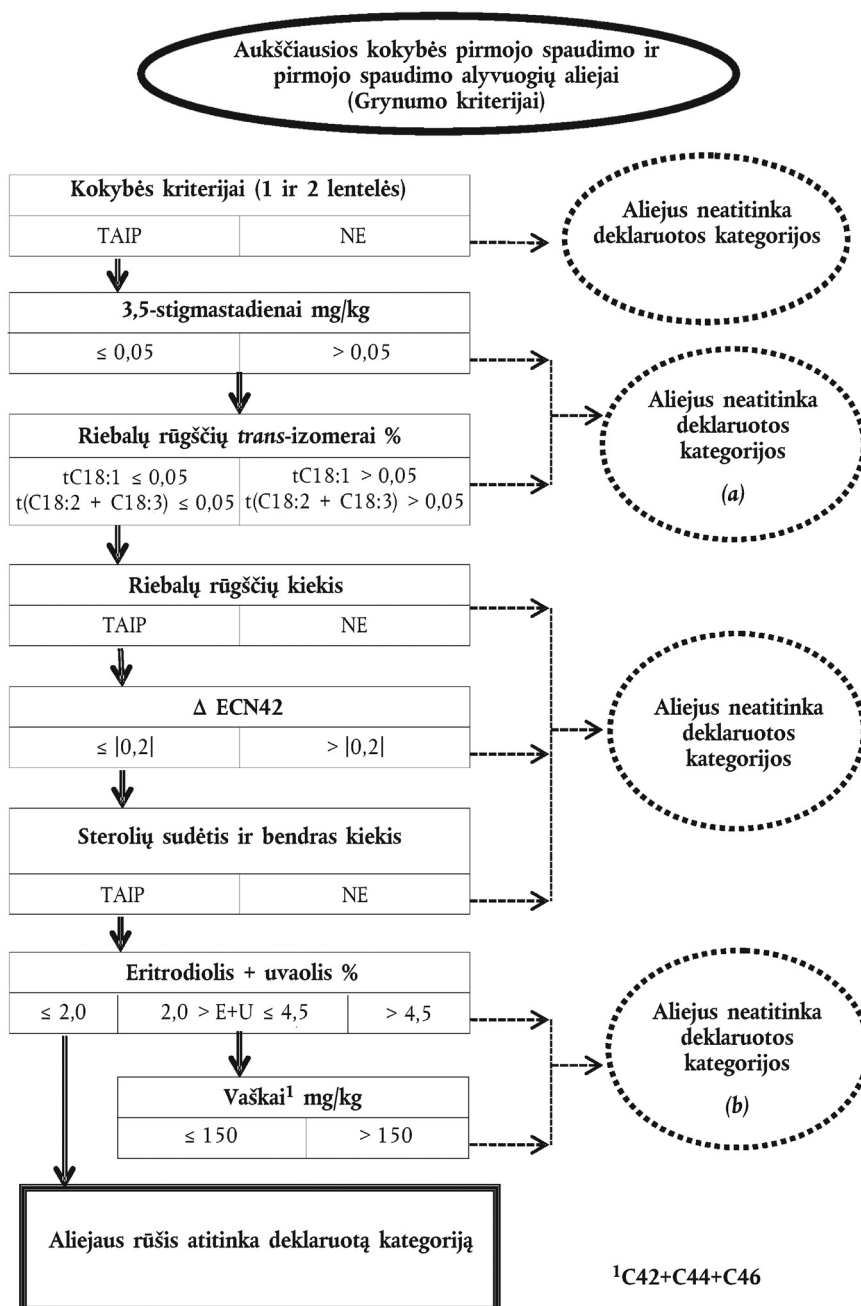
▼ M26

2 lentelė



▼ M26

3 lentelė



▼ **M26***1 priedėlis***Šio reglamento priedų ir sprendimų schemoje nurodytų analizių atitikmenų lentelė**

— Rūgštingumas	II priedas	Laisvųjų riebalų rūgščių kiekio nustatymas šaltuoju metodu
— Peroksidų skaičius	III priedas	Peroksidų skaičiaus nustatymas
— UV spektrometrija	IX priedas	Spektrofotometrinis tyrimas
— Organoleptinis vertinimas	XII priedas	Pirmojo spaudimo alyvuogių aliejaus organoleptinių savybių vertinimas
— Etilo esteriai	XX priedas	Vaškų, riebalų rūgščių metilesterių ir riebalų rūgščių etilo esterių kiekio nustatymo kapiliarinės dujų chromatografijos būdu metodas
— 3,5-stigmastadienai	XVII priedas	Augaliniuose aliejuose esančių stigmastadienų nustatymo metodas
▼ M28		
— Riebalų rūgščių <i>trans</i> -izomerai	X priedas	Riebalų rūgščių metilesterių nustatymas dujų chromatografijos metodu
— Riebalų rūgščių sudėtis	X priedas	Riebalų rūgščių metilesterių nustatymas dujų chromatografijos metodu
▼ M26		
— ΔECN42	XVIII priedas	Trigliceridų sudėties nustatymas su ECN42 (HPLC duomenų ir teorinės sudėties skirtumas)
— Sterolių sudėtis ir bendras kiekis	V priedas	Sterolių ir triterpeno dialkolių sudėties ir kiekio nustatymas kapiliarinės dujų chromatografijos metodu
— Eritrodiolis ir uvaolis		
— Vaškai	IV priedas	Vaškų kiekio nustatymas dujų chromatografijos metodu-kapiliarinėje kolonėlėje
▼ M28		
— Alifatiniai ir triterpenų alkoholiai	XIX priedas	Alifatinių ir triterpenų alkoholių kiekio nustatymas kapiliarinės dujų chromatografijos metodu
▼ M26		
— 2 padėtyje prisotintos riebalų rūgštys	VII priedas	2-glicerilo monopalmitato procentinės dalies nustatymas

▼ **M29***II PRIEDAS***LAISVŲJŲ RIEBALŲ RŪGŠČIŲ KIEKIO NUSTATYMAS ŠALTUOJU METODU****1. TAIKYMO SRITIS**

Šio metodo apraše nurodoma, kaip nustatomas laisvųjų riebalų rūgščių kiekis alyvuogių aliejuje ir alyvuogių išspaudų aliejuje. Laisvųjų rūgščių kiekis išreiškiamas rūgštingumu, apskaičiuojamu kaip oleino rūgšties procentinė dalis.

2. METODO ESMĖ

Ėminys ištirpinamas tirpiklių mišinyje ir esančios laisvosios riebalų rūgštys titruojamos naudojant kalio hidroksido arba natrio hidroksido tirpalą.

3. REAGENTAI

Visi reagentai turi būti pripažintos analiziškai grynų reagentų kokybės, o naudojamas vanduo turi būti distiliuotas arba lygiaverčio grynumo.

3.1. Dietileterio ir 95 % (v/v) etanolio lygių tūrio dalių mišinys.

Prieš pat naudojimą mišinys neutralizuojamas kalio hidroksido tirpalu (3.2) kiekvienam 100 ml mišinio pilant 0,3 ml fenoltaleino tirpalo (3.3).

1 pastaba. Dietileteris yra labai degus ir gali sudaryti sprogius peroksidus. Jį naudojant turi būti imamasi ypatingų atsargumo priemonių.

2 pastaba. Jei negalima naudoti dietiletrio, gali būti naudojamas tirpiklių mišinys, kurio sudėtyje yra etanolio ir tolueno. Prireikus etanolį galima pakeisti 2-propanoliu.

3.2. Kalio hidroksido arba natrio hidroksido titruotas tirpalas etanolyje arba vandenyje, c(KOH) [arba c(NaOH)] apytikriai 0,1 mol/l arba, jei būtina, c(KOH) [arba c(NaOH)] apytikriai 0,5 mol/l. Tirpalų galima ir nusipirkti.

Turi būti žinoma tiksli kalio hidroksido tirpalo (arba natrio hidroksido tirpalo) koncentracija; prieš naudojimą ji patikrinama. Naudokite bent prieš penkias dienas paruoštą ir į rudo stiklo butelį su guminiu kamščiu dekantuoatą tirpalą. Tirpalas turi būti bespalvis arba šiaudų spalvos.

Jei naudojant kalio hidroksido (arba natrio hidroksido) vandeninį tirpalą stebimas fazių atsiskyrimas, vandeninį tirpalą pakeiskite etanolio tirpalu.

3 pastaba. Stabilų bespalvį kalio hidroksido (arba natrio hidroksido) tirpalą galima paruošti taip: į 1 000 ml etanolio arba vandens įdedama 8 g kalio hidroksido (arba natrio hidroksido) ir 0,5 g aliuminio drožlių, užvirinama ir vieną valandą verdama su grįžtamuju kondensatoriumi. Nedelsiant distiliuojama. Distiliate ištirpinamas reikiamas kiekis kalio hidroksido (arba natrio hidroksido). Paliekama kelias dienas stovėti, paskui skaidrus virš kalio karbonato (arba natrio karbonato) nuosėdų esantis tirpalas dekantuojamas.

Tirpalą galima paruošti ir be distiliacijos: į 1 000 ml etanolio (arba vandens) įpilama 4 ml aliuminio butilato ir mišinys paliekamas kelias dienas stovėti. Virš nuosėdų esantis skystis dekantuojamas ir jame ištirpinamas reikiamas kiekis kalio hidroksido (arba natrio hidroksido). Tirpalas paruoštas naudoti.

▼ M29

- 3.3. Fenolftaleino 10 g/l tirpalas 95–96 % (v/v) etanolyje arba šarminio žydriojo 6B ar timolftaleino 20 g/l tirpalas 95–96 % (v/v) etanolyje. Stiprios spalvos aliejams naudojamas šarminis žydrasis arba timolftaleinas.

4. APARATŪRA

Įprasta laboratorinė įranga, įskaitant:

- 4.1. Analizines svarstyklės;
- 4.2. 250 ml talpos kūginę kolbą;
- 4.3. 10 ml A klasės biuretę, sugraduotą po 0,05 ml, arba lygiavertę automatinę biuretę.

5. PROCEDŪRA

5.1. **Analizuojamo ėminio ruošimas**

Jei ėminys yra drumstas, jį reikėtų filtruoti.

5.2. **Analizuojamo ėminio dalis**

Ėminio imama, atsižvelgiant į numatomą rūgštingumą, pagal tokią lentelę:

Numatomas rūgštingumas (oleino rūgšties kiekis g/100g)	Ėminio masė (g)	Svėrimo tikslumas (g)
0–2	10	0,02
> 2–7,5	2,5	0,01
> 7,5	0,5	0,001

Ėminys sveriamas kūginėje kolboje (4.2).

5.3. **Nustatymas**

Ėminys (5.2) ištirpinamas 50–100 ml prieš tai neutralizuoto dietileterio ir etanolio mišinio (3.1).

Titruojama 0,1 mol/l koncentracijos kalio hidroksido (arba natrio hidroksido) tirpalu (3.2) (žr. 4 pastabą) maišant, kol pasikeičia indikatoriaus spalva (spalvoto indikatoriaus spalva nepranyksta bent 10 sekundžių).

4 pastaba. Jei reikiamo kalio hidroksido (arba natrio hidroksido) 0,1 mol/l tirpalo kiekis yra didesnis nei 10 ml, naudojamas 0,5 mol/l tirpalas arba pagal siūlomą lentelę pasirenkama kita ėminio masė atsižvelgiant į numatomą rūgštingumą.

5 pastaba. Jei titruojant tirpalas susidrumsčia, įpilama tiek tirpiklių (3.1), kad tirpalas pasidarytų skaidrus.

Antras nustatymas atliekamas tik jei gautas pirmas rezultatas viršija aliejaus kategorijai nustatytą ribą.

▼ M29

6. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

Rūgštingumas oleino rūgšties masės procentais apskaičiuojamas pagal formulę:

$$V \times c \times \frac{M}{1\,000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

čia:

V = titruoti naudoto kalio hidroksido (arba natrio hidroksido) tirpalo tūris mililitrais;

c = tiksli titruoti naudoto kalio hidroksido (arba natrio hidroksido) tirpalo koncentracija moliais litre;

M = 282 g/mol, molinė masė gramais vienam oleino rūgšties moliui;

m = ėminio masė gramais.

Oleino rūgšties kiekis nurodomas taip:

a) nuo 0 iki 1 imtinai – šimtųjų tikslumu;

b) nuo 1 iki 100 imtinai – dešimtųjų tikslumu.



III PRIEDAS

PEROKSIDŲ SKAIČIAUS NUSTATYMAS

1. TIKSLAS

Šiame standarte aprašytas aliejų ir riebalų peroksidų skaičiaus nustatymo metodas.

2. TAIKYMOSRITIS

Šis standartas taikytinas gyvuliniais ir augaliniais aliejams ir riebalams.

3. APIBRĖŽIMAS

Medžiagų, kurios aprašytomis bandymo sąlygomis oksiduoja kalio jodidą, kiekis, skaičiuojamas aktyvaus deguonies miliekivalentais kilogramui bandinio, vadinamas peroksidų skaičiumi.

4. METODOESMĖ

Acto rūgšties ir chloroformo mišinyje ištirpinta analizuojamo bandinio dalis veikiama kalio jodido tirpalu. Išsiskyręs jodas titruojamas etaloniniu natrio tiosulfato tirpalu.

5. APARATŪRA

Visoje naudojamoje įrangoje neturi būti oksiduojančių arba redukuojančių medžiagų.

Pastaba. Šlifo sujungimai netepami.

5.1. 3 ml talpos stiklinė bertuvėlė.

5.2. Maždaug 250 ml talpos kolbos su šlifo kaklais ir kamščiais iš anksto išdžiovintos ir užpildytos švariomis, sausomis inertinėmis dujomis (azotu arba geriau anglies dioksidu).

5.3. 25 arba 50 ml biuretė, sugraduota 0,1 ml padalomis.

6. REAGENTAI

6.1. Chloroformas, analiziškai grynas, išvalytas nuo deguonies, barbotuojant per jį švarių ir sausų inertinių dujų srovę.

6.2. Ledinė (atšaldyta) acto rūgštis, analiziškai gryna, išvalyta nuo deguonies, barbotuojant per ją švarių ir sausų inertinių dujų srovę.

6.3. Kalio jodidas, neseniai paruoštas prisotintas vandeninis tirpalas, be jodo ir jodatų.

6.4. Natrio tiosulfatas, tiksliai etalonuotas 0,01 arba 0,002 mol/l vandeninis tirpalas. Titrų nustatomas prieš pat naudojimą.

6.5. Krakmolo tirpalas, 10 g/l dispersija vandenyje, neseniai paruoštas iš natūralaus tirpaus krakmolo.

7. BANDINYS

Reikia žiūrėti, kad bandinys būtų imamas ir laikomas neapšviestoje šaltoje vietoje, visiškai užpildytame stikliniame inde, hermetiškai užkimštame šlifo arba kamščiamedžio kamščiais.

▼ B**8. DARBO EIGA**

Analizė turi būti atliekama išsklaidytoje dienos šviesoje arba esant dirbtiniam apšvietimui. Stiklinėje bertuvėlėje (5.1) arba, jos neturint, kolboje (5.2) 0,001 g tikslumu pasverama bandinio masė, kuri pasirenkama iš lentelės duomenų, atsižvelgiant į numatomą peroksidų skaičių:

Laukiamas peroksidų skaičius (mekv.)	Analizuojamos bandinio dalies masė (g)
0–12	5,0–2,0
12–20	2,0–1,2
20–30	1,2–0,8
30–50	0,8–0,5
50–90	0,5–0,3

Kolba (5.2) atkemšama ir į ją įdedama stiklinė bertuvėlė su bandiniu. Įpilama 10 ml chloroformo (6.1). Bandinys greitai ištirpinamas maišant. Įpilama 15 ml ledinės acto rūgšties (6.2) ir paskui 1 ml kalio jodido tirpalo (6.3). Kolba greitai užkemšama, kratoma vieną minutę ir lygiai penkias minutes paliekama stovėti neapšviestoje vietoje, 15–25 °C temperatūroje.

Įpilama maždaug 75 ml distiliuoto vandens. Išsiskyręs jodas titruojamas natrio tiosulfato tirpalu (6.4) (0,002 mol/l, jei manoma, kad peroksidų skaičius yra mažesnis kaip 12, ir 0,01 mol/l, jei numatomos vertės yra didesnės kaip 12), stipriai kratant. Indikatoriumi naudojamas krakmolo tirpalas (6.5).

Tam pačiam analizuojamam bandiniui atliekami du nustatymai.

Tuo pačiu metu atliekamas tuščiasis bandymas. Jei tuščiojo bandymo rezultatas didesnis kaip 0,05 ml 0,01 mol/l natrio tiosulfato tirpalo (6.4), negryni reagentai pakeičiami.

9. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

Peroksidų skaičius (PS), skaičiuojant aktyvaus deguonies miliekvivalentais kilogramui, nustatomas pagal formulę:

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

kurioje:

V = nustatymui sunaudoto etaloninio natrio tiosulfato tirpalo (6.4) tūris, pataisytas pagal tuščiojo bandymo rezultatą, ml;

T = tiksli naudoto natrio tiosulfato tirpalo (6.4) molinė koncentracija;

m = analizuojamos bandinio dalies masė, g.

Rezultatas skaičiuojamas kaip dviejų nustatymų aritmetinis vidurkis.

▼ **M21***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 tirinama 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. Chromatografo 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 stiprintuvams.

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 ± 0,1 mg.

3.9. Įprasti laboratoriniai stikliniai indai.

4. REAGENTAI

4.1. Silikagelis, kurio granulių dydis 60–200 μm.

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.

▼ **M21**

- 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.). Priemonės 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 pridedamas 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 ± 4 °C, temperatūroje.

Pastabos: — n-heksano/etileterio mišinys (99:1) turi būti ruošiamas kasdien.

— Siekiant vizualiai sekti, ar vaškai tinkamai išplaunami, į skystą mėginio išplovimo mišinį galima įpilti 100 µl 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 vaškai 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 savi-rašio veikimas ir t. t.).

▼ **M21**

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 80 °C (1')	→	240 °C	→	325 °C (6')	→	340 °C (10')

— detektoriaus temperatūra: 350 °C,

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

— nešančiosios dujos: helis arba vandenilis, naudojamas pasirinktomis 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 C₃₂ 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 įsiurbiamas 1 µl mėginio tirpalo; stūmoklis traukiamas, kol adata ištuštėja. Adata įkišama į įpurškimo įtaisą ir po vienos-dviejų sekundžių tirpalas greitai įšvirkščiamas. Maždaug po penkių sekundžių adata lėtai ištraukiama.

Užrašinėjama, kol vaškai visiškai išplaunami.

▼ **M21**

Bazinė linija turi visuomet atitikti nustatytas sąlygas.

5.4. **Smailių identifikavimas**

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

Gryno alyvuogių aliejaus vašų chromatograma parodyta paveiksle.

5.5. **Kiekybinis vertinimas**

Integratoriumi išmatuojami vidinio etalono ir C₄₀–C₄₆ alifatinių esterių smailių plotai.

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

$$\text{esteris, mg/kg} = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m}$$

kurioje:

A_x = kiekvieno esterio smailės plotas, kvadratiniais milimetrais

A_s = kiekvieno vidinio etalono esterio smailės plotas, kvadratiniais milimetrais

m_s = pridėto vidinio etalono masė, miligramais

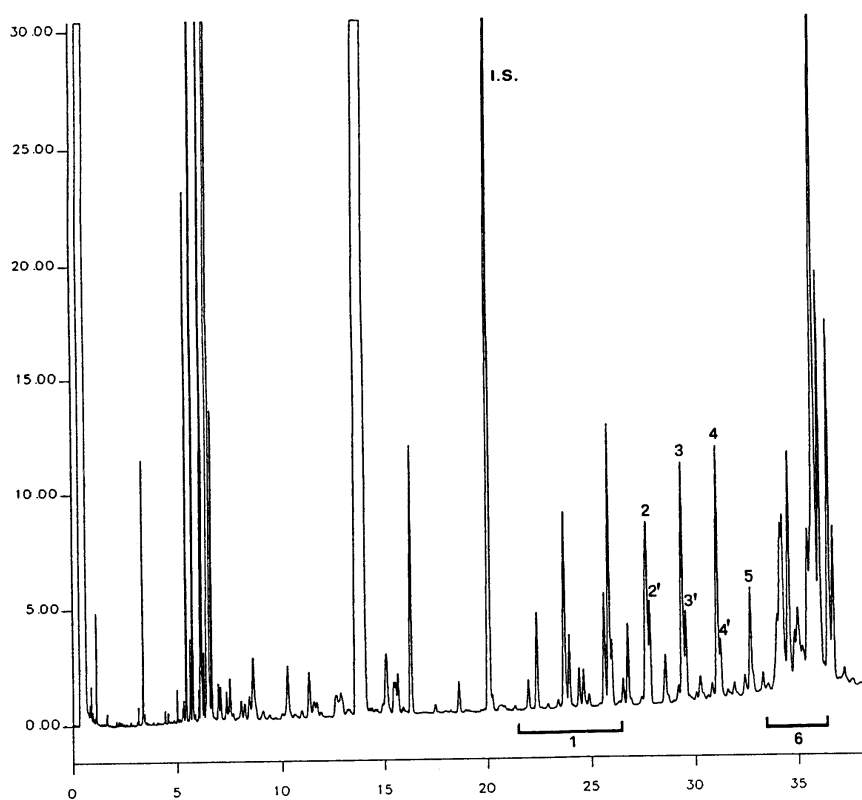
m = tyrimui paimto mėginio masė, gramais.

6. **REZULTATŲ PATEIKIMAS**

Pateikiami atskirų C₄₀–C₄₆ vašų kiekiai ir šių kiekių suma, mg/kg riebalų (ppm).

Pastaba. Vašų sudedamųjų dalių kiekiai nustatomi remiantis alyvuogių aliejaus chromatogramos esterių porinių anglių skaičiaus smailių C₄₀–C₄₆ pavyzdžiu, pateiktu paveiksle. Jei C₄₆ esteris matomas du kartus, jam identifikuoti rekomenduojama analizuoti maišytą alyvuogių išspaudų aliejų, kuriame C₄₆ lengvai nustatomas, nes šiame aliejuje jo yra daugiausia.

Rezultatai pateikiami vieno ženklo po kablelio (dešimtųjų) tikslumu.

▼ **M21***Paveikslas***Alyvuogių aliejaus vaškų chromatograma ⁽¹⁾***Paaiškinimas:*

I.S. = Laurileikozanatas

1. = Diterpeniniai esteriai

2 + 2' = Esteris C₄₀3 + 3' = Esteris C₄₂4 + 4' = Esteris C₄₄5. = Esteris C₄₆

6. = Steroliniai esteriai ir triterpeninis alkoholis

⁽¹⁾ Atlikus sterolinių esterių išplovimą, chromatografinėje linijoje ryškių smailių (trigliceridų) neturi būti.

▼ M21*Priedėlis***Dujų linijinio greičio nustatymas**

Į dujų chromatografą, nustatytą normalioms darbo sąlygoms, įpurškiama 1–3 μl 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.

▼ **M26***V PRIEDAS***STEROLIŲ IR TRITERPENO DIALKOHOLIŲ SUDĖTIES IR KIEKIO
NUSTATYMAS KAPILIARINĖS DUJŲ CHROMATOGRAFIJOS
METODU****1. TAIKYMO SRITIS**

Šiame metode aprašomas atskirų sterolių ir triterpeno dialkolių ir bendro jų kiekio alyvuogių ir alyvuogių išspaudų aliejuose nustatymo būdas.

2. METODO ESMĖ

Aliejus, įdėjus α -cholestanolio kaip vidinio etalono, muilinamas kalio hidroksido tirpalu etanolyje, o nemuilinama medžiaga ekstrahuojama etileteriu.

Sterolių ir triterpeno dialkolių frakcija išskiriama iš nemuilinos medžiagos ant šarmu impregnuotos silikagelio plokštelės plonasluoksnės chromatografijos būdu. Iš silikagelio regeneruotos frakcijos paverčiamos trimetilsilileteriais ir analizuojamos kapiliarinės dujų chromatografijos metodu.

3. ĮRANGA

Įprasta laboratorinė įranga, visų pirma:

- 3.1. 250 ml talpos kolba su grįžtamuoju kondensatoriumi, turinčiu šlifo sujungimus.
- 3.2. 500 ml talpos dalijamasis piltuvas.
- 3.3. 250 ml talpos kolbos.
- 3.4. Visa įranga plonasluoksnei chromatografiniai analizei atlikti naudojant 20×20 cm matmenų stiklines plokšteles.
- 3.5. Ultravioletinė 254 arba 366 nm ilgio šviesos bangų lempa.
- 3.6. Mikrošvirkštai 100 μ l ir 500 μ l tūriams imti.
- 3.7. G3 aktyumo cilindro formos filtras (15–40 μ m aktyumas), maždaug 2 cm skersmens ir 5 cm aukščio, tinkamas vakuuminiam filtravimui su šlifo mova.
- 3.8. 50 ml talpos vakuuminė kūgio formos kolba su šlifo įmova filtrui (3.7 punktas) prijungti.
- 3.9. 10 ml talpos mėgintuvėlis su kūginiu dugnu ir stiklo kamščiu.
- 3.10. Darbai su kapiliarine kolonėle tinkamas dujų chromatografas su dozavimo mėginio įpurškimo sistema, kurį sudaro:
 - 3.10.1. termostatuojama kamera norimai temperatūrai kolonėlėse palaikyti ± 1 °C tikslumu;
 - 3.10.2. reguliuojamos temperatūros įpurškimo įrenginys su polisiloksanu dengtu garinimo elementu ir dozavimo sistema;
 - 3.10.3. liepsnos jonizacinis detektorius (FID);
 - 3.10.4. duomenų rinkimo sistema, tinkama naudoti su FID detektoriumi (3.10.3 punktas) ir pritaikyta rankiniam integravimui.
- 3.11. Lydyto kvarco 20–30 m ilgio kapiliarinė kolonėlė, kurios vidinis skersmuo 0,25–0,32 mm, padengta vienodo 0,10–0,30 μ m storio 5% difenilo – 95% dimetilpolisiloksano (SE-52 arba SE-54 nejudančiosios fazės arba ją atitinkančia plėvele) sluoksniu.

▼ **M26**

- 3.12. 10 µl talpos mikrošvirkštas dujų chromatografijai su kietinta adata, tinkama dozuojamajam įpurškimui.
- 3.13. Kalcio dichlorido eksikatorius.
4. REAGENTAI
- 4.1. Kalio hidroksidas, mažiausias titras – 85%.
- 4.2. Kalio hidroksido tirpalas etanolyje, maždaug 2 N.

130 g kalio hidroksido (4.1 punktas) ištirpinama šaldant 200 ml distiliuoto vandens ir paskui praskiedžiama etanolio (4.10 punktas) iki 1 litro. Tirpalas turi būti laikomas gerai užkimštuose tamsaus stiklo buteliuose ir saugomas ne ilgiau kaip dvi dienas.
- 4.3. Etileteris, analizei tinkamos kokybės.
- 4.4. Kalio hidroksido tirpalas etanolyje, maždaug 0,2 N.

13 g kalio hidroksido (4.1 punktas) ištirpinama 20 ml distiliuoto vandens ir praskiedžiama etanolio (4.10 punktas) iki 1 litro.
- 4.5. Bevandenis natrio sulfatas, analizei tinkamos kokybės.
- 4.6. Fluorescencijos indikatoriumi neužteršto silikagelio 0,25 mm sluoksniu dengtos stiklinės plokštelės (20 × 20 cm) (galima pirkti paruoštų naudoti plokštelių).
- 4.7. Toluenas, chromatografijai tinkamos kokybės.
- 4.8. Acetonas, chromatografijai tinkamos kokybės.
- 4.9. n-heksanas, chromatografijai tinkamos kokybės.
- 4.10. Etileteris, chromatografijai tinkamos kokybės.
- 4.11. Analizei tinkamos kokybės etanolis.
- 4.12. Analizei tinkamos kokybės etilacetatas.
- 4.13. Etaloninis tirpalas plonasluoksnei chromatografijai: cholesterolis arba fitosteroliai, taip pat eritrodolio 5% tirpalas etilacetate (4.11 punktas).
- 4.14. 0,2% 2,7-dichlorfluoresceino tirpalas etanolyje. Jis truputį pašarminamas įlašinant kelis lašus 2 N kalio hidroksido tirpalo alkoholyje (4.2 punktas).
- 4.15. Bevandenis piridinas, chromatografijai tinkamos kokybės (žr. 5 pastabą).
- 4.16. Analizei tinkamos kokybės heksametilidisilazanas.
- 4.17. Analizei tinkamos kokybės trimetilchlorsilanas.
- 4.18. Sterolių trimetilsilileterių mėginio tirpalai.

Ruošiami prieš pat juos naudojant iš sterolių ir eritrodolio, gauto iš šių medžiagų turinčių aliejų.
- 4.19. α-cholestanolis, didesnio nei 99% grynumo (grynumas turi būti patikrintas dujų chromatografijos analizės būdu).
- 4.20. α-cholestanolio vidinio etalono tirpalas, 0,2% tirpalas (m/V) etilacetate (4.11 punktas).
- 4.21. Fenoltaleino tirpalas, 10 g/l etanolyje (4.10 punktas).
- 4.22. Dujos nešikliai: vandenilis arba helis, dujų chromatografijai tinkamo grynumo.
- 4.23. Pagalbinės dujos: vandenilis, helis, azotas ir oras, dujų chromatografijai tinkamo grynumo.

▼ **M26**

4.24. n-heksano (4.9 punktas) ir etileterio (4.10 punktas) mišinys santykiu 65:35 (V/V).

4.25. Sililinio reagentas, kurį sudaro piridino, heksametildisilazano ir trimetilchlorsilano mišinys santykiu 9:3:1 (V/V/V).

5. DARBO EIGA

5.1. Nemuilinamų medžiagų gavimas.

5.1.1. Į 250 ml talpos kolbą (3.1 punktas) 500 µl mikrošvirkštu (3.6 punktas) įšvirkščiamas toks α-cholestanolio vidinio etalono tirpalo (4.20 punktas) kiekis, kuriame cholestanolio kiekis atitiktų maždaug 10% mėginio sterolių kiekio. Pavyzdžiui, į 5 g alyvuogių aliejaus mėginį įpilama 500 µl α-cholestanolio tirpalo (4.20 punktas), o į alyvuogių išspaudų aliejaus mėginį – 1 500 µl. Tirpalas naudojant silpną azoto srovę šilto vandens vonelėje išgarinamas iki sauso likučio, atvėsinus kolbą, į tą pačią kolbą pasveriamas $5 \pm 0,01$ g sauso filtruoto mėginio.

1 pastaba. Gyvulinės kilmės arba augaliniai aliejai ir riebalai, kuriuose yra nemaži kiekiai cholesterolio, chromatogramoje gali turėti smailę, kurios sulaikymo trukmė panaši į cholestanolio. Tokiu atveju sterolių frakcija turi būti analizuojama du kartus – su vidiniu etalonu ir be jo.

5.1.2. Į kolbą įpilama 50 ml 2 N kalio hidroksido tirpalo etanolyje (4.2 punktas) ir įdedama šiek tiek pemzos, prijungiamas grįžtamasis kondensatorius ir kolba šildoma iki nestipraus virimo, kol įvyksta muilinimas (tirpalas pasidaro skaidrus). Šildoma dar 20 minučių, paskui per kondensatoriaus viršų įpilama 50 ml distiliuoto vandens, kondensatorius atjungiamas ir kolba ataušinama iki maždaug 30 °C.

5.1.3. Kolbos turinys naudojant kelias distiliuoto vandens porcijas (50 ml) kiekybiškai supilamas į 500 ml dalijamąjį piltuvą (3.2 punktas). Įpilama maždaug 80 ml etileterio (4.10 punktas), turinys stipriai plakamas maždaug 60 sekundžių periodiškai sumažinant slėgį apverčiant dalijamąjį piltuvą ir atidarant čiaupą. Paskui kolba paliekama stovėti, kol turinys visiškai išsisluoksniuoja į dvi fazes (2 pastaba).

Paskui kuo didesnis muilo tirpalo kiekis išleidžiamas į antrąjį dalijamąjį piltuvą. Vandens ir alkoholio fazė tuo pačiu būdu ekstrahuojama dar du kartus, kiekvieną kartą sunaudojant 60–70 ml etileterio (4.10 punktas).

2 pastaba. Bet kokia susidariusi emulsija gali būti panaikinta įpilant nedidelį kiekį etanolio (4.11 punktas).

5.1.4. Trys eteriniai ekstraktai supilami į vieną dalijamąjį piltuvą, kuriame yra 50 ml vandens. Mišinys plaunamas vandeniu (50 ml), kol plovimo vanduo, įlašinus fenolfaleino tirpalo (4.21 punktas) lašą, nebeusidažo rožine spalva.

Atskyrus plovimo vandenį, ekstraktas per bevandenį natrio sulfatą (4.5 punktas) filtruojamas į prieš tai pasvertą 250 ml kolbą, piltuvą ir filtrą nuplaunant nedideliu kiekiu etileterio (4.10 punktas).

5.1.5. Tirpiklis distiliuojant vakuume išgarinamas sukamuoju garintuvu 30 °C temperatūroje. Įpilama 5 ml acetono ir lakus tirpiklis visiškai pašalinamas silpnoje oro srovėje. Likutis 15 minučių džiovinamas krosnyje 103 ± 2 °C temperatūroje. Paskui likutis ataušinamas eksikatoriuose ir pasveriamas 0,1 mg tikslumu.

▼ **M26**

5.2. Sterolių ir triterpeno dialkoholių frakcijos (eritrodolis + uvaolis) atskyrimas

5.2.1. Ruošiamos bazinės plonasluoksnės chromatografijos plokštelės. Silikageliu dengtos plokštelės (4.6 punktas) 10 sekundžių maždaug 4 cm įmerkiamos į 0,2 N kalio hidroksido tirpalą etanolyje (4.5 punktas), paskui paliekamos dvi valandas džiūti traukos spintoje ir galiausiai vieną valandą laikomos krosnyje 100 °C temperatūroje.

Plokštelės išimamos iš krosnies ir laikomos eksikatoriuje su kalcio chloridu (3.13 punktas), kol jų pririekia (taip apdorotos plokštelės turi būti panaudotos per 15 dienų).

3 pastaba. Kai sterolių frakcijai atskirti naudojamos bazinės silikagelio plokštelės, nemuilingos frakcijos nebūtina apdoroti aliuminio oksidu. Taip visi rūgštinio pobūdžio junginiai (riebalų rūgštys ir kiti) sulaikomi užlašinimo linijoje ir sterolių juosta aiškiai atsiskiria nuo alifatinių ir triterpeno alkoholių juostos.

