

Šis dokumentas yra skirtas tik informacijai, ir institucijos nėra teisiškai atsakingos už jo turinį

► **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 , 5.9.1991, p. 1)

iš dalies keičiamas:

		Oficialusis leidinys		
		Nr.	puslapis	data
► <u>M1</u>	Komisijos Reglamentas (EEB) Nr. 3682/91 1991 m. gruodžio 17 d.	L 349	36	18.12.1991
► <u>M2</u>	Komisijos Reglamentas (EEB) Nr. 1429/92 1992 m. gegužės 26 d.	L 150	17	2.6.1992
► <u>M3</u>	Commission Regulation (EEC) No 1683/92 of 29 June 1992 (*)	L 176	27	30.6.1992
► <u>M4</u>	Commission Regulation (EEC) No 1996/92 of 15 July 1992 (*)	L 199	18	18.7.1992
► <u>M5</u>	Komisijos reglamentas (EEB) Nr. 3288/92 1992 m. lapkričio 12 d.	L 327	28	13.11.1992
► <u>M6</u>	Komisijos reglamentas (EEB) Nr.183/93 1993 m. sausio 29 d.	L 22	58	30.1.1993
► <u>M7</u>	iš dalies keičiamas Komisijos reglamentas (EEB) Nr. 826/93 1993 m. balandžio 6 d.	L 87	6	7.4.1993
► <u>M8</u>	Commission Regulation (EEC) No 620/93 of 17 March 1993 (*)	L 66	29	18.3.1993
► <u>M9</u>	Komisijos reglamentas (EB) Nr. 177/94 1994 m. sausio 28 d.	L 24	33	29.1.1994
► <u>M10</u>	Commission Regulation (EC) No 2632/94 of 28 October 1994 (*)	L 280	43	29.10.1994
► <u>M11</u>	Komisijos reglamentas (EB) Nr. 656/95, 1995 m. kovo 28 d.	L 69	1	29.3.1995
► <u>M12</u>	Commission Regulation (EC) No 2527/95 of 27 October 1995 (*)	L 258	49	28.10.1995
► <u>M13</u>	Commission Regulation (EC) No 2472/97 of 11 December 1997 (*)	L 341	25	12.12.1997
► <u>M14</u>	Komisijos reglamentas (EB) Nr. 282/98 1998 m. vasario 3 d.	L 28	5	4.2.1998
► <u>M15</u>	Commission Regulation (EC) No 2248/98 of 19 October 1998 (*)	L 282	55	20.10.1998
► <u>M16</u>	Komisijos reglamentas (EB) Nr. 379/1999 1999 m. vasario 19 d.	L 46	15	20.2.1999
► <u>M17</u>	Commission Regulation (EC) No 455/2001 of 6 March 2001 (*)	L 65	9	7.3.2001
► <u>M18</u>	Commission Regulation (EC) No 2042/2001 of 18 October 2001 (*)	L 276	8	19.10.2001
► <u>M19</u>	Commission Regulation (EC) No 796/2002 of 6 May 2002 (*)	L 128	8	15.5.2002
► <u>M20</u>	Komisijos reglamentas (EB) Nr. 1989/2003 2003 m. lapkričio 6 d.	L 295	57	13.11.2003

(*) Šis aktas nebuvo skelbtas lietuvių kalba.



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

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos ekonominės bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1966 m. rugsėjo 22 d. Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 136/66/EEB dėl bendro aliejų ir riebalų rinkos organizavimo ⁽¹⁾ su paskutiniais pakeitimais, padarytais Reglamentu (EEB) Nr. 3577/90 ⁽²⁾, ypač į jo 35a straipsnį,

kadangi Reglamento Nr. 136/66/EEB priede pateikiami alyvuogių aliejaus ir alyvuogių išspaudų aliejaus, parduodamo kiekvienoje valstybėje narėje, Bendrijos vidaus rinkoje ir prekyboje su trečiomis šalimis, aprašymai ir apibrėžimai;

kadangi siekiant diferencijuoti aliejus pagal įvairias rūšis, turi būti apibrėžtos kiekvienos jų fizikinės ir cheminės savybės bei organoleptinės pirmo spaudimo aliejaus savybės, kad būtų garantuotas nagrinėjamo produkto grynumas ir kokybė, nepažeidžiant kitų esančių nuostatų;

kadangi skirtingų rūšių aliejaus savybės turi būti nustatomos vienodai visoje Bendrijoje; kadangi tuo tikslu turi būti sukurti Bendrijos cheminės analizės ir organoleptinio vertinimo metodai; kadangi pereinamajam laikotarpiui turi būti leista naudoti kitus metodus, taikomus valstybėse narėse, su sąlyga, kad gavus skirtingus rezultatus lems rezultatai, gauti taikant bendrą metodą;

kadangi alyvuogių aliejaus fizikinių ir cheminių savybių ir analizės metodų apibrėžimas reikalauja iš dalies pakeisti Kombinuotosios nomenklatūros 15 skyriaus papildomas pastabas;

kadangi pirmo spaudimo aliejaus organoleptinių savybių vertinimo metodas numato parinktų ir paruoštų degustatorių grupių sudarymą; kadangi dėl to turi būti nustatyta tokios struktūros sukūrimo trukmė; kadangi atsižvelgiant į sunkumus, su kuriais susidurs kai kurios valstybės narės sudarydamos degustatorių grupes, turi būti leista grupes naudoti kitose valstybėse narėse;

kadangi, siekiant užtikrinti alyvuogių išspaudų importui taikomos rinkliavų sistemos teisingą funkcionavimą, turi būti patvirtintas vienas metodas aliejaus kiekiui šiuose produktuose nustatyti;

kadangi, siekiant nepakenkti prekybai, turi būti priimta nuostata dėl iki šio reglamento įsigaliojimo įpakuoto aliejaus realizavimo per ribotą laiką;

kadangi būtina panaikinti Komisijos reglamentą (EEB) Nr. 1058/77 ⁽³⁾ su paskutiniais pakeitimais, padarytais Reglamentu (EEB) Nr. 1858/88 ⁽⁴⁾;

kadangi Aliejaus ir riebalų vadybos komitetas nepateikė savo nuomonės per pirmininko nustatytą laiką,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:



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.

⁽¹⁾ OL 172, 1966 9 30, p. 3025/66.

⁽²⁾ OL L 353, 1990 12 17, p. 23.

⁽³⁾ OL L 128, 1977 5 24, p. 6.

⁽⁴⁾ OL L 166, 1988 7 1, p. 10.

▼ M20

2. Aliejus, kurio charakteristikos atitinka šio reglamento I priedo 3 punkte nustatytas charakteristikas, laikomas pirmojo spaudimo klasikiniu 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.

▼ B*2 straipsnis*

1. Aliejų savybės, nurodytos I priede, nustatomos taikant toliau pateiktus analizės metodus:
 - laisvosioms riebiosioms rūgštims, skaičiuojant oleino rūgšties procentiniu kiekiu, nustatyti – II priede nurodytą metodą,
 - peroksidų skaičiui nustatyti – III priede nurodytą metodą,

▼ M19

- for determination of the wax content, the method given in Annex IV,

▼ B

- sterolių kiekiui nustatyti – V priede nurodytą metodą,
- eritrodolio ir uvaolio kiekiui nustatyti – VI priede nurodytą metodą,
- sočiųjų riebiųjų rūgščių 2-oje triglicerido padėtyje kiekiui nustatyti – VII priede nurodytą metodą,

▼ M20**▼ B**

- spektrofotometrinei analizei – IX priede nurodytą metodą,
- riebiųjų rūgščių sudėčiai nustatyti – X A ir X B prieduose nurodytą metodą,
- lakiųjų halogenintų tirpiklių kiekiui nustatyti – XI priede nurodytą metodą,
- organoleptinėms pirmo spaudimo alyvuogių aliejaus savybėms įvertinti – XII priede nurodytą metodą,

▼ M20**▼ M11**

- stigmastadienų kiekiui nustatyti – XVII priede nurodytą metodą,

▼ M13

- for determining the content of triglycerides with ECN42, the method set out in Annex XVIII,

▼ M19

— for determination of the aliphatic alcohol content, the method given in Annex XIX.

2. Verification by national authorities or their representatives of the organoleptic characteristics of virgin oils shall be effected by tasting panels approved by the Member States.

The organoleptic characteristics of an oil as referred to in the first subparagraph shall be deemed consonant with the category declared if a panel approved by the Member State confirms the grading.

Should the panel not confirm the category declared as regards the organoleptic characteristics, at the interested party's request the national authorities or their representatives shall have two counter-assessments carried out by other approved panels, at least one by a panel approved by the producer Member State concerned. The characteristics concerned shall be deemed consonant with the characteristics declared if at least two of the counter-assessments confirm the declared grade. If that is not the case, the interested party shall be responsible for the cost of the counter-assessments.

▼ M17

3. When the national authorities or their representatives verify the characteristics of the oil as provided for in paragraph 1, samples shall be taken in accordance with international standards EN ISO 661 on the preparation of test samples and EN ISO 5555 on sampling. However, notwithstanding point 6.8 of standard EN ISO 5555, in the case of batches of such oils in immediate packaging not exceeding 100 litres, the sample shall be taken in accordance with Annex Ia to this Regulation.

▼ M19

Without prejudice to standard EN ISO 5555 and Chapter 6 of standard EN ISO 661, the samples taken shall be put in a dark place away from strong heat as quickly as possible and sent to the laboratory for analysis no later than:

- the tenth working day after they are taken, during the period from October to May, and
- the fifth working day after they are taken, during the period from June to September.

▼ M17

4. ► **M20** Tikrinant 3 dalyje nustatyta tvarka, analizės, nurodytos II, III, IX, X ir XII prieduose, ir, jei daromos, bet kokios nacionaliniuose įstatymuose numatytos kontraanalizės atliekamos prieš pasibaigiant minimaliam bandinių galiojimo laikui. Jei bandiniai paimami daugiau nei prieš keturis mėnesius iki pasibaigiant minimaliam galiojimo laikui, jie turi būti analizuojami ne vėliau kaip ketvirtąjį mėnesį po bandinių paėmimo. Kitoms šiame reglamente numatytais analizėms jokie laiko apribojimai netaikomi. ◀

Unless the sample was taken less than one month before the minimum durability date, if the results of the analyses do not match the characteristics of the category of olive oil or olive-residue oil declared, the party concerned shall be notified no later than one month before the end of the period laid down in the first subparagraph.

▼ M19

5. For the purpose of determining the characteristics of olive oils by the methods provided for in paragraph 1, the analysis results shall be directly compared with the limits laid down in this Regulation.

▼ M20*2a straipsnis*

Patikrinti, ar bandinys atitinka deklaruotą kategoriją, nacionalinės valdžios institucijos arba jų atstovai gali šiais būdais:

▼ **M20**

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

▼ **M19**▼ **M5**► **M19 3** ◀ *straipsnis*

Jei nustatoma, kad aliejaus organoleptinės savybės neatitinka jo aprašymo, suinteresuota valstybė narė, nespėdama iš anksto apie bet kokias kitas bausmes, taiko administracines finansines baudas, atsižvelgdama į nustatyto pažeidimo sunkumą.

Įvertinant pažeidimą ypatingai turi būti kreipiamas dėmesys į savaime suprantamus įprastomis sąlygomis laikomo aliejaus savybių pakitimus.

Kiekvieno pusmečio pradžioje valstybės narės informuoja Komisiją apie nustatytų pažeidimų skaičių bei pobūdį ir apie per praėjusį pusmetį pritaikytas bausmes.

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.

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

▼ **M20***7 straipsnis*

Taikomos Bendrijos nuostatos dėl nepageidaujamų medžiagų.

▼ M20

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.

▼ B*8 straipsnis*

1. Valstybės narės praneša Komisijai apie priemones, kurių buvo imtasi reglamentui įgyvendinti.

2. Valstybės narės kiekvieno pusmečio pradžioje siunčia Komisijai per praėjusį pusmetį atliktų tikrinimų analizės duomenų oficialią suvestinę.

Rezultatus nagrinėja Aliejaus ir riebalų vadybos komitetas, laikydamasis Reglamento Nr. 136/66/EEB 39 straipsnyje nustatytos tvarkos.

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.