5.2.2. Į ryškinimo indą maždaug 1 cm storio sluoksniu įpilama heksano ir etileterio mišinio (4.24 punktas) (4 pastaba). Indas uždaromas tinkamu dangčiu ir paliekamas vėsioje vietoje ne mažiau kaip pusvalandžiui, kad nusistovėtų garų ir skysčio pusiausvyra. Ant vidinių indo sienelių gali būti uždedamos filtro popieriaus juostelės, įmerktos į eliuentą. Taip maždaug trečdaliu sutrumpinama ryškinimo trukmė, o komponentai išplaunami vienodžiau ir pastoviau.

4 pastaba. Visiškai pakartojamoms išplovimo sąlygoms užtikrinti ryškinimo tirpalą reikia pakeisti kiekvienai analizei; kaip alternatyvus tirpiklis gali būti naudojamas n-heksano ir etileterio mišinys, kurio tūrių santykis 50:50.

5.2.3. Ruošiamas maždaug 5% nemuilingų medžiagų (5.1.5 punktas) tirpalas etilacetate (4.12 punktas) ir 0,3 ml šio tirpalo 100 µl talpos mikrošvirkštu vienoda siaura juoste užlašinama ant apatinio chromatografinės plokštelės (5.2.1 punktas) galo (2 cm nuo apačios). Vienoje linijoje su šia juoste užlašinama 2–3 µl medžiagos etaloninio tirpalo (4.13 punktas) sterolių ir triterpeno dialkoholių juostai identifikuoti užbaigus ryškinimą.

5.2.4. Plokštelė dedama į ryškinimo indą, paruoštą kaip nurodyta 5.2.2 punkte. Turėtų būti palaikoma 15–20 °C aplinkos temperatūra (5 pastaba). Indas iš karto uždengiamas ir plaunama, kol tirpiklio frontas atsiduria maždaug 1 cm atstumu nuo plokštelės viršutinio krašto. Plokštelė išimama iš ryškinimo indo ir tirpiklis išgarinamas karšto oro srovėje arba plokštelė trumpam paliekama traukos spintoje.

5 pastaba. Aukštesnė temperatūra gali pasunkinti atskyrimą.

5.2.5. Plokštelė plonai ir vienodai apipurškiama 2,7-dichlorfluoresceino tirpalu (4.14 punktas) ir paliekama išdžiūti. Žiūrint į plokštelę ultravioletinėje šviesoje, sterolių ir triterpeno dialkoholių juostos gali būti atpažintos pagal buvimą viename lygyje su etaloninio tirpalo (4.13 punktas) dėmėmis. Juostų ribos pagal fluorescuojančius kraštus pažymimos juodu pieštuku (žr. 3 brėžinį, kuriame vaizduojama plonasluoksnės chromatografijos plokštelė).

5.2.6. Silikagelis pažymėtame plote nugrandomas metaline mentele. Gerai susmulkinta medžiaga nuo plokštelės supilama į filtrą (3.7 punktas). Įpilama 10 ml karšto etilacetato (4.12 punktas), gerai sumaišoma metaline mentele ir vakuume filtruojama į kūgio formos kolbą (3.8 punktas), prijungtą prie filtro.

▼ **M26**

Likutis kolboje tris kartus plaunamas etileteriu (4.3 punktas) (maždaug po 10 ml kiekvieną kartą), filtruojant į tą pačią prie filtro prijungtą kolbą; filtratas nugarinamas iki maždaug 4–5 ml tūrio, likęs tirpalas supilamas į 10 ml talpos mėgintuvėlį (3.9 punktas), kuris prieš tai pasveriamas; mėgintuvėlio turinys džiovinamas nestipriai kaitinant nedidelėje azoto srovėje, iš naujo tirpinamas keliuose acetono (4.8 punktas) lašuose ir vėl džiovinamas.

Likutį mėgintuvėlyje turi sudaryti sterolių ir triterpeno dialkoholių frakcijos.

5.3. Trimetilsilileterių ruošimas

- 5.3.1. Į mėgintuvėlį su sterolių ir triterpenų frakcija, vengiant bet kokio drėgmės patekimo (7 pastaba), įpilama sililinio reagento (4.25 punktas) (6 pastaba), kurio imama po 50 µl vienam sterolių ir triterpeno dialkoholių miligramui.

6 pastaba. Galima pirkti paruoštų naudoti tirpalų. Be to, galima pirkti ir kitų sililinio reagentų, pvz., N,O-bis(trimetilsilil)trifluoracetamido + 1% trimetilchlorsilano mišinį, kuris turi būti praskiestas tokio pat tūrio sausu piridinu.

Piridiną galima pakeisti tokio pat acetonitrilo kiekiu.

- 5.3.2. Mėgintuvėlis užkemšamas ir atsargiai kratomas (neapverčiant), kol junginiai visiškai ištirpsta. Po to jis bent 15 minučių paliekamas stovėti aplinkos temperatūroje ir paskui kelias minutes centrifuguojamas. Skaidrus tirpalas paruoštas dujų chromatografinėi analizei.

7 pastaba. Nedidelė opalescencija yra įprastas reiškinys ir nesukelia jokių anomalijų. Baltų dribsnių susidarymas ar rožinė spalva yra drėgmės patekimo arba reagento sugedimo požymiai. Šiuo atveju bandymas turi būti pakartotas (tik jei naudojamas heksametildisilazano ir trimetilchlorsilano mišinys).

5.4. Dujų chromatografinė analizė.

- 5.4.1. Parengiamieji darbai ir kapiliarinės kolonėlės kondicionavimas.

- 5.4.1.1. Kolonėlė (3.11 punktas) prijungiama prie dujų chromatografo, kolonėlės įėjimą sujungiant su dozuojamuoju injektoriumi, o išėjimą – su detektoriumi.

Atliekamas bendras dujų chromatografavimo įrenginio patikrinimas (nutekėjimai dujų sistemoje, detektoriaus, dozavimo sistemos ir savi-rašio veikimas ir t. t.).

- 5.4.1.2. Pirmą kartą naudojamą kapiliarinę kolonėlę rekomenduojama kondicionuoti: per kolonėlę paleidžiama nestipri dujų srovė, paskui įjungiamas chromatografas ir pradedamas laipsniškas kaitinimas, kol temperatūra pakyla bent 20 °C aukščiau, nei naudojama darbe (8 pastaba). Šioje temperatūroje kolonėlė laikoma ne mažiau kaip dvi valandas, vėliau visas įrenginys nustatomas darbo režimu (reguliuojamas dujų srautas ir dozavimas, uždegama ugnis, prijungiama skaičiavimo sistema, reguliuojama kolonėlės, detektoriaus ir injektoriaus temperatūra ir t. t.) ir užrašomas signalas bent du kartus didesniu jautrumu, nei bus naudojamas analizei atlikti. Pagrindo linija turi būti brėžiama tiesi, be jokių smailių ir dreifo požymių.

▼ **M26**

Neigiamas tiesinis dreifas yra kolonėlės sujungimų nesandarumo požymis, o teigiamas dreifas rodo nepakankamą kolonėlės kondicionavimą.

8 pastaba. Kondicionavimo temperatūra visuomet turi būti bent 20 °C mažesnė, nei naudojamai nejudančiajai fazei nustatyta didžiausia temperatūra.

5.4.2. Darbo sąlygų parinkimas

5.4.2.1. Darbo sąlygos:

- kolonėlės temperatūra: 260 ± 5 °C;
- injektoriaus temperatūra: 280–300 °C;
- detektoriaus temperatūra: 280–300 °C;
- dujų nešiklio linijinis greitis: helio – 20–35 cm/s; vandenilio – 30–50 cm/s;
- padalijimo santykis: nuo 1:50 iki 1:100;
- prietaiso jautrumas: 4–16 kartų didesnis nei minimalus silpninimas;
- užrašymo jautrumas: 1–2 mV per visą skalę;
- įpurkštos medžiagos kiekis: 0,5–1 µl TMSE tirpalo.

Šios sąlygos gali būti keičiamos pagal kolonėlės ir dujų chromatografo savybes, kad būtų gautos chromatogramos, atitinkančios tokias sąlygas:

- β-sitosterolio smailės sulaikymo trukmė turėtų būti 20 ± 5 minutės;
- kampesterolio smailės aukštis turėtų būti: alyvuogių aliejui (vidutinis kiekis 3%) $20 \pm 5\%$ visos skalės aukščio; sojos pupelių aliejui (vidutinis kiekis 20%) $80 \pm 10\%$ visos skalės aukščio;
- visi esantys steroliai turi būti atskirti. Be to, smailės turi būti visiškai atsiskyrusios, t. y. smailės trajektorija turėtų sugrįžti iki pagrindo linijos, kol prasideda kilimas atsiradus naujai smailei. Tačiau neviseiškas atsiskyrimas leidžiamas, jei smailės su santykinė sulaikymo trukme 1,02 plotas (sitostanolis) gali būti apskaičiuotas naudojant statmenį.

5.4.3. Analizė

5.4.3.1. 10 µl talpos mikrošvirkštu įsiurbiami 1 µl heksano, paskui įtraukiama 0,5 µl oro ir 0,5–1 µl mėginio tirpalo. Mikrošvirkšto plunžeris pakeičiamas aukštyn, kad adata ištuštėtų. Adata įkišama per injektoriaus membraną ir po vienos dviejų sekundžių tirpalas greitai įšvirkščiamas, paskui po kokių penkių sekundžių adata lėtai ištraukiama.

Taip pat gali būti naudojamas automatinis injektorius.

5.4.3.2. Užrašymas atliekamas, kol bus visiškai išplauti esančių triterpeno dialkoholių TMSE. Pagrindo linija turi visą laiką atitikti reikalavimus (5.4.1.2 punktas).

5.4.4. Smailių identifikavimas

Atskiros smailės identifikuojamos pagal sulaikymo trukmes ir lyginant su sterolių ir triterpeno dialkoholių TMSE mišiniu, analizuojamu tokiais pat sąlygomis (žr. priedėlį).

▼ **M26**

Steroliai ir triterpeno dialkoholiai išplaunami tokia eilės tvarka: cholesterolis, brakasterolis, ergosterolis, 24-metilencholesterolis, kampesterolis, kampestanolis, stigmasterolis, $\Delta 7$ -kampesterolis, $\Delta 5,23$ -stigmastadienolis, klerosterolis, β -sitosterolis, sitostanolis, $\Delta 5$ -avenasterolis, $\Delta 5,24$ -stigmastadienolis, $\Delta 7$ -stigmastenolis, $\Delta 7$ -avenasterolis, eritrodiolis ir uvaolis.

β -sitosterolio sulaikymo trukmės SE-52 ir SE-54 kolonėlėse parodytos 1 lentelėje.

1 ir 2 brėžiniuose vaizduojamos tipiškos kai kurių aliejų chromatogramos.

5.4.5. Kiekybinis vertinimas

5.4.5.1. Naudojant skaičiavimo sistemą apskaičiuojami α -cholestanolio ir sterolių bei triterpeno dialkolių smailių plotai. Į 1 lentelėje nurodytų junginių smailės neatsižvelgiama (ergosterolio smailės plotas neturi būti skaičiuojamas). α -cholestanolio kalibravimo koeficientas turėtų būti laikomas lygiu 1.

5.4.5.2. Kiekvieno atskiro sterolio kiekis, skaičiuojant miligramais 1 kg riebalinės medžiagos, nustatomas pagal tokią formulę:

$$\text{sterolio x kiekis} = \frac{A_x \times m_s \times 1\,000}{A_s \times m}$$

čia:

A_x = x sterolio smailės plotas kompiuterinėje sistemoje naudojamais vienetais;

A_s = α -cholestanolio smailės plotas kompiuterinėje sistemoje naudojamais vienetais;

m_s = įdėto α -cholestanolio masė miligramais;

m = nustatymui paimto mėginio masė gramais.

6. REZULTATŲ PATEIKIMAS

6.1. Užrašomos atskirų sterolių koncentracijos miligramais 1 kg riebalinės medžiagos ir jų bendro kiekio vertė.

Kiekvieno atskiro sterolio, eritrodiolio ir uvaolio kiekis turėtų būti nurodomas vienos dešimtosios tikslumu.

Bendras sterolių kiekis turi būti išreiškiamas nenurodant jokių ženklų po kablelio.

▼ **M28**

6.2. Kiekvieno atskiro sterolio procentinė dalis apskaičiuojama pagal atitinkamo sterolio smailės ploto ir visų sterolių smailių plotų sumos santykį:

$$\text{sterol}_x = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

čia:

A_x – x smailės plotas;

$\sum A$ – visų sterolių smailių plotų suma.

▼ **M26**

6.3. Tariamasis β -sitosterolis: $\Delta 5$ -23-stigmastadienolis + klerosterolis + β -sitosterolis + sitostanolis + $\Delta 5$ -avenasterolis + $\Delta 5$ -24-stigmastadienolis.

▼ M26

- 6.4. Eritrodiolio ir uvaolio procentinė dalis apskaičiuojama taip:

$$\text{Eritrodiolis + uvaolis} = \frac{\text{Er} + \text{Uv}}{\text{Er} + \text{Uv} + \Sigma\text{A} \times 100}$$

čia:

ΣA = bendras sterolių plotas kompiuterinėje sistemoje naudojamais vienetais;

Er = eritrodiolio plotas kompiuterinėje sistemoje naudojamais vienetais;

Uv = uvaolio plotas kompiuterinėje sistemoje naudojamais vienetais.

▼ **M26***Priedėlis***Dujų linijinio greičio nustatymas**

I normalioms darbo sąlygoms sureguliuotą dujų chromatografą įpurškiama 1–3 µl metano (arba propano) ir matuojamas laikas, kurį dujos tekės per kolonėlę nuo įpurškimo momento iki smailės išplovimo momento (tM).

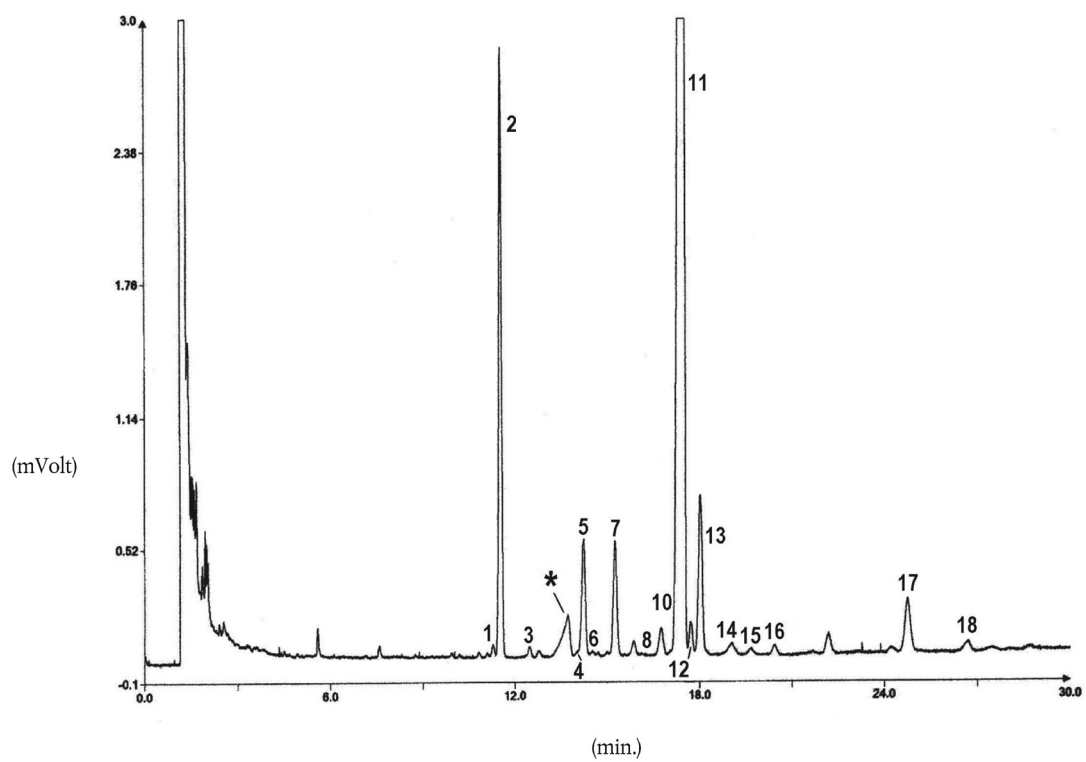
Linijinis greitis (cm/s) apskaičiuojamas pagal formulę L/tM ; čia L yra kolonėlės ilgis centimetrais, o tM – sekundėmis išmatuotas laikas.

*1 lentelė***Santykinė sterolių sulaikymo trukmė**

Smailė	Pavadinimas		Santykinė sulaikymo trukmė	
			SE 54 kolonėlė	SE 52 kolonėlė
1.	Cholesterolis	Δ -5-cholesten-3 β -olis	0,67	0,63
2.	Cholestanolis	5 α -cholestan-3 β -olis	0,68	0,64
3.	Brasikasterolis	[24S]-24-metil- Δ -5,22-cholestadien-3 β -olis	0,73	0,71
*	Ergosterolis	[24S] 24-metil- Δ -5-7-22-cholestatrien-3 β -olis	0,78	0,76
4.	24-metilencholesterolis	24-metilen- Δ -5,24-cholestadien-3 β -olis	0,82	0,80
5.	Kampesterolis	(24R)-24-metil- Δ -5-cholesten-3 β -olis	0,83	0,81
6.	Kampestanolis	(24R)-24-metilcholestan-3 β -olis	0,85	0,82
7.	Stigmasterolis	(24S)-24-etil- Δ -5,22-cholestadien-3 β -olis	0,88	0,87
8.	Δ -7-kampesterolis	(24R)-24-metil- Δ -7-cholesten-3 β -olis	0,93	0,92
9.	Δ -5,23-stigmastadienolis	(24R,S)-24-etil- Δ -5,23-cholestadien-3 β -olis	0,95	0,95
10.	Klerosterolis	(24S)-24-etil- Δ -5,25-cholestadien-3 β -olis	0,96	0,96
11.	β -sitosterolis	(24R)-24-etil- Δ -5-cholesten-3 β -olis	1,00	1,00
12.	Sitostanolis	24-etilcholestan-3 β -olis	1,02	1,02
13.	Δ -5-avenasterolis	(24Z)-24-etiliden- Δ -cholesten-3 β -olis	1,03	1,03
14.	Δ -5-24-stigmastadienolis	(24R,S)-24-etil- Δ -5,24-cholestadien-3 β -olis	1,08	1,08
15.	Δ -7-stigmastenolis	(24R,S)-24-etil- Δ -7-cholesten-3 β -olis	1,12	1,12
16.	Δ -7-avenasterolis	(24Z)-24-etiliden- Δ -7-cholesten-3 β -olis	1,16	1,16
17.	Eritrodiolis	5- α -olean-12-en-3 β -28-diolis	1,41	1,41
18.	Uvaolis	Δ -12-ursen-3 β -28-diolis	1,52	1,52

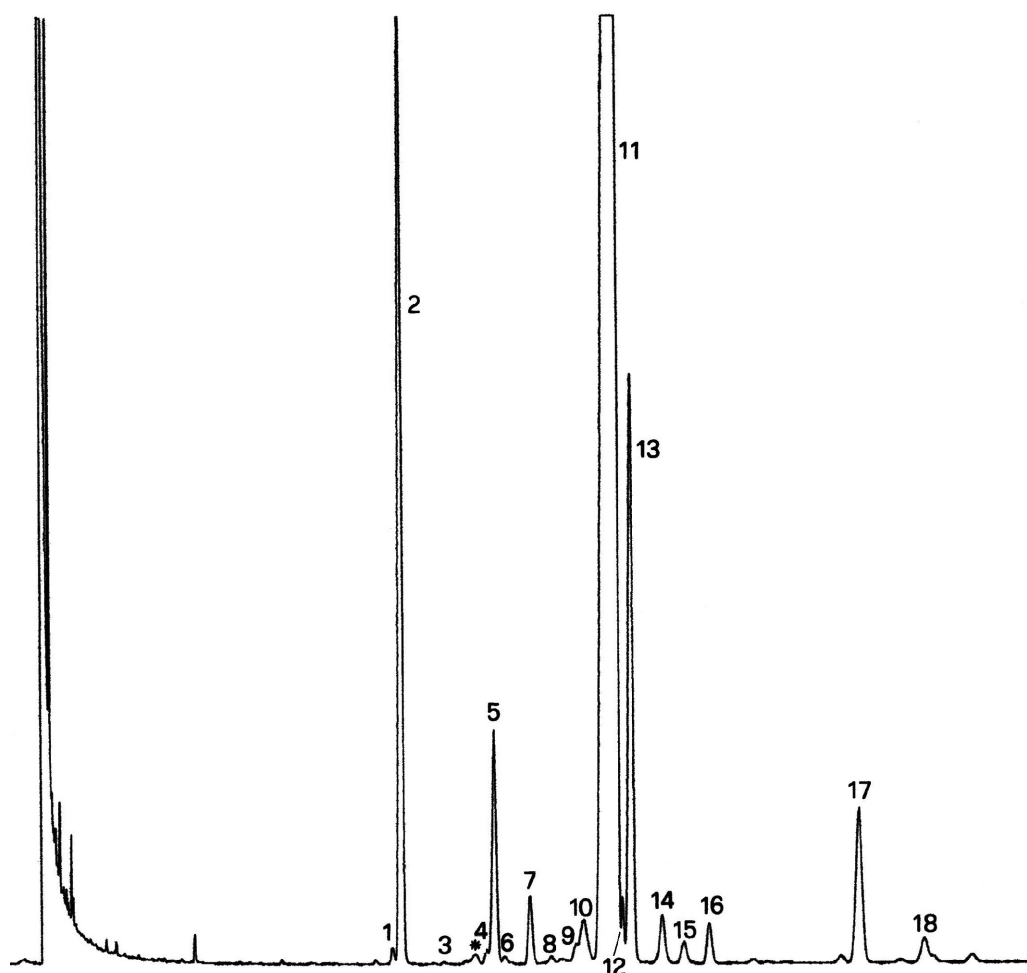
▼ **M26***1 brėžinys*

Pirmojo spaudimo klasikinio alyvuogių aliejaus lampante (sodrinto vidiniu etalonu) sterolių ir triterpeno dialkoholių frakcijos dujų chromatograma



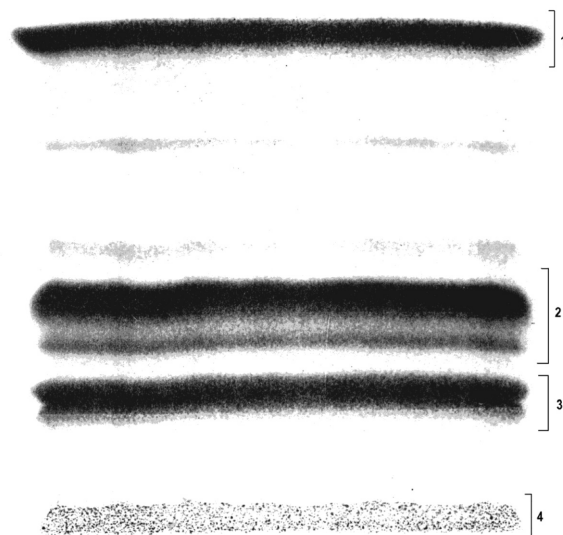
▼ **M26***2 brėžinys*

Rafinuoto alyvuogių aliejaus (sodrinto vidiniu etalonu) sterolių ir triterpeno dialkoholių frakcijos dujų chromatograma



▼M26*3 brėžinys*

Alyvuogių išspaudų aliejaus plonasluoksnės chromatografijos plokštelė su plotu, kuris turi būti nugrądytas steroliams ir triterpeno dialkoholiams nustatyti



- 1 – skvalenas
- 2 – triterpeno ir alifatiniai alkoholiai
- 3 – steroliai ir triterpeno dialkoholiai
- 4 – pradžia ir laisvosios riebalų rūgštys

▼ **M21***VII PRIEDAS***2-GLICERIL MONOPALMITATO PROCENTINIO KIEKIO
NUSTATYMAS****1. TIKSLAS IR TAIKYMO SRITIS**

Aprašyti analitinę procedūrą 2-oje triglicerido padėtyje esančios palmi-
tino rūgšties procentinei daliai apskaičiuoti, nustatant 2-glicerilo mono-
palmitato kiekį.

Šis metodas taikomas aplinkos temperatūros (20 °C) skystiems augali-
niams aliejams.

2. METODO ESMĖ

Paruoštas aliejaus mėginys veikiamas kasos lipaze: dėl dalinės ir speci-
finės 1 bei 3 padėties triglicerido molekulės 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 tempe-
ratūrą 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 savirašis 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 metilpolisilok-
sano arba 5 % fenil metilpolisiloksano plėvele. Kolonėlė gali būti naudo-
jama 370 °C temperatūroje.

▼ **M21**

- 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 vėsinamas iki kambario temperatūros. Įpilama 5 % (silikagelio masės) vandens: Erlenmejerio kolboje pasveriami 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 mažesnio 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 sililavimo reagentai, pvz., N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamido + 1 % trimetilchlorsilano mišinys, praskiestas tuo pačiu sauso piridino tirpiu).
- 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 kolonėlinę 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.

▼ **M21**

- 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 kolonelinę 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. *Kolonelinė chromatografija*

25 ml talpos Erlenmejerio kolboje (3.1.) tiksliai pasverama 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 pasverama ir apskaičiuojamas išgautas ekstrakto kiekis.

▼ M21

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, užkemšama 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 įšvirkščinama 100 µl tirpalo (5.2.3).

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

5.3.3. Po 20 minučių, įpilama 1–5 ml n-heksano (atsižvelgiant į chromatografinės sąlygas): gautas tirpalas yra paruoštas dujų chromatografinėi 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 C₅₄ 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),

▼ M21

— įpurkštas 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:

$$\text{glicerilo monopalmitatas (\%)}: \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

kurioje:

A_x = Glicerino monopalmitatą atitinkančios smailės plotas

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

Rezultatai pateikiami vieno ženklų po kablelio (dešimtųjų) tikslumu.

7. ANALIZĖS ATASKAITA

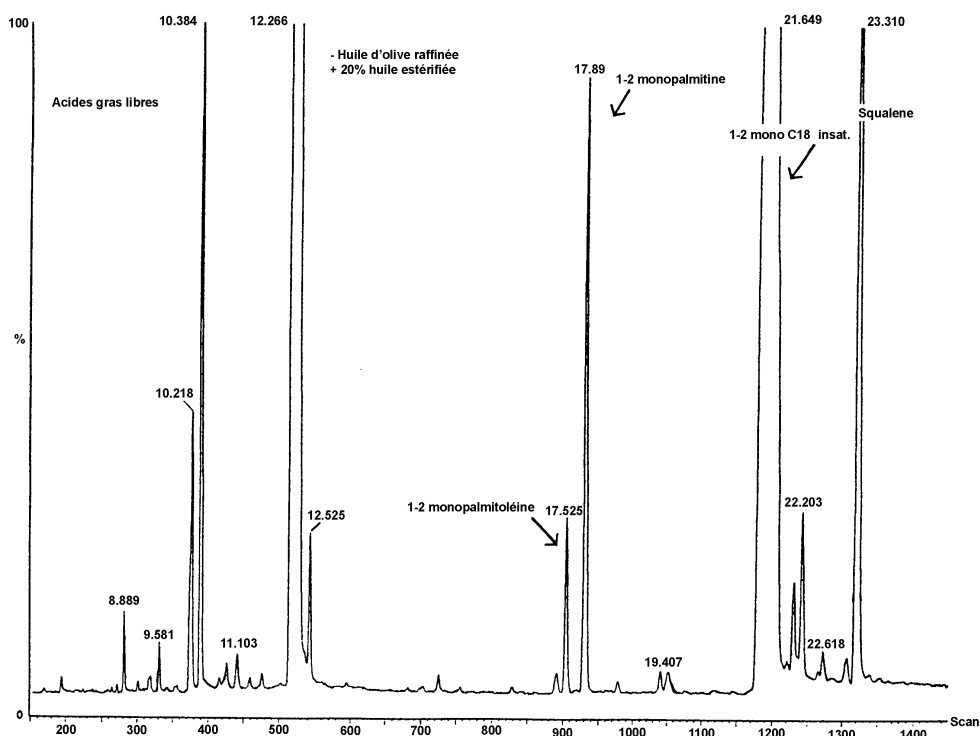
Analizės ataskaitoje pateikiama:

- 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.

▼ M21

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 C₁₈ insat. – 1-2 mono C₁₈ neprisot; Squalene – Skvalenas.

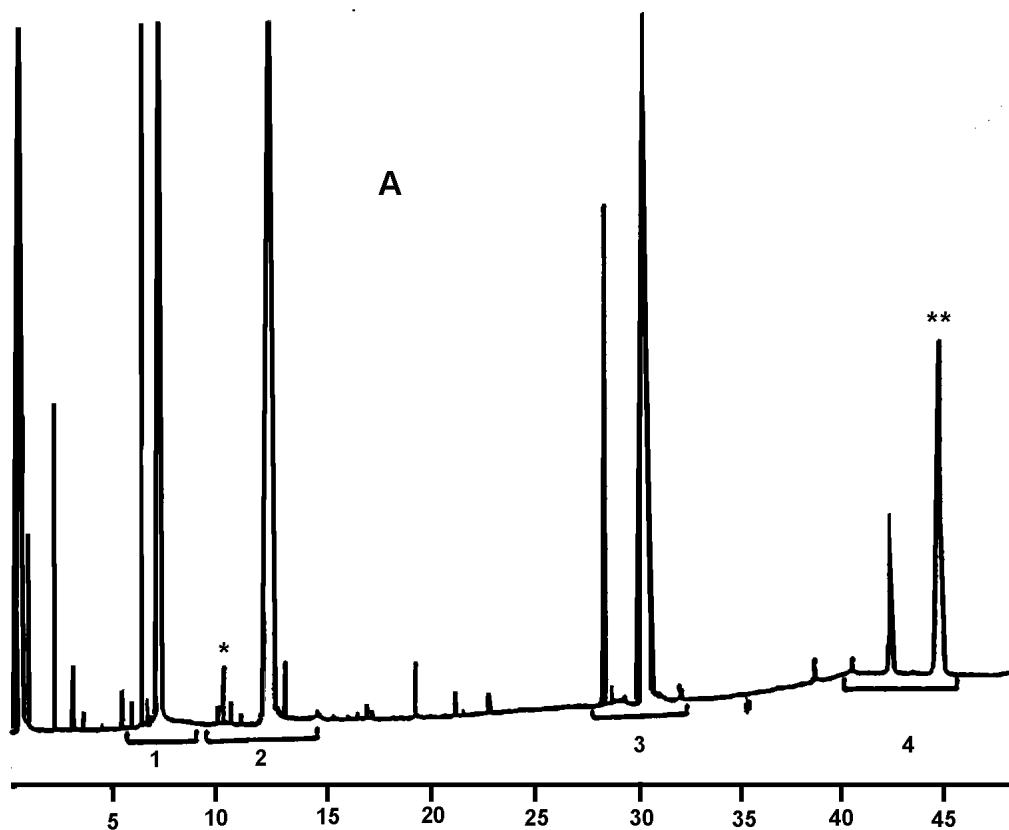
▼ **M21**

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 %

*Paiškinimas:*

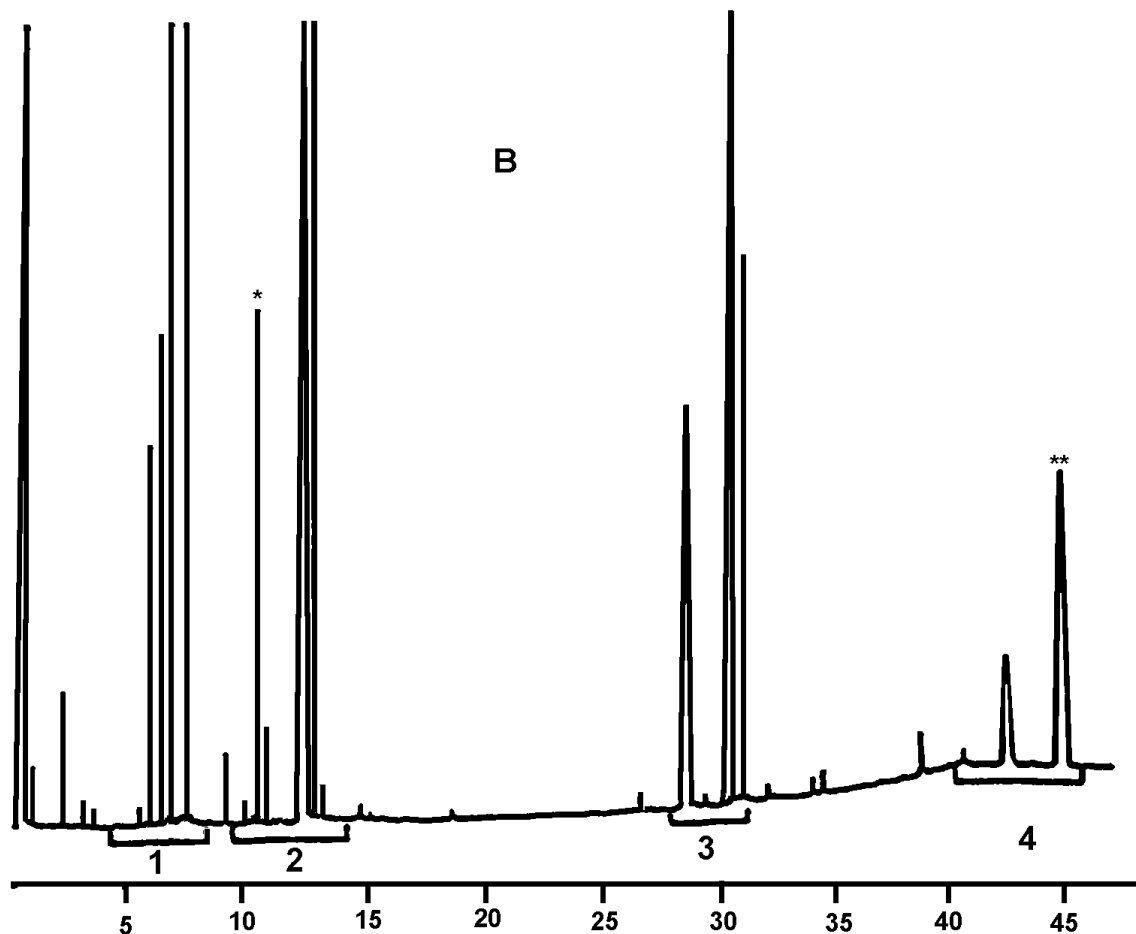
- 1 = Laisvosios riebalų rūgštys
- 2 = Monogliceridai
- 3 = Digliceridai
- 4 = Trigliceridai
- * = 2-monopalmitinas
- ** = Trigliceridas C₅₄

▼ **M21**

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 %



Paiškinimas:

- 1 = Laisvosios riebalų rūgštys
- 2 = Monogliceridai
- 3 = Digliceridai
- 4 = Trigliceridai
- * = 2-monopalmitinas
- ** = Trigliceridas C₅₄

▼ **M21**

8. PASTABOS

1 pastaba. LIPAZĖS RUOŠIMAS

Rinkoje prekiaujama naudoti paruošta pakankamo aktyvumo lipazė. 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 ruošiama 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 chronometras ir natrio hidroksido tirpalas lašinamas tokiu greičiu, kad pH visą laiką būtų 8,3. Kas minutę pasižymimas 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.

▼ **M20**

▼ **M28***IX PRIEDAS***Spektrofotometrinis tyrimas ultravioletinėje spektro dalyje****IŽANGA**

Spektrofotometrinis tyrimas ultravioletinėje spektro dalyje gali suteikti informacijos apie riebalų kokybę, jų išsilaikymo būklę ir technologinių procesų metu įvykusių pasikeitimų. Absorbicija metode nurodytų bangų ilgių srityje vyksta dėl konjuguotų dienų ir trienų sistemų, atsiradusių vykstant oksidacijos procesams ir (arba) dėl taikomų rafinavimo metodų. Ši absorbicija išreiškiama kaip savitoji ekstinkcija $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (riebalų 1 % masės tirpalo tam tikrame tirpiklyje ekstinkcija 10 mm storio kiuvetėje), pagal susitarimą žymima K raide (taip pat vadinama „ekstinkcijos koeficientu“).

1. TAIKymo sritys

Šiame priede aprašyta riebalų spektrofotometrinio tyrimo ultravioletinėje spektro dalyje procedūra.

2. Metodo esmė

Ėminys ištirpinamas reikiamame tirpiklyje ir šio tirpalo optinis tankis matuojamas gryno tirpiklio atžvilgiu, esant nustatytam bangos ilgiui.

Apskaičiuojama 1 % (m/V) tirpalo izooktane, esant 232 nm ir 268 nm bangos ilgiui, arba tirpalo cikloheksane, esant 232 nm ir 270 nm bangos ilgiui, savitoji ekstinkcija, kai naudojama 10 mm kiuvetė.

3. ĮRANGA

- 3.1. Spektrofotometras, tinkamas matuoti ultravioletinėje spektro dalyje (nuo 220 nm iki 360 nm), kurio rodmenis galima nuskaityti vieno nanometro tikslumu. Rekomenduojama reguliariai tikrinti optinio tankio ir bangų ilgio skalių tikslumą ir atkuriamumą, taip pat išsklaidytosios šviesos buvimą.

- 3.1.1. *Bangų ilgio skalė.* Ją galima patikrinti naudojant etaloninę medžiagą, kurią sudaro holmio oksido turinčio optinio stiklo filtras arba holmio oksido tirpalas (sandariai uždarytas arba neuždarytas), turintis ryškias absorbcijos juostas. Etaloninės medžiagos skirtos matomos ir ultravioletinės spektro dalies spektrofotometrų, kurių nominalusis spektrinis juostos plotis yra 5 nm arba mažesnis, bangos ilgio skalėms tikrinti ir kalibruoti. Matuojama oro atžvilgiu nuo 640 iki 240 nm bangų ilgio intervale pagal instrukcijas, pridėdama prie etalonių medžiagų. Kiekvieną kartą keičiant plyšio plotį, atliekama atskaitos linijos korekcija, esant tuščiam pluošto keliui. Etalono bangų ilgiai nurodyti etaloninės medžiagos sertifikate.

- 3.1.2. *Optinio tankio skalė.* Ją galima patikrinti, naudojant prekyboje esančias etalonines medžiagas, kurias sudaro tam tikros koncentracijos parūgštinti kalio dichromato tirpalai, turintys jų λ_{max} atitinkantį sertifikuotą optinį tankį (4 kalio dichromato tirpalai perchlorato rūgštyje, sandariai uždaryti keturiose UV kvarcinio stiklo kiuvetėse, skirtose tiesiškumui ir optinio tankio atskaitos taškui matuoti UV spektro dalyje). Kalio dichromato tirpalai matuojami naudojamos rūgšties tirpalo atžvilgiu po atskaitos linijos korekcijos pagal instrukcijas, pridėdama prie etaloninės medžiagos. Optinio tankio vertės nurodytos etaloninės medžiagos sertifikate.

Fotoelemento atsaką ir fotodaugintuvą galima patikrinti kitu būdu, darant taip: į 1 000 ml matavimo kolbą pasverama 0,2000 g spektrofotometriškai gryno kalio chromato, ištirpinama 0,05 mol/l kalio hidroksido tirpale ir skiedžiama iki žymės. Paimama lygiai 25 ml gauto tirpalo ir tuo pačiu kalio hidroksido tirpalu 500 ml talpos matavimo kolboje skiedžiama iki žymės.

▼ **M28**

Matuojama tokiu būdu gauto tirpalo ekstinkcija, esant bangos ilgiui 275 nm, o palyginamuoju tirpalu naudojant kalio hidroksido tirpalą. 1 cm storio kiuvetėje išmatuota ekstinkcijos vertė turi būti $0,200 \pm 0,005$.

- 3.2. Stačiakampės kvarcinės kiuvetės su dangčiais, kurios tinka matuoti ultravioletinės spektro dalies bangų ilgių intervale (nuo 220 iki 360 nm) ir kurių optinio kelio ilgis – 10 mm. Vandens arba kito tinkamo tirpiklio pripildytų kiuvetėjų ekstinkcijos vertė neturėtų skirtis daugiau kaip 0,01 ekstinkcijos vieneto.
- 3.3. Vienos žymės 25 ml matavimo kolbos, A klasės.
- 3.4. Analizinės svarstyklės, kuriomis galima pasverti 0,0001 g tikslumu.

4. REAGENTAI

Jei nenurodyta kitaip, naudojami tik analiziškai grynai reagentai ir distiliuotas, demineralizuotas arba lygiaverčio grynumo vanduo.

Tirpiklis: izooktanas (2,2,4-trimetilpentanas) matavimams esant 232 nm ir 268 nm bangos ilgiui arba cikloheksanas matavimams esant 232 nm ir 270 nm bangos ilgiui, kurio optinis tankis esant 232 nm bangos ilgiui yra mažesnis nei 0,12, o esant 270 nm bangos ilgiui mažesnis nei 0,05, palyginamuoju tirpalu naudojant distiliuotą vandenį ir matuojant 10 mm kiuvetėje.

5. PROCEDŪRA

- 5.1. Ėminys turi būti visiškai vienalytis ir be suspenduotų priemaišų. Jei jų yra, tirpalą būtina filtruoti per filtravimo popierių maždaug 30 °C temperatūroje.
- 5.2. Apie 0,25 g taip paruošto ėminio tiksliai pasverama (1 mg tikslumu) į 25 ml matavimo kolbą, skiedžiama nurodytu tirpikliu iki žymės ir sumaišoma. Gautas tirpalas turi būti visiškai skaidrus. Jei yra opalescencija arba drumstumas, greitai filtruojama per filtravimo popierių.

PASTABA. Optiniam tankiui matuoti, esant 268 nm ir 270 nm, paprastai pakanka 0,25–0,30 g aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo ir pirmojo spaudimo aliejaus. Kai matuojama esant 232 nm bangos ilgiui, paprastai reikia turėti 0,05 g ėminio, todėl dažniausiai ruošiami du skirtingi tirpalai. Matuojant alyvuogių išspaudų aliejų, rafinuotų alyvuogių aliejų ir falsifikuotų alyvuogių aliejų optinį tankį, ėminio masė dėl didesnio optinio tankio paprastai gali būti mažesnė, pvz., 0,1 g.

- 5.3. Prireikus atliekama atskaitos linijos (220–290 nm) korekcija, į abi kvarcines kiuvetes (ėminio ir lyginamojo tirpalo) įpilant tirpiklio, vėliau į ėminio kiuvetę įpilama bandomojo tirpalo ir naudojamo tirpiklio atžvilgiu matuojami ekstinkcijos koeficientai, esant 232, 268 ar 270 nm.

Gautos ekstinkcijos vertės turi būti 0,1–0,8 intervale arba spektrofotometro tiesiškumo intervale, kuris turėtų būti patikrintas. Jei taip nėra, matavimai turi būti pakartoti, atitinkamai naudojant labiau praskiestus arba labiau koncentruotus tirpalus.

- 5.4. Išmatavus optinį tankį, esant 268 ar 270 nm, matuojamas optinis tankis, esant $\lambda_{\max}$, $\lambda_{\max} + 4$ ir $\lambda_{\max} - 4$. Šios optinio tankio vertės naudojamos savitosios ekstinkcijos pokyčiui (ΔK) nustatyti.

PASTABA. Laikoma, kad izooktano kaip tirpiklio $\lambda_{\max}$ yra 268 nm, o cikloheksano – 270 nm.

▼M28

6. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

- 6.1. Užrašomos savitosios ekstinkcijos (ekstinkcijos koeficientų) vertės, kurios įvairiems bangų ilgiams apskaičiuojamos pagal formulę:

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

čia:

K_λ – savitoji ekstinkcija, esant bangos ilgiui λ ;

E_λ – ekstinkcija, išmatuota esant bangos ilgiui λ ;

c – tirpalo koncentracija g/100 ml;

s – kvarcinės kiuvetės optinio kelio ilgis, cm;

išreikšti šimtųjų tikslumu.

- 6.2. Savitosios ekstinkcijos pokytis (ΔK)

Ekstinkcijos absoliučiosios vertės pokytis (ΔK) apskaičiuojamas pagal formulę:

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

kurioje K_m – savitoji ekstinkcija, esant maksimalios absorbcijos bangos ilgiui, kuris priklauso nuo naudojamo tirpiklio yra 270 nm ar 268 nm.

Rezultatai turėtų būti išreikšti šimtųjų tikslumu.

▼ **M28***X PRIEDAS***RIEBALŲ RŪGŠČIŲ METILESTERIŲ NUSTATYMAS DUJŲ CHROMATOGRAFIJOS METODU****1. TAIKYMO SRITIS**

Šiame priede pateikti nurodymai dėl augalinių riebalų ir aliejų laisvųjų ir sujungtųjų rūgščių nustatymo dujų chromatografijos metodu, jas prieš tai pavertus riebalų rūgščių metilesteriais (FAME).

Sujungtosios triacilglicerolių (TAG) riebalų rūgštys ir priklausomai nuo esterinio metodo gautos laisvosios riebalų rūgštys (FFA) paverčiamos riebalų rūgščių metilesteriais (FAME), kurie nustatomi kapiliarinės dujų chromatografijos metodu.

Šiame priede aprašytu metodu galima nustatyti FAME nuo C₁₂ iki C₂₄, įskaitant sočiųjų, *cis*- ir *trans*-mononesočiųjų bei *cis*- ir *trans*-polinesočiųjų riebalų rūgščių metilesterius.

2. METODO ESMĖ

Dujų chromatografija (GC) taikoma kiekybinei FAME analizei. FAME paruošiami pagal A dalį. Paskui jie įpurškiami ir išgarinami injektoriaus viduje. FAME atskiriami nustatyto poliškumo ir ilgio analizės kolonėlėse. FAME aptinkami liepsnos jonizaciniu detektoriumi (FID). Analizės sąlygos pateiktos B dalyje.

Atliekant FAME dujų chromatografiją su FID, kaip nešančiąsias dujas galima naudoti vandenilį arba helį (judančioji fazė). Vandenilis paspartina atskyrimą ir gaunamos aštresnės smailės. Nejudamoji fazė – mikroskopinis plonos skysčio plėvelės sluoksnis ant inertinio kieto lydyto kvarco paviršiaus.

Dujoms judant kapiliarine kolonėle, vyksta išgarintų analizuojamų junginių sąveika su nejudamąja faze, dengiančia vidinį kolonėlės paviršių. Dėl nevienodos skirtingų junginių sąveikos jie išplaunami skirtingu laiku, kuris vadinamas junginio sulaikymo trukme esant tam tikram analizės parametru rinkiniui. Sulaikymo trukmės verčių palyginimas naudojamas skirtingiems junginiams identifikuoti.

A DALIS.**ALYVUOGIŲ ALIEJAUS IR ALYVUOGIŲ IŠSPAUDŲ ALIEJAUS RIEBALŲ RŪGŠČIŲ METILESTERIŲ PARUOŠIMAS****1. APRĖPTIS**

Šioje dalyje aprašytas riebalų rūgščių metilesterių paruošimas. Ją sudaro alyvuogių aliejų ir alyvuogių išspaudų aliejų riebalų rūgščių metilesterių paruošimo metodai.

2. TAIKYMO SRITIS

Alyvuogių aliejų ir alyvuogių išspaudų aliejų riebalų rūgščių metilesteriai ruošiami atliekant peresterinimą kalio hidroksido metanoliniu tirpalu kambario temperatūroje. Ėminio gryninimo prieš peresterinimą būtinybė priklauso nuo ėminio laisvųjų riebalų rūgščių kiekio bei nustatomo analizės parametro ir metodą galima pasirinkti pagal šią lentelę:

▼ **M28**

Aliejaus rūšis	Metodas
Pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus, kurio rūgštingumas $\leq 2,0$ %	1. Riebalų rūgštys 2. Riebalų rūgščių <i>trans</i> -izomerai 3. Δ ECN42 (išgryninus silikageliu ekstrakcijos kietąją fazę (SPE) metodu)
Rafinuotas alyvuogių aliejus	
Alyvuogių aliejus, sudarytas iš rafinuoto alyvuogių aliejaus ir pirmojo spaudimo alyvuogių aliejų:	
Rafinuotas alyvuogių išspaudų aliejus	
Alyvuogių išspaudų aliejus	
Pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus, kurio rūgštingumas $> 2,0$ % Neapdorotas alyvuogių išspaudų aliejus	1. Riebalų rūgštys (išgryninus silikageliu SPE metodu) 2. Riebalų rūgščių <i>trans</i> -izomerai (išgryninus silikageliu SPE metodu) 3. Δ ECN42 (išgryninus silikageliu SPE metodu)

3. METODIKA

3.1. **Peresterinimas kalio hidroksido metanoliniu tirpalu kambario temperatūroje.**3.1.1. *Principas*

Metilesteriai susidaro atliekant peresterinimą metanoliniu kalio hidroksido tirpalu, kaip tarpinė stadija prieš įvykstant muilinimui.

3.1.2. *Reagentai*

3.1.2.1. Metanolis, turintis ne daugiau kaip 0,5 % (masės) vandens.

3.1.2.2. Heksanas, tinkamas chromatografijai.

3.1.2.3. Heptanas, tinkamas chromatografijai.

3.1.2.4. Dietileteris, stabilizuotas prieš analizę.

3.1.2.5. Acetonas, tinkamas chromatografijai.

3.1.2.6. Išplovimo tirpiklis aliejui gryninti kolonėlinės chromatografijos arba ekstrakcijos kietąją fazę būdu: heksano ir dietileterio mišinys 87/13 (v/v).

3.1.2.7. Kalio hidroksidas, maždaug 2 mol/l metanolinis tirpalas: 11,2 g kalio hidroksido ištirpinama 100 ml metanolio.

3.1.2.8. Silikagelio kasetės, 1 g (6 ml), ekstrakcijai kietąją fazę atlikti.

3.1.3. *Aparatūra*

3.1.3.1. Mėgintuvėliai su užsukamais dangteliais (5 ml tūrio), dangtelis su PTFE jungtimi.

3.1.3.2. Graduotos arba automatinės pipetės, 2 ml ir 0,2 ml.

▼ **M28**3.1.4. *Aliejaus ėminių gryninimas*

Jei būtina, ėminiai gryninami aliejų leidžiant per ekstrakcijos kietąją fazę silikagelio kasetę. Silikagelio kasetė (3.1.2.8) dedama į išplovimo vakuume aparatą ir plaunama 6 ml heksano (3.1.2.2); plaunama ne vakuume. Paskui aliejaus (maždaug 0,12 g) tirpalas, esantis 0,5 ml heksano (3.1.2.2) supilamas į kolonėlę. Tirpalas leidžiamas žemyn ir išplaunamas 10 ml heksano ir dietileterio (87:13 v/v) mišiniu (3.1.2.6). Sujungti eliuatai sumaišomi ir padalijami į du maždaug vienodus tūrius. Alikvotinė dalis išgarinama sukamajame garintuve iki sauso likučio, esant sumažintam slėgiui ir kambario temperatūroje. Likutis ištirpinamas 1 ml heptano ir gautą tirpalą galima naudoti riebalų rūgščių analizei GC metodu. Antroji alikvotinė dalis išgarinama, o likutis ištirpinamas 1 ml acetono, kad prireikis būtų galima atlikti trigliceridų analizę HPLC metodu.

3.1.5. *Procedūra*

Į 5 ml mėgintuvėlį su užsukamu dangteliu (3.1.3.1) pasveriami maždaug 0,1 g aliejaus ėminio. Įpilama 2 ml heptano (3.1.2.2) ir supurtoma. Įpilama 0,2 ml metanolinio kalio hidroksido tirpalo (3.1.2.7), uždedamas dangtelis su PTFE jungtimi, dangtelis užsukamas ir mėgintuvėlis stipriai purtomas 30 sekundžių. Paliekama išsisluoksniuoti tol, kol viršutinis tirpalo sluoksnis tampa skaidrus. Viršutinis sluoksnis su metilesteriais dekantuojamas. Tirpalas heptane yra paruoštas įpurkšti į dujų chromatografą. Patartina tirpalą laikyti šaldytuve iki bus atliekama jo dujų chromatografinė analizė. Nerekomenduojama tirpalo laikyti ilgiau kaip 12 h.

B DALIS.

RIEBALŲ RŪGŠČIŲ METILESTERIŲ ANALIZĖ DUJŲ CHROMATOGRAFIJOS METODU1. **TAIKYMO SRITIS**

Šioje dalyje aprašyti bendri nurodymai, kaip taikyti kapiliarinę dujų chromatografiją, nustatant pagal A dalyje nurodytą metodą gauto riebalų rūgščių metilesterių mišinio kokybinę ir kiekybinę sudėtį.

Ši dalis netaikoma polimerizuotoms riebalų rūgštims.

2. **REAGENTAI**2.1. **Nešančiosios dujos**

Inertinės dujos (vandenilis ar helis), visiškai išdžiovintos, turinčios mažiau kaip 10 mg/kg deguonies.

1 pastaba. Vandenilis gali dvigubai pagreitinti analizę, bet yra pavojingas. Galima įsigyti saugių įtaisų.

2.2. **Pagalbinės dujos**

2.2.1. Vandenilis (grynumas $\geq 99,9$ %), neturintis organinių priemaišų.

2.2.2. Oras arba deguonis, neturintys organinių priemaišų.

2.2.3. Azotas (grynumas > 99 %).

2.3. **Pamatinis etalonas**

Grynų riebalų rūgščių metilesterių arba žinomos sudėties riebalų, geriausiai tokių, kurie yra panašūs į analizuojamą riebalinę medžiagą, metilesterių mišinys. Nesočiųjų rūgščių *trans*-izomerams identifikuoti tinka okta-deceno, okta-dekadieno ir okta-dekatrieno rūgščių metilesterių *cis*- ir *trans*-izomerai.

Reikėtų imtis atsargumo priemonių, kad būtų išvengta polinesočiųjų riebalų rūgščių oksidacijos.

▼ **M28****3. APARATŪRA**

Pateikiamos instrukcijos tinka įprastai dujų chromatografijos įrangai, kai naudojamos kapiliarinės kolonėlės ir dujų jonizacinis detektorius.

3.1. Dujų chromatografas

Dujų chromatografą sudaro šie elementai:

3.1.1. Įpurškimo sistema

Naudojama įpurškimo sistema su kapiliarinėmis kolonėlėmis, ir šiuo atveju ji turėtų būti specialiai suprojektuota darbui su tokiais kolonėlėmis. Tai gali būti dalijamo ar nedalijamo srauto tiesioginio įpurškimo į kolonėlę injektorius.

3.1.2. Krosnis

Krosnis turi įkaitinti kapiliarinę kolonėlę bent iki 260 °C ir pasirinktą temperatūrą palaikyti 0,1 °C tikslumu. Pastarasis reikalavimas yra ypač svarbus, kai naudojamas lydyto kvarco vamzdelis.

Visais atvejais rekomenduojamas programuojamos temperatūros kaitinimo režimas, ypač kai analizuojamos riebalų rūgštys, turinčios mažiau kaip 16 anglies atomų.

3.1.3. Kapiliarinė kolonėlė

3.1.3.1. Vamzdelis pagamintas iš medžiagos, inertiškos analizuojamoms medžiagoms (paprastai stiklinis arba lydyto kvarco). Vidinis skersmuo turi būti nuo 0,20 iki 0,32 mm. Prieš padengiant nejudamąją fazę, vidinį paviršių reikia tinkamai apdoroti (pvz., paruošti paviršių ir padaryti jį inertišku). Riebalų rūgštims ir jų *cis*- bei *trans*-izomerams pakanka 60 m ilgio.

3.1.3.2. Kaip kolonelių nejudamoji fazė tinka tinklinės struktūros polinis polisiloksanas (cianpropilpolisiloksanas).

2 pastaba. Yra rizika, kad naudojant polinius polisiloksanus gali būti sunkiau identifikuoti ir atskirti linoleno rūgštį bei C₂₀ rūgštis.

Dangos turi būti plonos, t. y. nuo 0,1 iki 0,2 μm.

3.1.3.3. Kolonėlės surinkimas ir kondicionavimas

Surenkant kapiliarines kolonėles, laikomasi įprastų atsargumo priemonių, t. y. kolonėlės įstatymas į krosnį (tvirtinimas), jungčių pasirinkimas ir sujungimas (sandarumas), kolonėlės galų jungimas su injektoriumi ir detektoriumi (neveikos tūrių sumažinimas). Į kolonėlę tiekiamos nešančiosios dujos (pvz., 0,3 bar (30 kPa) slėgio, kai naudojama 25 m ilgio ir 0,3 mm vidinio skersmens kolonėlė).

Kolonėlė kondicionuojama, programuojant krosnies temperatūros kitimą 3 °C/min sparta nuo kambario temperatūros iki 10 °C mažesnės už nejudamosios fazės skilimo temperatūrą. Krosnis šioje temperatūroje laikoma vieną valandą, kol nusistovi atskaitos linija. Temperatūra darbui izoterminėmis sąlygomis sumažinama iki 180 °C.

3 pastaba. Tinkamai iš anksto kondicionuotų kolonelių galima nusipirkti.

3.1.4. Liepsnos jonizacinis detektorius ir konverteris-stiprintuvas**3.2. Švirkštas**

Didžiausia švirkšto talpa turi būti 10 μl, sugraduotas 0,1 μl padalomis.

3.3. Duomenų rinkimo sistema

Duomenų rinkimo sistema tiesiogiai sujungiama su detektoriais ir yra naudojama su programine įranga, kuri galėtų integruoti ir normalizuoti smailes.

▼ **M28**

4. PROCEDŪRA

Nuo 4.1 iki 4.3 skirsniuose aprašyti veiksmai tinka naudojant liepsnos jonizacinį detektorių.

4.1. **Bandymo sąlygos**4.1.1. *Kapiliarinių kolonėlių optimalių veikimo sąlygų parinkimas*

Dėl kapiliarinių kolonėlių efektyvumo ir pralaidumo komponentų atskyrimas ir analizės trukmė labai priklauso nuo nešančiųjų dujų srauto kolonėlėje. Todėl būtina optimizuoti veikimo sąlygas, reguliuojant šį parametą (arba tiesiog kolonėlės slėgio sumažėjimą), priklausomai nuo to, ar siekiama pagerinti atskyrimą ar paspartinti analizę.

Paaikškėjo, kad FAME (nuo C4 iki C26) atskirti tinka tokios sąlygos. Chromatogramų pavyzdžiai pateikti B priedėlyje:

injektoriaus temperatūra:	250 °C
detektoriaus temperatūra:	250 °C
krosnies temperatūra:	nuo 165 °C (8 min) iki 210 °C 2 °C/min sparta
nešančiosios dujos:	vandenilis, dujų tiekimo į kolonėlę slėgis: 179 kPa
suminis srautas:	154,0 ml/min;
padalijimo santykis:	1:100
įpurškiamas tūris:	1 µl

4.1.2. *Skyros nustatymas (žr. A priedėlį)*

Dviejų gretimų smailių I ir II skyra R apskaičiuojama pagal formulę:

$$R = 2 \times ((d_{r(II)} - d_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ or } R = 2 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ (USP) (JAV farmakopėja),}$$

arba

$$R = 1,18 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)})/(\omega_{0,5(I)} + \omega_{0,5(II)})) \text{ (EP, BP, JP, DAB), (JP (Japonijos farmakopėja), EP (Europos farmakopėja), (BP (Britų farmakopėja)),}$$

čia:

$d_{r(I)}$ – I smailės sulaikymo atstumas;

$d_{r(II)}$ – II smailės sulaikymo atstumas;

$t_{r(I)}$ – I smailės sulaikymo trukmė;

$t_{r(II)}$ – II smailės sulaikymo trukmė;

$\omega_{(I)}$ – I smailės pagrindo plotis;

$\omega_{(II)}$ – II smailės pagrindo plotis;

$\omega_{0,5}$ – tam tikro junginio smailės pusaukščio plotis;

If $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$, R skaičiuojama pagal šias formules:

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

čia:

σ – standartinis nuokrypis (žr. A priedėlio 1 paveikslą).

▼ **M28**

Jei atstumas d_r tarp dviejų smailių $d_{r(II)} - d_{r(I)}$ lygus 4σ , skyros faktorius $R = 1$.

Jei dvi smailės atsiskiria nevisiškai, dviejų smailių perlinkio taškų liestinės susikerta C taške. Kad dvi smailės visiškai atsiskirtų, atstumas tarp jų turi būti lygus:

$d_{r(II)} - d_{r(I)} = 6 \sigma$, todėl $R = 1,5$ (žr. A priedėlio 3 paveikslą).

5. REZULTATŲ IŠRAIŠKA

5.1. Kokybinė analizė

Pagal B priedėlio 1 paveikslo chromatogramą identifikuojamos ėminio metilesterių smailės, prireikus atliekant interpoliaciją arba lygindami su metiesterių etaloninių mišinių smailėmis (kaip nurodyta 2.3 punkte).

5.2. Kiekybinė analizė

5.2.1. Sudėties nustatymas

Atskirų riebalų rūgščių metilesterių masės dalis w_i , išreikšta metilesterių masės procentine dalimi, apskaičiuojama taip:

5.2.2. Apskaičiavimo metodas

5.2.2.1. Bendrasis atvejis

Duoto i komponento kiekis, išreikštas metilesterių masės procentine dalimi, apskaičiuojamas nustatant atitinkamos smailės ploto procentinę dalį visų smailių plotų sumos atžvilgiu pagal formulę:

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

čia:

A_i – atskiro riebalų rūgšties metilesterio i smailės plotas;

ΣA – atskirų riebalų rūgščių metilesterių visų smailių plotų suma.

Rezultatai pateikiami šimtųjų tikslumu.

4 pastaba. Riebalų ir aliejų riebalų rūgščių metilesterių masės dalis yra lygi triacilglicerolių masės daliai, išreikštai gramais 100 g. Tais atvejais, kai ši prielaida negalioja, žr. 5.2.2.2.

5.2.2.2. Korekcijos koeficientų naudojimas

Tam tikrais atvejais, pvz., jei yra riebalų rūgščių, turinčių mažiau kaip aštuonis anglies atomus, arba rūgščių su antrinėmis grupėmis, turi būti atliekama plotų korekcija, taikant specialius korekcijos koeficientus (F_{ci}). Šie koeficientai turi būti nustatyti kiekvienam atskiram prietaisui. Šiuo tikslu turi būti naudojamos atitinkamam intervalui tinkamos etaloninės medžiagos, kurių riebalų rūgščių sudėtis būtų sertifikuota.

5 pastaba. Šie korekcijos koeficientai nėra identiški A priedėlyje pateiktiems teoriniams FID korekcijos koeficientams, nes į juos įtrauktos įpurškimo sistemos veikimo charakteristikos ir kt. Tačiau esant didesniems skirtumams reikėtų patikrinti visos sistemos veikimo charakteristikas.

▼ M28

Šio etaloninio mišinio i metilesterio masės dalis apskaičiuojama pagal formulę:

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

čia:

m_i – etaloninio mišinio i metilesterio masė;

Σm – įvairių etaloninio mišinio komponentų, kaip metilesterių, masių suma.

Pagal etaloninio mišinio chromatogramą i metilesterio ploto procentinė dalis apskaičiuojama pagal formulę:

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

čia:

A_i – etaloninio mišinio i metilesterio plotas;

ΣA – visų etaloninio mišinio metilesterių plotų suma.

Tokiu atveju pataisos koeficientas F_c yra lygus:

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

Ėminio kiekvieno i metilesterio masės procentinė dalis yra lygi:

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

Rezultatai pateikiami šimtųjų tikslumu.

6 pastaba. Apskaičiuota vertė atitinka atskiros riebalų rūgšties masės procentinę dalį, apskaičiuotą kaip triacilglicerolių masė 100 g riebalų.

5.2.2.3. Vidinio etalono naudojimas

Atliekant tam tikras analizes (pvz., kai kiekybiškai nustatomos ne visos rūgštys, pvz., kai be rūgščių su 16 ir 18 anglies atomų yra keturis ir šešis anglies atomus turinčios rūgštys, arba kai reikia nustatyti absoliutų riebalų rūgšties kiekį ėminyje) būtina naudoti vidinį etaloną. Dažnai naudojamos riebalų rūgštys su 5, 15 arba 17 anglies atomų. Vidiniam etalonui turi būti nustatytas korekcijos koeficientas (jei yra).

Metilesteriu išreikšto i komponento procentinė masės dalis nustatoma pagal formulę:

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

Čia:

A_i – i metilesterio plotas;

A_{IS} – vidinio etalono plotas;

F_i – i riebalų rūgšties, išreikštos metilesteriu, korekcijos koeficientas;

F_{IS} – vidinio etalono korekcijos koeficientas;

m – tiriamosios dalies masė, miligramais;

m_{IS} – vidinio etalono masė, miligramais.

Rezultatai pateikiami šimtųjų tikslumu.

▼ M28**6. BANDYMŲ ATASKAITA**

Bandymų ataskaitoje turi būti nurodyti visi metilesterių ruošimo ir dujų chromatografinės analizės metodai ir gauti rezultatai. Joje taip pat nurodoma visa su darbu susijusi informacija, nenurodyta šiame standartiniame metode, arba laikoma neprivaloma, kartu nurodant visų incidentų, galėjusių turėti įtakos rezultatams, aplinkybes.

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta ėminiui visiškai identifikuoti būtina informacija.

7. PRECIZIŠKUMAS**7.1. Tarplaboratorinio tyrimo rezultatai:**

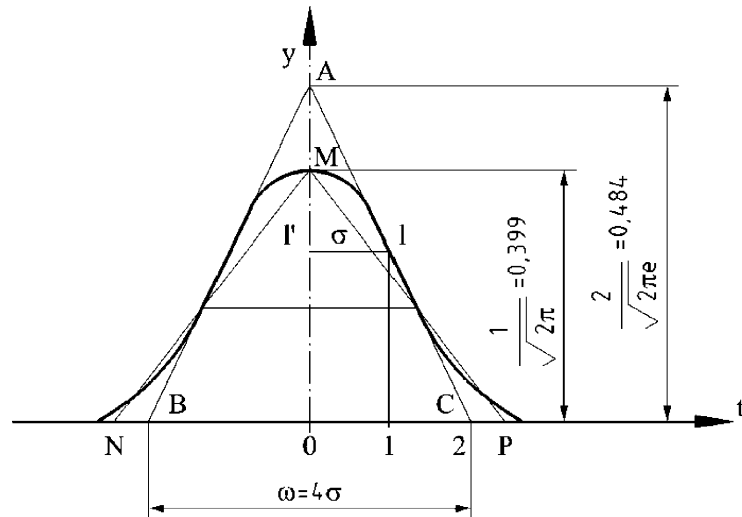
Metodo preciziškumo tarplaboratorinio tyrimo duomenys pateikti standarto IOC/T.20/Doc. No 33 C priede. Šiame tarplaboratoriniame tyrime gautos vertės gali netikti kitoms nei nurodytos koncentracijos vertėms ir matricoms.

7.2. Pakartojamumas

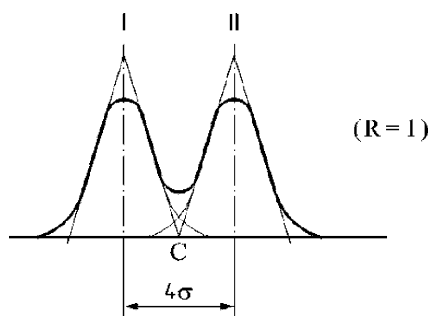
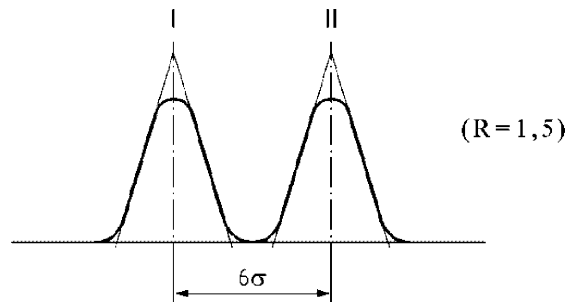
Dviejų atskirų bandymo rezultatų, kuriuos per trumpą laiką toje pačioje laboratorijoje ir ta pačia įranga gavo vienas operatorius, tai pačiai tiriamajai medžiagai taikydamas tą patį tyrimo metodą, absoliutusias skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų gali būti didesnis už r vertes, pateiktas IOC/T.20/Doc No 33 standarto C priedo nuo 1 iki 14 lentelėse.