▼ 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

▼ **M17**

Ia priedas Alyvuogių aliejaus arba alyvų išspaudų aliejaus bandinių, pristatytų ne didesnėse kaip 100 litrų pakuotėse, paėmimas

▼ **M20**

Ib priedas Schema sprendimams priimti

▼ **B**

II priedas Laisvųjų riebiųjų rūgščių kiekio nustatymas

III priedas Peroksidų skaičiaus nustatymas

IV priedas ► **M6** Vaško kiekio nustatymas dujų ir skysčių kapiliarinių stulpelių chromatografijos metodu ◀

V priedas Sterolių sudėties ir kiekio nustatymas kapiliarinės dujų chromatografijos metodu

VI priedas Eritrodiolio ir uvaolio nustatymas

VII priedas Sočiųjų riebiųjų rūgščių 2-oje triglicerido padėtyje nustatymas

▼ **M20**▼ **B**

IX priedas Spektrofotometrinis tyrimas ultravioletinėje srityje

XA priedas Riebiųjų rūgščių metilesterių analizė dujų chromatografijos metodu

Annex X B Preparation of the fatty acid methyl esters from olive oil and olive-pomace oil

XI priedas Lakiųjų halogenintų tirpiklių kiekio alyvuogių aliejuje nustatymas

Annex XII Organoleptic assessment of virgin olive oils

▼ **M20**▼ **M19**▼ **B**

XV priedas Aliejaus kiekio alyvuogių atliekose nustatymas

XVI priedas Jodo skaičiaus nustatymas

▼ **M11**

XVII priedas Stigmastadienų nustatymas augaliniuose aliejuose

▼ **M13**

Annex XVIII Method for determining the content of triglycerides with ECN42

▼ **M19**

Annex XIX Method for determining aliphatic alcohol content

I PRIEDAS

ALYVUOGIŲ ALIEJAUS CHARAKTERISTIKOS

Kategorija	Rūgštingumas (%) (*)	Peroksidų skaičius, mEqO ₂ /kg (*)	Vaškai mg/kg (**)	Sočiosios riebalų rūgštys 2-oje triglicerido padėtyje (%)	Stigmastadijos mg/kg (1)	Skirtumas tarp HPLC ECN42 ir teorinio ECN42	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptinis trūkumų vidurkio įvertinimas (Md) (*)	Organoleptinis vaisių likučių vidurkio įvertinimas (Mf) (*)
1. Aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 1,5	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 1,5	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Pirmojo spaudimo klasikinis alyvuogių aliejus <i>lampante</i>	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 1,5	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 2,5 (2)	—
4. Rafinuotas alyvuogių aliejus	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 1,8	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Maišytas alyvuogių aliejus, sudarytas iš rafinuotų ir pirmojo spaudimo alyvuogių aliejų	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 1,8	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Neapdorotas alyvų išspaudų aliejus	—	—	> 350 (4)	≤ 2,2	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Rafinuotas alyvų išspaudų aliejus	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 2,2	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Alyvų išspaudų aliejus	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 2,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Bendras izomerų, kuriuos galima (arba negalima) išskirti kapiliarine kolonėle, kiekis.

(2) Arba jei trūkumų vidurkio vertė mažesnė nei 2,5, o vaisių likučių vidurkis yra 0.

(3) Aliejai, turintys nuo 300 mg/kg iki 350 mg/kg vaško, laikomi *lampante* alyvuogių aliejumi, jei bendras alifatinio alkoholio kiekis yra mažesnis arba lygus 350 mg/kg arba jei eritrodolio ir uvaolio kiekis mažesnis arba lygus 3,5 %.

(4) Aliejai, turintys nuo 300 mg/kg iki 350 mg/kg vaško, laikomi neapdorotu alyvų išspaudų aliejumi, jei bendras alifatinio alkoholio kiekis didesnis nei 350 mg/kg arba jei eritrodolio ir uvaolio kiekis didesnis nei 3,5 %.

▼ M20

Kategorija	(1)Riebiųjų rūgščių kiekis						Trans-oleinių izomerų suma (%)	Trans-oleinių ir trans-linoleninių izomerų suma (%)	Sterolių kiekis						Bendras sterolių kiekis, (mg/kg)	Eritrodioolis ir uvaolis (%) (**)
	Miristo (%)	Linoleno (%)	Arachino (%)	Eikozeno (%)	Beheno (%)	Lignocero (%)			Cholesterolis (%)	Brasikasterolis (%)	Kamposterolis (%)	Stigmasterolis (%)	Beta-sitosterolis (%) (2)	Delta-7-stigmasterolis (%)		
1. Aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	> 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
3. Pirmojo spaudimo klasikinis alyvuogių aliejus <i>lampante</i>	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	–	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (3)
4. Rafinuotas alyvuogių aliejus	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Maišytas alyvuogių aliejus, sudarytas iš rafinuotų ir pirmojo spaudimo alyvuogių aliejų	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1000	≤ 4,5
6. Neapdorotas alyvų išspaudų aliejus	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	–	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2500	> 4,5 (4)
7. Rafinuotas alyvų išspaudų aliejus	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Alyvų išspaudų aliejus	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

(1) Kitų riebiųjų rūgščių kiekis (%): palmitinės: 7,5 iki 20,0; palmitoleinės: 0,3 iki 3,5; heptadekanoinės: 0,3; heptadekenoinės: 0,3; stearinės: 0,5 iki 5,0; oleinės: 55,0 iki 83,0; linoleinės: 3,5. iki 21,0.

(2) Delta-5–23-stigmastadienolis + chlosterolis + Beta-sitosterolis + sitostanolis + delta-5-avenasterolis + delta -5–24 stigmastadienolis.

(3) Aliejai, turintys nuo 300 mg/kg iki 350 mg/kg vaško, laikomi *lampante* alyvuogių aliejumi, jei bendras alifatinio alkoholio kiekis yra mažesnis arba lygus 350 mg/kg arba jei eritrodioolio ir uvaolio kiekis mažesnis arba lygus 3,5 %.

(4) Aliejai, turintys nuo 300 mg/kg iki 350 mg/kg vaško, laikomi neapdorotu alyvų išspaudų aliejumi, jei bendras alifatinio alkoholio kiekis yra didesnis nei 350 mg/kg arba jei eritrodioolio ir uvaolio kiekis didesnis nei 3,5 %.

Pastabos:

- Analizės rezultatai turi būti pateikti tokiu pat tikslumu po kablelio, kaip nustatyta kiekvienai charakteristikai. Apvalinant rezultata, kai po kablelio yra daugiau nei keturi skaitmenys, paskutinis ketvirtasis skaitmuo yra didinamas vienetu, jei po jo sekantis skaitmuo didesnis už 4.
- Aliejus turi būti priskirtas kitai kategorijai arba paskelbtas neatitinkančiu šiame reglamente jam keliamų grynumo kriterijų net ir tuo atveju, jei vienintelės charakteristikos vertė nesutampa su nustatyta ribine verte.
- Žvaigždute (*) pažymėtos aliejaus kokybės charakteristikos reiškia:

▼ **M20**

Kategorija	(1)Riebiųjų rūgščių kiekis						Trans-oleinių izomerų suma (%)	Trans-oleinių ir trans-linoleninių izomerų suma (%)	Sterolių kiekis						Bendras sterolių kiekis, (mg/kg)	Eritrodioolis ir uvaolis (%) (**)
	Miristo (%)	Linoleno (%)	Arachino (%)	Eikozeno (%)	Beheno (%)	Lignocero (%)			Cholesterolis (%)	Brasikasterolis (%)	Kampesterolis (%)	Stigmasterolis (%)	Betasitosterolis (%) (2)	Delta-7-stigmasterolis (%)		

- *lampante* alyvuogių aliejus nebūtinai vienu metu turi atitikti visas ribines vertes.
- pirmojo spaudimo alyvuogių aliejai net ir tuo atveju, jei vienintelės charakteristikos vertė nesutampa su nustatyta ribine verte, yra priskiriami kitai aliejaus kategorijai, tačiau vis tiek klasifikuojami kaip pirmojo spaudimo alyvuogių aliejus.
- d) Dviem žvaigždutėmis (**) pažymėtos aliejaus kokybės charakteristikos reiškia, kad alyvų išspaudų aliejus nebūtinai vienu metu turi atitikti visas ribines vertes.

▼ **M20***Ia PRIEDAS***ALYVUOGIŲ ALIEJAUS ARBA ALYVŲ IŠSPAUDŲ ALIEJAUS BANDINIŲ, PRISTATYTŲ NE DIDESNĖSE KAIP 100 LITRŲ PAKUOTĖSE, PAĖMIMAS**

Šis bandinių paėmimo būdas taikomas alyvuogių aliejaus arba alyvų išspaudų aliejaus 125 000 litrų neviršijančioms siuntoms, pristatytoms ne didesnėse kaip 100 litrų pakuotėse.

Jei siunta viršija 125 000 litrų, ji turi būti padalinta į kelias 125 000 litrų arba mažesnes partijas. Jei siunta mažesnė nei 125 000 litrų, ji laikoma viena partija. Tiriama atskirai kiekviena partija.

Priklausomai nuo partijos dydžio, pagal 1 punkte pateiktą lentelę nustatomas reikalingų priminių bandinių skaičius.

Bandinio dydis pagal 2.1 punkte pateiktą lentelę nustatomas atsižvelgiant į pakuotės talpą.

Sąvokos „siunta“, „pirminis bandinys“ ir „laboratorijos bandinys“ apibrėžti standarte EN ISO 5555.

„Partija“ susideda iš daugelio prekės vienetų, kurie buvo pagaminti ir supakuoti tokiais aplinkybėmis, kad kiekviename prekės vienete esantis aliejus pagal visas analitines charakteristikas gali būti laikomas homogenišku.

1. REIKALINGŲ PIRMINIŲ BANDINIŲ SKAIČIUS

Pagal šią lentelę, priklausomai nuo partijos dydžio, nustatomas reikalingų priminių bandinių skaičius:

Partijos dydis (litrais), mažesnis nei	Reikalingų priminių bandinių skaičius
7 500	2
25 000	3
75 000	4
125 000	5

Pirminiams bandiniams paimti turi būti pasirenkamos šalia viena kitos esančios tos partijos pakuotės.

Iškilus abejonėms, valstybė narė padidina reikalingų priminių bandinių skaičių.

2. PIRMINIŲ BANDINIŲ SUDĖTIS**2.1 Kiekvieną pirminį bandinį sudaro:**

Jei pakuotės talpa:	Pirminį bandinį sudarys aliejus iš:
a) 5 litrai ir daugiau	a) 3 pakuočių
b) ne mažiau nei 3, bet ne daugiau nei 5 litrai	b) 3 pakuočių
c) ne mažiau nei 2, bet ne daugiau nei 3 litrai	c) 3 pakuočių
d) ne mažiau nei 1, bet ne daugiau nei 2 litrai	d) 6 pakuočių
e) ne mažiau nei 0,75, bet ne daugiau nei 1 litras	e) 6 pakuočių
f) mažiau nei 0,75 litro	f) trigubo aliejaus kiekio iš minimalaus pakuočių, kurių bendras tūris didesnis nei 5 litrai, skaičiaus

2.2 Pirminiai bandiniai iki jų analizės turi būti laikomi pakuotėse. Po to pirminiai bandiniai nustatyta tvarka suskirstomi į tris laboratorinius bandinius, norint atlikti:

- a) analizes, nurodytas II, III, IX ir X prieduose,
- b) analizes, nurodytas XII priede,

▼ **M20**

c) kitas analizės.

2.3 Pakuotės, sudarančios pirminį mėginį, suskirstomos nacionaliniuose įstatymuose patikrinimo procedūrai nustatytos tvarkos.

3. ANALIZĖS IR REZULTATAI

a) Kiekvienas 1 punkte apibrėžtas pirminis bandinys suskirstomas į tris laboratorinius bandinius standarto EN ISO 5555 2.5 punkte nustatyta tvarka ir analizuojamas taip:

- remiantis 2 straipsnio 1 dalies pirma įtrauka nustatomos laisvosios riebiosios rūgštys,
- remiantis 2 straipsnio 1 dalies antra įtrauka nustatomas peroksido skaičius,
- remiantis 2 straipsnio 1 dalies aštunta įtrauka atliekama spektrofotometrinė analizė,
- remiantis 2 straipsnio 1 dalies devinta įtrauka nustatoma riebiųjų rūgščių sudėtis.

b) Jei bent vieno tos pačios partijos pirminio bandinio analizių, išvardytų a dalyje, rezultatai neatitinka deklaruotos alyvuogių aliejaus kategorijos charakteristikų, laikoma, kad visa partija neatitinka šių charakteristikų.

Jei visų tos pačios partijos pirminių bandinių analizių, išvardytų a dalyje, rezultatai, esant pasikartojančioms naudotų metodų savybėms, yra skirtingi, visa partija laikoma nehomogeniška, ir kiekvienas pirminis bandinys turi būti analizuojamas visais likusiais nurodytais analizės būdais. Kitu atveju likusiais nurodytais analizės būdais turi būti analizuojamas tik vienas tos partijos pirminis bandinys.

c) Jei bent vieno tos pačios partijos pirminio bandinio analizių, išvardytų antros straipsnio dalies b dalyje, rezultatai neatitinka deklaruotos alyvuogių aliejaus kategorijos charakteristikų, laikoma, kad visa partija neatitinka šių charakteristikų.

Jei visi tos pačios partijos pirminio bandinio analizių, išvardytų antros straipsnio dalies b dalyje, rezultatai atitinka deklaruotos alyvuogių aliejaus kategorijos charakteristikas, laikoma, kad visa partija atitinka šias charakteristikas.

▼ **M20***Ib PRIEDAS***SCHEMA SPRENDIMAMS PRIIMTI, SIEKiant NUSTATYTI, AR
ALYVUOGIŲ ALIEJAUS BANDINYS ATITINKA DEKLARUOTĄ KATE-
GORIJĄ**

Analizė siekiant nustatyti, ar alyvuogių aliejus arba alyvų išspaudų aliejus atitinka deklaruotą kategoriją, gali būti atlikta taip:

- a) bet kuria eilės tvarka atliekant I priede nurodytas aliejaus atitikimo deklaruotai kategorijai analizes; arba
- b) laikantis schemoje sprendimams priimti nustatytos tvarkos, kol gaunamas vienas šioje schemoje įrašytų atsakymų.