7.3. Atkuriamumas

Dviejų atskirų bandymo rezultatų, kuriuos skirtingose laboratorijose ir skirtinga įranga gavo skirtingi operatoriai, tai pačiai tiriamajai medžiagai taikydami tą patį tyrimo metodą, absoliutusias skirtumas ne daugiau kaip 5 % atvejų gali būti didesnis už R vertes, pateiktas IOC/T.20/Doc No 33 standarto C priedo nuo 1 iki 14 lentelėse.

▼ **M28***A priedėlis**1 paveikslas*

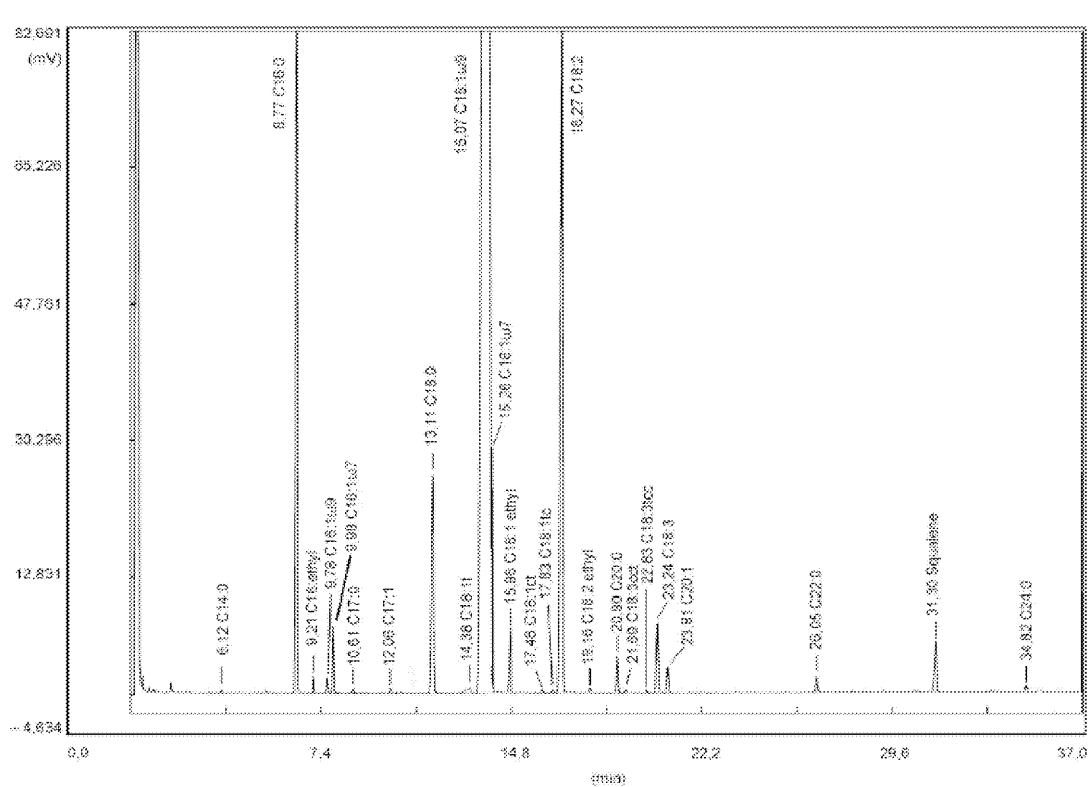
$\omega_{0,5}$ – trikampio (ABC) pusaukščio plotis, b – trikampio (NPM) pusaukščio plotis.

2 paveikslas*3 paveikslas*

▼ M28

*B priedėlis**1 paveikslas*

Dujų chromatografijos smailių profilis, gautas alyvuogių išspaudų aliejui taikant šaltojo metilinimo metodą



Chromatogramoje pavaizduotos smailės yra metilesterių ir etilesterių smailės, išskyrus atvejus, kai nurodyta kitaip.



XI PRIEDAS

LAKIŲJŲ HALOGENINTŲ TIRPIKLIŲ KIEKIO ALYVUOGIŲ ALIEJUJE NUSTATYMAS

1. METODAS

Dujų chromatografinė analizė, naudojant lakiųjų medžiagų nustatymo tuščioje erdvėje virš produkto metoda.

2. APARATŪRA

2.1. Dujų chromatografijos įrenginys su elektronų pagavos detektoriumi (EPD).

2.2. Lakiųjų medžiagų nustatymo tuščioje erdvėje virš produkto įrenginys.

2.3. Stiklinė dujų chromatografinė kolonėlė, ilgis 2 m, skersmuo 2 mm, nejudančioji fazė gaunama 10 % OV101 arba atitinkama medžiaga impregnuojant iškaitintą, rūgštyje išplautą diatomitą, kurio dalelių dydis 80–100 mešų.

2.4. Dujos nešiklis ir pagalbinės dujos: azotas dujų chromatografijai, tinkamas elektronų pagavos detektavimui.

2.5. 10–15 ml talpos stiklinės kolbos, padengtos teflonu ir aliuminio kamščiu su įtaisais švirkštui įkišti.

2.6. Hermetiškai uždariantys fiksatoriai.

2.7. 0,5–2 ml talpos dujų švirkštas.

3. REAGENTAI

Etalonas: halogeninti tirpikliai, pagal grynumą tinkami dujų chromatografiniai analizėi.

4. DARBO EIGA

4.1. Į stiklinę kolbą (pakartotinai nenaudoti) tiksliai pasverama apie 3 g aliejaus; kolba hermetiškai uždaroma. Kolba dedama vienai valandai į termostatą, esant 70 °C temperatūrai. Švirkštu paimama tiksliai 0,2–0,5 ml tuščiosios erdvės turinio. Tai įpurškiama į dujų chromatografinę kolonėlę, nustatytą taip:

— inžektoriaus temperatūra: 150 °C,

— kolonėlės temperatūra: 70–80 °C,

— detektoriaus temperatūra: 200–250 °C.

Temperatūros gali būti kitos, jei gaunami tokie patys rezultatai.

4.2. Etaloniniai tirpalai: naudojant grynintą, tirpiklių pėdsakų neturinti alyvuogių aliejų, ruošiami etaloniniai tirpalai, kurių koncentracija 0,05–1 milijonoji dalis (mg/kg), ir kuri atitiktų numatomą kiekį bandinyje. Halogeninti tirpikliai gali būti praskiedžiami pentanu.

4.3. Kiekybinis vertinimas: lyginami bandinio ir etaloninio tirpalo, kurio koncentracija laikoma arčiausia nustatoma, smailių plotai arba aukščiai. Jei nuokrypis yra didesnis kaip 10 %, analizė turi būti pakartojama, lyginant su kitu etaloniniu tirpalu, kol nuokrypis bus 10 % ribose. Kiekis nustatomas remiantis atskirų įpurškimų rezultatų vidurkiu.

4.4. Rezultatų skaičiavimas: milijonosiomis dalimis (mg/kg). Metodo radimo riba 0,01 mg/kg.

▼ **M26***XII PRIEDAS***TARPTAUTINĖS ALYVUOGIŲ ALIEJAUS TARYBOS PIRMOJO
SPAUDIMO ALYVUOGIŲ ALIEJAUS ORGANOLEPTINIO
VERTINIMO METODAS**▼ **M28**

1. TIKSLAS IR TAIKYMO SRITIS

Šiame priede aprašyto tarptautinio metodo tikslas – nustatyti Europos Parlamento ir Tarybos reglamento (ES) Nr. 1308/2013 ⁽¹⁾ VII priedo VIII dalies 1 punkte apibūdinto pirmojo spaudimo alyvuogių aliejaus organoleptinių savybių vertinimo procedūrą ir nustatyti jo klasifikavimo pagal tas charakteristikas metodą. Taip pat pateikiamos nuorodos dėl neprivalomo ženklinimo.

Apibūdintas metodas taikomas tik pirmojo spaudimo alyvuogių aliejams ir tokius aliejus klasifikuojant arba ženklinant pagal pajaustų trūkumų ir vaisių požymio stiprumą, apie kurį sprendžia atrinktų, apmokytų ir prižiūrimų degustuotojų grupė.

Taikoma paskutinė paskelbta šiame priede minimų TAAT standartų versija.

▼ **M26**

2. BENDRASIS PAGRINDINIS JUTIMINĖS ANALIZĖS ŽODYNAS

Žr. standartą IOC/T.20/Dok. Nr. 4 „Jutiminė analizė. Bendrasis pagrindinis žodynas“

3. SPECIALUSIS ŽODYNAS

3.1. **Neigiami požymiai**

Sudvisęs ir (arba) su drumzlinomis nuosėdomis Šis prieskonis būdingas aliejui, pagamintam iš kaupuose laikytų alyvuogių, kurių anaerobinis fermentavimo procesas buvo gerokai pažengęs į priekį, arba prieskonis, atsiradęs dėl ilgalaikio aliejaus sąlyčio su anaerobinį fermentavimo procesą taip pat patyrusiomis statinių ir talpyklų dekantavimo nuosėdomis.

Atsiduodantis pelėsiams, drėgme, žeme Šis prieskonis būdingas aliejams, pagamintiems iš vaisių, kuriuose užsiveisė didelis grybelių ir mielių bakterijų kiekis drėgnas alyvuoges kelias dienas palaikius supiltas į kaupus, arba aliejui, pagamintam iš alyvuogių, surinktų kartu su žemėmis, arba purvinų ir nenuplautų.

Vyno, acto, rūgštus, aitrus Tai kai kuriems aliejams būdingas prieskonis, primenantis vyną arba actą. Atsiranda daugiausia dėl aerobinio alyvuogių ar alyvuogių masės likučių blogai išplautuose dembliuose fermentacijos proceso, dėl kurio susidaro acto rūgštis, etilacetatas ir etanolis.

Apkartęs Šis prieskonis būdingas aliejams, paveiktiems stipraus oksidacijos proceso.

Šalnos pakąstos alyvuogės (drėgnos medienos) Šis prieskonis būdingas aliejams, išspaustiems iš šalnos medžiuose pakąstų alyvuogių.

⁽¹⁾ 2013 m. gruodžio 17 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentas (ES) Nr. 1308/2013, kuriuo nustatomas bendras žemės ūkio produktų rinkų organizavimas ir panaikinami Tarybos reglamentai (EEB) Nr. 922/72, (EEB) Nr. 234/79, (EB) Nr. 1037/2001 ir (EB) Nr. 1234/2007 (OL L 347, 2013 12 20, p. 671).

▼ **M28**3.1.1. *Kiti neigiami požymiai*

<i>Pakaitintas arba pridegęs.</i>	Šis prieskonis būdingas aliejams, kurie buvo per stipriai ir (arba) per ilgai kaitinami juos apdorojant, ypač jei terminis masės maišymas buvo atliekamas netinkamomis temperatūros sąlygomis.
<i>Šieno, medienos.</i>	Šis prieskonis būdingas kai kuriems aliejams, pagamintiems iš išdžiuvusių alyvuogių.
<i>Sunkus.</i>	Kai kurių senų aliejų burnoje sukeliamas tirštumo, klampumo pojūtis.
<i>Tepalų.</i>	Aliejaus prieskonis, primenantis dyzeliną, tepalą ar mineralinę alyvą.
<i>Augalinio vandens.</i>	Aliejaus prieskonis, atsiradęs dėl ilgo sąlyčio su fermentacijos paveiktu augaliniu vandeniu
<i>Sūrymo.</i>	Aliejaus, pagaminto iš alyvuogių, kurios buvo konservuojamos sūryme, prieskonis.
<i>Metalo.</i>	Prieskonis, primenantis metalą. Jis atsiranda dėl ilgalaikio aliejaus sąlyčio su metaliniais paviršiais gniuždymo, maišymo, spaudimo arba laikymo metu.
<i>Esparto.</i>	Šis prieskonis būdingas aliejui, pagamintam alyvuogės spaudžiant naujuose dembliuose iš esparto žolės. Prieskonis gali skirtis pagal tai, ar dembliai pagaminti iš žalios, ar iš džiovintos žolės.
<i>Kirmėlių.</i>	Aliejaus, pagaminto iš alyvuogių, kurias smarkiai pažeidė alyvmedžių musų (<i>Bactrocera oleae</i>) lervos, prieskonis.
<i>Agurkų.</i>	Prieskonis, atsirandantis, kai aliejus per ilgai laikytas sandariai uždarytuose induose, ypač skardinėse, ir siejamas su 2,6-nonadienolio susidarymu.

3.2. **Teigiami požymiai**

<i>Vaisių.</i>	Įvairūs aliejui būdingi uoslės pojūčiai, kurie priklauso nuo alyvuogių rūšies ir kuriuos aliejui suteikia gaminant naudotos sveikos, šviežios sunokusios arba nesunokusios alyvuogės. Pajuntami iš karto ir (arba) giliai nosyje.
<i>Kartus.</i>	Pagrindinis skonis, būdingas aliejui, pagamintam iš žalių arba iš pradedančių nokti alyvuogių. Jis pajaučiamas liežuvio šaknyje esančiais skonio svogūneliais.
<i>Aštrus.</i>	Juntamas geliantis pojūtis, būdingas aliejams, pagamintiems derliaus nuėmimo sezono pradžioje, daugiausia iš dar nesunokusių alyvuogių. Jį galima jausti visoje burnos ertmėje, ypač gerklėje.

▼ **M29**3.3. **Neprivalomi ženklavimo terminai**

Gavęs prašymą, degustuotojų grupės vadovas gali patvirtinti, kad įvertinti aliejai atitinka apibrėžtis ir parametrų intervalus, pagal kuriuos jie, atsižvelgiant į požymių stiprumą ir juntamumą, apibūdinami tik toliau nurodytais terminais.

▼ **M29**

Teigiami požymiai (vaisių skonis, kartumas ir aitrumas): pagal pojūčio stiprumą:

- *stiprus*, kai požymio mediana didesnė nei 6;
- *vidutinis*, požymio mediana yra nuo 3 iki 6;
- *silpnas*, kai požymio mediana mažesnė nei 3.

Vaisių skonis Įvairūs aliejaus sukeliama būdingi uoslės pojūčiai, kurie priklauso nuo alyvuogių rūšies ir kuriuos aliejui suteikia sveikos, šviežios alyvuogės, neturinčios nei žalių, nei sunokusių vaisių vyraujančio skonio. Pajuntami iš karto ir (arba) giliai nosyje.

Žalių vaisių skonis Įvairūs aliejaus sukeliama būdingi uoslės pojūčiai, kuriuos aliejui suteikia gaminant naudotos žalios, sveikos ir šviežios alyvuogės ir kurie primena žalių vaisių aromatą. Pajuntami iš karto ir (arba) giliai nosyje.

Sunokusių vaisių skonis Įvairūs aliejaus sukeliama būdingi uoslės pojūčiai, kuriuos aliejui suteikia gaminant naudotos sveikos ir šviežios alyvuogės ir kurie primena sunokusių vaisių aromatą. Pajuntami iš karto ir (arba) giliai nosyje.

Subalansuotas aliejus Aliejus, kuriam netrūksta uoslės, skonio ir lietimui pojūčių pusiausvyros (kurio kartumo mediana ir aitrumo mediana yra ne daugiau kaip dviem punktais didesnė nei vaisių skonio mediana).

Švelnus aliejus Aliejus, kurio kartumo ir aitrumo mediana yra ne didesnė kaip 2.

Terminų sąrašas pagal pojūčio stiprumą:

Terminas galima vartoti pateikus organoleptinio tyrimo sertifikatą	Pojūčio mediana
Vaisių skonio	—
Sunokusių vaisių skonio	—
Žalių vaisių skonio	—
Lengvo vaisių skonio	Mažiau nei 3
Vidutinio vaisių skonio	Nuo 3 iki 6
Stipraus vaisių skonio	Daugiau kaip 6
Lengvo sunokusių vaisių skonio	Mažiau nei 3
Vidutinio sunokusių vaisių skonio	Nuo 3 iki 6
Stipraus sunokusių vaisių skonio	Daugiau kaip 6
Lengvo žalių vaisių skonio	Mažiau nei 3

▼ **M29**

Terminus galima vartoti pateikus organoleptinio tyrimo sertifikatą	Pojūčio mediana
Vidutinio žalių vaisių skonio	Nuo 3 iki 6
Stipraus žalių vaisių skonio	Daugiau kaip 6
Lengvai kartus	Mažiau nei 3
Vidutiniškai kartus	Nuo 3 iki 6
Stipriai kartus	Daugiau kaip 6
Lengvai aitrus	Mažiau nei 3
Vidutiniškai aitrus	Nuo 3 iki 6
Stipriai aitrus	Daugiau kaip 6
Subalansuotas aliejus	Kartumo mediana ir aitrumo mediana yra ne daugiau kaip 2 punktais didesnės nei vaisių skonio mediana.
Švelnus aliejus	Kartumo mediana ir aitrumo mediana yra ne didesnės kaip 2

▼ **M26**

4. ALIEJAUS DEGUSTAVIMO STIKLINĖ

Žr. standartą IOC/T.20/Dok. Nr. 5 „Aliejaus degustavimo stiklinė“.

5. DEGUSTAVIMO PATALPOS

Žr. standartą IOC/T.20/Dok. Nr. 6 „Degustavimo patalpų įrengimo vadovas“.

6. REIKMENYS

Kiekviename degustavimo kambaryje turi būti šie degustuotojams reikalingi ir lengvai pasiekiami reikmenys, kad degustuotojai galėtų tinkamai atlikti savo užduotį:

- stiklinės (standartinės) su mėginiais, pažymėtos kodo numeriais, uždengtos išgaubtais dangteliais ir laikomos $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje;
- savybių vertinimo lapas (žr. 1 pav.), kuris pateikiamas popierine arba elektronine forma, laikantis savybių vertinimo lapui taikomų sąlygų, ir, prireikus, jo naudojimo nurodymai;
- rašiklis arba nenuplaunamas rašalas;
- padėklai su obuolio skiltelėmis ir (arba) vandeniu, gazuotu vandeniu ir (arba) saldžiais džiovėsėliais;
- stiklinės su kambario temperatūros vandeniu;
- lapas, kuriame primenamos 8.4 ir 9.1.1 skirsniuose išvardytos bendrosios taisyklės;
- spjaudyklės.

▼ **M26****7. DEGUSTUOTOJŲ GRUPĖS VADOVAS IR DEGUSTUOTOJAI****7.1. Degustuotojų grupės vadovas**

Degustuotojų grupės vadovas turi būti tinkamai parengtas asmuo, turintis ekspertinių žinių apie įvairias aliejų rūšis, su kuriomis susidurs savo darbe. Tai pagrindinis grupės narys, atsakingas už jos darbo organizavimą ir veiklą.

Degustuotojų grupės vadovas dėl savo darbo pobūdžio turi būti bendrai išmokytas naudoti jutiminės analizės priemonės ir naudotis jutimaisiais įgūdžiais, gebėti kruopščiai rengti bandymus, juos organizuoti ir vykdyti ir turi turėti įgūdžių bei kantrybės moksliškai planuoti bandymus ir juos vykdyti.

Tai vienintelis asmuo, atsakingas už degustuotojų atranką, mokymą ir stebėjimą, atliekamą jų tinkamumo lygiui nustatyti. Taigi jis yra atsakingas už degustuotojų vertinimą, kuris visada turi būti objektyvus ir kuriam atlikti jis turi būti parengęs konkrečias procedūras, pagrįstas testais ir patikimais priėmimo ir atmetimo kriterijais. Žr. standartą IOC/T.20/Dok. Nr. 14 „Kvalifikuotų pirmojo spaudimo alyvuogių aliejaus degustuotojų atrankos, mokymo ir stebėjimo vadovas“.

Degustuotojų grupės vadovas atsakingas už degustuotojų grupės veiklos rezultatus, taigi ir už jų vertinimą, kurį jis turi pagrįsti patikimais ir objektyviais įrodymais. Bet kokių atveju jis turi gebėti bet kada įrodyti, kad taikomas degustavimo metodas ir degustuotojai yra kontroliuojami. Degustuotojų grupę rekomenduojama periodiškai tikrinti (IOC/T.20/Dok. Nr. 14, 5 dalis).

Degustuotojų grupės vadovui tenka didžiausia atsakomybė už degustuotojų grupės dokumentų saugojimą. Šiuos dokumentus visada turi būti įmanoma atsekti. Jis turi laikytis tarptautiniuose jutiminės analizės standartuose nustatytų patikrinimo ir kokybės reikalavimų ir visais atvejais užtikrinti mėginių anonimiškumą.

Degustuotojų grupės vadovas atsakingas už inventurizaciją, jis turi užtikrinti, kad prietaisai ir įranga, reikalingi šio metodo specifikacijoms vykdyti, būtų tinkamai valomi ir prižiūrimi, ir turi saugoti rašytinius tokios priežiūros ir bandymų sąlygų laikymosi įrodymus.

Jis yra atsakingas už mėginių priėmimą ir saugojimą juos pristčius į laboratoriją, taip pat už jų saugojimą atlikus tyrimą. Vykdydamas šią pareigą, jis nuolat užtikrina, kad mėginiai būtų anonimiški ir tinkamai saugomi, o šiuo tikslu turi parengti rašytines procedūras, kurias taikant būtų užtikrinta, kad visas procesas būtų atsekamas, o jo rezultatai – garantuoti.

Be to, jis yra atsakingas už mėginių paruošimą, žymėjimą kodais ir pateikimą degustuotojams pagal atitinkamą eksperimentų planą, parengtą pagal iš anksto nustatytus protokolus, taip pat už degustuotojų gautų duomenų surinkimą ir jų statistinį apdorojimą.

Degustuotojų grupės vadovas yra atsakingas už visų kitų procedūrų, kurių galėtų pririekti šiam standartui papildyti, rengimą ir įforminimą dokumentais ir už užtikrinimą, kad degustuotojų grupė tinkamai veiktų.

Jis turi ieškoti būdų degustuotojų grupės rezultatus palyginti su kitų pirmojo spaudimo alyvuogių aliejaus analizę atliekančių grupių gautais rezultatais, kad įsitikintų, jog grupė tinkamai dirba.

▼ M26

Degustuotojų grupės vadovas privalo motyvuoti grupės narius skatinamas jų domėjimąsi, smalsumą ir tarpusavio konkurencijos dvasią. Todėl jam primygtinai rekomenduojama užtikrinti sklandų abipusį keitimąsi informacija su grupės nariais, nuolat informuojant juos apie visas užduotis, kurias jie atlieka, ir apie gautus rezultatus. Be to, jis turi užtikrinti, kad jo nuomonė nebūtų žinoma, ir turi neleisti galimiems lyderiams primesti savo kriterijų kitiems degustuotojams.

Jis turi pakankamai iš anksto sukviesti degustuotojus ir atsakyti į visus klausimus dėl bandymų atlikimo, tačiau neturi siūlyti jiems jokios nuomonės apie mėginį.

▼ M28**7.1.1. Degustuotojų grupės vadovo pavaduotojas**

Degustuotojų grupės vadovą dėl pateisinamų priežasčių gali pakeisti degustuotojų grupės vadovo pavaduotojas, kuris gali laikinai atlikti pareigas, susijusias su bandymų atlikimu. Šis pavaduotojas turi turėti visus grupės vadovui būtinus įgūdžius.

7.2. Degustuotojai

Asmenys, kurie kaip degustuotojai dalyvauja atliekant organoleptinius alyvuogių aliejų tyrimus, tai turi daryti savanoriškai. Todėl patartina, kad kandidatai paraišką teiktų raštu. Degustuotojų grupės vadovas kandidatus atrenka, parengia ir stebi remdamasis jų gebėjimu atskirti panašius mėginius; reikėtų atminti, kad po mokymų jų tikslumas padidės.

Degustuotojai turi elgtis kaip tikrieji jutimų stebėtojai, nepaisantys savo asmeninių skonių ir nurodantys tik juntamus pojūčius. Todėl jie visada turi dirbti tyloje, be įtampos ir skubos, kuo labiau sutelkdami savo jautimus į degustuojamą mėginį.

Kiekvienam bandymui atlikti reikia 8–12 degustuotojų, nors būtų pravartu nuolat turėti keletą papildomų atsarginių degustuotojų, kuriuos būtų galima iškviesti, kitiems negalint dalyvauti.

▼ M26**8. BANDYMO SĄLYGOS****8.1. Mėginio pateikimas**

Aliejaus mėginys analizei pateikiamas standartinėse degustavimo stiklinėse, atitinkančiose standartą IOC/T.20/Dok. Nr. 5 „Aliejaus degustavimo stiklinė“.

Stiklinėje yra įpilta 14–16 ml aliejaus, arba 12,8–14,6 g, jeigu mėginiai turi būti pasveriami, ir ji uždengta išgaubtu dangteliu.

Kiekviena stiklinė pažymėta kodu, kurį sudaro atsitiktine tvarka parinkti skaitmenys arba raidžių ir skaitmenų derinys. Kodas bus pažymėtas pašalinio kvapo neturinčiu rašikliu.

8.2. Bandymo ir mėginio temperatūra

Degustavimui skirti aliejaus mėginiai viso bandymo metu laikomi stiklinėse $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ temperatūroje. Ši temperatūra pasirinkta dėl to, kad pastebėti organoleptinius skirtumus esant tokiai temperatūrai yra lengviau nei aplinkos temperatūroje; esant žemesnei temperatūrai, šiems aliejams būdingi aromatiniai junginiai prastai išsiskiria, o esant aukštesnei temperatūrai formuojasi lakūs junginiai, būdingi pakaitintam aliejui. Dėl metodo, kurį reikia naudoti mėginiams stiklinėje kaitinti, žr. standartą IOC/T.20/Dok. Nr. 5 „Aliejaus degustavimo stiklinė“.

▼ **M26**

Temperatūra degustavimo patalpose turi siekti 20–25 °C (žr. IOC/T.20/Dok. Nr. 6).

8.3. **Bandymo laikas**

Aliejus geriausia degustuoti ryte. Įrodyta, kad kai kuriais dienos laikotarpiais skonis ir kvapas jaučiami optimaliausiai. Laikotarpiu prieš valgį jautrumas kvapams ir skoniams padidėja, o paskui jis silpnėja.

Tačiau taikant šį kriterijų neturėtų būti puolama į kraštutinumą, nes degustuotojus galėtų blaškyti alkis, o dėl to sumažėtų jų atpažinimo gebėjimas; todėl degustavimui rekomenduojama skirti laiką nuo 10 val. ryto iki vidurdienio.

8.4. **Degustuotojai. Bendrosios elgesio taisyklės**

Degustuotojų elgesiui darbe taikomos tokios rekomendacijos.

Degustuotojų grupės vadovo pakviesti dalyvauti organoleptiniame tyrime degustuotojai turėtų įstengti atvykti iš anksto nustatytu laiku ir turi laikytis tokių taisyklių:

- nerūkyti ir negerti kavos bent 30 minučių iki bandymui nustatyto laiko;
- nenaudoti jokių kvepalų, kosmetikos ar muilo, kurio kvapas galėtų išlikti iki bandymo laiko. Rankoms nusiplauti jie privalo naudoti nekvėpintą muilą; rankas jie turi skalauti ir šluostyti taip dažnai, kaip gali būti būtina bet kokiam kvapui pašalinti;
- nevalgyti bent valandą iki degustavimo;
- jeigu jie fiziškai prastai jaučiasi, visų pirma jei yra sutrikęs jų kvapo ar skonio jausmas, arba jeigu jie jaučia kokią nors psichologinį poveikį, dėl kurio negali sutelkti dėmesio į darbą, degustuotojai neturi degustuoti ir turi atitinkamai apie tai pranešti degustuotojų grupės vadovui;
- įvykdę minėtus reikalavimus, degustuotojai turi tvarkingai ir tyliai užimti jiems degustavimo kambaryje skirtą vietą;
- atidžiai perskaityti savybių vertinimo lape pateiktus nurodymus ir nepradėti nagrinėti mėginio, kol nebus visiškai pasirengę užduočiai, kurią turi atlikti (atsipalaiduoti ir neskubėti). Kilus kokių nors abejonių, jie turėtų kitiems negirdint kreiptis į degustuotojų grupės vadovą;
- atlikdami savo užduotis nekalbėti;
- jų mobilusis telefonas visą laiką turi būti išjungtas, kad netrukdytų susikaupti ir kolegoms dirbti.

9. **PIRMOJO SPAUDIMO ALYVUOGIŲ ALIEJAUS ORGANOLEPTINIO VERTINIMO IR KLASIFIKAVIMO PROCEDŪRA**9.1. **Degustavimo metodas**▼ **M29**

- 9.1.1. Degustuotojai pakelia stiklinę, uždengtą išgaubtu stikliniu dangteliu, ir švelniai ją palenkia; šioje padėtyje jie suka stiklinę, kad kuo labiau suvilgytų vidinę stiklinės sienelę. Užbaigę šį etapą, jie nuima išgaubtą stiklinį dangtelį ir, lėtai ir giliai įkvėpdami, uosto mėginį, kad įvertintų aliejų. Turėtų būti uostoma ne ilgiau kaip 30 sekundžių. Jeigu per šį laiką jokios išvados nepadaryta, jie padaro trumpą pertraukėlę ir uosto dar kartą.

▼ **M29**

Atlikę uostymo analizę, degustuotojai vertina pojūčius burnoje (bendri pojūčiai – kvapas giliai nosyje, skonis ir lietimasis). Tam jie išgeria maždaug 3 ml aliejaus gurkšnelį. Labai svarbu aliejų paskleisti po visą burnos ertmę – nuo priekinės burnos dalies ir liežuvio palei šonus iki užpakalinės dalies, gomurio galo ir gerklės, nes yra žinoma, kad skonio ir lietimasis pojūčiai skirtingose liežuvio, gomurio ir gerklės vietose yra nevienodai stiprūs.

Reikėtų pabrėžti, kad svarbu pakankamą aliejaus kiekį ant užpakalinės liežuvio dalies link gomurio ir gerklės paskleisti labai lėtai, degustuotojui sutelkiant dėmesį į tai, kokia tvarka juntami kartumo ir aitrumo dirgikliai. Jei to nepadaroma, kai kuriuose aliejuose abiejų šių dirgiklių galima nepastebėti arba kartumo dirgiklį gali užgožti aitrumo dirgiklis.

Trumpai ir nuosekliai įkvėpdamas per burną degustuotojas gali ne tik plačiai paskleisti mėginį po visą burną, bet ir, stengdamasis naudoti nosies užpakalinę dalį, pajusti lakiuosius aromatinius junginius.

Pastaba. Kai degustuotojai ėminyje nejaučia vaisių skonio, o klasifikuojamojo neigiamo požymio stiprumas yra 3,5 arba mažesnis, degustuotojų grupės vadovas gali nuspręsti, kad degustuotojai dar kartą vertins ėminį (aplinkos temperatūros) (COI/T.20/Doc. Nr. 6/Rev. 1, 2007 m. rugsėjo mėn., 3 skirsnis „Tyrimų patalpos įrengimo bendrosios sąlygos“ (angl. „General specifications for installation of a test room“), nurodydamas aplinkos temperatūros sąlygas ir paaiškindamas jos sąvoką. Ėminiui pasiekus kambario temperatūrą, degustuotojai turėtų jį dar kartą įvertinti vien tam, kad patikrintų, ar jaučiamas vaisių skonis. Jei jis jaučiamas, jo stiprumas pažymimas skalėje.

Reikėtų atsižvelgti į su aitrumu susijusį lietimasis pojūtį. Todėl patartina aliejų nuryti.

▼ **M26**

- 9.1.2. Kad būtų išvengta kontrasto efekto, kuris galėtų atsirasti iš karto ragaujant kitus mėginius, organoleptiškai vertinant pirmojo spaudimo alyvuogių aliejų per vieną degustaciją rekomenduojama įvertinti ne daugiau kaip KETURIS MĖGINIUS ir per dieną rengti ne daugiau kaip tris degustacijas.

Nuoseklūs ragavimai sukelia nuovargį arba dėl pirmiau ragautų mėginių netenkama jautrumo, todėl būtina vartoti produktą, kuris iš burnos gali pašalinti prieš tai ragauto aliejaus likučius.

Rekomenduojama suvalgyti nedidelę obuolio skiltelę, kurią sukramčius galima išspjauti į spjaudyklę. Paskui burna skalaujama nedideliu kiekiu kambario temperatūros vandens. Tarp vienos degustacijos pabaigos ir kitos pradžios turi praeiti ne mažiau kaip 15 minučių.

9.2. Degustuotojų pildomas savybių vertinimo lapas

Savybių vertinimo lapas, kurį turi pildyti degustuotojai, pateikiamas šio priedo 1 paveiksle.

Kiekvienas degustuotojų grupei priklausantis degustuotojas uosto, o po to ragauja ⁽¹⁾ analizuojamą aliejų. Paskui pateiktame savybių vertinimo lape 10 cm skalėje jie pažymi kiekvieno iš pajustų neigiamų ir teigiamų požymių stiprumą.

⁽¹⁾ Jie gali aliejaus neragauti, jeigu tiesiogiai užuodžia labai stiprų neigiamą požymį, ir šią išimtinę aplinkybę pažymi vertinimo lape.

▼ **M26**

Pajutę kokių nors 4 skirsnyje neišvardytų neigiamų požymių, degustuotojai juos turi nurodyti skiltyje „Kita“, vartodami kuo tiksliau tuos požymius apibūdinančią sąvoką ar sąvokas.

▼ **M28**9.3. **Degustuotojų grupės vadovo atliekamas duomenų tvarkymas**

Degustuotojų grupės vadovas surenka kiekvieno degustuotojo užpildytus savybių vertinimo lapus ir patikrina nurodytus įvairių požymių stiprumo įvertinimus. Pastebėjęs ką nors neįprasto, jis paprašo degustuotojo peržiūrėti savo savybių vertinimo lapą ir prireikus pakartoti bandymą.

Degustuotojų grupės vadovas įveda kiekvieno degustuotojų grupės nario įvertinimo duomenis į kompiuterinę programą, pvz., nustatytą standartu IOC/T.20/ Doc No 15, kad būtų statistiškai apskaičiuoti medianos skaičiavimu pagrįsti analizės rezultatai. Žr. šio priedo 9.4 skirsnį ir priedėlį. Atskiro mėginio duomenys įvedami naudojant matricą, kurią sudaro 9 jutimo požymius atitinkančios 9 skiltys ir n eilučių, atitinkančių n degustuotojų.

Jei kokį nors trūkumą pajunta ir skiltyje „Kita“ nurodo ne mažiau kaip 50 % degustuotojų grupės narių, degustuotojų grupės vadovas apskaičiuoja šio trūkumo medianą ir nustato atitinkamą klasifikaciją.

Klasifikaciją (labiausiai pajautą trūkumą ir vaisių požymį) apibrėžiančio stabilaus variacijos koeficiento vertė turi būti ne didesnė nei 20 %.

Priešingu atveju degustuotojų grupės vadovas turi pakartotinai atlikti konkretaus mėginio įvertinimą per kitą degustaciją.

Jei tokie atvejai pasitaiko dažnai, degustuotojų grupės vadovui rekomenduojama organizuoti specialų papildomą degustuotojų mokymą (IOC/T.20/ Doc No 14, 5 dalis) ir taikyti pakartojamumo bei nuokrypio rodiklius degustuotojų grupės veiklos rezultatams tikrinti (IOC/T.20/ Doc No 14, 6 dalis).

▼ **M29**9.4. **Aliejaus klasifikavimas**

Atsižvelgiant į trūkumų medianą ir vaisių skonio medianą, aliejus priskiriamas kuriai nors iš toliau nurodytų kategorijų. Trūkumų mediana – stipriausiai pajauto trūkumo mediana. Trūkumų mediana ir vaisių skonio mediana išreiškiamos vienos dešimtosios tikslumu.

Aliejaus rūšis nustatoma lyginant trūkumų medianos ir vaisių skonio medianos vertes su toliau nustatytais etaloniniais intervalais. Šių intervalų ribos nustatytos atsižvelgiant į metodo paklaidas, todėl tos ribos laikomos absoliučiomis. Naudojant programinę įrangą rūšiavimą galima atvaizduoti statistikos duomenų lentelėje arba diagramoje.

- a) Aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus: trūkumų mediana lygi 0, o vaisių skonio mediana didesnė nei 0;
- b) pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus: trūkumų mediana didesnė nei 0, bet ne didesnė kaip 3,5, o vaisių skonio mediana didesnė nei 0;
- c) klasikinis pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus lampante: trūkumų mediana didesnė nei 3,5 arba trūkumų mediana ne didesnė nei 3,5, o vaisių skonio mediana lygi 0.

▼ **M29**

1 pastaba. Jeigu kartumo ir (arba) aitrumo mediana yra didesnė nei 5,0, degustuotojų grupės vadovas tai pažymi aliejaus analizės sertifikate.

Jei aliejus vertinamas atitikčiai kontroliuoti, atliekamas vienas bandymas. Priešingų vertinimų atveju analizė atliekama du kartus – per skirtingas degustacijas. Dvigubos analizės rezultatai turi būti statistiškai homogeniški. (Žr. 9.5 punktą.) Jei taip nėra, ėminys vėl analizuojamas du kartus. Klasifikavimo požymių medianos galutinė vertė apskaičiuojama remiantis abiejų medianų vidurkiu.

9.5. Dvigubos analizės rezultatų priėmimo arba atmetimo kriterijai

Toliau apibrėžta normalizuotoji paklaida naudojama nustatyti, ar per dvigubą analizę gauti du rezultatai yra homogeniški arba statistiškai priimtini:

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

čia Me_1 ir Me_2 yra dvigubos analizės (t. y. pirmos ir antros analizės) rezultatų medianos, o U_1 ir U_2 yra tų dviejų verčių išplėtosios neapibrėžtys, apskaičiuotos pagal priedėlį, kaip nurodyta toliau:

$$U_1 = c \times s^* \text{ and } s^* = \frac{(CV_r \times Me_1)}{100}$$

Išplėtosios neapibrėžties atveju $c = 1,96$; taigi

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

čia CV_r yra stabilus variacijos koeficientas.

Kad galima būtų teigti, jog dvi gautos vertės nėra statistiškai skirtingos, E_n turi būti lygi arba mažesnė už 1,0.

▼ **M26***Priedėlis***Medianos ir pasikliautiniųjų intervalų apskaičiavimo metodas****Mediana**

$$Me = [p(X < x_m) \leq \frac{1}{2} \wedge p(X \leq x_m) \geq \frac{1}{2}]$$

Mediana – tai realusis skaičius X_m , apibrėžiamas taip: tikimybė (p), kad sklaidos dydžiai (X) yra mažesni už šį skaičių (X_m), yra mažesnė nei 0,5 arba lygi šiai vertei, o tikimybė (p), kad sklaidos dydžiai (X) yra mažesni nei X_m arba jam lygūs, tuo pačiu metu yra didesnė nei 0,5 arba lygi šiai vertei. Pagal praktiškesnę apibrėžtį mediana yra 50-asis sklaidos dydžių, išdėstytų didėjančia tvarka, procentilis. Paprasčiau sakant, mediana yra vidurinis tam tikra tvarka išrikiuotų nelyginių skaičių rinkinio dydis arba tam tikra tvarka išrikiuotų lyginių skaičių rinkinio dviejų vidurinių skaičių vidurkis.

Stabilus standartinis nuokrypis

Norint patikimai apskaičiuoti su vidurkiu susijusį kintamumą, būtina remtis stabilium standartiniu nuokrypiu, apskaičiuojamu Stuardo ir Kendallo metodu (4). Taikant formulę nustatomas asimptotinis stabilus standartinis nuokrypis, t. y. stabilus nagrinėjamųjų duomenų kintamumo apskaičiavimas, kur N yra stebėjimų skaičius, o IQR – tarpkvartilinis nuotolis, kuris tiksliai apima 50% visų bet kurios tikimybės sklaidos atvejų:

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

Tarpkvartilinis nuotolis nustatomas apskaičiuojant skirtumo tarp 75-ojo ir 25-ojo procentilių dydį.

$$\text{IQR} = 75 - \text{asis procentilis} - 25 - \text{asis procentilis},$$

čia procentilis – tai dydis X_{pc} , apibrėžiamas taip: tikimybė (p), kad sklaidos dydžiai yra mažesni už X_{pc} , yra mažesnė nei konkreti šimtoji arba jai lygi, o tikimybė (p), kad sklaidos dydžiai yra mažesni nei X_{pc} arba lygūs šiam dydžiui, tuo pačiu metu yra didesnė nei ta konkreti šimtoji arba jai lygi. Šimtoji – tai pasirinkta sklaidos trupmena. Medianos atveju tai lygu 50/100.

$$\text{procentilis} = [p(X < x_{pc}) \leq \frac{n}{100} \wedge p(X \leq x_{pc}) \geq \frac{n}{100}]$$

Praktiškai procentilis – tai sklaidos dydis, atitinkantis konkretų plotą, pažymėtą pagal sklaidos arba tankio kreivę. Pavyzdžiui, 25-asis procentilis – tai sklaidos dydis, atitinkantis plotą, lygų 0,25 arba 25/100.

Taikant šį metodą procentiliai apskaičiuojami remiantis realiomis vertėmis, kurios pateikiamos duomenų matricoje (procentilių apskaičiavimo procedūra).

Stabilus variacijos koeficientas (%)

$CV_r\%$ - tai bedimensis dydis, rodantis procentinį analizuojamų skaičių rinkinio kintamumo dydį. Todėl jis labai naudingas degustuotojų grupės vertintojų patikimumui tikrinti.

$$CV_r = \frac{s^*}{Me} \times 100$$

▼ M26**95% pasikliautiniai medianos intervalai**

95% (pirmos rūšies paklaidos dydis lygus 0,05 arba 5%) pasikliautiniai intervalai parodo intervalą, kuriame galėtų kisti medianos dydis, jei eksperimentą būtų galima kartoti iki begalybės. Praktiškai jis parodo bandymo kintamumo intervalą patvirtintomis darbo sąlygomis darant prielaidą, kad tą bandymą galima kartoti daug kartų. Kaip ir $CV\%$, šis intervalas padeda įvertinti bandymo patikimumą.

$$P.I._{virš.} = Me + (c \times s^*)$$

$$P.I._{apat} = Me - (c \times s^*)$$

čia $C = 1,96$, jei pasikliautinasis intervalas yra 95%.

Apskaičiavimo lapo pavyzdys pateikiamas standarto IOC/T 20/Dok. Nr. 15 I priede.

Literatūra

- 1) L. Wilkinson, 1990. *Systat: The system for statistics*. Evanston, IL.SYSTAT Inc.
- 2) G. Cicchitelli, 1984. *Probabilità e Statistica*. Maggioli Editore, Rimini.
- 3) D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, Y. Deming, L. Michotte, 1988. *Chemometrics. A textbook*. Elsevier. Amsterdam.
- 4) M. G. Kendall, A. Stuart, A. 1967. *The advanced theory of statistics. Vol. 1*. Hafner Publishing Co.
- 5) R. McGill, J. W. Tukey, W. A. Larsen, 1978. *Variation of Box Plots. The American Statistician*, 32, (2), p. 12–16.
- 6) IOC/T.28/Doc. Nr. 1 September 2007, *Guidelines for the accreditation of sensory testing laboratories with particular reference to virgin olive oil according to standard ISO/IEC 17025:2005*.
- 7) IOC/T.20/Doc. Nr. 14.
- 8) IOC/T.20/Doc. Nr. 15.
- 9) ISO/IEC 17025:05.

▼ M20

▼ M19

▼ B*XV PRIEDAS***1. ALIEJAUS KIEKIO ALYVUOGIŲ ATLIEKOSE NUSTATYMAS****1.1. Aparatūra**

- tinkamas ekstrahavimo aparatas su 200–250 ml talpos apvaliadugne kolba,
- elektra kaitinama vonia (pvz., smėlio vonia, vandens vonia) arba elektrinė viryklė,
- analizinės svarstyklės,
- džiovavimo spinta, reguliuojama ne daugiau kaip iki 80 °C temperatūros,
- elektrinė džiovavimo spinta su 103 ± 2 °C temperatūrai nustatytu termostataavimo įtaisu, per kurią būtų galima pūsti orą ir dirbti sumažintame slėgyje,
- mechaninis, lengvai valomas malūnas, kuriame alyvuogių atliekos gali būti sumaltos nepakeliant jų temperatūros arba jose žymiai nepakeičiant drėgmės, lakiųjų arba heksanu ekstrahuojamų medžiagų kiekio,
- ekstrahavimo tūta ir vata arba filtravimo popierius, iš kurių yra pašalintos heksanu ekstrahuojamos medžiagos,
- eksikatorius,
- sietas su 1 mm skersmens akutėmis,
- iš anksto išdžiovintos pemzos gabaliukai.

1.2. Reagentas

Techniškai grynas *n*-heksanas, kurio 100 ml visiškai išgarinus turi likti ne didesnės kaip 0,002 g masės likutis.

2. DARBO EIGA**2.1. Analizuojamo bandinio ruošimas**

Prireikus laboratorinį bandinį sumalti, kad visos dalelės sumažėtų iki sijojamo dydžio, naudojamas mechaninis malūnas, kuris prieš tai gerai išvalomas.

Maždaug dvidešimtoji bandinio dalis sunaudojama malūno valymui užbaigti, sumalta medžiaga išmetama, likusi dalis malama, surenkama, kruopščiai sumaišoma ir iš karto analizuojama.

2.2. Analizuojamo bandinio dalis

Užbaigus malimo operaciją, 0,01 g tikslumu analizei pasverama maždaug 10 g bandinio.

2.3. Ekstrahavimo tūtos ruošimas

Analizuojama dalis sudedama į tūtą, kuri užkemšama vata. Jei naudojamas filtravimo popierius, analizuojama bandinio dalis suvyniojama į jį.

2.4. Išankstinis džiovinimas

Jei alyvuogių atliekos yra labai drėgnos (t. y. drėgmės ir lakiųjų medžiagų kiekis didesnis kaip 10 %), jos iš anksto džiovinamos, užpildytą tūtą (arba filtravimo popierių) laikant reikiamą laiką džiovavimo spintoje, kaitinamoje ne daugiau kaip iki 80 °C, kad drėgmės ir lakiųjų medžiagų kiekis sumažėtų iki mažiau kaip 10 %.

▼B**2.5. Apvaliadugnės kolbos ruošimas**

Kolba su vienu arba dviem gabaliukais pemzos, prieš tai išdžiovinta džiovinimo spintoje 103 ± 2 °C temperatūroje ir ne trumpiau kaip valandą aušinta eksikatoriuje, pasverama 1 mg tikslumu.

2.6. Pradinis ekstrahavimas

Į ekstrahavimo aparatą įkišama tūta (arba filtro popierius) su analizuojama bandinio dalimi. Į kolbą įpilamas reikiamas kiekis heksano. Kolba prijungiama prie ekstrahavimo aparato ir viskas įstatoma į elektra šildomą vonią. Šildymas nustatomas taip, kad tekėjimo atgal greitis būtų ne mažesnis kaip trys lašai per sekundę (vidutinis, ne audringas virimas). Po keturių ekstrahavimo valandų paliekama ataušti. Tūta išimama iš ekstrahavimo aparato ir įsigėrusio tirpiklio didesnei daliai pašalinti pakišama po oro srove.

2.7. Antrasis ekstrahavimas

Tūtos turinys iškratomas į mažą grūstuvę ir kiek galima smulkiau sumalamas. Sumaltas mišinys be nuostolių vėl supilamas į tūtą, kuri dedama atgal į ekstrahavimo aparatą.

Ekstrahuojama dar dvi valandas toje pačioje apvaliadugnėje kolboje su pradiniu ekstraktu.

Ekstrahavimo kolboje gautas tirpalas turi būti skaidrus. Jei taip nėra, tirpalas filtruojamas per filtravimo popierių, paskui kolba, kurioje jis buvo laikomas, bei filtravimui naudotas popierius kelis kartus plaunami heksanu. Filtratas ir plovimo tirpiklis supilami į antrą apvaliadugnę kolbą, kuri buvo išdžiovinta ir pasverta 1 mg tikslumu.

2.8. Tirpiklio šalinimas ir ekstrakto svėrimas

Didesnė tirpiklio dalis pašalinama distiliuojant ant elektra šildomos vonios. Paskutiniai tirpiklio pėdsakai šalinami kolbą 20 minučių kaitinant džiovinimo spintoje 103 ± 2 °C temperatūroje. Tirpiklio šalinimas greitinamas pučiant orą, geriausia inertines dujas, arba džiovinant sumažintame slėgyje.

Kolba ne trumpiau kaip valandą paliekama eksikatoriuje ataušti ir pasverama 1 mg tikslumu.

Kolba pašildoma dar kartą 10 minučių tomis pačiomis sąlygomis, ataušinama eksikatoriuje ir vėl pasverama.

Skirtumas tarp dviejų svėrimų neturi viršyti 10 mg. Jei jis didesnis, šildoma dar po 10 minučių, paskui aušinama ir sverama, kol skirtumas sumažėja iki 10 mg arba mažiau. Paskutinė kolbos masės vertė užrašoma.

Atliekama pakartotina paties bandinio analizė.

3. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS**3.1. Apskaičiavimo metodas ir formulė**

a) Ektrakto kiekis, analizei gauto bandinio masės procentais, skaičiuojamas pagal formulę:

$$S = m_1 \times \frac{100}{m_0},$$

▼B

kurioje: S = ekstrakto kiekis analizei gauto bandinio masės procentais,

m_0 = bandinio analizuojamos dalies masė gramais,

m_1 = išdžiovinto ekstrakto masė gramais.

Rezultatu imamas pakartotinių nustatymų vidurkis, jei buvo laikomasi pakartojamumo sąlygų.

Rezultatas skaičiuojamas vieno ženklo po kablelio tikslumu.

- b) Ektrakto kiekis, procentais išdžiovinto bandinio masei, skaičiuojamas pagal formulę:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{aliejaus ekstrakto kiekis procentais, skaičiuojant sausai medžiagai,}$$

kurioje: S = ekstrakto kiekis analizei gauto bandinio masės procentais (žr. a punktą),

U = drėgmės ir lakiųjų medžiagų kiekis bandinyje.

3.2. Pakartojamumas

Dviejų rezultatų, gautų tam pačiam analitikui lygiagrečiai arba greitai paeiliui atliekant du nustatymus, skirtumas neturi viršyti 0,2 g heksaninio ekstrakto 100 gramų bandinio.

Jei ši sąlyga neįvykdoma, analizė pakartojama su kitomis dviem bandinio dalimis. Jei ir šiuo atveju skirtumas didesnis kaip 0,2 g, rezultatu imamas šių keturių nustatymų aritmetinis vidurkis.



XVI PRIEDAS

JODO SKAIČIAUS NUSTATYMAS

1. TAIKYMO SRITIS

Šis tarptautinis standartas tiksliai apibrėžia metodą gyvulinių ir augalinių riebalų bei aliejų, toliau vadinamų riebalais, jodo skaičiui nustatyti.

2. APIBRĖŽIMAS

Šiame tarptautiniame standarte vartojamas toks apibrėžimas:

- 2.1. *Jodo skaičius*. Masė jodo, kurį bandinys sugeria šiame tarptautiniame standarte nurodytomis sąlygomis.

Jodo skaičius skaičiuojamas jodo gramais 100 g bandinio.

3. METODO ESME

Analizuojama bandinio dalis ištirpinama tirpiklyje ir pridedama *Wijs* reagento. Po tam tikro laiko įpilama kalio jodido tirpalo bei vandens ir išsiskyręs jodas titruojamas natrio tiosulfato tirpalu.

4. REAGENTAI

Visi reagentai turi būti pripažintos analiziškai grynų reagentų kokybės:

- 4.1. *vanduo*, atitinkantis ISO 3696 reikalavimus, 3 rūšis;

- 4.2. *kalio jodidas*. 100 g/l tirpalas, be jodato arba laisvo jodo;

- 4.3. *krakmolo* tirpalas;

5 g tirpaus krakmolo sumaišoma su 30 ml vandens, mišinys supilamas į 1 000 ml verdančio vandens, tris minutes virinama ir paliekama ataušti;

- 4.4. *natrio tiosulfatas*, etaloninis tirpalas titruoti voliumometriškai, kurio $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$, ir kurio titras nustatomas ne anksčiau kaip septynios dienos prieš naudojimą;

- 4.5. *tirpiklis*, ruošiamas sumaišant lygiomis dalimis cikloheksaną ir acto rūgštį;

- 4.6. *Wijs reagentas*, kurį sudaro jodo monochlorido tirpalas acto rūgštyje. Naudojamas prekyboje esantis *Wijs* reagentas.

5. APARATŪRA

Įprasta laboratorinė įranga ir konkrečiai tokia:

- 5.1. *svėrimui skirtos stiklinės bertuvėlės*, pritaikytos bandiniui ir įdėjimui į kolbas (5.2);

- 5.2. *kūginės kolbos*, 500 ml talpos, su šlifo kamščiais ir visiškai sausos.

6. ANALIZUOJAMO BANDINIO RUOŠIMAS

Homogenizuotas bandinys džiovinamas virš natrio sulfato ir filtruojamas.

7. DARBO EIGA

- 7.1. Analizuojamo bandinio dalis

Analizuojamos bandinio dalies masė priklauso nuo numatomo jodo skaičiaus, kaip tai parodyta 1 lentelėje.

▼B

I lentelė

Numatomas jodo skaičius	Analizuojamos bandinio dalies masė (g)
mažesnis kaip 5	3,00
5–20	1,00
21–50	0,40
51–100	0,20
101–150	0,13
151–200	0,10

Analizuojama bandinio dalis 0,1 mg tikslumu sverama stiklinėje bertuvėlėje (5.1).

7.2. Nustatymas

Analizuojama bandinio dalis supilama į 500 ml kolbą (6.2). Įpilama 20 ml tirpiklio (4.5) riebalams ištirpinti. Pridedama tiksliai 25 ml *Wijs* reagento (4.6), užkemšama kamščiu, turinys sumaišomas ir kolba pastatoma tamsioje vietoje. *Wijs* reagentui imti nenaudojama pipetė, į kurią siurbama burna.

Panašiai paruošiamas tuščiasis bandymas, įpilant tirpiklio ir *Wijs* reagento, bet neįdedant paties bandinio.

Jei bandinio jodo skaičius mažesnis kaip 150, kolba tamsioje paliekama vieną valandą, jei jodo skaičius didesnis kaip 150 arba produktai yra polimerizuoti arba dideliu laipsniu oksiduoti, paliekama dvi valandas.

Šiam laikui baigiantis, į kiekvieną kolbą įpilama 20 ml kalio jodido tirpalo (4.2) ir 150 ml vandens (4.1).

Titruojama etaloniniu tūrio analizėje naudojamu natrio tiosulfato tirpalu (4.4), kol dėl išsiskyrusio jodo atsiradusi geltona tirpalo spalva beveik išnyksta. Įlašinami keli lašai krakmolo tirpalo (4.3) ir titravimas tęsiamas, kol žydra spalva vos tik dingsta po labai stipraus kratymo.

Pastaba. Ekvivalentinį tašką leidžiama nustatyti potenciometriškai.

7.3. Nustatymų skaičius

To paties bandinio analizė atliekama du kartus.

8. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

Jodo skaičius apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\frac{12,69 \cdot c \cdot (V_1 - V_2)}{m}$$

kurioje:

c = naudoto etaloninio natrio tiosulfato tirpalo (4.4) tikslios koncentracijos skaitinė vertė moliais litre;

V_1 = tuščiajame bandyme sunaudoto etaloninio natrio tiosulfato tirpalo (4.4) skaitinė tūrio vertė mililitrais;

▼B

V_2 = nustatymui sunaudoto etaloninio natrio tiosulfato tirpalo (4.4) skaitinė tūrio vertė mililitrais;

m = analizuojamos bandinio dalies (7.1) masės skaitinė vertė gramais.

Rezultatu imamas dviejų nustatymų aritmetinis vidurkis, jei įvykdytos pakartojamumo (9.2) sąlygos.

▼ **M11***XVII PRIEDAS***AUGALINIULOSE ALIEJUOSE ESANČIŲ STIGMASTADIENŲ
NUSTATYMO METODAS****1. TIKSLAS**

Stigmastadienų nustatymas augaliniuose aliejuose, turinčiuose mažą šių angliavandenilių kiekį, ypač pirmojo spaudimo alyvuogių aliejuje ir alyvuogių išspaudų aliejuje.

2. TAIKymo SRITIS

Standartas gali būti taikomas visiems augaliniams aliejams, nors matavimai yra patikimi tik tuo atveju, kai šių angliavandenilių kiekis yra 0,01–4,0 mg/kg. Metodas ypač tinka nustatyti grynintų augalinių aliejų (maišyto alyvuogių, maišyto alyvuogių išspaudų, saulėgrąžų, palmių ir t. t.) buvimą pirmojo spaudimo alyvuogių aliejuje, kadangi gryninti aliejai turi stigmastadienų, o pirmojo presavimo aliejus jų neturi.

3. METODO ESMĖ

Nemuilinamos medžiagos atskyrimas. Steroidinių angliavandenilių frakcijos išskyrimas, taikant kolonelinę chromatografiją su silikageliu, ir analizė kapiliarinės dujų chromatografijos metodu.

4. APARATŪRA

4.1. 250 ml talpos kolbos, pritaikytos naudoti kartu su grįžtamuoju kondensatoriumi.

4.2. Dalijamieji 500 ml talpos piltuvai.

4.3. 100 ml talpos apvaliadugnės kolbos.

4.4. Sukamasis garintuvas.

4.5. Stiklinė chromatografinė kolonėlė (vidinis skersmuo 1,5–2,0 cm, ilgis 50 cm) su teflono čiaupu ir stiklo vatos kamščiu arba sukepieto stiklo disku apačioje. Ruošiant kolonėlę su silikageliu, į ją įpilama maždaug per 5 cm heksano, paskui užpildoma silikagelio suspensija heksane (15 g 40 ml), nuplaunant ją heksano porcijomis. Silikageliui leidžiama nusėsti, nusodinimas baigiamas lengvu supurtymu. Įdedama bevandenio natrio sulfato, maždaug 0,5 cm aukščio sluoksnis, heksano perteklius išleidžiamas.

4.6. Dujų chromatografas su liepsnos jonizaciniu detektoriumi, inžektoriumi su bandinio dalikliu arba šaltu tiesioginiu inžektoriumi ir ± 1 °C tikslumu programuojama krosnimi.

4.7. Lydyto kvarco kapiliarinė kolonėlė dujų chromatografijai (vidinis skersmuo 0,25 arba 0,32 mm, ilgis 25 m), padengta 0,25 mm storio 5 % polifenilmetilsiloksano plėvele.

1 pastaba:

Gali būti naudojamos kitos panašaus arba mažesnio poliškumo kolonėlės.

4.8. Integratorius-savirašis, kuriuo būtų galima integruoti nuo minimumo iki minimumo.

4.9. 5–10 ml mikrošvirkštai dujų chromatografijai su kietinta adata.

4.10. Elektrinis kaitinimo gaubtas arba elektrinė viryklė.

▼ **M11**

5. REAGENTAI

Visi reagentai turi būti analiziškai grynai, jei nepasakyta kitaip. Turi būti naudojamas distiliuotas vanduo arba bent atitinkamo grynumo vanduo.

- 5.1. Heksanas arba alkanų mišinys, kurio virimo temperatūrų intervalas 65–70 °C, nudistiliuotas rektifikavimo kolonoje.

2 pastaba:

Tirpiklis turi būti nudistiliuotas priemonėms pašalinti.

- 5.2. 96 % (v/v) etanolis.

- 5.3. Bevandenio natrio sulfatas.

- 5.4. 10 % kalio hidroksido tirpalas alkoholyje. Į 50 g kalio hidroksido įpilama 10 ml vandens, sumaišoma ir mišinys ištirpinamas 500 ml etanolio.

3 pastaba:

Stovėdamas kalio hidroksido tirpalas alkoholyje ruduoja. Jis turi būti kiekvieną dieną ruošiamas iš naujo ir laikomas gerai užkimštame tamsaus stiklo butelyje.

- 5.5. Silikagelis 60 kolonelinei chromatografijai, 70–230 mešų (*Merck* numeris 7734 arba panašios rūšies).

4 pastaba:

Paprastai silikagelis iš konteinerio gali būti naudojamas iš karto, be jokio apdorojimo. Tačiau kai kurių partijų silikagelis gali būti per mažo aktyvumo, dėl ko bus blogas chromatografinis atskyrimas. Šiuo atveju silikagelis turi būti apdorojamas tokiu būdu. Silikagelis aktyvinamas mažiausiai 4 valandas kaitinant 550 °C temperatūroje. Po kaitinimo silikagelis, kol ataušta, laikomas eksikatoriuje, paskui supilamas į užkemšamą kolbą. Įpilama 2 % vandens ir kratoma tol, kol nesimato sukritusių gabalų ir milteliai lengvai byra.

Jei naudojant tokį silikagelį, gaunamos chromatogramos su trukdančiomis smailėmis, šių partijų silikagelis turi būti apdorojamas anksčiau nurodytu būdu. Arba galima naudoti ypač švarų silikagelį 60 (*Merck* numeris 7754)

- 5.6. Pradinis (koncentracija 200 milijonųjų dalių (ppm) cholesta-3,5-dieno (*Sigma*, 99 % grynumo) tirpalas heksane (10 mg/50 ml).

- 5.7. Etaloninis 20 milijonųjų dalių (ppm) koncentracijos cholesta-3,5-dieno tirpalas heksane, gautas praskiedžiant prieš tai pagamintą tirpalą.

5 pastaba:

Pagal punktus 5.6 ir 5.7 gauti tirpalai išlieka patvarūs ne mažiau kaip keturis mėnesius, jei laikomi žemesnėje nei 4 °C temperatūroje.

- 5.8. Maždaug 100 milijonųjų dalių (ppm) koncentracijos *n*-nonakozano tirpalas heksane.

- 5.9. Dujos nešiklis chromatografijai: helis arba vandenilis, 99,9990 % grynumo.

- 5.10. Pagalbinės dujos liepsnos jonizaciniam detektoriumi: 99,9990 % grynumo vandenilis ir išvalytas oras.

▼ M11**6. DARBO EIGA****6.1. Nemuilinamos medžiagos gavimas**

- 6.1.1. 250 ml tūrio kolboje (4.1) pasveriami $20 \pm 0,1$ g aliejaus, įpilama 1 ml etaloninio cholesta-3,5-dieno ($20 \mu\text{g}$) ir 75 ml 10 % kalio hidroksido tirpalo alkoholyje, prijungiamas grįžtamasis kondensatorius ir 30 minučių nestipriai virinama. Kolba su bandiniu nukaičiama, tirpalui leidžiama šiek tiek ataušti (neatšaldoma visiškai, nes bandinys iškrenta į nuosėdas). Įpilama 100 ml vandens ir tirpalas supilamas į dalijamąjį piltuvą (4.2), panaudojant 100 ml heksano. Mišinys 30 sekundžių stipriai plakamas, sluoksniams leidžiama atsiskirti.

6 pastaba:

Susidarius emulsijai, kuri greitai nepranyksta, įpilama truputis etanolio.

- 6.1.2. Apatinis vandens sluoksnis supilamas į kitą dalijamąjį piltuvą ir vėl ekstrahuojama su 100 ml heksano. Apatinis sluoksnis dar kartą nuleidžiamas ir heksano ekstraktai (surinkti į kitą dalijamąjį piltuvą) tris kartus plaunami etanolio ir vandens mišiniu (1: 1), kiekvieną kartą sunaudojant po 100 ml, kol tirpalo pH pasidaro neutralus.
- 6.1.3. Tirpalas heksane perleidžiamas per bevandenį natrio sulfatą (50 g), plaunamas 20 ml heksano ir esant sumažintam slėgiui $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje garinamas sukamajame garintuve iki sauso likučio.

6.2. Steroidinių angliavandenilių frakcijos atskyrimas

- 6.2.1. Likutis, ištirpintas dviejose 1 ml heksano porcijose, supilamas į frakcionavimo kolonėlę, bandinio tirpalui leidžiama nusileisti iki natrio sulfato sluoksnio viršaus ir pradedamas chromatografinis išplovimas heksanu, srauto greičiui esant maždaug 1 ml/min . Pirmieji 25–30 ml eliuato išpilami ir surenkama 40 ml paskesnės frakcijos. Surinkus tokį tūrį, frakcija supilama į 100 ml apvaliadugnę kolbą (4.3).

7 pastaba:

Pirmojoje frakcijoje yra sotieji angliavandeniliai (1a brėžinys), antrojoje frakcijoje – steroidiniai angliavandeniliai. Toliau plaunant gaunamas skvalenas ir giminingi junginiai. Kad sotieji ir steroidiniai angliavandeniliai gerai atsiskirtų, reikia optimizuoti frakcijos tūrius. Dėl to pirmosios frakcijos tūris turi būti nustatytas toks, kad kai analizuojama antroji frakcija, sočiuosius angliavandenilius atstovaujančios smailės būtų žemos (žr. 1c brėžinį); jei jos nepasirodo, o etaloninės smailės intensyvumas yra mažas, tūris turi būti sumažintas. Bet koku atveju visiškas atskyrimas tarp pirmosios ir antrosios frakcijos komponentų nėra būtinas, kadangi dujų chromatografijos metu nėra smailių persidengimo, jei dujų chromatografijos sąlygos yra parinktos, kaip tai nurodyta 6.3.1 punkte. Optimizuoti antrosios frakcijos tūrio paprastai nereikia, nes atskyrimas nuo vėliau išplaukiamų komponentų geras. Visgi aukštos skvalenui priskiriamos smailės, turinčios maždaug 1,5 minutės mažesnę nei etalonas sulaukymo trukmę, buvimas rodo, kad atskyrimas blogas.

- 6.2.2. Antroji frakcija $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, esant sumažintam slėgiui, garinama sukamajame garintuve iki sauso likučio, kuris iš karto ištirpinamas 0,2 ml heksano. Tirpalas iki analizės laikomas šaldytuve.

8 pastaba:

Pagal 6.1.3 ir 6.2.2 punktus gauti likučiai kambario temperatūroje neturi būti laikomi sausi. Kai tik jie gaunami, įpilama tirpiklio ir tirpalas laikomas šaldytuve.

▼ **M11****6.3. Dujų chromatografija****6.3.1. Darbo sąlygos, naudojant inžektorių su bandinio dalikliu:**

- inžektoriaus temperatūra: 300 °C,
- detektoriaus temperatūra: 320 °C,
- integratorius-sąvirašis: integravimo parametrai turi būti nustatyti tokie, kad būtų teisingai įvertinami plotai. Rekomenduojamas integravimo nuo minimumo iki minimumo būdas,
- jautrumas: maždaug 16 kartų didesnis nei mažiausia silpninimo vertė,
- įpurškiamo tirpalo tūris: 1 µl,
- programuojama krosnies temperatūra: šešioms minutėms pradinė 235 °C temperatūra, toliau kėlimas 2 °C/min. greičiu iki 285 °C,
- inžektorius su srauto dalikliu 1: 15,
- nešiklis: helis arba vandenilis, esant maždaug 120 kPa slėgiui.

Sąlygos, atsižvelgiant į chromatografo ir kolonėlės charakteristikas, gali būti reguliuojamos taip, kad gauta chromatograma atitiktų šiuos reikalavimus: vidinio etalono smailė atsirastų maždaug per 5 minutes 6.3.2 punkte nurodyto laiko; vidinio etalono smailės aukštis turi sudaryti bent 80 % visos skalės aukščio.

Dujų chromatografijos įtaisas turi būti patikrintas įpurškiant cholestadieno pradinio tirpalo (5.6) ir *n*-nonakozano tirpalo (5.8) mišinį. Cholesta-3,5-dieno smailė turi atsirasti prieš *n*-nonakozano smailę (1c brėžinys); jei taip neįvyksta, yra dvi galimybės: sumažinti krosnies temperatūrą ir (arba) naudoti mažiau polišką kolonėlę.

6.3.2. Smailių identifikavimas

Vidinio etalono smailė atsiranda maždaug po 19 minučių, 3,5-stigmastadieno santykinė sulaikymo trukmė apytikriai lygi 1,29 (žr. 1b brėžinį). 3,5-stigmastadienas būna su nedideliu izomero kiekiu ir paprastai abu išplaunami kartu kaip viena chromatografinė smailė. Tačiau jei kolonėlė yra per didelio poliškumo arba turi didelę atskiriamąją galią, izomeras gali atsirasti kaip maža smailė prieš pat 3,5-stigmastadieno smailę (2 brėžinys). Norint užtikrinti, kad stigmastadienai būtų išplaunami vienos smailės apvi-dalu, patartina kolonėlę pakeisti į mažiau polišką arba į turinčią didesnį vidaus skersmenį.

9 pastaba:

Stigmastadienai palyginimui gali būti gauti atliekant gryninto augalinio aliejaus analizę, kai naudojamas mažesnis bandinio kiekis (1–2 g). Stigmastadienų smailė ryški ir lengvai identifikuojama.