Taip pat, atsižvelgiant į Bendrijos nuostatas, turi būti atlikta papildoma analizė nepageidaujamoms medžiagoms nustatyti.

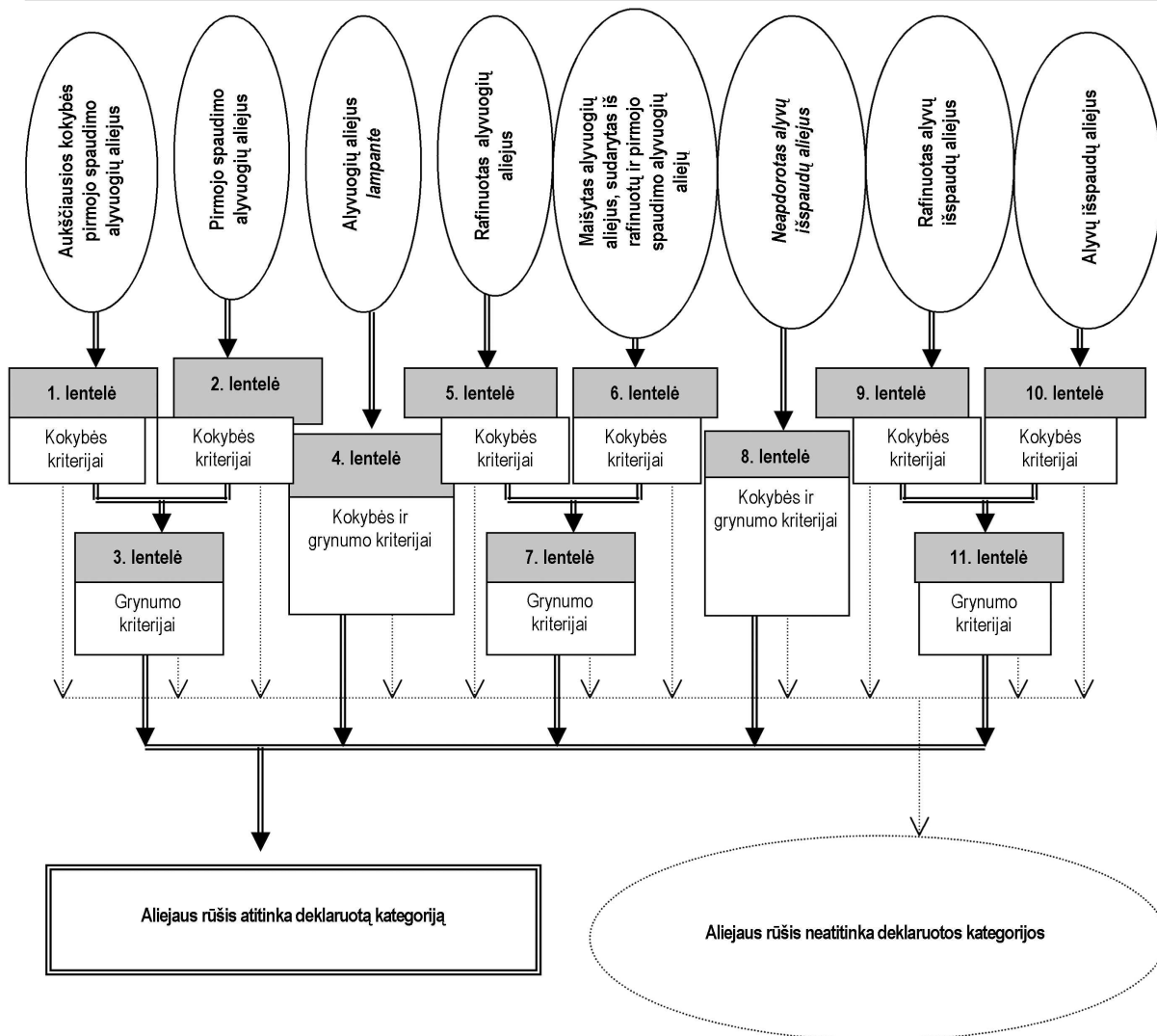
Schema sprendimams priimti taikoma visoms alyvuogių aliejaus ir alyvų išspaudų aliejaus kategorijoms. Ją sudaro nuo 1 iki 11 numeruotos lentelės, kurios taikomos atsižvelgiant į deklaruotą aliejaus kategoriją bendrojoje lentelėje nustatyta eilės tvarka.

Bendrosios lentelės ir lentelių nuo 1 iki 11 paaiškinimai:

- dviguba linija (=) nurodo sekantį žingsnį sprendimo link, jei buvo patenkintos sąlygos, nurodytos prieš tai buvusiame stačiakampyje (teigiamas atsakymas). Punktyrinė linija (...) nurodo sekantį žingsnį neigiamo atsakymo atveju,
- Remiantis šio priedo 1 priedėlyje pateikta atitikmenų lentele, 1–11 schemose esančių stačiakampių laukelių pavadinimais nurodomos analizės, numatytos šiame reglamente.
- 1–11 schemose esančiomis raidėmis skliausteliuose (neigiamas atsakymas) nurodomos pastabos, pateiktos šio priedo 2 priedėlyje. Pačios raidės nereiškia būtinybės atlikti kitas analizes.

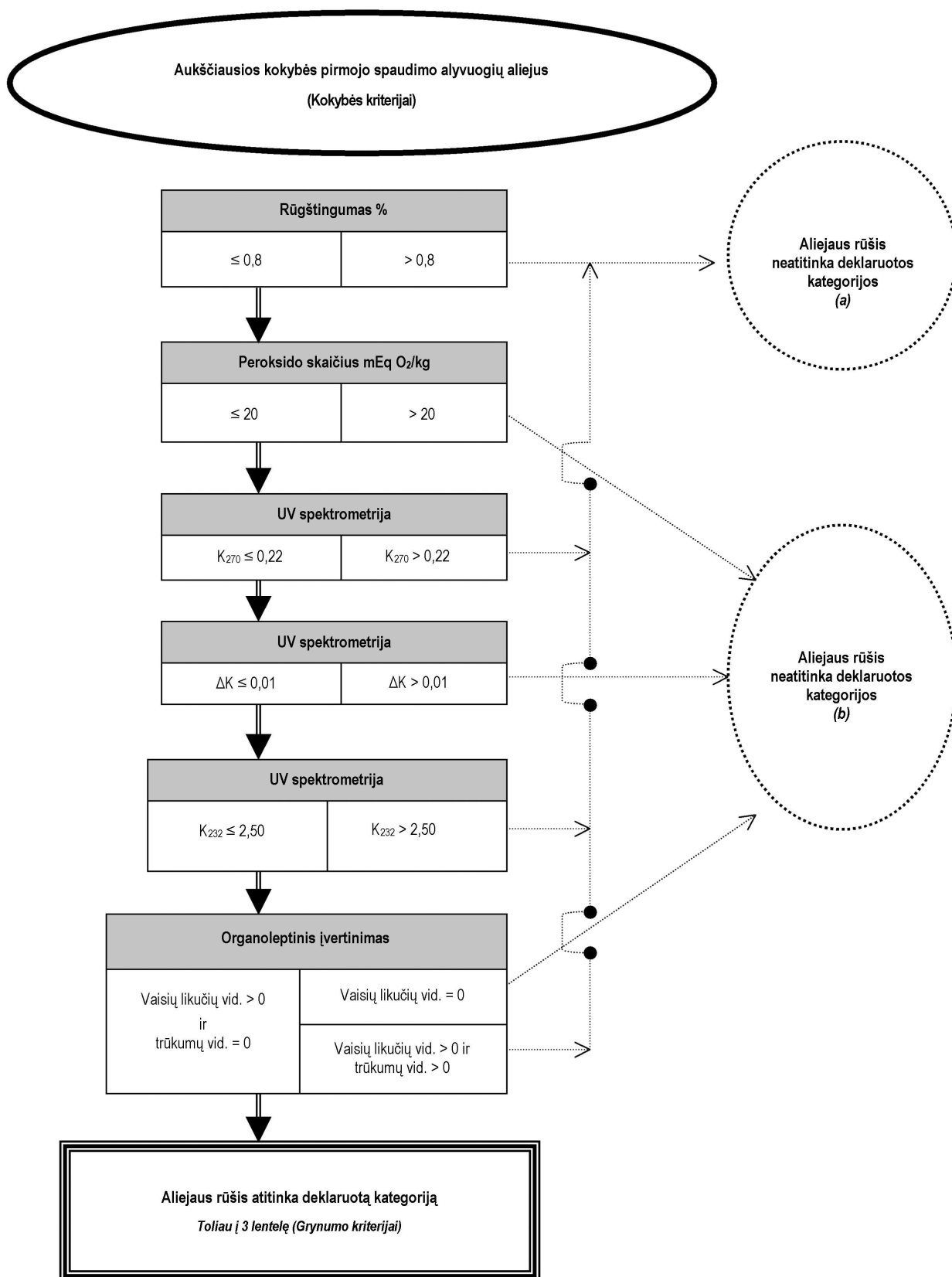
▼ **M20****Bendroji lentelė**

Alyvuogių aliejus, deklaruotas kaip:



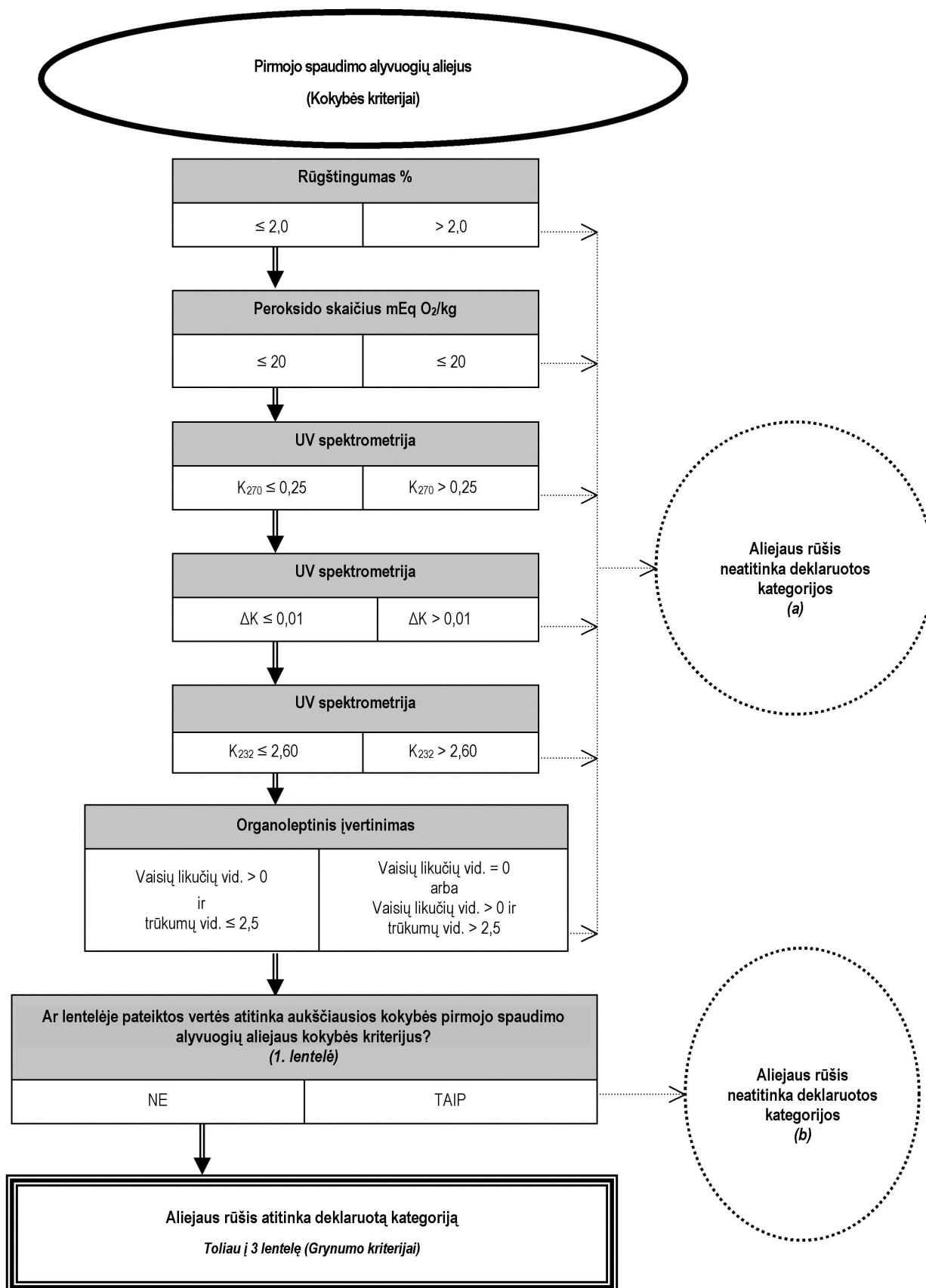
▼ M20

1 lentelė



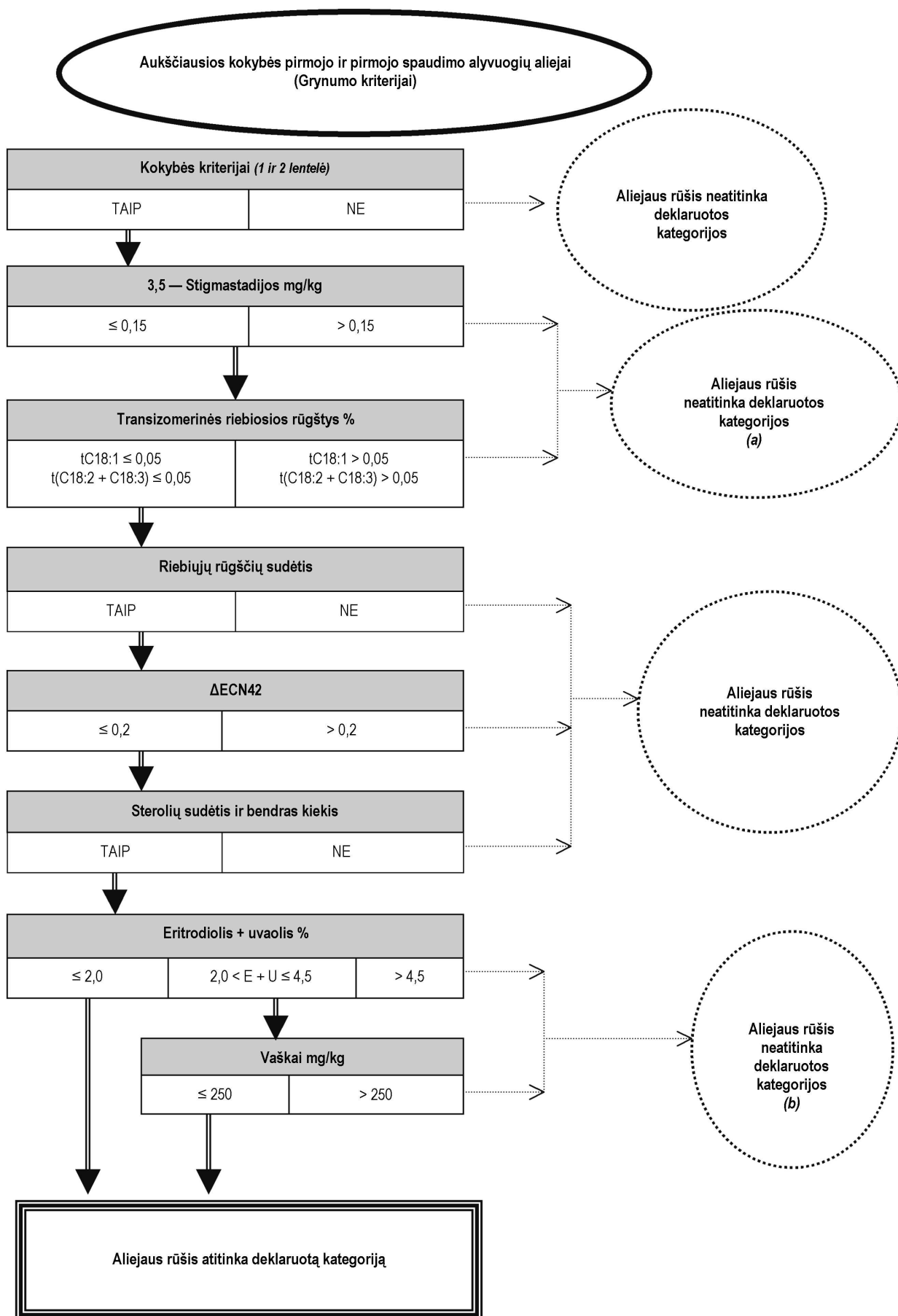
▼ M20

2 lentelė



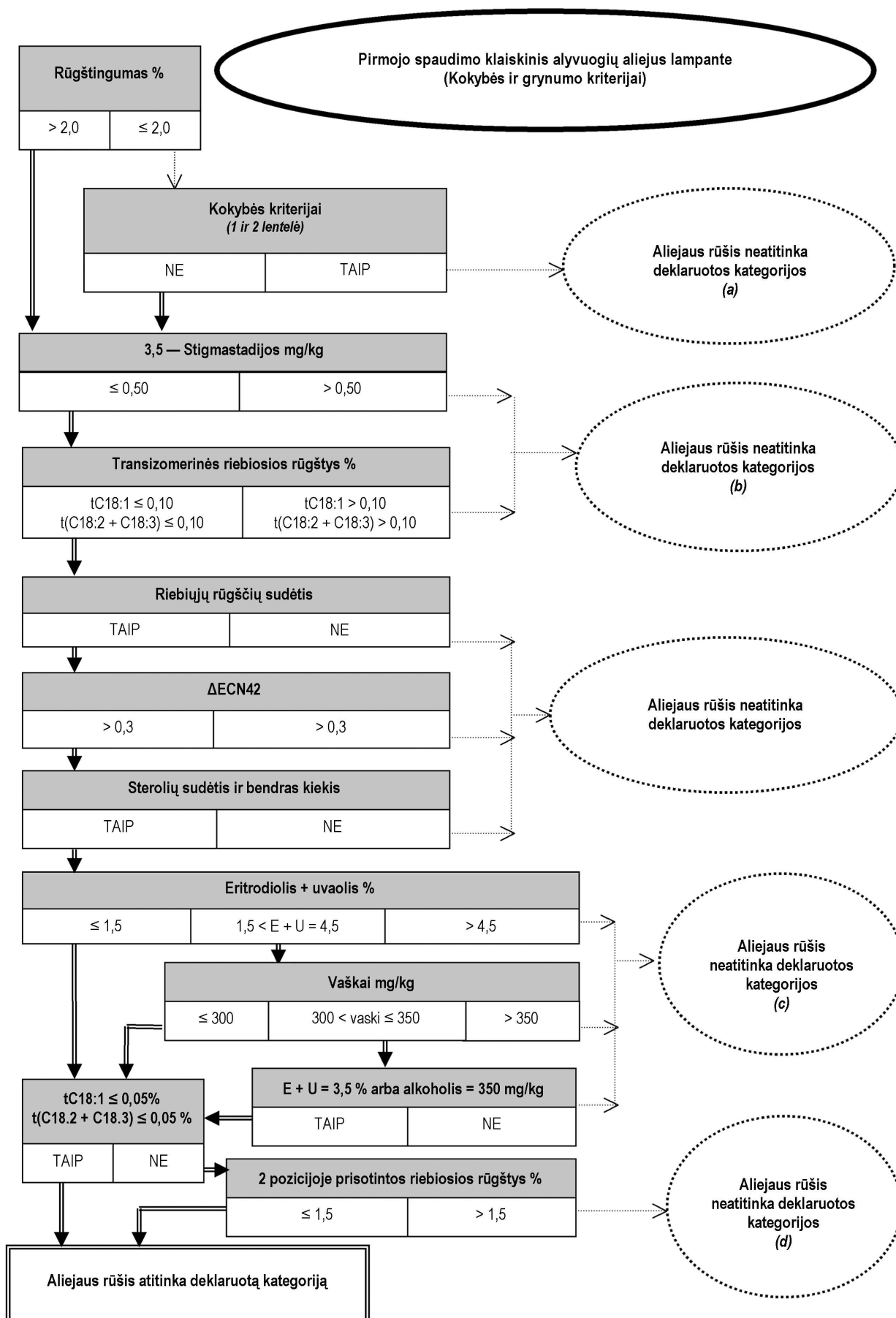
▼ M20

3 lentelė



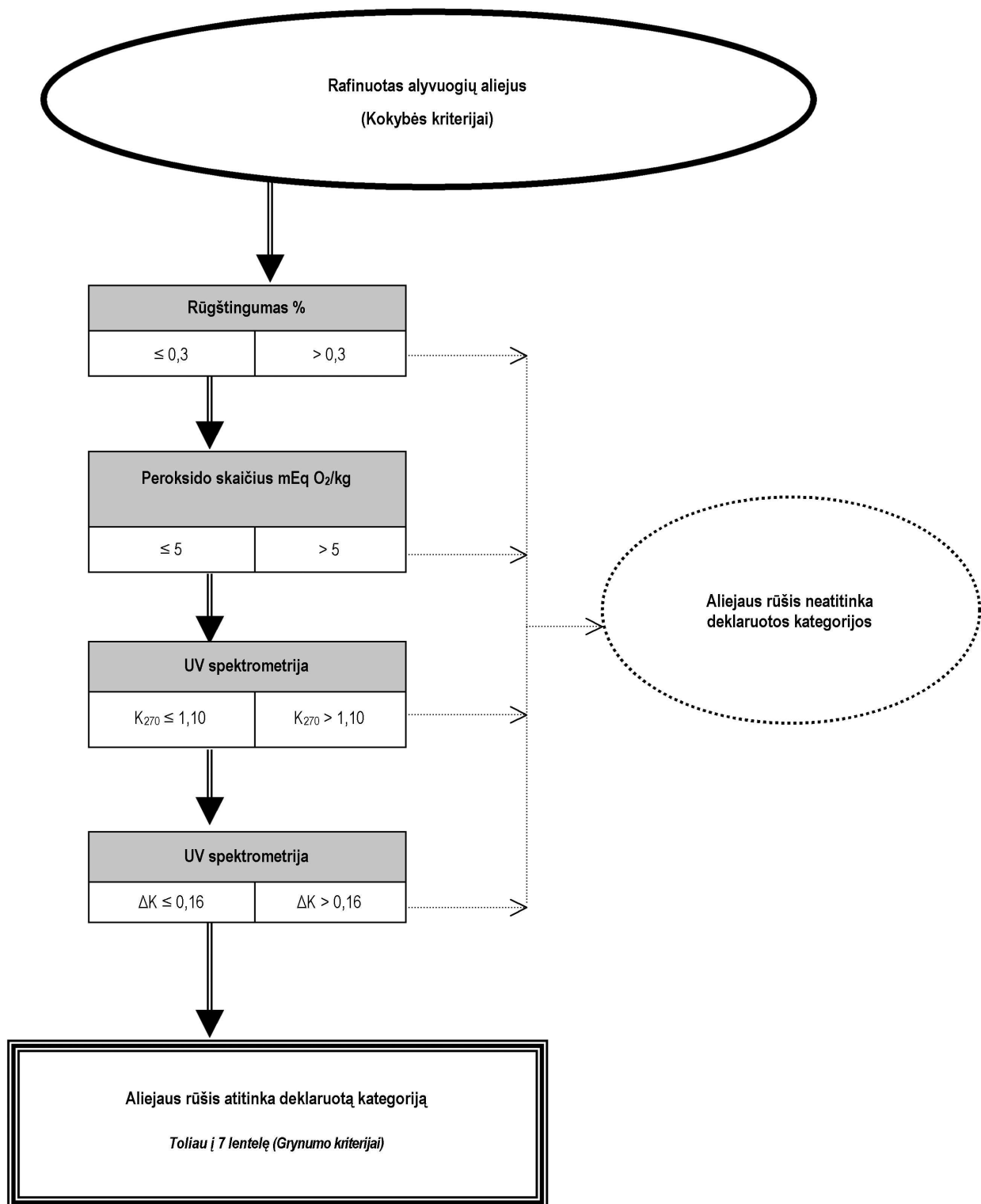
▼ M20

4 lentelė



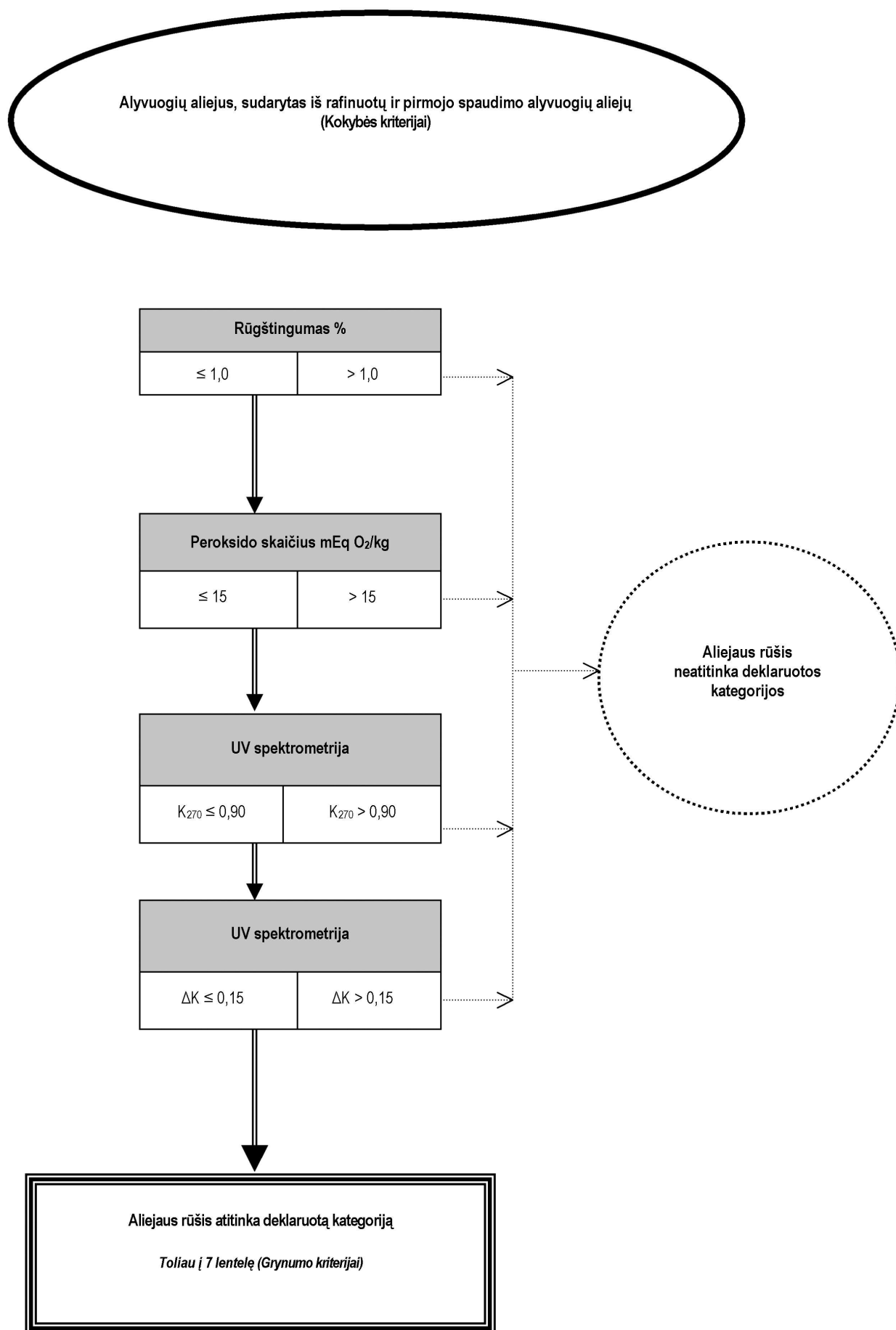
▼ **M20**

5 lentelė



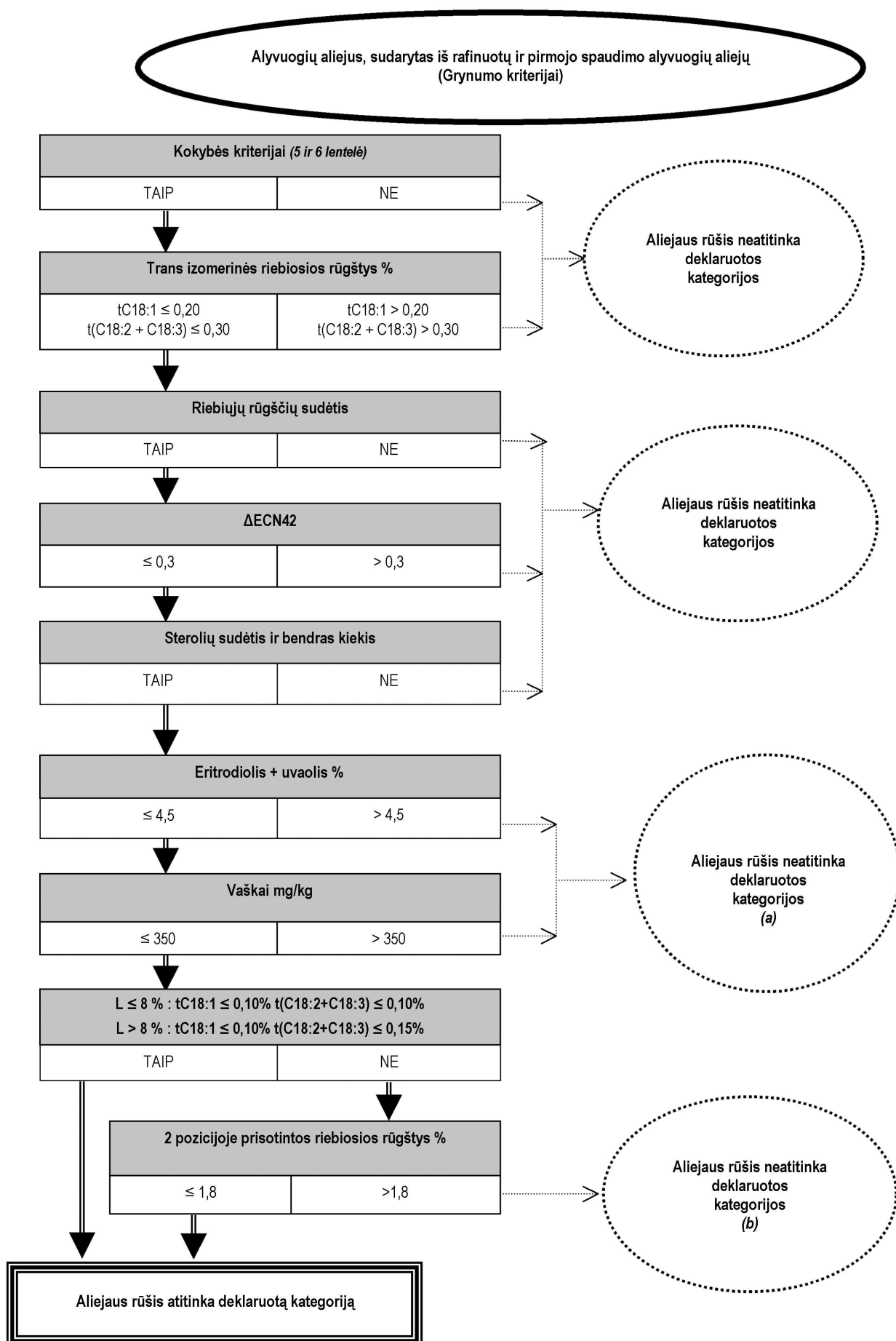
▼ **M20**

6 lentelė



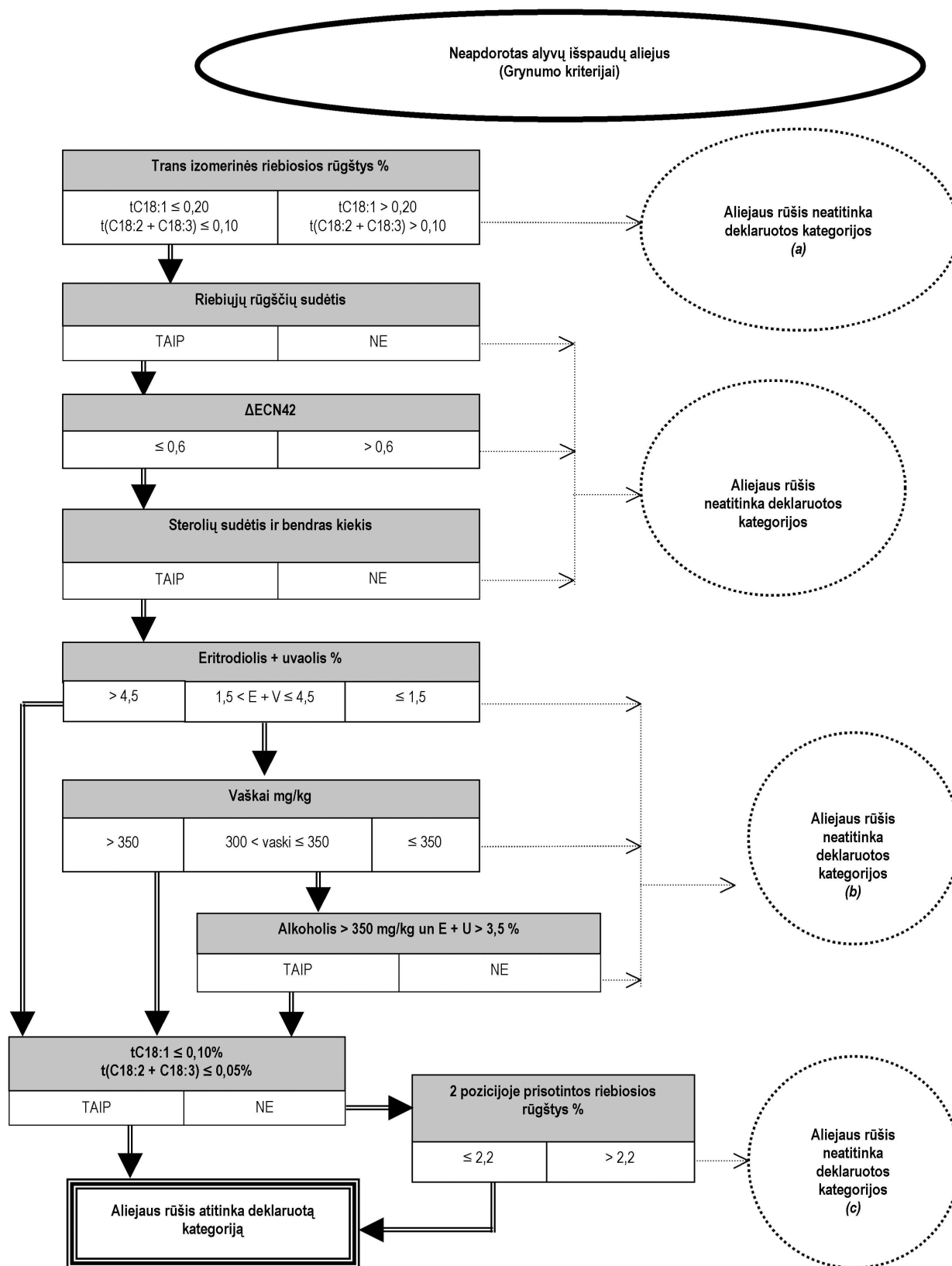
▼ M20

7 lentelė



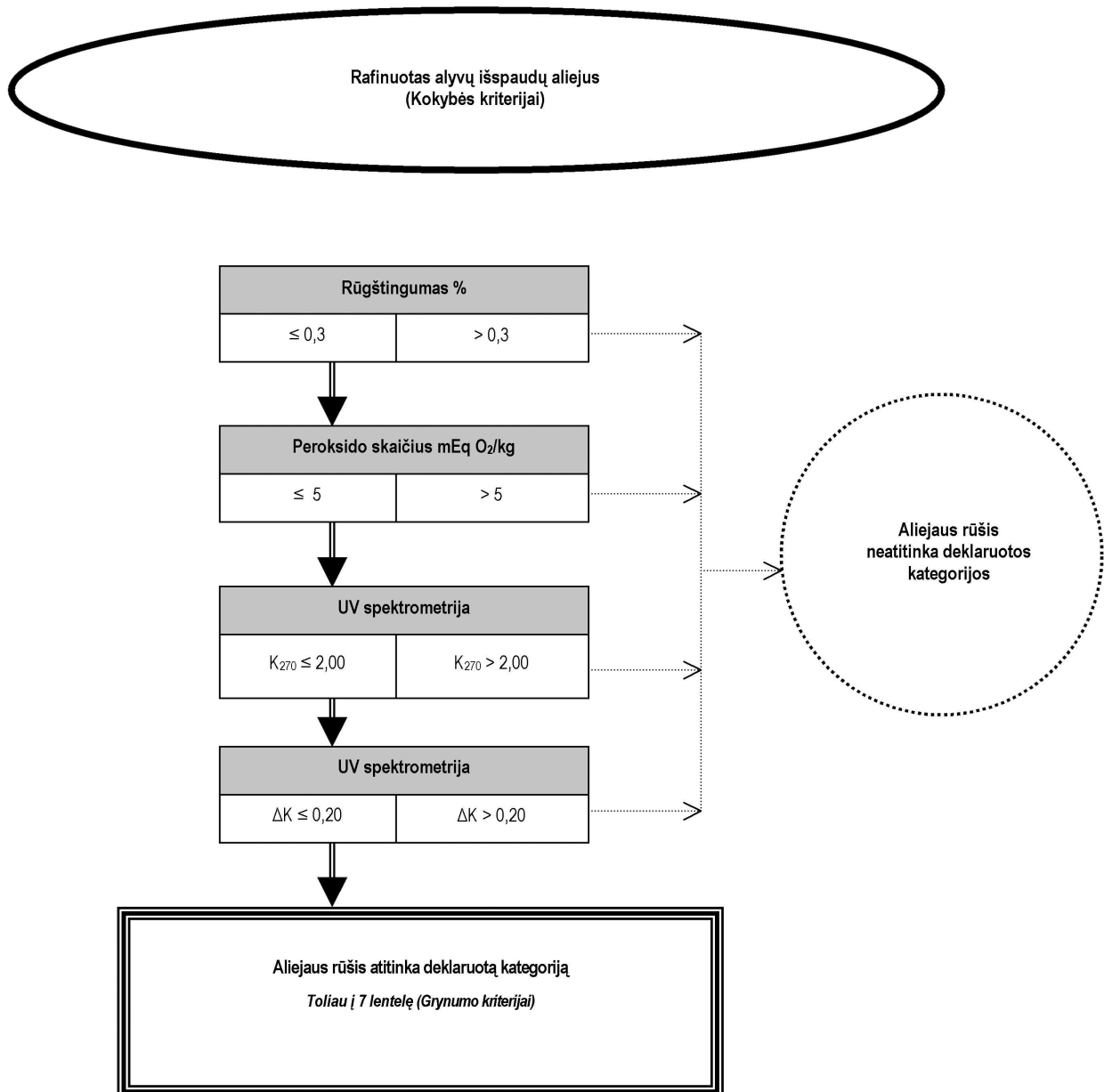
▼ M20

8 lentelė



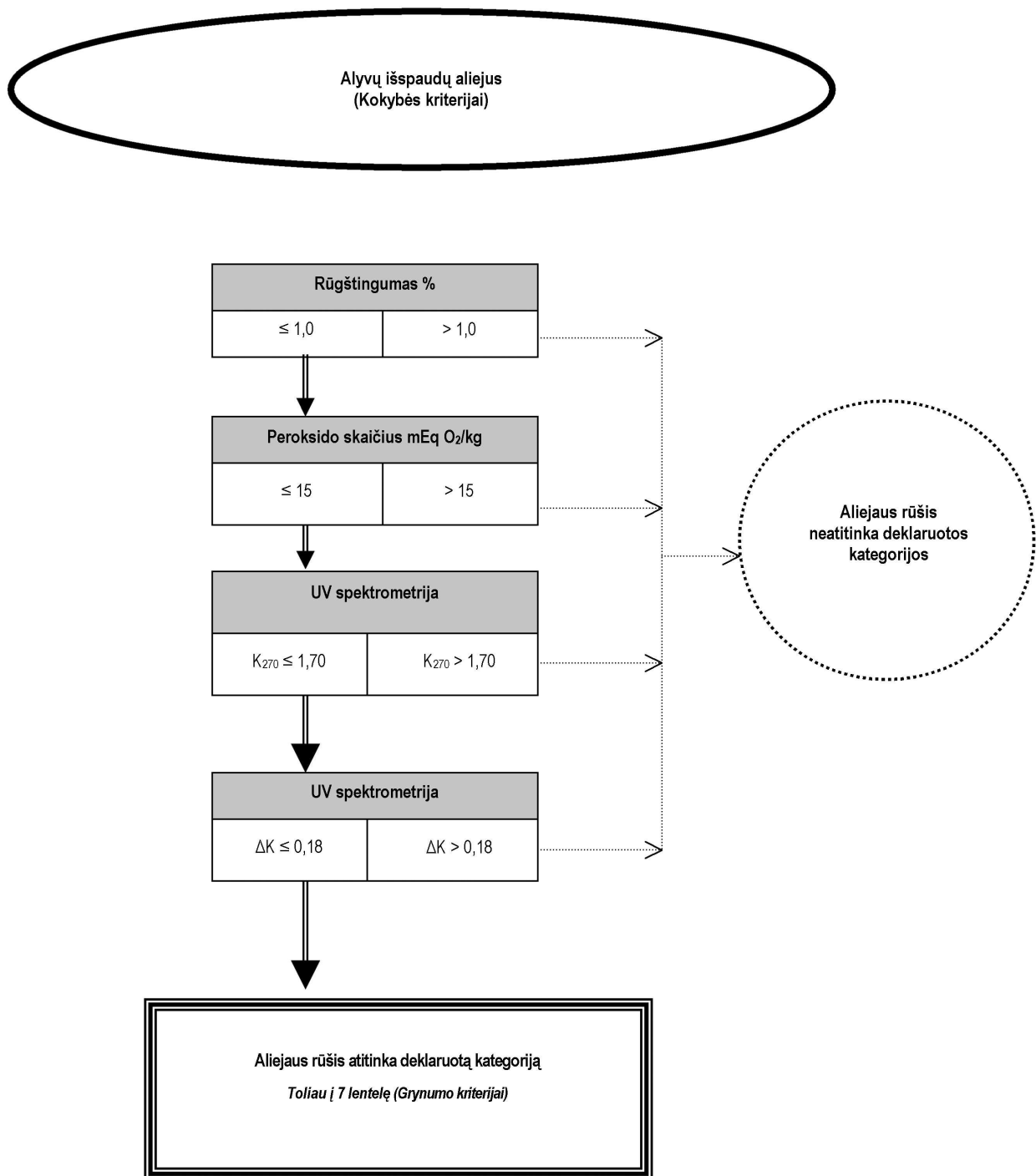
▼ **M20**

9 lentelė



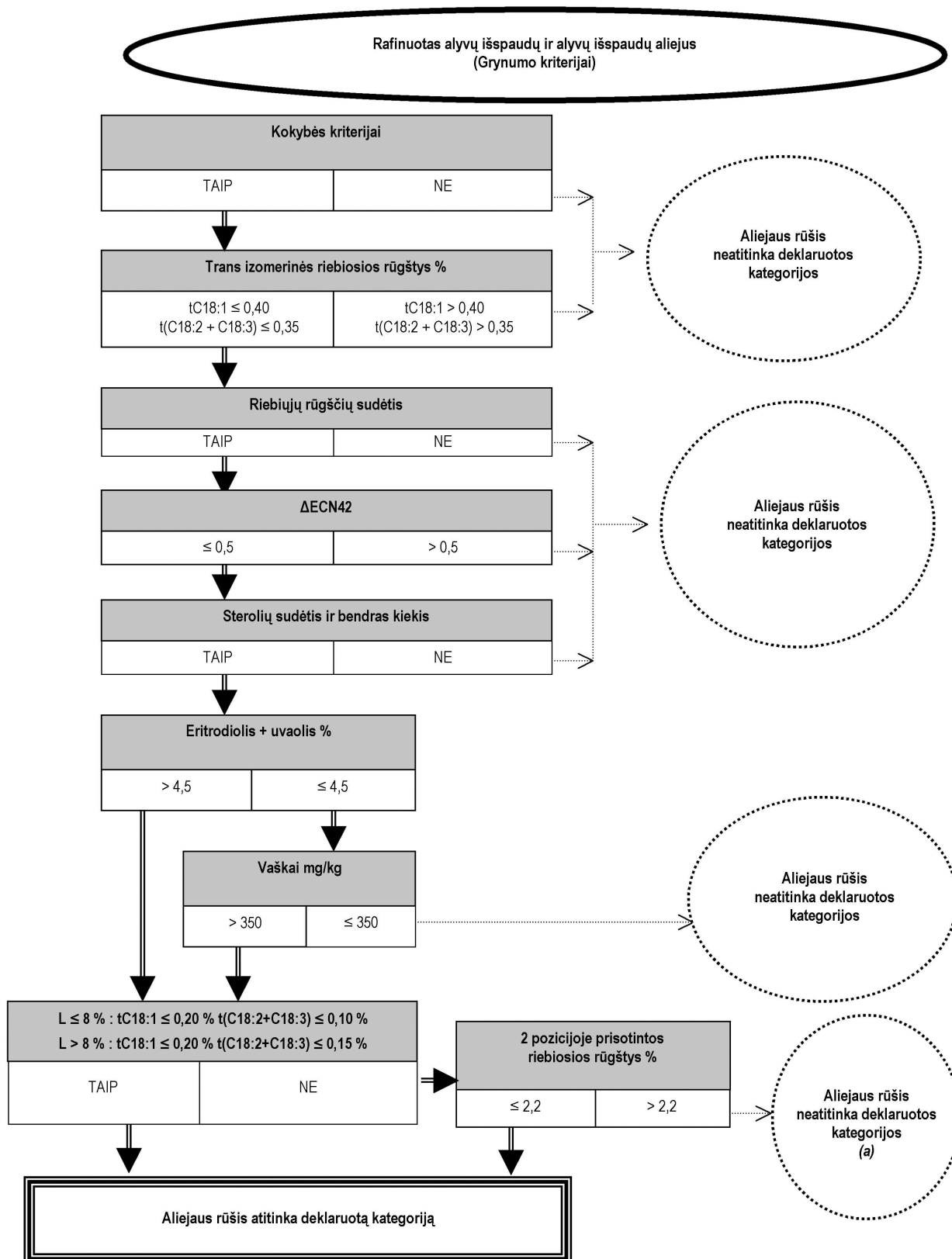
▼ **M20**

10 lentelė



▼ M20

11 lentelė



▼ **M20***1 priedėlis***Šio reglamento priedų ir schemos sprendimams priimti laukelių atitikmenų lentelė**

– Rūgštingumas	II priedas	Laisvųjų riebalų rūgščių kiekio nustatymas
– Peroksido skaičius	III priedas	Peroksidų skaičiaus nustatymas
– UV spektrometrija	IX priedas	Spektrofotometrinis tyrimas
– Organoleptinis įvertinimas	XII priedas	Pirmojo spaudimo alyvuogių aliejaus organoleptinių charakteristikų vertinimas
– 3,5-Stigmastadijos	XVII priedas	Stigmastadijų nustatymo augaliniame aliejuje metodai
– Transizomerinės riebiosios rūgštys	X.a ir X.b priedas	Riebalų rūgščių metilesterių analizė dujų chromatografijos metodu
– Riebiųjų rūgščių sudėtis	X.a ir X.b priedas	Riebalų rūgščių metilesterių analizė dujų chromatografijos metodu
– AECN42	XVIII priedas	Trigliceridų sudėties nustatymas su ECN42 (skirtumas tarp HPLC duomenų ir teorinės sudėties)