6.3.3. Kiekybinė analizė

Stigmastadienų kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{stigmastadienų kiekis} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o} \text{ mg/kg,}$$

▼ M11

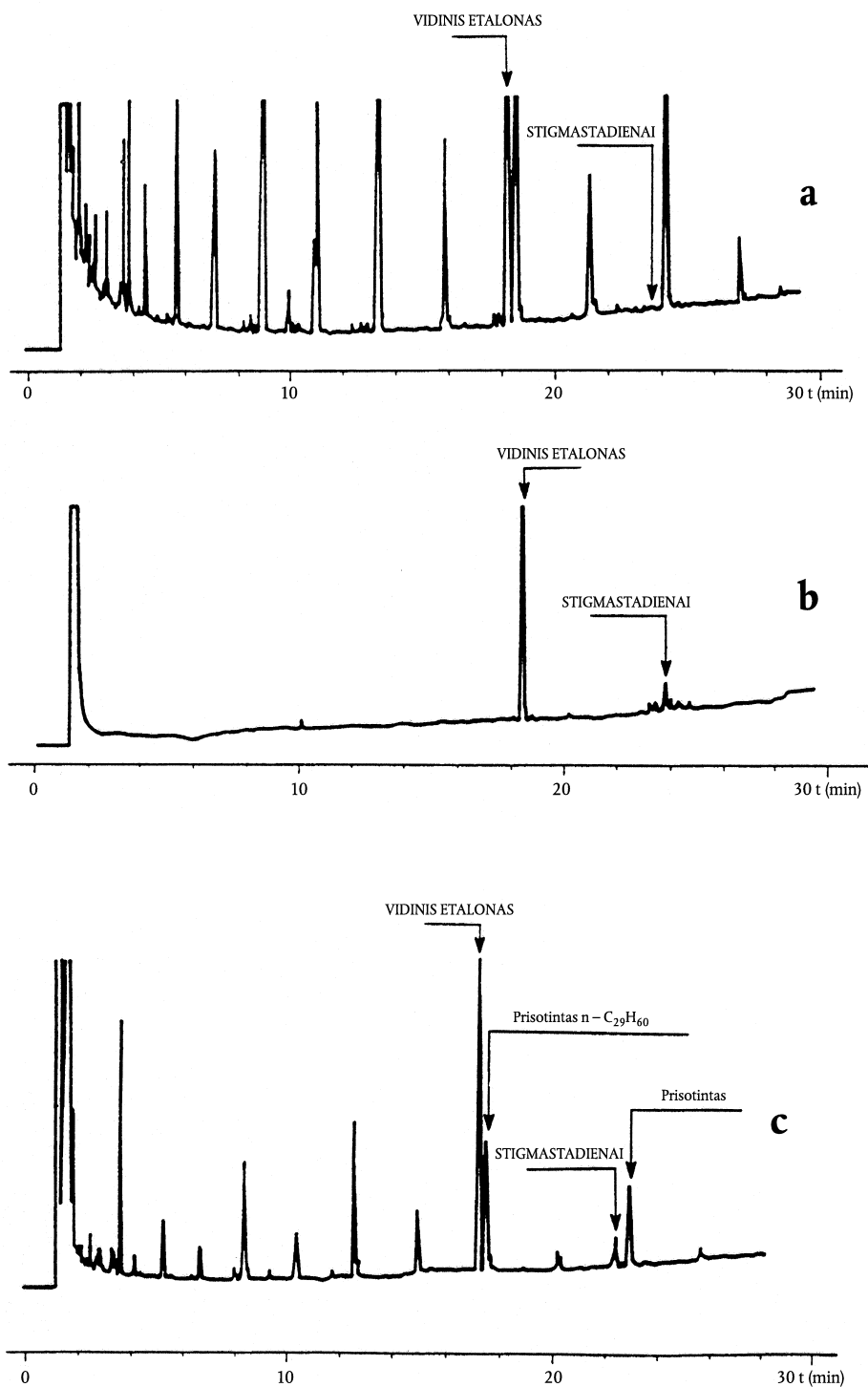
kurioje: A_s = stigmastadienų smailės plotas (jei smailė pasidalina į dvių izomerų smailes, tai abiejų smailių plotas),

A_c = vidinio etalono smailės plotas (cholestadieno),

M_c = įpurkšto etalono kiekis, mikrogramais,

M_o = paimto aliejaus kiekis, gramais.

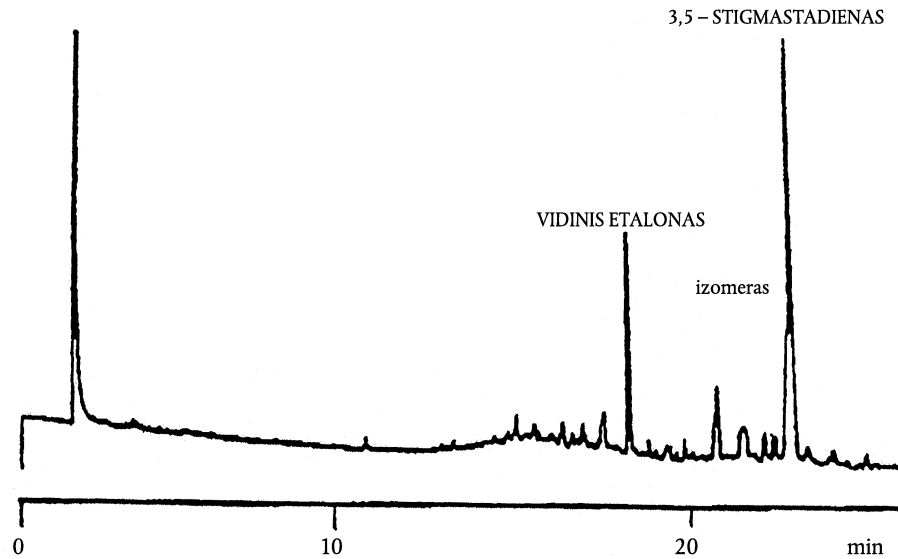
Radimo riba: apie 0,01 mg/kg.

▼ **M11****1 brėžinys**

Dujų chromatogramos, gautos alyvuogių aliejaus bandiniams, analizuojamiems lydyto kvarco kapiliarinėje kolonėlėje (vidinis skersmuo 0,25 mm, ilgis 25 m), padengtoje 0,25 μm storio 5 % polifenilmetilsiloksano plėvele.

▼ M11

- a) Pirmoji frakcija (30 ml), gauta iš pirmojo presavimo aliejaus bandinio, sodrinta etalonu.
- b) Antroji frakcija (40 ml), gauta iš alyvuogių aliejaus bandinio, turinčio 0,10 mg/kg stigmastadienų.
- c) Antroji frakcija (40 ml), turinti truputį pirmosios frakcijos.

**2 brėžinys**

Dujų chromatograma, gauta DB-5 kolonėlėje analizuojamiems gryninto alyvuogių aliejaus bandiniams, kurioje matoma 3,5-stigmastadieno izomero smailė.

▼ **M25***XVIII PRIEDAS***SKIRTUMO TARP FAKTINIO IR TEORINIO TRIACILGLICEROLIŲ
KIEKIO SU ECN 42 NUSTATYMAS****1. TAIKYMAS**

Absoliutaus skirtumo tarp eksperimentinių triacilglicerolių (TAG) verčių su ekvivalentiniu anglies skaičiumi 42 ($ECN_{42_{HPLC}}$), gautų tiriant aliejų efektyviąja skysčių chromatografija (HPLC), ir teorinių TAG verčių su ekvivalentiniu anglies skaičiumi 42 ($ECN_{42_{teorinis}}$), apskaičiuotų pagal riebalų rūgščių sudėtį, nustatymas.

2. TAIKymo SRITIS

Standartas taikomas alyvuogių aliejui. Metodas taikomas mažiems sėklų aliejaus (kuriame daug linolo rūgšties) kiekiams visų rūšių alyvuogių aliejuje aptikti.

3. PRINCIPAS

Gryno alyvuogių aliejaus HPLC analize nustatytas triacilglicerolių kiekis su ECN 42 ir teorinis triacilglicerolių kiekis su ECN 42 (apskaičiuotas remiantis dujų ir skysčių chromatografijos (GLC) būdu nustatyta riebalų rūgščių sudėtimi) atitinka tam tikras ribas. Didesnis skirtumas nei nustatyta kiekvienai aliejaus rūšiai rodo, kad aliejuje yra sėklų aliejaus.

4. METODAS

Teorinio triacilglicerolių kiekio su ECN 42 ir skirtumo lyginant su HPLC duomenimis apskaičiavimas iš esmės atliekamas derinant kitais metodais gautus analizinius duomenis. Galima išskirti tris etapus: riebalų rūgščių sudėties nustatymas kapiliarinės dujų chromatografijos metodu, teorinės triacilglicerolių sudėties su ECN 42 apskaičiavimas, ECN 42 triacilglicerolių nustatymas HPLC metodu.

4.1. Prietaisai

4.1.1. Apvaliadugnės kolbos, 250 ir 500 ml.

4.1.2. Laboratorinės stiklinės, 100 ml.

4.1.3. Stiklinė chromatografinė kolonėlė, kurios vidinis skersmuo 21 mm, ilgis 450 mm, su čiaupu ir normalizuotu kūgiu (su vidiniu sriegiu) viršuje.

4.1.4. Dalijamieji piltuvai, 250 ml, su normalizuotu kūgiu (su išoriniu sriegiu) apačioje, tinkami jungti prie kolonėlės viršaus.

4.1.5. Stiklinė lazdelė, 600 mm ilgio.

4.1.6. Stiklinis piltuvas, 80 mm skersmens.

4.1.7. Matavimo kolbos, 50 ml.

4.1.8. Matavimo kolbos, 20 ml.

4.1.9. Sukamasis garintuvas.

4.1.10. Efektyviosios skysčių chromatografijos chromatografas su galimybe termostatu kontroliuoti kolonėlės temperatūrą.

4.1.11. 10 µl švirkštai.

4.1.12. Detektorius – diferencinis refraktometras. Visos skalės jautrumas turi būti ne mažesnis kaip 10^{-4} lūžio rodiklio vieneto.

▼ M25

4.1.13. Kolonėlė – 250 mm ilgio ir 4,5 mm vidinio skersmens nerūdijančio plieno vamzdelis, užpildytas 5 µm skersmens silicio oksido dalelėmis, kuriose yra 22–23 % anglies oktaedecilsilano pavidalu.

4.1.14. Duomenų apdorojimo programinė įranga.

4.1.15. Maždaug 2 ml tūrio buteliukai su teflonu dengtomis pertvaromis ir užsukamais dangteliais.

4.2. Reagentai

Reagentai turi būti analiziškai grynai. Išplovimo tirpikliai turi būti nudu-jinti ir gali būti pakartotinai naudojami keletą kartų nepakenkiant atsky-rimo kokybei.

4.2.1. Tinkamas chromatografijai petroleteris, virimo temperatūra nuo 40 °C iki 60 °C, arba heksanas.

4.2.2. Prieš analizę distiliuotas etileteris, kuriame nėra peroksidų.

4.2.3. Išplovimo tirpiklis aliejui gryninti kolonėlinės chromatografijos būdu: petroleterio ir etileterio mišinys 87/13 (v/v).

4.2.4. 70–230 mešų *Merck 7734* tipo silikagelis su etaloniniu 5 % (m/m) vandens kiekiu.

4.2.5. Stiklo vata.

4.2.6. HPLC skirtas acetonas.

4.2.7. HPLC skirtas acetonitrilas arba propionitrilas.

4.2.8. HPLC išplovimo tirpiklis – acetonitrilas + acetonas (proporcijas reikia reguliuoti taip, kad gautųsi reikiamas atskyrimas; pradedama nuo 50:50 mišinio) arba propionitrilas.

4.2.9. Soliubilizavimo tirpiklis – acetonas.

4.2.10. Standartiniai trigliceridai – gali būti naudojami prekyboje esantys trigli-ceridai (tripalmitinas, trioleinas ir kt.), tada sulaikymo trukmės grafikas braižomas pagal ekvivalentinį anglies skaičių arba naudojamos etalo-ninės sojos aliejaus, sojos aliejaus ir alyvuogių aliejaus 30:70 mišinio ir gryo alyvuogių aliejaus chromatogramos (žr. 1 ir 2 pastabas ir 1–4 pav.).

4.2.11. Kietosios fazės ekstrahavimo kolonėlė su 1g silicio dioksido faze, 6 ml.

4.3. Mėginių ruošimas

Kadangi dėl kai kurių trukdančių medžiagų gali būti gauti klaidingi teigiami rezultatai, mėginys turi būti visuomet gryninamas pagal IUPAC 2.507 metodą, taikomą poliškiems junginiams kepimo riebaluose nustatyti.

4.3.1. Chromatografinės kolonėlės paruošimas

Į kolonėlę (4.1.3) įpilama apie 30 ml išplovimo tirpiklio (4.2.3), tada įdedama stiklo vatos (4.2.5), kuri stikline lazdele (4.1.5) nustumiama į kolonėlės apačią.

25 g silikagelio (4.2.4) 100 ml cheminėje stiklinėje suspenduojama 80 ml išplovimo mišinio (4.2.3); gauta suspensija per stiklinį piltuvą (4.1.6) supilama į kolonėlę.

Kad į kolonėlę būtų supiltas visas silikagelis, cheminė stiklinė plaunama išplovimo mišiniu ir plovimui naudotas skystis taip pat supilamas į kolonėlę.

Atsukamas čiaupas ir tirpikliui leidžiama tekėti iš kolonėlės tol, kol jo lieka maždaug 1 cm virš silikagelio.

▼ **M25**4.3.2. *Kolonelinė chromatografija*

Į 50 ml matavimo kolbą (4.1.7) 0,001 g tikslumu pasveriamą $2,5 \pm 0,1$ g prieš tai filtruoto, homogenizuoto ir, jei reikia, išdžiovinto aliejaus.

Aliejus ištirpinamas maždaug 20 ml išplovimo tirpiklio (4.2.3). Prireikus, kad greičiau ištirtų, šiek tiek pašildoma. Atvėsinama iki kambario temperatūros ir praskiedžiama išplovimo tirpikliu iki žymės.

Matavimo pipete į pagal 4.3.1 punktą paruoštą kolonėlę įpilama 20 ml tirpalo, atsukamas čiaupas ir tirpiklis nuleidžiamas iki silikagelio sluoksnio lygio.

Plaunama 150 ml išplovimo tirpiklio (4.2.3), apie 2 ml/min. tekėjimo greičiu (kad iš kolonėlės ištėtų 150 ml reikia maždaug 60–70 minučių).

Eliuatas supilamas į 250 ml apvaliadugnę išdžiovintą džiovavimo spin-toje ir tiksliai pasvertą kolbą (4.1.1). Tirpiklis nugarinamas sukamajame garintuve (4.1.9) esant sumažintam slėgiui, o likutis, kuris bus naudojamas HPLC analizės tirpalui ir metilesteriui ruošti, pasveriamas.

Mėginio regeneravimas iš kolonėlės aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo, pirmojo spaudimo, paprastojo pirmojo spaudimo, rafinuoto alyvuogių aliejaus rūšims turi būti ne mažesnis kaip 90 %, klasikinio alyvuogių aliejaus (*lampante*) ir alyvuogių išspaudų aliejui jis turi būti ne mažesnis kaip 80 %.

4.3.3. *SPE gryninimas*

Silicio oksido SPE kolonėle aktyvuojama per ją praleidžiant 6 ml heksano (4.2.3) esant vakuumui, vengiant sausumo.

0,001 g tikslumu 2 ml buteliuke (4.1.15) pasveriamą 0,12 g medžiagos ir praskiedžiama 0,5 ml heksano (4.2.3).

Tirpalas suleidžiamas į SPE kolonėlę ir esant vakuumui plaunamas 10 ml heksano ir dietileterio mišiniu (87:13 v/v) (4.2.3).

Surinktos frakcijos sausai išgarinamos sukamajame garintuve (4.1.9) esant sumažintam slėgiui kambario temperatūroje. Likučiai ištirpinami 2 ml acetone (4.2.6), kad būtų galima analizuoti triacilglicerolius (TAG).

4.4. **HPLC analizė**4.4.1. *Mėginių ruošimas chromatografinėi analizei*

5 % tiriamojo mėginio tirpalas ruošiamas 10 ml matavimo kolboje su padalomis pasveriant $0,5 \pm 0,001$ g mėginio ir praskiedžiant iki 10 ml solubilizavimo tirpikliu (4.2.9).

4.4.2. *Procedūra*

Chromatografinė sistema paruošiama darbui. Visai sistemai išplauti 1,5 ml/min. greičiu pumpuojamas išplovimo tirpiklis (4.2.8). Palaukiama, kol gaunama stabili pagrindo linija.

Išvirkščiama 10 µl pagal 4.3 punktą paruošto mėginio.

4.4.3. *Rezultatų skaičiavimas ir pateikimas*

Taikomas ploto normalizavimo metodas, t. y. daroma prielaida, kad smailių, atitinkančių TAG nuo ECN 42 iki ECN 52, plotų suma lygi 100 %.

Kiekvieno triglicerido ploto dalis procentais apskaičiuojama pagal formulę:

triglicerido % = $\text{smailės plotas} \times 100 / \text{smailių plotų suma}$.

Rezultatai pateikiami bent jau šimtųjų tikslumu.

Žr. 1–4 pastabas.

▼ **M25****4.5. Triacilglicerolių sudėties (molių %) apskaičiavimas pagal riebalų rūgščių sudėties duomenis (ploto %)****4.5.1. Riebalų rūgščių sudėties nustatymas**

Riebalų rūgščių sudėtis nustatoma naudojant kapiliarinę kolonėlę pagal ISO 5508 metodą. Metilesteriai ruošiami pagal COI/T.20/Dok. Nr. 24.

4.5.2. Skaičiavimuose naudojamos riebalų rūgštys

Gliceridai suskirstomi pagal jų ekvivalentinį anglies skaičių (ECN), atsižvelgiant į tai, kokie ECN priskiriami riebalų rūgštims. Buvo nagrinėjamos tik 16 ir 18 anglies atomų turinčios riebalų rūgštys, nes tik jos yra svarbios alyvuogių aliejaus atveju. Riebalų rūgštis reikėtų normalizuoti iki 100 %.

Riebalų rūgštis (RR)	Santrumpa	Molekulinė masė (MM)	ECN
Palmitino rūgštis	P	256,4	16
Palmitoleino rūgštis	Po	254,4	14
Stearino rūgštis	S	284,5	18
Oleino rūgštis	O	282,5	16
Linolo rūgštis	L	280,4	14
Linoleno rūgštis	Ln	278,4	12

4.5.3. Visų riebalų rūgščių ploto procentinės dalies vertimas jų molių skaičiumi (1)

$$\begin{aligned} P \text{ moliai} &= \frac{P \text{ ploto } \%}{MM P} & S \text{ moliai} &= \frac{S \text{ ploto } \%}{MM S} & Po \text{ moliai} &= \frac{Po \text{ ploto } \%}{MM Po} \\ O \text{ moliai} &= \frac{O \text{ ploto } \%}{MM O} & L \text{ moliai} &= \frac{L \text{ ploto } \%}{MM L} & Ln \text{ moliai} &= \frac{Ln \text{ ploto } \%}{MM Ln} \end{aligned}$$

4.5.4. Riebalų rūgščių kiekio normalizavimas iki 100 % (2)

$$\begin{aligned} P (1,2,3) \text{ molių } \% &= \frac{P \text{ moliai} * 100}{(P + S + Po + O + L + Ln) \text{ moliai}} \\ S (1,2,3) \text{ molių } \% &= \frac{S \text{ moliai} * 100}{(P + S + Po + O + L + Ln) \text{ moliai}} \\ Po (1,2,3) \text{ molių } \% &= \frac{Po \text{ moliai} * 100}{(P + S + Po + O + L + Ln) \text{ moliai}} \\ O (1,2,3) \text{ molių } \% &= \frac{O \text{ moliai} * 100}{(P + S + Po + O + L + Ln) \text{ moliai}} \\ L (1,2,3) \text{ molių } \% &= \frac{L \text{ moliai} * 100}{(P + S + Po + O + L + Ln) \text{ moliai}} \\ Ln (1,2,3) \text{ molių } \% &= \frac{Ln \text{ moliai} * 100}{(P + S + Po + O + L + Ln) \text{ moliai}} \end{aligned}$$

Gautas rezultatas yra kiekvienos riebalų rūgšties procentais skaičiuojama molinė dalis visose TAG (1,2,3-) padėtyse.

Tada apskaičiuojamas sočiųjų riebalų rūgščių P ir S (SRR) ir nesočiųjų riebalų rūgščių Po, O, L ir Ln (NRR) bendras kiekis (3):

$$SSR \text{ molių } \% = P \text{ molių } \% + S \text{ molių } \%$$

$$NRR \text{ molių } \% = 100 - SSR \text{ molių } \%$$

▼ **M25**4.5.5. *Riebalų rūgščių sudėties TAG 2-ojoje ir 1,3-iojoje padėtyje apskaičiavimas*

Riebalų rūgštys yra pasiskirsčiusios į tris grupes taip: viena 2-ojoje padėtyje ir dvi vienodos 1-ojoje ir 3-iojoje padėtyse, esant skirtingiems koeficientams sočiosioms (P ir S) rūgštims ir nesočiosioms (Po, O, L ir Ln) rūgštims.

4.5.5.1. Sočiosios riebalų rūgštys 2-ojoje padėtyje [P(2) ir S(2)] (4)

$$P(2) \text{ molių \%} = P(1,2,3) \text{ molių \%} * 0,06$$

$$S(2) \text{ molių \%} = S(1,2,3) \text{ molių \%} * 0,06$$

4.5.5.2. Nesočiosios riebalų rūgštys 2-ojoje padėtyje [Po(2), O(2), L(2) ir Ln(2)] (5):

$$Po(2) \text{ molių \%} = \frac{Po(1,2,3) \text{ molių \%}}{NRR \text{ molių \%}} * (100 - P(2) \text{ molių \%} - S(2) \text{ molių \%})$$

$$O(2) \text{ molių \%} = \frac{O(1,2,3) \text{ molių \%}}{NRR \text{ molių \%}} * (100 - P(2) \text{ molių \%} - S(2) \text{ molių \%})$$

$$L(2) \text{ molių \%} = \frac{L(1,2,3) \text{ molių \%}}{NRR \text{ molių \%}} * (100 - P(2) \text{ molių \%} - S(2) \text{ molių \%})$$

$$Ln(2) \text{ molių \%} = \frac{Ln(1,2,3) \text{ molių \%}}{NRR \text{ molių \%}} * (100 - P(2) \text{ molių \%} - S(2) \text{ molių \%})$$

4.5.5.3. Riebalų rūgštys 1,3-iojoje padėtyje [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) ir Ln(1,3)] (6):

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

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

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

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

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

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

4.5.6. *Triacilglicerolių kiekio apskaičiavimas*

4.5.6.1. TAG, kuriuos sudaro viena riebalų rūgštis (AAA, čia LLL, PoPoPo) (7)

$$AAA \text{ molių \%} = \frac{A(1,3) \text{ molių \%} * \text{molių \%} A(2) * A(1,3) \text{ molių \%}}{10\,000}$$

4.5.6.2. TAG, kuriuos sudaro dvi riebalų rūgštys (AAB, čia PoPoL, PoLL) (8)

$$AAB \text{ molių \%} = \frac{A(1,3) \text{ molių \%} * A(2) \text{ molių \%} * B(1,3) \text{ molių \%} * 2}{10\,000}$$

$$ABA \text{ molių \%} = \frac{A(1,3) \text{ molių \%} * B(2) \text{ molių \%} * A(1,3) \text{ molių \%}}{10\,000}$$

▼ M25

4.5.6.3. TAG, kuriuos sudaro trys skirtingos riebalų rūgštys (ABC, čia OLLn, PLLn, PoOLn, PPOLn) (9)

$$\text{ABC molių \%} = \frac{\text{A(1,3) molių \%} * \text{B(2) molių \%} * \text{C(1,3) molių \%} * 2}{10\,000}$$

$$\text{BCA molių \%} = \frac{\text{B(1,3) molių \%} * \text{C(2) molių \%} * \text{A(1,3) molių \%} * 2}{10\,000}$$

$$\text{CAB molių \%} = \frac{\text{C(1,3) molių \%} * \text{A(2) molių \%} * \text{B(1,3) molių \%} * 2}{10\,000}$$

4.5.6.4. Triacilgliceroliai su ECN42

Pagal 7, 8 ir 9 lygtis apskaičiuojamas šių triacilglicerolių su ECN42, išdėstytų pagal tikėtiną jų išplovimo seką HPLC (paprastai tik trys smailės), kiekis.

LLL

PoLL ir padėties izomeras LPOl

OLLn ir padėties izomerai OLnL ir LnOL

PoPoL ir padėties izomeras PoLPo

PoOLn ir padėties izomerai OPoLn ir OLnPo

PLLn ir padėties izomerai LLnP ir LnPL

PoPoPo

SLnLn ir padėties izomeras LnSLn

PPoLn ir padėties izomerai PLnPo ir PoPLn

Triacilgliceroliai su ECN42 pateikiami kaip devynių triacilglicerolių, įskaitant jų padėties izomeras, suma. Rezultatai pateikiami bent jau šimtųjų tikslumu.

5. REZULTATŲ ĮVERTINIMAS

Lyginamas apskaičiuotas teorinis kiekis ir HPLC metodu nustatytas kiekis. Jei skirtumas absoliučiajia verte tarp HPLC duomenų rezultatų ir teorinių duomenų yra didesnis nei atitinkamos kategorijos aliejui standarte nurodyta vertė, mėginyje yra sėklų aliejaus.

Rezultatai pateikiami šimtųjų tikslumu.

6. PAVYZDYS (NUMERACIJA ATITINKA METODO TEKSTO DALIS)

— 4.5.1. *Riebalų rūgščių molių % apskaičiavimas pagal dujų-skysčių chromatografijos (GLC) duomenis (normalizuoto ploto %)*

Taikant GLC gaunami tokie duomenys apie riebalų rūgščių sudėtį:

RR	P	S	Po	O	L	Ln
MM	256,4	284,5	254,4	282,5	280,4	278,4
Ploto %	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

▼ **M25**

- 4.5.3. *Visų riebalų rūgščių ploto procentinės dalies vertimas jų molinių skaičių (žr. 1 formulę)*

$$\begin{aligned} P \text{ moliai} &= \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moliai } P \\ S \text{ moliai} &= \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moliai } S \\ Po \text{ moliai} &= \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moliai } Po \\ O \text{ moliai} &= \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moliai } O \\ L \text{ moliai} &= \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moliai } L \\ Ln \text{ moliai} &= \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ moliai } Ln \end{aligned}$$

$$\text{Bendras kiekis} = 0,35821 \text{ moliai TAG}$$

- 4.5.4. *Riebalų rūgščių kiekio normalizavimas iki 100 % (žr. 2 formulę)*

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

$$\text{Molij \% suma} = 100 \%$$

Bendras sočiųjų ir nesočiųjų riebalų rūgščių kiekis 1,2,3 TAG padėtyje (žr. 3 formulę):

$$\text{SRR molij \%} = 10,887 \% + 2,942 \% = \mathbf{13,829 \%}$$

$$\text{NRR molij \%} = 100,000 \% - 13,829 \% = \mathbf{86,171 \%}$$

- 4.5.5. *Riebalų rūgščių sudėties TAG 2-ojoje ir 1,3-iojoje padėtyse apskaičiavimas*

- 4.5.5.1. Sočiosios riebalų rūgštys 2-ojoje padėtyje [P(2) ir S(2)] (žr. 4 formulę)

$$P(2) \text{ molij \%} = 10,887 \% * 0,06 = 0,653 \text{ molij \%}$$

$$S(2) \text{ molij \%} = 2,942 \% * 0,06 = 0,177 \text{ molij \%}$$

- 4.5.5.2. Nesočiosios riebalų rūgštys 2-ojoje padėtyje [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) ir Ln(1,3)] (žr. 5 formulę)

$$Po(2) \text{ molij \%} = \frac{1,097 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,262 \text{ molij \%}$$

$$O(2) \text{ molij \%} = \frac{74,116 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 85,296 \text{ molij \%}$$

$$L(2) \text{ molij \%} = \frac{9,955 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 11,457 \text{ molij \%}$$

$$Ln(2) \text{ molij \%} = \frac{1,002 \%}{86,171 \%} * (100 - 0,653 - 0,177) = 1,153 \text{ molij \%}$$

▼ **M25**

- 4.5.5.3. Riebalų rūgštys 1,3-iojoje padėtyje [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) ir Ln(1,3)] (žr. 6 formulę)

$$P(1,3) \text{ molų \%} = \frac{10,887 - 0,653}{2} + 10,887 = 16,004 \text{ molų \%}$$

$$S(1,3) \text{ molų \%} = \frac{2,942 - 0,177}{2} + 2,942 = 4,325 \text{ molų \%}$$

$$Po(1,3) \text{ molų \%} = \frac{1,097 - 1,262}{2} + 1,097 = 1,015 \text{ molų \%}$$

$$O(1,3) \text{ molų \%} = \frac{74,116 - 85,296}{2} + 74,116 = 68,526 \text{ molų \%}$$

$$L(1,3) \text{ molų \%} = \frac{9,955 - 11,457}{2} + 9,955 = 9,204 \text{ molų \%}$$

$$Ln(1,3) \text{ molų \%} = \frac{1,002 - 1,153}{2} + 1,002 = 0,927 \text{ molų \%}$$

- 4.5.6. *Triacilglicerolių kiekio apskaičiavimas*

Pagal apskaičiuotą riebalų rūgščių sudėtį 2-ojoje ir 1,3-iojoje padėtyse:

RR	1,3-iojoje padėtyje	2-ojoje padėtyje
P	16,004 %	0,653 %
S	4,325 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,262 %
O	68,526 %	85,296 %
L	9,204 %	11,457 %
Ln	0,927 %	1,153 %
Iš viso	100,0 %	100,0 %

apskaičiuojamas tokių triacilglicerolių kiekis:

LLL

PoPoPo

PoLL su 1 padėties izomeru

SLnLn su 1 padėties izomeru

PoPoL su 1 padėties izomeru

PPoLn su 2 padėties izomerais

OLLn su 2 padėties izomerais

PLLn su 2 padėties izomerais

PoOLn su 2 padėties izomerais

- 4.5.6.1. TAG, kuriuos sudaro viena riebalų rūgštis (LLL, PoPoPo) (žr. 7 formulę)

$$LLL \text{ molų \%} = \frac{9,204 \% * 11,457 \% * 9,204 \%}{10\,000} = \mathbf{0,09706 \text{ moliai LLL}}$$

$$PoPoPo \text{ molų \%} = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 1,015 \%}{10\,000} = \mathbf{0,00013 \text{ moliai PoPoPo}}$$

▼ **M25**

— 4.5.6.2. TAG, kuriuos sudaro dvi riebalų rūgštys (PoLL, SLnLn, PoPoL) (žr. 8 formulę)

$$\text{PoLL} + \text{LLPo} \text{ molių } \% = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 9,204 \% * 2}{10\,000} = 0,02141$$

$$\text{LPoL} \text{ molių } \% = \frac{9,204 \% * 1,262 \% * 9,204 \%}{10\,000} = 0,01069$$

0,03210 moliai PoLL

$$\text{SLnLn} + \text{LnLnS} \text{ molių } \% = \frac{4,325 \% * 1,153 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,00092$$

$$\text{LnSLn} \text{ molių } \% = \frac{0,927 \% * 0,177 \% * 0,927 \%}{10\,000} = 0,00002$$

0,00094 moliai SLnLn

$$\text{PoPoL} + \text{LPoPo} \text{ molių } \% = \frac{1,015 \% * 1,262 \% * 9,204 \% * 2}{10\,000} = 0,00236$$

$$\text{PoLPo} \text{ molių } \% = \frac{1,015 \% * 11,457 \% * 1,015 \%}{10\,000} = 0,00118$$

0,00354 moliai PoPoL

— 4.5.6.3. TAG, kuriuos sudaro trys riebalų rūgštys (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) (žr. 9 formulę)

$$\text{PPoLn} \text{ molių } \% = \frac{16,004 \% * 1,262 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,00374$$

$$\text{LnPPo} \text{ molių } \% = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 1,015 \% * 2}{10\,000} = 0,00012$$

$$\text{PoLnP} \text{ molių } \% = \frac{1,015 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\,000} = 0,00375$$

0,00761 molių PPoLn

$$\text{OLLn} \text{ molių } \% = \frac{68,526 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,14556$$

$$\text{LnOL} \text{ molių } \% = \frac{0,927 \% * 85,296 \% * 9,204 \% * 2}{10\,000} = 0,14555$$

$$\text{LLnO} \text{ molių } \% = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 68,526 \% * 2}{10\,000} = 0,14544$$

0,43655 molių OLLn

$$\text{PLLn} \text{ molių } \% = \frac{16,004 \% * 11,457 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,03399$$

$$\text{LnPL} \text{ molių } \% = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,204 \% * 2}{10\,000} = 0,00111$$

$$\text{LLnP} \text{ molių } \% = \frac{9,204 \% * 1,153 \% * 16,004 \% * 2}{10\,000} = 0,03397$$

0,06907 molių PLLn

▼ **M25**

$$\text{PoOLn molių \%} = \frac{1,015 \% * 85,296 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,01605$$

$$\text{LnPoO molių \%} = \frac{0,927 \% * 1,262 \% * 68,526 \% * 2}{10\,000} = 0,01603$$

$$\text{OLnPo molių \%} = \frac{68,526 \% * 1,153 \% * 1,015 \% * 2}{10\,000} = 0,01604$$

0,04812 molių PoOLn

ECN42 = 0,69512 molių TAG

1 pastaba. Išplovimo tvarka gali būti nustatyta apskaičiuojant ekvivalentinius anglies skaičius, dažnai apibrėžiamus priklausomybe $ECN = CN - 2n$, kur CN yra anglies atomų skaičius ir n yra dvigubų jungčių skaičius; ji gali būti tiksliau apskaičiuota atsižvelgiant į dvigubos jungties kilmę. Jeigu n_o , n_l ir n_{ln} yra dvigubų jungčių, atitinkamai priskiriamų oleino, linolo ir linoleno rūgštims, skaičiai, ekvivalentinis anglies skaičius gali būti apskaičiuotas taikant formulę:

$$EN = CN - d_o n_o - d_l n_l - d_{ln} n_{ln}$$

kur koeficientai d_o , d_l ir d_{ln} gali būti apskaičiuoti pagal standartinius trigliceridus. Pagal šiametode nurodytas sąlygas gauta priklausomybė bus artima:

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

2 pastaba. Su keliais standartiniais trigliceridais galima apskaičiuoti trioleino skiriamąją gebą:

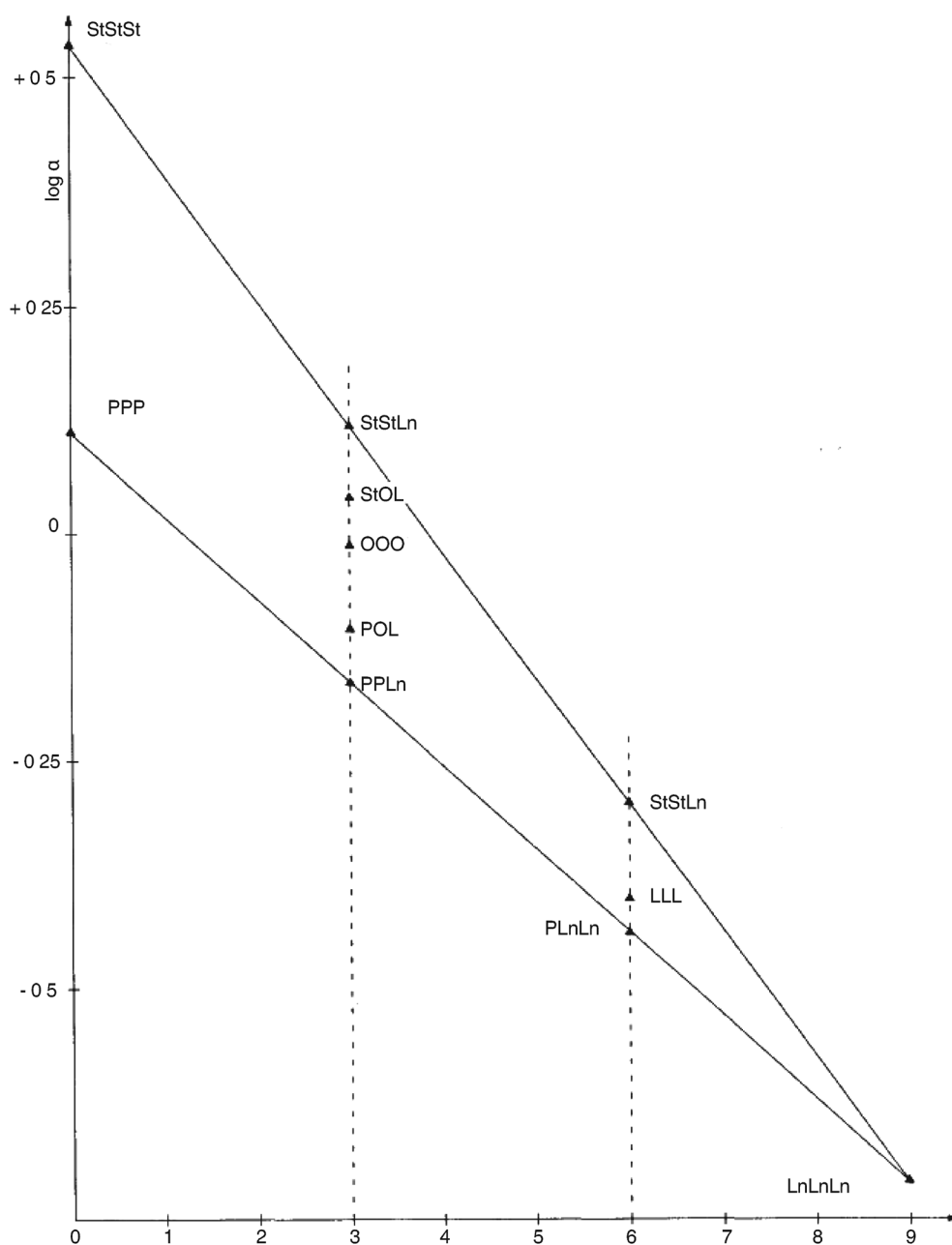
$$\alpha = RT^1 / RT \text{ trioleinas}$$

naudojant sumažintą sulaikymo trukmę $RT^1 = RT - RT \text{ tirpiklis}$.

$\log \alpha$ priklausomybės nuo f (dvigubų jungčių skaičiaus) grafikas leidžia nustatyti visų orientacinių trigliceridų sudėtyje esančių riebiųjų rūgščių trigliceridų sulaikymo vertes – žr. 1 pav.

3 pastaba. Kolonėlės efektyvumas turėtų būti toks, kad būtų galima aiškiai atskirti trilinoleino smailę nuo trigliceridų smailių su gretima RT. Išplovimas atliekamas iki ECN52 smailės.

4 pastaba. Šio nustatymo atveju teisingas visų aktualių smailių sričių išmatavimas užtikrinamas, jeigu antra smailė, atitinkanti ECN 50, yra 50 % registravimo prietaiso visos skalės aukščiau.

▼ **M25***1 paveikslas***Log α priklausomybės nuo f (dvigubų jungčių skaičiaus) grafikas**

Dvigubų jungčių skaičius

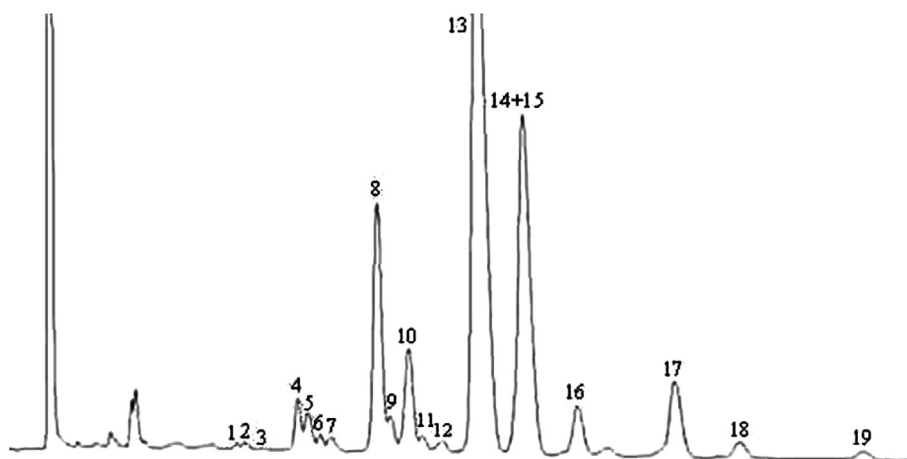
La – lauro rūgštis; My – miristo rūgštis; P – palmitino rūgštis; S – stearino rūgštis; O – oleino rūgštis; L – linolo rūgštis; Ln – linoleno rūgštis

▼ **M25**

2 paveikslas

Alyvuogių aliejus, kuriame mažai linolo rūgšties

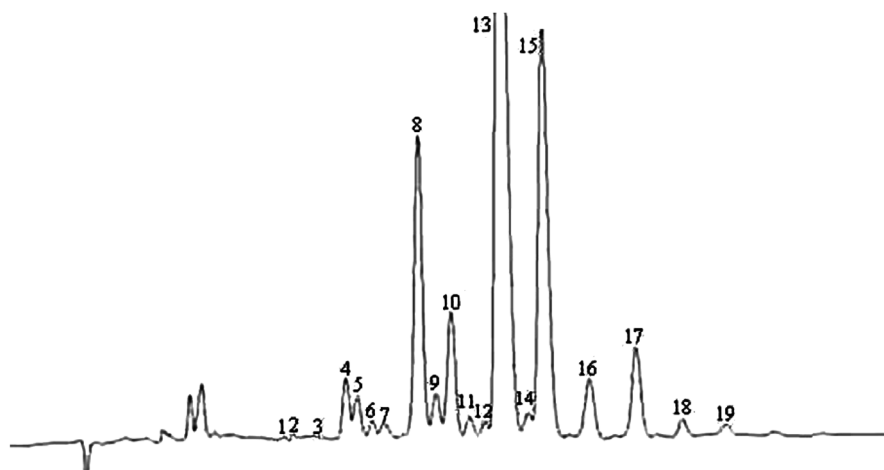
a



Su tirpikliu acetonu / acetonitrilu.

a PROFILIS. Pagrindiniai chromatografinių smailių komponentai: **ECN42**: (1) LLL + PoLL; (2) OLLn + PoOLn; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL + PoOL; (5) OOLn + PLL; (6) POLn + PPoPo; (7) OOL + PoOO; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP; (14 + 15) SOL + POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS.

b



Su tirpikliu propionitrilu

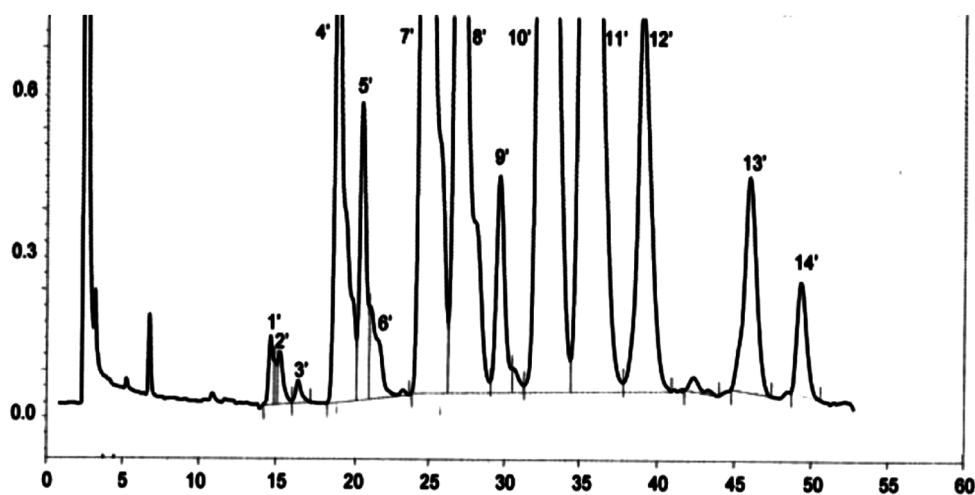
b PROFILIS. Pagrindiniai chromatografinių smailių komponentai: **ECN42**: (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPoPo + PPoL; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50**: (17) SOO; (18) POS + SLS.

▼ M25

3 paveikslas

Alyvuogių aliejus, kuriame daug linolo rūgšties

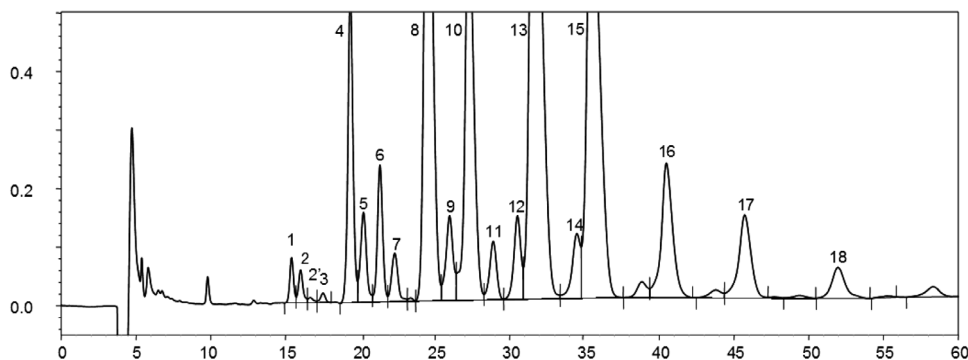
a



Su tirpikliu acetonu / acetonitrilu (50:50).

a profilis. Pagrindiniai chromatografinių smailių komponentai: **ECN42:** (1') LLL + PoLL; (2') OLLn + PoOLn; (3') PLLn; **ECN44:** (4') OLL + PoOL; (5') OOLn + PLL; (6') POLn + PPoPo; **ECN46:** (7') OOL + PoOO; (8') PLO + SLL + PoOP; (9') PLP + PoPP; **ECN48:** (10') OOO; (11') POO + SLL + PPoO; (12') POP + PLS; **ECN50:** (13') SOO; (14') POS + SLS

b



Su tirpikliu propionitrilu.

b profilis. Pagrindiniai chromatografinių smailių komponentai: **ECN42:** (1) LLL; (2 + 2') OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44:** (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPoPo + PPoL; **ECN46:** (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; **ECN48:** (12) PLP; (13) OOO + PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; **ECN50:** (17) SOO; (18) POS + SLS; **ECN52:** (19) AOO.

▼ M19*ANNEX XIX***▼ M28****ALIFATINIŲ IR TRITERPENŲ ALKOHOLIŲ KIEKIO NUSTATYMAS
KAPILIARINĖS DUJŲ CHROMATOGRAFIJOS METODU****1. DALYKAS**

Šiame priede aprašytas alifatinių ir triterpenų alkoholių kiekio aliejuose ir riebaluose nustatymo metodas.

▼ M19**2. PRINCIPLE OF THE METHOD**

The fatty substance, with 1-eicosanol added as internal standard, is saponified with ethanolic potassium hydroxide and then the unsaponifiable matter extracted with ethyl ether. The alcoholic fraction is separated from the unsaponifiable matter by chromatography on a basic silica gel plate; the alcohols recovered from the silica gel are transformed into trimethylsilyl ethers and analysed by capillary gas chromatography.

3. EQUIPMENT

- 3.1. 250 ml round-bottomed flask fitted with a reflux condenser having ground-glass joints.
- 3.2. 500 ml separating funnel.
- 3.3. 250 ml round-bottomed flasks.
- 3.4. Chromatographic tank for thin-layer chromatographic analysis, for glass plates of dimensions 20 x 20 cm.
- 3.5. Ultraviolet lamp having a wavelength of 366 or 254 nm.
- 3.6. 100 µl and 500 µl microsyringes.
- 3.7. A cylindrical filter funnel with a G3 porous septum (porosity 15 to 40 µm) of diameter approximately 2 cm and a depth of some 5 cm, with an attachment suitable for filtration under vacuum and a 12/21 male ground glass joint.
- 3.8. 50 ml vacuum conical flask with a 12/21 ground-glass female joint which can be fitted to the filter funnel (3.7).
- 3.9. A 10 ml test tube with a tapering bottom and a sealing stopper.
- 3.10. Gas chromatograph for use with a capillary column, and provided with a splitting system composed of:
 - 3.10.1. Thermostatic chamber for columns (column oven) to hold the temperature desired with a precision of ± 1 °C.
 - 3.10.2. A temperature-adjustable injection unit with a persilanised glass vaporising element.
 - 3.10.3. A flame ionisation detector and converter-amplifier.
 - 3.10.4. Recorder-integrator for operation with the converter-amplifier (3.10.3), with response time not exceeding one second and with variable paper-speed.
- 3.11. Glass or fused silica capillary column, of length 20 to 30 m, internal diameter 0,25 to 0,32 mm, with SE-52 or SE-54 liquid phase or equivalent, with a film thickness between 0,10 and 0,30 µm.
- 3.12. Microsyringe for gas chromatography, of 10 µl capacity with hardened needle.
- 3.13. Analytical balance sensitive to 1 mg (with 0,1 mg display).

▼ M19

4. REAGENTS

- 4.1. Potassium hydroxide, approximately 2 N ethanolic solution: 130 g potassium hydroxide (minimum concentration 85 %) is dissolved, with cooling, in 200 ml distilled water and then made up to one litre with ethanol. The solution should be stored in a well-stoppered opaque glass bottle.
- 4.2. Ethyl ether, pure for analysis.
- 4.3. Anhydrous sodium sulphate, analytical purity.
- 4.4. Glass plates coated with silica gel, without fluorescence indicator, thickness 0,25 mm (commercially available ready for use).
- 4.5. Potassium hydroxide, approximately 0,2 N ethanolic solution; 13 g of potassium hydroxide are dissolved in 20 ml of distilled water and made up to one litre with ethanol.
- 4.6. Benzene, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.7. Acetone, for chromatography (See 5.2.2).
- 4.8. Hexane, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.9. Ethyl ether, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.10. Chloroform, for chromatography.

▼ M28

- 4.11. Plonasluoksnės chromatografijos etaloninis tirpalas: C₂₀–C₂₈ alkoholių arba alkoholių frakcijos, gautos, kaip nurodyta 5.2 punkte, iš alyvuogių išspaudų aliejaus nemuolinamos medžiagos, 0,5 % tirpalas chloroforme.

▼ M19

- 4.12. 0,2 % solution of 2', 7'-dichlorofluorescein in ethanol. Make slightly basic by adding a few drops of 2 N alcoholic potassium hydroxide solution.
- 4.13. Anhydrous pyridine, for chromatography.
- 4.14. Hexamethyl disilazane.
- 4.15. Trimethylchlorosilane.
- 4.16. Standard solutions of trimethylsilyl ethers of aliphatic alcohols from C₂₀ to C₂₈. They may be prepared from mixtures of pure alcohols at the time they are required for use.
- 4.17. A 0,1 % (m/v) solution of 1-eicosanol in chloroform (internal standard).
- 4.18. Carrier gas: hydrogen or helium, gas-chromatographic purity.
- 4.19. Auxiliary gas: nitrogen, gas-chromatographic purity.

5. PROCEDURE

5.1. Preparation of the unsaponifiables

- 5.1.1. Using a 500 µl microsyringe place, into a 250 ml round-bottom flask, a volume of 0,1 % 1-eicosanol solution in chloroform (4.17) containing a quantity of 1-eicosanol approximately equal to 10 % of the aliphatic alcohols content in that portion of sample to be taken for analysis. For example, to 5 g of sample add 250 µl of the 0,1 % 1-eicosanol solution if olive oil and 1 500 µl if olive pomace oil.

Evaporate to dryness in current of nitrogen and then weigh accurately 5 g of the dry filtered sample into the same flask.

▼ **M19**

- 5.1.2. Add 50 ml of 2 N potassium hydroxide ethanolic solution, fit the reflux condenser and heat the apparatus to slight boiling on a steam bath, stirring continuously throughout the heating process until saponification has taken place (the solution becomes clear). Continue heating for a further 20 minutes and then add 50 ml of distilled water through the condenser. The condenser is then disconnected and the flask cooled to approximately 30 °C.
- 5.1.3. The contents of the flask are quantitatively transferred to a separating funnel of 500 ml capacity by adding distilled water several times, using a total of around 50 ml distilled water. Add approximately 80 ml of ethyl ether, shake vigorously for approximately 30 seconds and allow to settle (Note 1).

Separate off the lower aqueous phase collecting it in a second separating funnel. Two further extractions are effected on the aqueous phase, in the same manner, using each time 60 to 70 ml ethyl ether.

Note 1: Emulsions may be eliminated by adding, using as a spray, small quantities of ethyl alcohol or methyl alcohol.

- 5.1.4. The ethyl ether extracts are combined in a separating funnel and washed with distilled water (50 ml at a time) until the washing water gives a neutral reaction.

Discard the washing water, dry with anhydrous sodium sulphate and filter, into a flask of 250 ml capacity which has been weighed beforehand, the funnel and filter being washed with small quantities of ethyl ether which are added to the total.

- 5.1.5. Distil the ether down to a few ml, then bring to dryness under a slight vacuum or in a current of nitrogen, completing drying in an oven at 100 °C for approximately a quarter of an hour, and then weigh after cooling in a desiccator.

5.2. Separation of alcoholic fractions

- 5.2.1. Preparation of basic TLC plates: the silica gel plates (4.4) are immersed completely, in 0,2 N potassium hydroxide solution (4.5) for 10 seconds, and then left to dry for two hours under an extractor hood and finally placed in an oven at 100 °C for one hour.

Remove from the oven and keep in a calcium chloride desiccator until required for use (plates treated in this way must be used within 15 days).

Note 2: When basic silica gel plates are used to separate the alcoholic fraction there is no need to treat the unsaponifiables with alumina. It follows that all acid compounds (fatty acids and others) are retained at the origin thereby obtaining both aliphatic alcohol and terpenic alcohol bands which are both separated distinctly from the sterol band.

- 5.2.2. Place a 65/35 by volume hexane/ethyl ether mixture in the plate-developing chamber to a depth of approximately 1 cm ⁽¹⁾.

Close the chamber using an appropriate cover and leave for half an hour to allow equilibration between vapour and liquid. Strips of filter paper dipping into the eluent may be affixed to the inside surfaces of the tank to reduce the development time by approximately one third and obtain more uniform, regular elution of the components.

⁽¹⁾ In these cases in particular, a 95/5 by volume benzene/acetone eluent mixture must be used to obtain distinct band separation.

▼ M19

Note 3: The developing solution must be replaced for each analysis in order to obtain reproducible developing conditions.

- 5.2.3. An approximately 5 % solution of unsaponifiable matter (5.1.5) in chloroform is prepared and 0,3 ml of the solution is streaked as a uniform strip of minimum thickness, using the 100 µl microsyringe, on a TLC plate at approximately 2 cm from the bottom of the TLC plate. Aligned with the origin, 2 to 3 µl of the aliphatic alcohols reference solution (4.11) are spotted for the identification of the aliphatic alcohols band after development has been completed.
- 5.2.4. Place the plate inside the development tank as stated in 5.2.2. The ambient temperature should be maintained between 15 and 20 °C. Immediately close the chamber with the cover and allow to elute until the solvent front reaches approximately 1 cm from the upper edge of the plate.

The plate is then removed from the development chamber and the solvent evaporated under a hot air current or the plate is left for a while under the extractor hood.

▼ M28

- 5.2.5. Ultravioletinėje šviesoje stebima plokštelė tolygiai apipurškiama plonu 2', 7'-dichlorfluoresceino sluoksniu. Alifatinių alkoholių juostą galima identifikuoti sulyginant su etaloninio tirpalo dėme: juostos ribos pažymimos juodu pieštuku, kartu apibrėžiant alifatinių alkoholių juostą ir tiesiai virš jos esančią terpenų alkoholių juostą (4 pastaba).

4 pastaba. Alifatinių alkoholių juosta ir terpenų alkoholių juosta turi būti sujungta į vieną grupę, atsižvelgiant į galimą kai kurių alifatinių alkoholių migraciją į triterpenų alkoholių juostą. Atskyrimo taikant PSC pavyzdys pateiktas priedėlio 1 paveiksle.

- 5.2.6. Silikagelis pažymėtame plote nugrandomas metaline mentele. Gerai susmulkinta medžiaga nuo plokštelės supilama į filtrą (3.7 punktas). Įpilama 10 ml karšto chloroformo, gerai sumaišoma metaline mentele ir vakuume filtruojama į kūgio formos kolbą (3.8), prijungtą prie filtro

Silikagelis kolboje tris kartus plaunamas dietileteriu (maždaug po 10 ml kiekvieną kartą), filtruojant į tą pačią prie filtro prijungtą kolbą. Filtratas nugarinamas maždaug iki 4–5 ml tūrio, likęs tirpalas supilamas į iš anksto pasvertą 10 ml talpos mėgintuvėlį (3.9), garinama iki sauso likučio nestipriai kaitinant nedidelėje azoto srovėje, likutis iš naujo tirpinamas keliuose acetono lašuose, vėl garinama iki sauso likučio, mėgintuvėlis maždaug 10 minučių dedamas į 105 °C temperatūros džiovinimo spintą, aušinamas eksikatoriuje ir pasveriamas.

Likutį mėgintuvėlyje sudaro alkoholių frakcija.

▼ M19**5.3. Preparation of the trimethylsilyl ethers**

- 5.3.1. The reagent for silylation, consisting of a mixture of 9:3:1 by volume (Note 5) of pyridine-hexamethyldisilazane-trimethylchlorosilane in the proportion of 50 µl for each milligram of aliphatic alcohols, is added to the test tube containing the alcoholic fraction, avoiding all absorption of moisture (Note 6).

▼ M19

Note 5: Solutions which are ready for use are available commercially. Other silanising reagents such as, for example, bis-trimethylsilyl, trifluor acetamide + 1 % trimethyl chlorosilane, which has to be diluted with an equal volume of anhydrous pyridine, are also available.

Note 6: The slight opalescence which may form is normal and does not cause any interference. The formation of a white floc or the appearance of a pink colour are indicative of the presence of moisture or deterioration of the reagent. If these occur the test must be repeated.

- 5.3.2. Stopper the test tube, shake carefully (without overturning) until the aliphatic alcohols are completely dissolved. Stand for at least 15 minutes at ambient temperature and then centrifuge for a few minutes. The clear solution is ready for gas chromatographic analysis.

5.4. **Gas chromatography analysis**

5.4.1. Preliminary operations, column packing

- 5.4.1.1. Fit the column in the gas chromatograph, attaching the inlet end to the injector connected to the splitting system and the outlet end to the detector. Carry out a general check of the gas chromatography assembly (tightness of gas fittings, efficiency of the detector, efficiency of the splitting system and of the recording system, etc.).

- 5.4.1.2. If the column is being used for the first time it is recommended that it should be subjected to conditioning. A little carrier gas is passed through the capillary column and then the gas chromatography assembly is switched on and gradually heated until a temperature not less than 20 °C above the operating temperature (see Note 7) is attained. That temperature is held for not less than two hours and then the assembly is brought to the operating conditions (regulation of gas flow, split flame ignition, connection to the electronic recorder, adjustment of the temperature of the capillary column oven, the detector and the injector, etc.) and the signal is adjusted to a sensitivity not less than twice the highest level contemplated for the execution of the analysis. The course of the base line must be linear, without peaks of any kind, and must not drift. A negative straight-line drift indicates leakage from the column connections; a positive drift indicates inadequate conditioning of the column.

Note 7: The conditioning temperature shall be at least 20 °C less than the maximum temperature contemplated for the liquid phase employed.

5.4.2. Choice of operating conditions

- 5.4.2.1. The guideline operating conditions are as follows:

— column temperature: the initial isotherm is set at 180 °C for eight minutes and then programmed at 5 °C/minute to 260 °C and a further 15 minutes at 260 °C,

— temperature of evaporator: 280 °C,

— temperature of detector: 290 °C,

— linear velocity of carrier gas: helium 20 to 35 cm/s, hydrogen 30 to 50 cm/s,

— splitting ratio: 1:50 to 1:100,

— sensitivity of instrument: 4 to 16 times the minimum attenuation,

▼ M19

- sensitivity of recording: 1 to 2 mV fs,
- paper speed: 30 to 60 cm/h,
- quantity of substance injected: 0,5 to 1 µl of TMSE solution.

The above conditions may be modified according to the characteristics of the column and of the gas chromatograph to obtain chromatograms satisfying the following conditions:

- alcohol C₂₆ retention time shall be 18 ± 5 minutes,
- the alcohol C₂₂ peak shall be 80 ± 20 % of the full scale value for olive oil and 40 ± 20 % of the full scale value for seed oil.

5.4.2.2. The above requirements are checked by repeated injection of the standard TMSE mixture of alcohols and the operating conditions are adjusted to yield the best possible results.

5.4.2.3. The parameters for the integration of peaks shall be set so that a correct appraisal of the areas of the peaks considered is obtained.

5.4.3. Analytical procedure

5.4.3.1. Using the microsyringe of 10 µl capacity draw in 1 µl of hexane followed by 0,5 µl of air and subsequently 0,5 to 1 µl of the sample solution; raise the plunger of the syringe further so the needle is emptied. Push the needle through the membrane of the injection unit and after one to two seconds inject rapidly, then slowly remove the needle after some five seconds.

5.4.3.2. Recording is effected until the TMSE of the aliphatic alcohols present have been eluted completely. The base line shall always correspond to the requirements of 5.4.1.2.

▼ M28

5.4.4. Smailių identifikavimas

Atskiros smailės identifikuojamos pagal sulaikymo trukmę ir lyginant su etaloniniu TMSE mišiniu, analizuojamu tokiomis pat sąlygomis.

Rafinuoto alyvuogių aliejaus alkoholių frakcijos chromatogramos pavyzdžiai pateikti priedėlio 2 ir 3 paveiksluose.

▼ M19

5.4.5. Quantitative evaluation

5.4.5.1. The peak areas of 1-eicosanol and of the aliphatic alcohols C₂₂, C₂₄, C₂₆ and C₂₈ are calculated by electronic integration.

5.4.5.2. The contents of each aliphatic alcohol, expressed in mg/1 000 g fatty substance, are calculated as follows:

$$\text{alcohol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

where:

A_x = area of the alcohol peak x

A_s = area of 1-eicosanol

m_s = mass of 1-eicosanol in milligrams

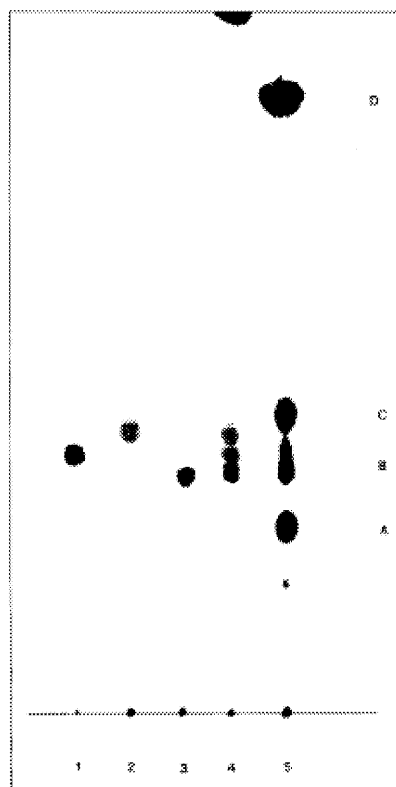
m = mass of sample drawn for determination, in grams.

6. EXPRESSION OF THE RESULTS

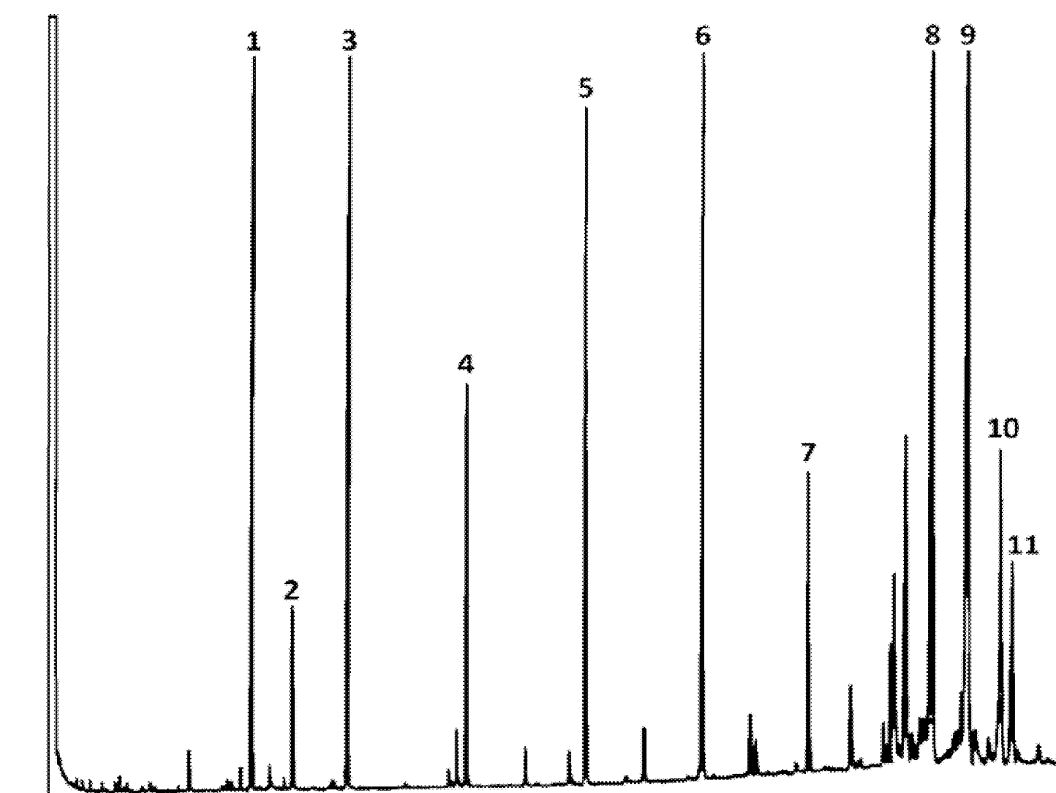
The contents of the individual aliphatic alcohols in mg/1 000 g of fatty substance and the sum of the „total aliphatic alcohols“ are reported.

▼ **M28***Priedėlis***Atskyrimo PSC metodu pavyzdys ir chromatogramų pavyzdžiai***1 paveikslas*

Alyvuogių aliejaus nemuilinamų medžiagų frakcijos, išplautos heksano ir dietileterio mišiniu (65/35), plonasluoksnės chromatografijos plokštelė



- | | | | |
|---|--|---|-------------------------|
| 1 | C ₂₆ alkoholis; | A | steroliai; |
| 2 | C ₃₀ alkoholis; | B | alifatiniai alkoholiai; |
| 3 | C ₂₀ alkoholis; | C | triterpenų alkoholiai; |
| 4 | C ₂₀₋₂₂₋₂₆₋₃₀ alkoholių mišinys; | D | skvalenas; |
| 5 | aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo aliejaus nemuilinamos medžiagos. | | |

▼ **M28***2 paveikslas***Rafinuoto alyvuogių aliejaus alkoholių frakcijos chromatograma**

1 – fitolis;

2 – geranilgeraniolis;

3 – C₂₀ alkoholis (IS);4 – C₂₂ alkoholis;5 – C₂₄ alkoholis;6 – C₂₆ alkoholis;7 – C₂₈ alkoholis;

8 – cikloartenolis;

9 – 24-metilencikloartenolis;

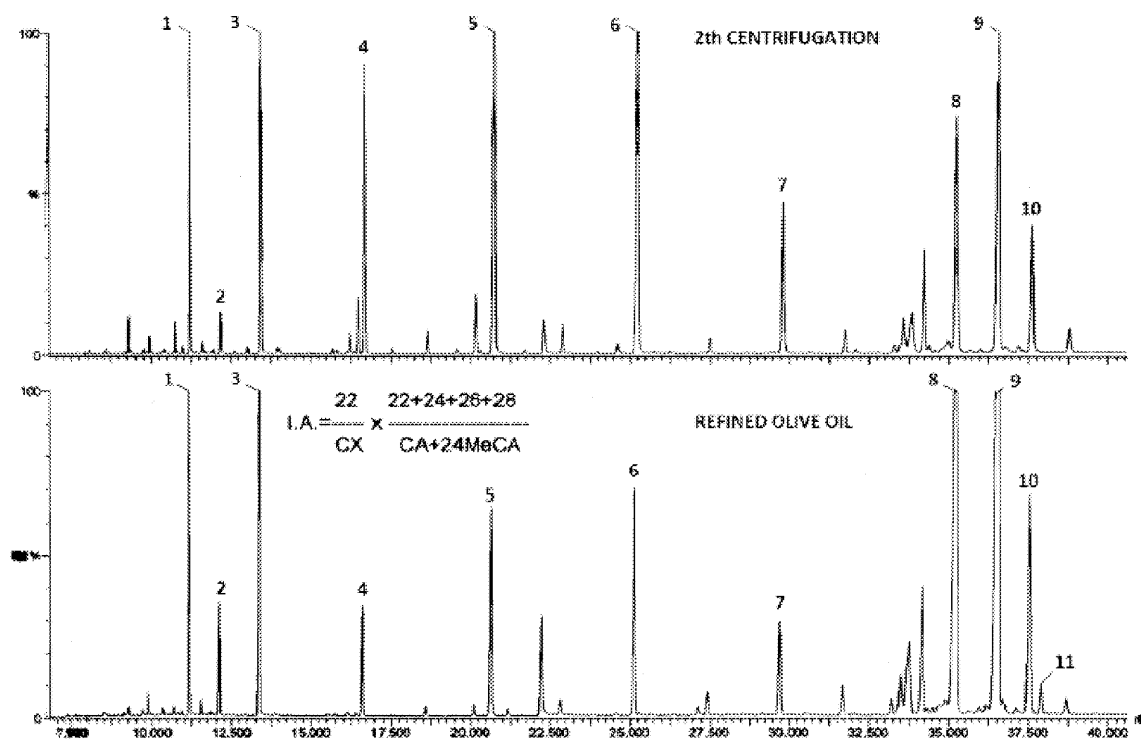
10 – citrostadienolis;

11 – ciklobranolis.