– Sterolių sudėtis ir bendras kiekis	V priedas	Sterolių sudėties ir kiekio nustatymas kapiliarinės dujų chromatografijos metodu
– Eritrodiolis ir uvaolis	VI priedas	Eritrodiolio ir uvaolio nustatymas
– Vaškai	IV priedas	Vaškų kiekio nustatymas kapiliarinės dujų chromatografijos metodu
– Alifatiniai alkoholiai	XIX priedas	Alifatinių alkoholių kiekio nustatymas kapiliarinės dujų chromatografijos metodu
– 2 pozicijoje prisotintos riebiosios rūgštys	VII priedas	Sočiųjų riebalų rūgščių 2-oje triglicerido padėtyje nustatymas

▼ **M20***2 priedėlis***1 lentelė**

- a) Žiūrėti pirmojo spaudimo arba *lampante* alyvuogių aliejų (Kokybės kriterijai – 2 *lentelė*, arba Kokybės ir grynumo kriterijai – 4 *lentelė*)
- b) Žiūrėti *lampante* alyvuogių aliejų (Kokybės ir grynumo kriterijai – 4 *lentelė*)

2 lentelė

- a) Žiūrėti *lampante* alyvuogių aliejų (Kokybės ir grynumo kriterijai – 4 *lentelė*)
- b) Žiūrėti aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo alyvuogių aliejų (Kokybės kriterijai – 1 *lentelė*)

3 lentelė

- a) Sudėtyje yra rafinuoto aliejaus (alyvuogių ar kito)
- b) Sudėtyje yra alyvų išspaudų aliejaus

4 lentelė

- a) Žiūrėti Aukščiausios kokybės pirmojo spaudimo ir pirmojo spaudimo alyvuogių aliejų (Kokybės kriterijai – 1 ir 2 *lentelė*)
- b) Sudėtyje yra rafinuoto aliejaus (alyvuogių ar kito)
- c) Sudėtyje yra alyvų išspaudų aliejaus
- d) Sudėtyje yra esterifikuotų aliejų

7 lentelė

- a) Sudėtyje yra alyvų išspaudų aliejaus
- b) Sudėtyje yra esterifikuotų aliejų

8 lentelė

- a) Sudėtyje yra rafinuoto aliejaus (alyvuogių ar kito)