▼ M28

3 paveikslas

Rafinuoto alyvuogių aliejaus ir antrinio centrifugavimo alyvuogių aliejaus alifatiniai ir triterpenų alkoholiai



1 – fitolis;

5 – C₂₄ alkoholis;

9 – 24-metilencikloartenolis
(24MeCA);

2 – geranilgeraniolis (CX);

6 – C₂₆ alkoholis;

10 – citrostadienolis;

3 – C₂₀ alkoholis;

7 – C₂₈ alkoholis;

11 – ciklobranolis.

4 – C₂₂ alkoholis;

8 – cikloartenolis (CA);

▼ **M23***XX PRIEDAS***Vaškų, riebiųjų rūgščių metilo esterių ir riebiųjų rūgščių etilo esterių kiekio nustatymo kapiliarinės dujų chromatografijos būdu metodika**

1. TIKSLAS

Ši metodika skirta vaškų, riebiųjų rūgščių metilo ir etilo esterių kiekiams alyvuogių aliejuose nustatyti. Atskiri vaškai ir alkilesteriai atskiriami pagal anglies atomų skaičių. Metodika rekomenduojama kaip priemonė alyvuogių aliejui atskirti nuo alyvuogių išspaudų aliejaus ir kaip aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo alyvuogių aliejų kokybės parametras, leidžiantis nustatyti nesąžiningai pagamintus pirmojo spaudimo alyvuogių aliejų mišinius su žemesnės kokybės aliejais, nesvarbu, ar jie pirmojo spaudimo, klasikiniai (*lampante*) ar kokie nors dezodoruoti aliejai.

2. PRINCIPAS

Į aliejų dedamas atitinkamas vidinis etalonas ir atliekamas chromatografinis frakcionavimas kolonėlėje su hidratuotu silikageliu. ► **C1** Regeneruojama frakcija, kuri bandymo sąlygomis išplaunama (jos poliškumas yra mažesnis nei triacilglicerolių), ir kapiliarinės dujų chromatografijos metodu atliekama tiesioginė analizė. ◀

3. PRIETAISAI

3.1. Erlenmejerio kolba, 25 ml.

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

3.3. Su kapiliarine kolonėle tinkamas naudoti dujų chromatografas su tiesioginio įpurškimo į kolonėlę sistema, kuri sudaro:

3.3.1. Termostatu kontroliuojama krosnis su galimybe programuoti temperatūrą.

3.3.2. Šaltas tiesioginio įpurškimo į kolonėlę inžektorius.

3.3.3. Liepsnos jonizacinis detektorius ir konverteris stiprintuvus.

3.3.4. Kintamo greičio savirašis integratorius (1 pastaba), skirtas naudoti su konverteriu stiprintuvu (3.3.3 punktą), kurio atsako trukmė ne didesnė nei 1 s.

1 pastaba. Jei dujų chromatografijos duomenys įvedami naudojantis kompiuteriu, galima naudoti ir kompiuterizuotas sistemas.

3.3.5. Kapiliarinė kolonėlė, kvarcinio stiklo (vaškų ir metilo bei etilo esterių analizei atlikti), ilgis 8–12 m, vidinis diametras 0,25–0,32 mm, iš vidaus padengta lygia 0,10–0,30 μm storio skystos fazės plėvele (2 pastaba).

2 pastaba. Prekyboje yra šiam tikslui tinkamų skystų fazių, tokių kaip SE52, SE54 ir pan.

3.4. Mikrošvirkštas, 10 μl, su kietinta adata, tiesioginio įpurškimo į kolonėlę reikmėms.

3.5. Elektrinė purtyklė.

3.6. Sukamasis garintuvas.

3.7. Mufelinė krosnis.

3.8. Analizinės svarstyklės, kurių svėrimo tikslumas ± 0,1 mg.

▼ **M23**

- 3.9. Įprasti laboratoriniai stiklo indai.

4. REAGENTAI

- 4.1. **Silikagelis**, 60–200 µm akutėmis. Silikagelis dedamas į mufelinę krosnį ir ne trumpiau kaip 4 val. kaitinamas 500 °C temperatūroje. Ataušinus įpilama 2 % panaudoto silikagelio kiekio atitinkantis vandens kiekis. Gerai supurtoma, kad suspensija būtų homogenizuota, ir prieš naudojimą ne trumpiau nei 12 valandų laikoma eksikatoriuje.

- 4.2. **n-heksanas**, chromatografijos klasės arba likučių klasės (reikia patikrinti grynumą).

ĮSPĖJIMAS – Garai gali užsidegti. Laikykite juos atokiai nuo šilumos šaltinių, žiežirbų ar atviros liepsnos. Pasirūpinkite, kad buteliukai visuomet būtų tinkamai uždaryti. Naudojimo metu užtikrinkite tinkamą vėdinimą. Venkite garų susikaupimo ir pašalinkite visus galimus gaisro sukėlėjus, tokius kaip šildytuvus ar elektros prietaisus, kurie nėra pagaminti iš nedegių medžiagų. Žalingi įkvėpus, nes gali pažeisti nervų ląsteles. Venkite kvėpavimo garais. Jei reikia, naudokite tinkamus kvėpavimo aparatus. Venkite patekimo į akis arba ant odos.

- 4.3. **Etilo eteris, chromatografijos klasės.**

ĮSPĖJIMAS – Labai degus ir vidutiniškai toksiškas. Dirgina odą. Žalingas įkvėpus. Gali pažeisti akis. Poveikis gali pasireikšti vėliau. Gali sudaryti sprogus peroksidus. Garai gali užsidegti. Laikykite juos atokiai nuo šilumos šaltinių, žiežirbų ar atviros liepsnos. Pasirūpinkite, kad buteliukai visuomet būtų tinkamai uždaryti. Naudojimo metu užtikrinkite tinkamą vėdinimą. Venkite garų susikaupimo ir pašalinkite visus galimus gaisro sukėlėjus, tokius kaip šildytuvus ar elektros prietaisus, kurie nėra pagaminti iš nedegių medžiagų. Negerkite iki išdžiūvimo ar beveik iki išdžiūvimo. Pridėjus vandens ar tinkamo redukuojančio reagento, peroksidų susidarymą galima sumažinti. Negerkite. Venkite kvėpavimo garais. Venkite ilgo ar pasikartojančio sąlyčio su oda.

- 4.4. **n-heptanas**, chromatografijos klasės, arba **izooktanais**.

ĮSPĖJIMAS – Degus. Žalingas įkvėpus. Laikykite juos atokiai nuo šilumos šaltinių, žiežirbų ar atviros liepsnos. Pasirūpinkite, kad buteliukai visuomet būtų tinkamai uždaryti. Naudojimo metu užtikrinkite tinkamą vėdinimą. Venkite kvėpavimo garais. Venkite ilgo ar pasikartojančio sąlyčio su oda.

- 4.5. **Etaloninis 0,05 % (m/V) laurileikozanato tirpalas (3 pastaba)** heptane (vidinis vašku etalonas).

3 pastaba. Taip pat galima naudoti palmitilo palmitatą, miristilstereatą arba eikozildodekanoatą.

- 4.6. **Etaloninis 0,02 % (m/V) metilheptadekanoato tirpalas** heptane (vidinis metilo ir etilo esterių etalonas).

- 4.7. **Sudanas 1 (1-fenilazo-2-naftolis).**

▼ **M23****4.8. Dujos nešiklis: vandenilis arba helis, grynos, dujų chromatografijos klasės.****ĮSPĖJIMAS**

Vandenilis. Suslėgus labai degus. Laikykite atokiai nuo šilumos šaltinių, kibirkščių, atvirų liepsnų ar elektros prietaisų, pagamintų ne iš nedegių medžiagų. Pasirūpinkite, kad nenaudojant buteliuko vožtuvus būtų uždarytas. Visuomet naudokite slėgio reduktorių. Prieš atidarydami buteliuko vožtuvą sumažinkite reduktoriaus spyruoklės įtempimą. Atidarydami vožtuvą nestovėkite prieš buteliuko išleidimo angą. Naudojimo metu užtikrinkite tinkamą vėdinimą. Neperkelkite vandenilio iš vieno buteliuko į kitą. Nemaišykite dujų buteliuke. Pasirūpinkite, kad buteliukų nebūtų galima apversti. Saugokite juos nuo saulės šviesos ir nuo šilumos šaltinių. Laikykite korozijos nesukeliančioje aplinkoje. Nenaudokite pažeistų ar nepažymėtų buteliukų.

Helis. Suspaustos aukšto slėgio dujos. Sumažina deguonies, kuriuo galima kvėpuoti, kiekį. Laikykite buteliuką uždarytą. Naudojimo metu užtikrinkite tinkamą vėdinimą. Neikite į sandėliavimo vietas, nebent jos tinkamai vėdinamos. Visuomet naudokite slėgio reduktorių. Prieš atidarydami buteliuko vožtuvą sumažinkite reduktoriaus spyruoklės įtempimą. Neperkelkite dujų iš vieno buteliuko į kitą. Pasirūpinkite, kad buteliukų nebūtų galima apversti. Atidarydami vožtuvą nestovėkite prieš buteliuko išleidimo angą. Saugokite juos nuo saulės šviesos ir nuo šilumos šaltinių. Laikykite korozijos nesukeliančioje aplinkoje. Nenaudokite pažeistų ar nepažymėtų buteliukų. Neįkvėpkite. Naudokite tik techninėms reikmėms.

4.9. Pagalbinės dujos:

— vandenilis, grynas, dujų chromatografijos klasės;

— oras, grynas, dujų chromatografijos klasės.

ĮSPĖJIMAS

Oras. Suspaustos aukšto slėgio dujos. Naudokite atsargiai, kai yra degių medžiagų, nes daugumos organinių junginių savaiminio užsiliepsnojimo temperatūra ore yra gerokai mažesnė, esant dideliame slėgiui. Pasirūpinkite, kad nenaudojant buteliuko vožtuvus būtų uždarytas. Visuomet naudokite su slėgio reduktoriumi. Prieš atidarydami buteliuko vožtuvą sumažinkite reduktoriaus spyruoklės įtempimą. Atidarydami vožtuvą nestovėkite prieš buteliuko išleidimo angą. Neperkelkite dujų iš vieno buteliuko į kitą. Nemaišykite dujų buteliuke. Pasirūpinkite, kad buteliukų nebūtų galima apversti. Saugokite juos nuo saulės šviesos ir nuo šilumos šaltinių. Laikykite korozijos nesukeliančioje aplinkoje. Nenaudokite pažeistų ar nepažymėtų buteliukų. Techninėms reikmėms skirtu oro negalima naudoti inhaliatoriuose ar kvėpavimo aparatuose.

5. DARBO EIGA**5.1. Chromatografinės kolonėlės paruošimas**

15 g silikagelio (4.1 punktas) suspenduojama n-heksane (4.2 punktas) ir supilama į kolonėlę (3.2 punktas). Silikageliui leidžiama savaime nusėsti. Kad chromatografinis sluoksnis būtų vienalytiškesnis, nusodinimas užbaigiamas su elektrine purtykle. Priemaišos pašalinamos per silikagelį praleidžiant 30 ml n-heksano. Naudojantis analizinėmis svarstyklėmis (3.8 punktas) į 25 ml talpos kolbą (3.1 punktas) tiksliai pasveriami 500 mg mėginio ir įdedamas reikiamas kiekis vidinio etalono (4.5 punktas), atsižvelgiant į numatomą vaško kiekį mėginyje, t. y., įdedama 0,1 mg laurilheksano alyvuogių aliejaus atveju, 0,25–0,5 mg alyvų išspaudų aliejaus atveju ir 0,05 mg metilheptadekanoato alyvuogių aliejų atveju (4.6 punktas).

▼ **M23**

Paruoštas mėginys dviem 2 ml n-heksano (4.2 punktas) porcijomis supilamas į chromatografijos kolonėlę.

Tirpikliui leidžiama ištekti iki 1 mm lygio virš absorbento viršutinio paviršiaus. Leidžiamas likęs n-heksanas ir etilo eteris (99:1) ir šurenkama 220 ml, leidžiant maždaug 15 lašų per 10 sekundžių greičiu. (**Šioje frakcijoje yra metilo ir etilo esteriai ir vašakai**). (4 pastaba) (5 pastaba).

4 pastaba. n-heksano/etileterio mišinį (99:1) kasdien reikia ruošti iš naujo

5 pastaba. Kad būtų galima vizualiai patikrinti, ar vašakai tinkamai išplauti, į mėginio tirpalą galima pridėti 100 µl Sudan I dažų (1 % išplovimo mišinyje).

Dažų sulaikymo trukmė yra didesnė nei vaškų ir mažesnė nei triacilglicerolių. Taigi, dažams pasiekus chromatografinės kolonėlės dugną, išplovimą reikia sustabdyti, nes visi vašakai jau išplauti.

Gautos frakcijos garinamos sukamajame garintuve, kol išgarinamas beveik visas tirpiklis. Paskutinius 2 ml pašalinkite veikdami silpna azoto srove. Surinkite frakciją, kurioje yra metilo ir etilo esteriai, praplaudami 2-4 ml n-heptano ar izooktano.

5.2. Dujų chromatografinė analizė

5.2.1. Parengiamasis procesas

► **C1** Kolonėlė prijungiama prie dujų chromatografo (3.3 punktas), kolonėlės pradžią sujungiant su kolonėlės tiesioginio įpurškimo įtaisu, galą – su detektoriumi. ◀ Patikrinamas dujų chromatografijos įrenginys (dujų kilpų veikimas, detektoriaus ir savirašės sistemos veikimas ir t. t.).

Jei kolonėlė naudojama pirmą kartą, patartina ją kondicionuoti. Per kolonėlę paleidžiama nestipri dujų srovė, paskui įjungiamas dujų chromatografas. Lėtai kaitinama, kol po maždaug 4 valandų temperatūra pasiekia 350 °C.

Ši temperatūra palaikoma ne mažiau kaip 2 valandas, po to nustatomos įrenginio darbo sąlygos (reguliuojamas dujų srautas, užkuriama liepsna, prijungiamas elektroninis savirašis (3.3.4 punktas), nustatoma kolonėlės krosnies temperatūra, reguliuojamas detektorius ir t. t.). Signalas užrašomas esant jautrumui, kuris bent du kartus didesnis nei reikalingas analizei atlikti. Pagrindo linija turi būti brėžiama tiesi, be jokių smailių ir nukrypimų.

Jei yra neigiamų nuokrypių nuo tiesios linijos, tai rodo, kad kolonėlės jungtys sujungtos neteisingai, o jei yra teigiamų nuokrypių – kolonėlė netinkamai kondicionuota.

5.2.2. Vaškų ir metilo bei etilo esterių darbo sąlygų parinkimas (6 pastaba).

Paprastai turi būti laikomasi tokių darbo sąlygų:

— kolonėlės temperatūra:

20 °C/min 5 °C/min

80 °C iš pradžių (1') ————— 140 °C ————— 335 °C (20)

— detektoriaus temperatūra: 350 °C.

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

▼ M23

— Dujos nešiklis: helis arba vandenilis, naudojamas pasirinktoms dujoms optimalus linijinis greitis (žr. A priedą).

— prietaiso jautris: tinkamas pirmiau nurodytoms sąlygoms išpildyti.

6 pastaba: Dėl labai aukštos galutinės temperatūros galimas teigiamas nuokrypis, tačiau jis negali viršyti 10 % didžiausios skalės vertės.

Šios sąlygos gali būti keičiamos, kad atitiktų kolonėlės ir dujų chromatografo charakteristikas, siekiant atskirti visus vaškus ir riebiųjų rūgščių metilo ir etilo esterius ir gauti patenkinamą smailių atsiskyrimą (žr. 2, 3 ir 4 pav.) ir 18 ± 3 minučių laurileikozanato vidinio etalono sulaikymo trukmę. Iškiliausia vaškų smailė turi sudaryti daugiau nei 60 % didžiausios skalės vertės, o metilheptadekanoato vidinio etalono smailė metilo ir etilo esterių atveju turi pasiekti didžiausią skalės vertę.

Smailių integravimo parametrus reikia nustatyti taip, kad būtų gautas teisingas nagrinėjamų smailių plotų įvertinimas.

5.3. Analizės atlikimas

10 µl mikrošvirkštu paimkite iki 10 µl tirpalo, traukdami stūmoklį atgal tol, kol adata bus tuščia. Įkiškite adatą į įpurškimo sistemą ir greitai įpurškite po 1–2 s. Po maždaug 5 s adatą švelniai ištraukite.

Registravimą vykdykite tol, kol vaškai arba stigmasdienai bus visiškai išplauti, priklausomai nuo analizuojamos frakcijos.

Pagrindo linija turi visuomet atitikti nustatytas sąlygas.

5.4. Smailių identifikavimas

Smailės identifikuojamos pagal sulaikymo trukmes, lyginant jas su žinomas sulaikymo trukmes turinčių vaškų mišiniais, analizuojamais tomis pačiomis sąlygomis. Alkilesteriai nustatomi iš pagrindinių alyvuogių aliejų riebiųjų rūgščių (palmitino ir oleino) metilo ir etilo esterių mišinių.

Pirmojo spaudimo alyvuogių aliejaus vaškų chromatograma parodyta 1 paveiksle. 2 ir 3 paveiksluose parodytos dviejų mažmeninėje prekyboje parduodamų aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo alyvuogių aliejų chromatogramos – viena su metilo ir etilo esteriais, o kita be jų. 4 paveiksle pateikiamos pačios aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo alyvuogių aliejaus ir to paties aliejaus, į kurį įpilta 20 % dezodoruoto aliejaus, chromatogramos.

5.5. Kiekybinė vaškų analizė

Integratoriumi išmatuojami laurleikozanato vidinį etaloną ir C₄₀–C₄₆ alifatinus esterius atitinkančių smailių plotai.

Sudedant visus atskirus vaškus, mg/kg riebalų, nustatomas bendras vaškų kiekis:

$$\text{Vaškai, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

▼ M23

čia:

A_x = atskiro esterio smailę atitinkantis plotas, kompiuteriniais vienetais

A_s = laurileikozanato vidinio etalono smailę atitinkantis plotas, kompiuteriniais vienetais

m_s = pridėto laurileikozanato vidinio etalono masė, miligramais;

m = nustatymui paimto mėginio masė, gramais.

5.5.1. *Metilo ir etilo esterių kiekybinė analizė***▼ C1**

Integratoriumi išmatuojami smailių, atitinkančių metilheptadekanoato vidinį etaloną, C_{16} ir C_{18} riebiųjų rūgščių metilo esterius ir C_{16} ir C_{18} riebiųjų rūgščių etilo esterius, plotai.

▼ M23

Nustatomas kiekvieno alkilesterio kiekis, mg/kg riebalų:

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

čia:

A_x = atskirą C_{16} ir C_{18} esterio smailę atitinkantis plotas, kompiuteriniais vienetais

A_s = atskirą metilheptadekanoato vidinio etalono smailę atitinkantis plotas, kompiuteriniais vienetais

m_s = pridėto metilheptadekanoato vidinio etalono masė, miligramais;

m = nustatymui paimto mėginio masė, gramais.

6. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

Pateikite skirtingų vaškų nuo C_{40} iki C_{46} kiekių sumą (7 *pastaba*) miligramais riebalų kilograme.

▼ C1

Pateikite metilesterių ir etilesterių nuo C_{16} iki C_{18} kiekių sumą ir bendrą jų abiejų kiekį.

▼ M23

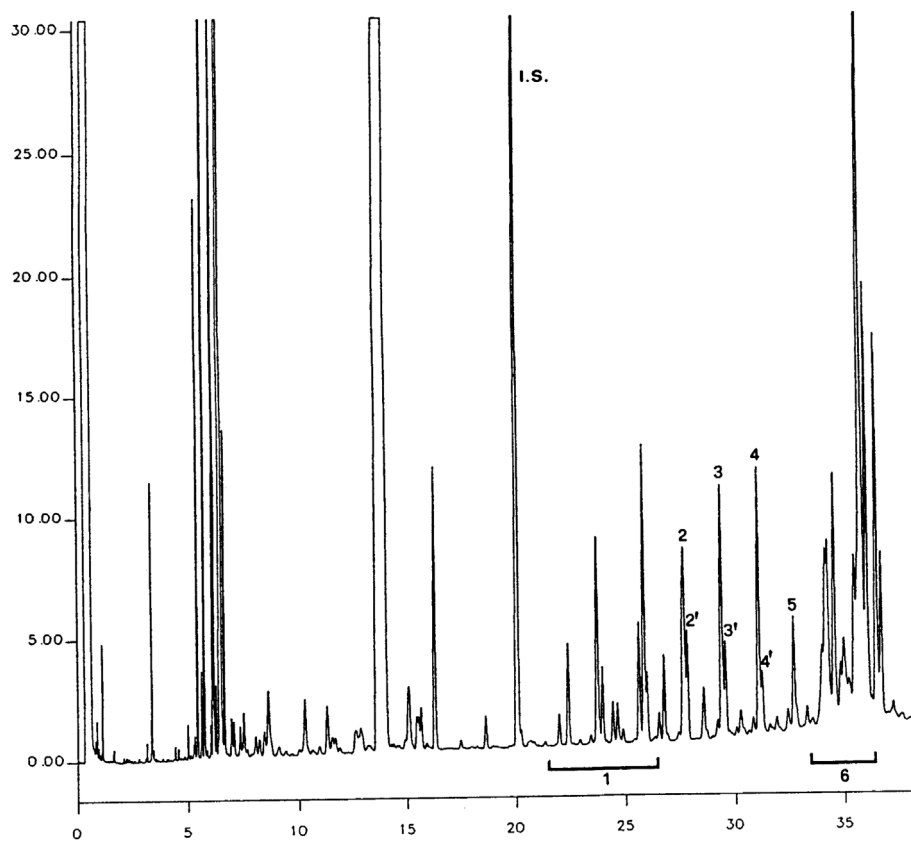
Rezultatus reikia suapvalinti iki artimiausių mg/kg.

7 *pastaba*. Kiekybinio įvertinimo komponentai yra smailės su lyginiais anglies atomų skaičiais iš C_{40} – C_{46} esterių pagal vaškų alyvuogių aliejuje mėginio chromatogramą, pateiktą pridėdame paveiksle. Nustatymo reikmėms, jei C_{46} esteris yra pasidalijęs, rekomenduojama analizuoti alyvuogių išspaudų aliejaus vaškų frakciją, kurioje C_{46} smailę galima atskirti, nes ji aiškiai vyrauja.

Pateikite etilesterių ir metilesterių santykį.

▼ M23

1 pav.

Alyvuofių aliejaus vaškų frakcijos dujų chromatogramos pavyzdys ⁽¹⁾

Riebiųjų rūgščių metilo ir etilo esterių smailės, kurių sulaikymo trukmė 5–8 min

Paiškinimai:

I.S. = Laurileikozanatas

1 = Diterpeniniai esteriai

2+2' = C₄₀ esteriai

3+3' = C₄₂ esteriai

4+4' = C₄₄ esteriai

5 = C₄₆ esteriai

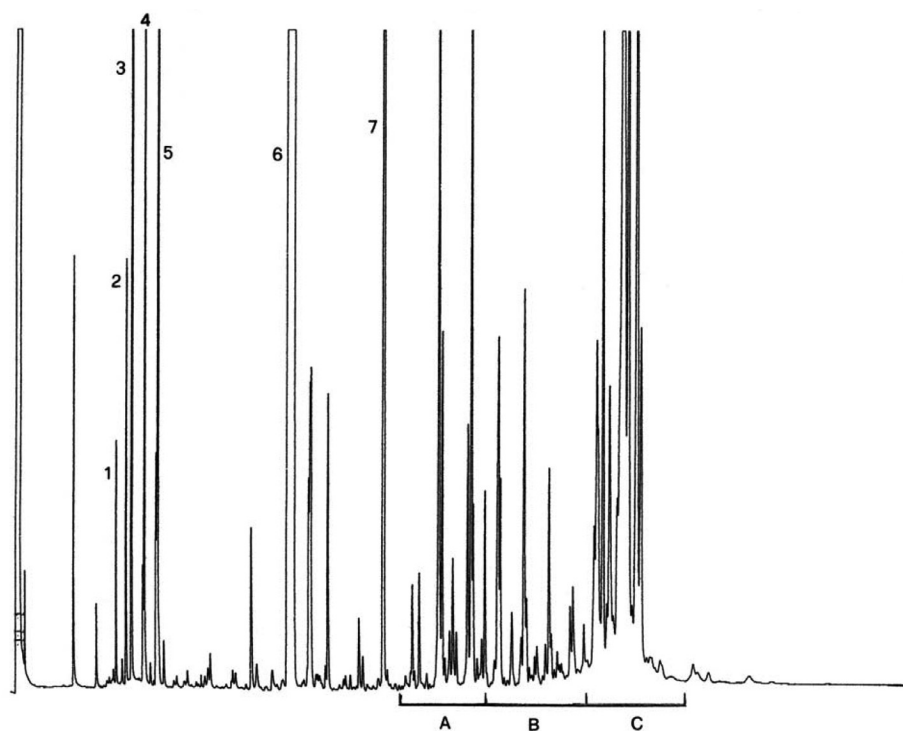
6 = Steroliniai esteriai ir triterpeninis alkoholis

⁽¹⁾ Atlikus sterolinių esterių išplovimą, chromatogramoje ryškių smailių (triacilglicerolių) neturi būti.

▼ **M23**

2 pav.

Pirmojo spaudimo alyvuogių aliejaus metilesteriai, etilesteriai ir vaškai



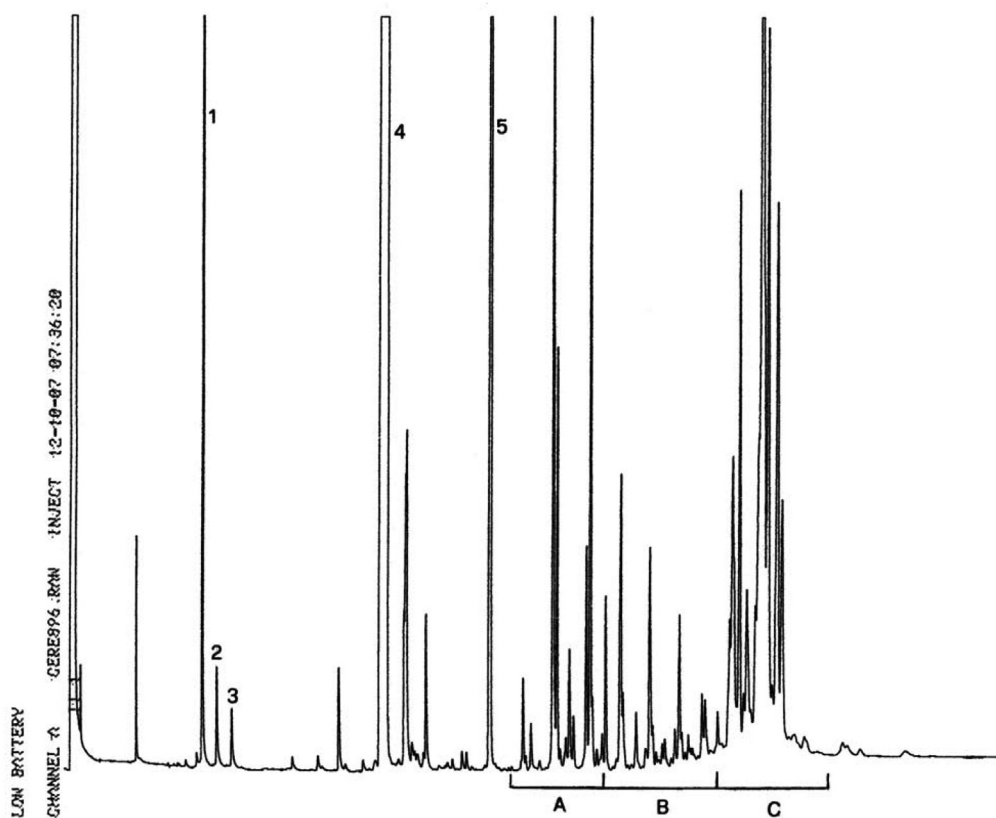
Paiškinimai:

- 1 – C₁₆ metilas
- 2 – C₁₆ etilas
- 3 – metilheptadekanoato vidinis etalonas
- 4 – C₁₈ metilas
- 5 – C₁₈ etilas
- 6 – skvalenas
- 7 – laurileikozanato vidinis etalonas
- A – diterpeniniai esteriai
- B – vaškai
- C – Steroliniai esteriai ir triterpeniniai esteriai

▼ **M23**

3 pav.

Aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo alyvuogių aliejaus metilesteriai, etilesteriai ir vaškai



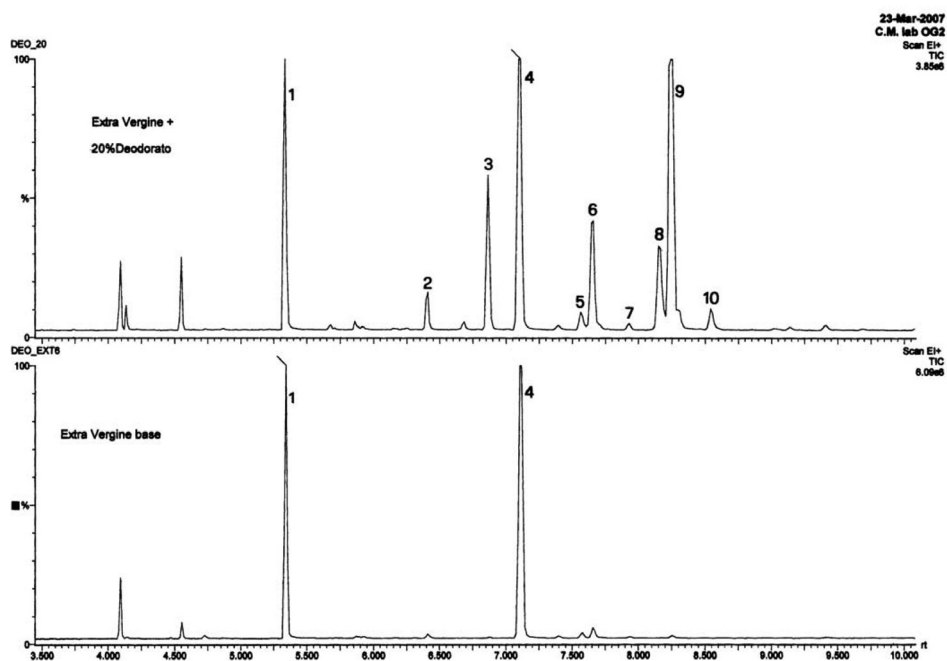
Paiškinimai:

- 1 – metilheptadekanoato vidinis standartas
- 2 – C₁₈ metilas
- 3 – C₁₈ etilas
- 4 – skvalenas
- 5 – laurileikozanato vidinis etalonas
- A – diterpeniniai esteriai
- B – vaškai
- C – Steroliniai esteriai ir triterpeniniai esteriai

▼ **M23**

4 paveikslas

Aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo alyvuogių aliejaus ir to paties aliejaus, į kurį įpilta dezodoruoto aliejaus, chromatogramos dalis



Paaiškinimai:

- 1 – metilmiristato vidinis etalonas
- 2 – metilpalmitatas
- 3 – etilpalmitatas
- 4 – metilheptadekanoato vidinis etalonas
- 5 – metilinoleatas
- 6 – metiloleatas
- 7 – metilstearatas
- 8 – etilinoleatas
- 9 – etiloleatas
- 10 – etilstearatas

▼ M23*A priedėlis***Dujų linijinio greičio nustatymas**

Į normalioms darbo sąlygoms nustatytą dujų chromatografą įpurškiama 1:3 μ l metano (arba propano). Išmatuojamas laikas, per kurį dujos prateka 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, cm, o t_M yra išmatuotas laikas sekundėmis.

▼ M28

XXI PRIEDAS

8 straipsnio 2 dalyje nurodytų alyvuogių aliejaus atitikties patikrų rezultatai

				Ženklinimas						Cheminiai parametrai			Organoleptinės savybės ⁽⁴⁾			Galutinė išvada	
Mėginys	Kategorija	Kilmės šalis	Tikrinimo vieta ⁽¹⁾	Teisinis pavadinimas	Kilmės vietos nuoroda	Laikymo sąlygos	Klaidinga informacija	Iškaitomumas	A/N ⁽³⁾	Už ribų išeinantys parametrai T/N	Jeigu taip, nurodykite, koks (kokie) ⁽²⁾	A/N ⁽³⁾	Trūkumų vidurkis	Vaisių likučių vidurkis	A/N ⁽³⁾	Reikiami veiksmai	Sankcijos

⁽¹⁾ Vidaus rinka (malūnas, išpilstytojai, mažmeninės prekybos etapas), eksportas, importas.
⁽²⁾ Kiekviena I priede pateikta alyvuogių aliejaus savybė turi turėti kodą.
⁽³⁾ Atitinka / neatitinka.
⁽⁴⁾ Nereikalaujama alyvuogių ir išspaudų aliejui.