- b) Žiūrėti *lampante* alyvuogių aliejų (Kokybės ir grynumo kriterijai – 4 *lentelė*)
- c) Sudėtyje yra esterifikuotų aliejų

11 lentelė

- a) Sudėtyje yra esterifikuotų aliejų



II PRIEDAS

LAISVŲJŲ RIEBIŲJŲ RŪGŠČIŲ KIEKIO NUSTATYMAS

1. RŪGŠTINGUMO NUSTATYMAS

Laisvųjų riebiųjų rūgščių nustatymas alyvuogių aliejuose. Laisvųjų rūgščių kiekis išreiškiamas sutartu būdu skaičiuojamu rūgštingumu.

1.1. **Metodo esmė**

Bandinys ištirpinamas tirpiklių mišinyje ir esančios laisvosios riebiųjų rūgštys titruojamos kalio hidroksido tirpalu etanolyje.

1.2. **Reagentai**

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

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

Pastaba. Dietileteris yra labai degus ir gali sudaryti sprogius peroksidus. Jį naudojant, turi būti imama ypatingų atsargumo priemonių.

Visiškai prieš pat naudojimą mišinys neutralizuojamas kalio hidroksido tirpalu (1.2.2), 100 ml mišinio įpilant 0,3 ml fenolftaleino tirpalo (1.2.3).

Pastaba. Jei negalima naudoti dietileterio, gali būti naudojamas tirpiklių mišinys, kurį sudaro etanolis ir toluenas. Prireikus etanolį galima pakeisti 2-propanoliu.

1.2.2. Kalio hidroksido titruotas tirpalas etanolyje, $c(\text{KOH})$ apie 0,1 mol/l arba, jei tai būtina, $c(\text{KOH})$ apie 0,5 mol/l.

Turi būti žinoma kalio hidroksido tirpalo etanolyje tiksli koncentracija, ji tikrinama prieš pat naudojimą. Reikia turėti paruoštą tirpalą bent penkios dienos prieš naudojimą, jį dekantavus į butelį iš rudo stiklo su guminiu kamščiu. Tirpalas turi būti bespalvis arba šviesiai geltonos spalvos.

Pastaba. Patvarus bespalvis kalio hidroksido tirpalas gali būti paruoštas taip. 1 000 ml etanolio, įdėjus 8 g kalio hidroksido ir 0,5 g aliuminio drožlių, užvirinama ir vieną valandą verdama su grįžtamuju kondensatoriumi. Tuoju pat distiliuojama. Distiliate ištirpinamas reikiamas kiekis kalio hidroksido. Paliekama kelias dienas stovėti, paskui skaidrus virš kalio karbonato nuosėdų esantis tirpalas dekantuojamas.

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

1.2.3. Fenolftaleino 10 g/l tirpalas 95–96 % (v/v) etanolyje arba šarminio žydriojo (ypač žymiai spalvotų riebalų atveju) 20 g/l tirpalas 95–96 % (v/v) etanolyje.

1.3. **Aparatūra**

Įprasta laboratorinė įranga, tarp kitų įrenginių:

1.3.1. analizinės svarstyklės;

1.3.2. 250 ml talpos kūginė kolba;

1.3.3. 10 ml biuretė, sugraduota 0,05 ml padalomis.

1.4. **Darbo eiga**

1.4.1. Bandinio ruošimas analizei

(Atliekama filtruoto bandinio analizė. Jei drėgmė ir priemaišos kartu sudaro mažiau kaip 1 %, bandinys analizuojamas be tolesnio apdorojimo; jei jų yra daugiau kaip 1 %, bandinį reikia filtruoti.)

1.4.2. Bandinio ėmimas

Bandinio imama, atsižvelgiant į numatomą rūgščių skaičių, pagal tokią lentelę:

▼ **B**

Laukiamas rūgščių skaičius	Bandinio masė (g)	Svėrimo tikslumas (g)
< 1	20	0,05
1–4	10	0,02
4–15	2,5	0,01
15–75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Bandinys sveriamas kūginėje kolboje (1.3.2).

1.4.3. Nustatymas

Bandinys (1.4.2) ištirpinamas 50–150 ml prieš tai neutralizuoto dietileterio ir etanolio mišinio (1.2.1).

Titruojama 0,1 mol/l koncentracijos kalio hidroksido tirpalu (1.2.2) (žr. 2 pastabą) maišant, kol pasikeičia indikatoriaus spalva (rožinė fenolfaleino spalva nepranyksta bent 10 sekundžių).

1 pastaba. Titruotas kalio hidroksido tirpalas etanolyje (1.2.2) gali būti pakeistas vandeniniu kalio arba natrio hidroksido tirpalu, jei titravimo metu įpilamas vanduo nesukelia išsisluoksniavimo.

2 pastaba. Jei 0,1 mol/l kalio hidroksido tirpalo reikia daugiau kaip 10 ml, naudojamas 0,5 mol/l tirpalas.

3 pastaba. Jei titruojant tirpalas susidrumsčia, įpilama tiek tirpiklių mišinio (1.2.1), kad tirpalas pasidarytu skaidrus.

1.5. **Rūgštingumas: skaičiuojamas oleino rūgšties procentiniu kiekiu**

Rūgštingumas masės procentais skaičiuojamas pagal formulę:

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

kurioje:

V = titravimui sunaudoto kalio hidroksido tirpalo tūris, mililitrais;

c = tiksli naudoto kalio hidroksido titruoto tirpalo koncentracija, moliais litre;

M = molinė masė rūgšties, pagal kurią skaičiuojamas rezultatas (= 282);

m = bandinio masė, gramais.

Rezultatas skaičiuojamas ► **M6** dviejų apskaičiavimų ◀ aritmetinis vidurkis.



III PRIEDAS

PEROKSIDŲ SKAIČIAUS NUSTATYMAS

1. TIKSLAS

Šiame standarte aprašytas aliejų ir riebalų peroksidų skaičiaus nustatymo metodas.

2. TAIKYMOSRITIS

Šis standartas taikytinas gyvuliniams ir augaliniams 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 rūgštis ir chloroformo mišinys ištirpina analizuojamo bandinio dalis veikiamą 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 išdžiovinamos 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 tirpus krakmolo.

7. BANDINYS

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

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 pasveriamas 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

▼B

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.

▼ **M6***IV PRIEDAS***VAŠKO KIEKIO NUSTATYMAS DUJŲ IR SKYSČIŲ KAPILIARINIŲ STULPELIŲ CHROMATOGRAFIJOS METODU****1. TAIKYMO SRITIS**

Šiame metode aprašomas būdas vaško kiekiui kai kuriuose riebaluose ir aliejuose nustatyti, esant bandymo sąlygoms.

Konkrečiai jis gali būti naudojamas, kai reikia atskirti spaudimo būdu gautą maišytą alyvuogių aliejų nuo alyvuogių aliejaus, gauto ekstrakavimo būdu (maišytas alyvų išspaudų aliejus).

2. METODO ESMĖ

Į riebalus arba aliejų dedamas vidinis etalonas ir atliekamas chromatografinis frakcionavimas kolonėlėje su hidratuotu silikageliu. Regeneruojama frakcija, kuri bandymo sąlygomis išplaunama pirmoji (jos poliškumas yra mažesnis kaip trigliceridų), vėliau dujų ir skysčių kapiliarinių stulpelių chromatografijos metodu atliekama tiesioginė analizė.

3. ĮRANGA

3.1. 25 ml talpos Erlenmejerio kolba.

3.2. Stiklinė chromatografijos kolonėlė, vidinis skersmuo 15 mm, ilgis 30–40 cm.

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

3.3.1. Termostatinė kontroliuojama kolonelių krosnis, kurioje norimą temperatūrą galima palaikyti 1 °C tikslumu.

3.3.2. Šaltas inžektorius mėginiui į kolonėlę tiesiogiai įpurkšti.

3.3.3. Liepsnos jonizacijos detektorius ir konverteris-stiprintuvas.

3.3.4. 3.3.4.Darbai kartu su konverteriu-stiprintuvu (3.3.3) skirtas kintamo popieriaus tiekimo greičio savirašis-integratorius, kurio inertiškumas mažiau kaip viena sekundė.

3.3.5. Stiklinis arba lydyto kvarco 10–15 m ilgio kapiliarinė kolonėlė, kurios vidinis skersmuo 0,25–0,32 mm, iš vidaus padengta 0,10–0,30 µm storio skystos fazės S-52 arba S-54 plėvele arba ją atitinkančios medžiagos plėvele.

3.4. 10 µl talpos mikrošvirkštai su kietinta adata, pritaikyti mėginiui tiesiogiai įpurkšti į kolonėlę.

4. REAGENTAI

4.1. Silikagelis, 70/230 mešų, artikulius 7754 Merck.

Silikagelis dedamas į krosnį, ir keturias valandas kaitinamas 500 °C temperatūroje. Ataušinama ir įpilama 2 % vandens. Gauta suspensija homogenizuojama gerai sumaišant. Prieš naudojimą laikoma tamsoje ne mažiau kaip 12 valandų.

4.2. n-heksanas, tinkamas chromatografijai.

4.3. Dietileteris, tinkamas chromatografijai.

4.4. n-heptanas, tinkamas chromatografijai.

4.5. Etaloninis 0,1 % (m/v) laurileikozanato tirpalas heksane (vidinis etalonas).

4.6. Nešančiosios dujos: grynas vandenilis, tinkamas dujų ir skysčių chromatografijai.

4.7. Pagalbinės dujos:

— grynas vandenilis, tinkamas dujų ir skysčių chromatografijai,

— grynas oras, tinkamas dujų ir skysčių chromatografijai.

5. METODIKA

5.1. Vaško trinties atskyrimas.

5.1.1 Chromatografinės kolonėlės paruošimas.

15 g silikagelio, hidratuoto 2 %, suspenduojama bevandeniame n-heksane ir supilama į kolonėlę.

▼ **M6**

Silikageliui leidžiama savaime nusėsti. Kad chromatografinė juosta būtų vienalytiškesnė, nusodinimas užbaigiamas su elektrine purtykle. Bet kokioms priemonėms pašalinti per silikagelį perleidžiama 30 ml n-heksano.

5.1.2. Chromatografija kolonėlėje

Į 25 ml talpos kolbą tiksliai pasverama 500 mg mėginio ir įdedama kiek reikia vidinio etalono, atsižvelgiant į numatomą vaško kiekį mėginyje, t. y., įdedama 0,1 mg laurileikozanato maišyto alyvuogių aliejaus atveju ir 0,25–0,5 mg maišyto alyvų išspaudų aliejaus atveju.

Paruoštas mėginys dviem 2 ml n-heksano porcijomis supilamas į chromatografijos kolonėlę, paruoštą pagal 5.1 punktą.

Tirpikliui leidžiama ištekti iki 1 mm lygio virš absorbento viršutinio paviršiaus. Paskui pradedamas chromatografinis eliuavimas; surenkama 140 ml n-heksano/dietileterio mišinio, paruošto tūriu santykiu 99: 1, esant 15 lašų per 10 sekundžių srauto greičiui (2,1 ml/minutę).

Gauta frakcija džiovinama sukamajame garintuve, kol išgarinamas beveik visas tirpiklis. Paskutiniai 2–3 ml tirpiklio pašalinami silpnoje azoto srovėje, paskui įpilama 10 ml n-heptano.

5.2. Dujų ir skysčių chromatografinė analizė

5.2.1. Paruošiamieji darbai, kolonėlės kondicionavimas

5.2.1.1. Kolonėlė prijungiama prie dujų ir skysčių chromatografo, kolonėlės pradžia sujungiant su kolonėlės tiesioginio įpurškimo įtaisu, galą – su detektoriumi.

Patikrinamas dujų ir skysčių chromatografijos įrenginys (dujų kilpų veikimas, detektoriaus ir savirašio veikimas ir t. t.).

5.2.1.2. Jei kolonėlė naudojama pirmą kartą, patartina ją kondicionuoti. Per kolonėlę paleidžiama nestipri dujų srovė, paskui įjungiamas dujų ir skysčių chromatografas. Laipsniškai kaitinama, kol temperatūra nepakyla bent 20 °C aukščiau nei naudojama darbe (pastaba). Ši temperatūra palaikoma ne mažiau kaip dvi valandas, po to nustatomos įrenginio darbo sąlygos (reguliuojamas dujų srautas, užkuriama liepsna, prijungiamas elektroninis savirašis, nustatoma kolonėlės krosnies temperatūra, reguliuojamas detektorius ir t. t.). Signalas užrašomas esant jautrumui, kuris būtų bent du kartus didesnis nei reikalingas analizei atlikti. Pagrindo linija turi būti brėžiama tiesi, be jokių smailių ir nukrypimų.

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

Pastaba: Kondicionuojama temperatūroje visą laiką bent 20 °C žemesnėje, nei didžiausia naudojamam eliuentui nurodyta temperatūra.

5.2.2. Darbo sąlygų parinkimas.

5.2.2.1. Paprastai darbo sąlygos yra tokios:

- kolonėlės temperatūra: pradinė temperatūra 80 °C, kėlimas 30 °C/minutę greičiu iki 120 °C ir toliau programuotas didinimas 5 °C/minutę greičiu iki 340 °C,
- detektoriaus temperatūra: 350 °C,
- nešančiųjų dujų linijinis greitis: vandenilis 20–35 cm/s,
- prietaiso jautrumas: 4–16 kartų didesnis nei mažiausias silpninimas,
- savirašio jautrumas: 1–2 mV per visą skalę,
- popieriaus greitis: 30 cm/val,
- įpurkštos medžiagos kiekis: 0,5–1 μl tirpalo.

Šios sąlygos gali būti keičiamos pagal kolonėlės bei dujų ir skysčių chromatografo savybes (kad būtų gautos chromatogramos, atitinkančios tokias sąlygas: C32 vidinio etalono sulaikymo trukmė turi būti 25 ± 2 minutės ir iškiliausios vaško smailės aukštis sudaro 60–100 % visos skalės aukščio).

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

▼ **M6**

5.2.3. Analizė

5.2.3.1. 10 µl talpos mikrošvirkštu įsiurbama 1 µl tirpalo; stūmoklis patraukiamas atgal, kol adata ištuštėja. Adata įkišama per įpurškimo įtaisą ir po vienos dviejų sekundžių tirpalas greitai išsvirkščiamas. Maždaug po penkių sekundžių adata atsargiai ištraukiama.

5.2.3.2. Užrašoma, kol vaškai visiškai išplaunami.

Pagrindo linija turi visuomet atitikti nustatytas sąlygas (5.2.1.2).

5.2.4. Smailių identifikavimas

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

Pirmojo spaudimo alyvuogių aliejaus vaškų chromatograma parodyta 1 brėžinyje.

5.2.5. Kiekybinė analizė

5.2.5.1. Integratoriumi išmatuojami vidinį etaloną ir alifatinius esterius C40-C46 atitinkančių smailių plotai.

5.2.5.2. Kiekvieno vašką sudarančio esterio kiekis, skaičiuojant mg/kg riebalų, nustatomas pagal formulę:

$$\text{esteris (mg/kg)} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot \blacktriangleright M91\,000 \blacktriangleleft}{A_s \cdot m}$$

kurioje: A_x = kiekvieną esterį atitinkančios smailės plotas;

A_s = laurileikozanatą atitinkančios smailės plotas;

m_s = pridėto laurileikozanato masė, miligramais;

m = nustatymui paimto mėginio masė, gramais.

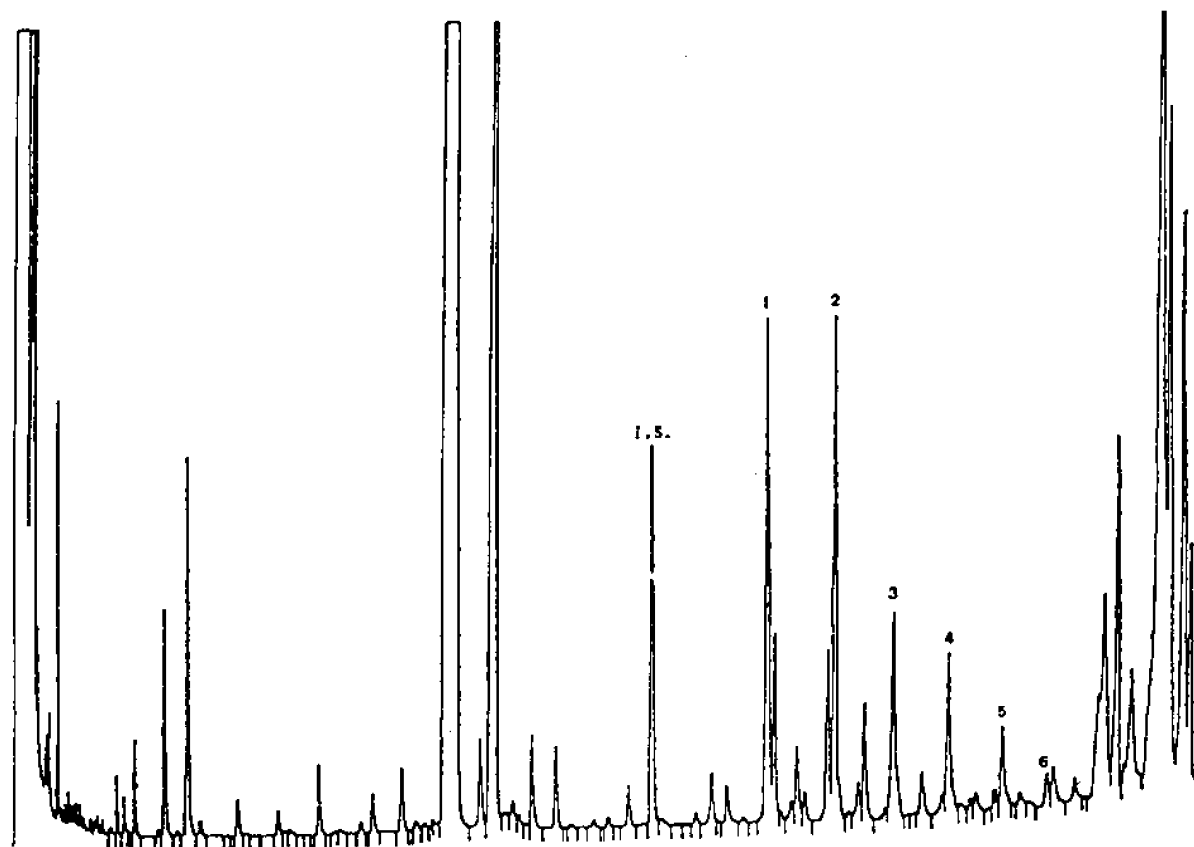
6. REZULTATŲ PATEIKIMAS

Pateikiamas atskirų vaškų kiekis ir šių kiekių suma, skaičiuojant mg/kg riebalų.

▼ M6*PAPILDYMAS**Dujų linijinio greičio nustatymas*

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

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



1 BRĖŽINYS – Pirmojo spaudimo alyvuogių aliejaus vaškų chromatograma.

I.S. = Vidinis etalonas, esteris C32

1 = esteriai C36,

2 = esteriai C38,

3 = esteriai C40,

4 = esteriai C42,

5 = esteriai C44,

6 = esteriai C46,



V PRIEDAS

**STEROLIŲ SUDETIES IR KIEKIO NUSTATYMAS KAPILIARINĖS
DUJŲ CHROMATOGRAFIJOS METODU**

1. TIKSLAS

Šiame metode aprašytas atskirų sterolių ir jų bendro kiekio nustatymo riebalinėse medžiagose būdas.

2. METODO ESMĖ

Riebalinė medžiaga, įdėjus β -cholestanolio kaip vidinio etalono, muilinama kalio hidroksido tirpalu etanolyje ir nemuilinama dalis ekstrahuojama dietileteriu.

Sterolių frakcija iš nemuilinamų medžiagų ekstrakto išskiriama chromatografiškai ant šarmu impregnuotų silikagelio plokštelių. Iš silikagelio regeneruoti steroliai paverčiami trimetilsilileteriais ir analizuojami kapiliarinės dujų chromatografijos metodu.

3. APARATŪRA

3.1. 250 ml tūrio kolba ir grįžtamasis kondensatorius, turintys šlifo sujungimus.

3.2. 500 ml talpos dalijamieji piltuvai.

3.3. 250 ml talpos kolbos.

3.4. Visa įranga plonasluoksnei chromatografinei (PSC) analizei atlikti, pritaikyta stiklinėms plokštelėms, kurių matmenys 20 x 20 cm.

3.5. UV 366 arba 254 nm ilgio šviesos bangų lempa.

3.6. Mikrošvirkštai 100 ir 500 μ l tūriams imti.

3.7. G3 aktyumo stiklinis filtras (15–40 μ m aktyumas) maždaug 2 cm skersmens ir 5 cm aukščio, tinkamas vakuuminiam filtravimui, su 12/21 šlifomova.

3.8. 50 ml talpos vakuuminė kolba su 12/21 šlifo įmova filtrui (3.7) prijungti.

3.9. 10 ml talpos mėgintuvėlis su kūginiu dugnu ir kamščiu.

3.10. Darbui su kapiliarine kolonėle naudojamas ir bandinio dozatorių turintis dujų chromatografas, kurį sudaro:

3.10.1 termostatuojama kamera norimai temperatūrai kolonėlėje palaikyti $\pm 1^\circ$ C tikslumu;

3.10.2 reguliuojamos temperatūros garinimo įrenginys su polisiloksanu dengtu garinimo elementu;

3.10.3 liepsnos jonizacinis detektorius ir konverteris stiprintuvais;

3.10.4 darbui kartu su konverteriu-stiprintuvu (3.10.3) pritaikytas kintamo popieriaus tiekimo greičio savirašis-integratorius, kurio inertiškumas ne didesnis kaip viena sekundė.

3.11. Stiklinė arba lydyto kvarco 20–30 m ilgio kapiliarinė kolonėlė, kurios vidinis skersmuo 0,25–0,32 mm, padengta 0,10–0,30 μ m storio skystos fazės SE-52 arba SE-54 plėvele arba ją atitinkančia plėvele.

3.12. 10 μ l talpos mikrošvirkštas dujų chromatografijai su kietinta adata.

4. REAGENTAI

4.1. Kalio hidroksido maždaug 2 mol/l tirpalas etanolyje: 130 g kalio hidroksido (mažiausia koncentracija 85 %) ištirpinama šaldant 200 ml distiliuoto vandens ir praskiedžiama etanoliumi iki 1 litro. Tirpalas turi būti laikomas gerai užkimštame tamsaus stiklo butelyje.

4.2. Dietileteris, analiziškai grynas.

4.3. Bevandenis natrio sulfatas, analiziškai grynas.

4.4. Fluorescencijos indikatoriumi neužteršto silikagelio 0,25 mm sluoksniu dengtos stiklinės PSC plokštelės (gali būti naudojamos gatavos pramonės gaminamos plokštelės).

4.5. Kalio hidroksido 0,2 mol/l tirpalas etanolyje: 13 g kalio hidroksido ištirpinama 20 ml distiliuoto vandens ir praskiedžiama etanoliumi iki 1 litro.

▼B

- 4.6. Benzenas, tinkamas chromatografijai (žr. 5.2.2).
- 4.7. Acetonas, tinkamas chromatografijai (žr. 5.2.2).
- 4.8. Heksanas, tinkamas chromatografijai (žr. 5.2.2).
- 4.9. Dietileteris, tinkamas chromatografijai (žr. 5.2.2).
- 4.10. Chloroformas, tinkamas chromatografijai (žr. 5.2.2).
- 4.11. Etaloninis tirpalas plonasluoksnei chromatografijai: cholesterolis arba fitosteroliai, ► **M6** 2 % ◄ tirpalas chloroforme.
- 4.12. 0,2 % 2',7'-dichlorfluoresceino tirpalas etanolyje. Jis truputį pašarminamas, įlašinant kelis lašus 2 mol/l kalio hidroksido tirpalo.
- 4.13. Bevandenis piridinas, tinkamas chromatografijai.
- 4.14. Heksametildisilazanas.
- 4.15. Trimetilchlorsilanas.
- 4.16. Etaloniniai sterolių trimetilsilileterių tirpalai. Ruošiami prieš pat juos naudojant iš grynų sterolių arba jų mišinių, gautų iš juos turinčių aliejų.
- 4.17. 0,2 % (m/v) β -cholestanolio tirpalas chloroforme (vidinis etalonas).
- 4.18. Dujų nešikliai: vandenilis arba helis, grynumas atitinka dujų chromatografijos reikalavimus.
- 4.19. Pagalbinės dujos:
 - vandenilis, kurio grynumas atitinka dujų chromatografijos reikalavimus,
 - oras, kurio grynumas atitinka dujų chromatografijos reikalavimus.

5. DARBO EIGA

5.1. Nemuilinamų medžiagų gavimas

- 5.1.1. Į 250 ml talpos kolbą 500 μ l mikrošvirkštu išvirkščiamas toks 0,2 % β -cholestanolio tirpalo tūris, kuriame cholestanolio kiekis būtų lygus maždaug 10 % sterolių kiekio analizei paimto bandinio alikvotinėje dalyje. Pavyzdžiui, į 5 g alyvuogių aliejaus bandinį įpilama 500 μ l 0,2 % β -cholestanolio tirpalo, 1 500 μ l – į ► **M6** ————— ◄ aliejaus iš alyvuogių išspaudų bandinį.

Vidinio etalono tirpalas N_2 srovėje išgarinamas iki sauso likučio, paskui į tą pačią kolbą tiksliai pasveriamas 5 g sauso, filtruoto bandinio.

► **M6** Aliejai ◄, kuriuose yra nemaži kiekiai cholesterolio, chromatogramoje gali turėti smailę, kurios sulaikymo trukmė tokia pati kaip ir cholestanolio. Tokiu atveju sterolių frakcija turi būti analizuojama du kartus, su vidiniu etalonu ir be jo ► **M6** arba vietoje cholestanolio turi būti naudojamas betulinolis ◄.

- 5.1.2. Į kolbą įpilama 50 ml 2 mol/l kalio hidroksido tirpalo alkoholyje, prijungiamas grįžtamasis kondensatorius ir kolba ant vandens vonios šildoma iki nestipraus virimo, nuolat stipriai maišant, kol įvyksta muilinimas (tirpalas pasidaro skaidrus). Šildymas tęsiamas dar 20 minučių, paskui per kondensatoriaus viršų įpilama 50 ml distiliuoto vandens, kondensatorius atjungiamas ir kolba ataušinama maždaug iki 30 °C.
- 5.1.3. Kolbos turinys kiekybiškai supilamas į 500 ml talpos dalijamąjį piltuvą, nuplovimui per kelis kartus sunaudojant maždaug 50 ml distiliuoto vandens. Įpilama maždaug 80 ml dietileterio, turinys stipriai plakamas 30 sekundžių, paskui leidžiama išsisluoksniuoti (1 pastaba).

Apatinis vandeninis sluoksnis išleidžiamas į antrąjį dalijamąjį piltuvą. Vandeninis sluoksnis ekstrahuojamas tuo pačiu būdu dar du kartus, kiekvieną kartą sunaudojant 60–70 ml dietileterio.

1 pastaba. Bet kokia susidariusi emulsija gali būti panaikinta, įpurškiant nedidelį kiekį etanolio arba metanolio.

- 5.1.4. Eteriniai ekstraktai supilami į vieną dalijamąjį piltuvą ir plaunami distiliuotu vandeniu (50 ml vienu kartu), kol plovimo vanduo rodo neutralią reakciją.

Atskyrus plovimo vandenį, eterinis ekstraktas džiovinamas virš bevardenio natrio sulfato ir filtruojamas per bevandenį natrio sulfatą į 250 ml talpos kolbą, kuri buvo prieš tai pasverta, dalijamąjį piltuvą ir filtrą nuplaunant nedideliu kiekiu dietileterio.

▼B

- 5.1.5. Eteris garinamas, kol tūris sumažėja iki kelių mililitrų, paskui likutis džiovinamas nedideliame vakuume arba azoto srovėje. Džiovinimas užbaigiamas, laikant maždaug ketvirtį valandos džiovinimo spintoje 100 °C temperatūroje, paskui ataušintas eksikatoriuje likutis pasveriamas.

5.2. Sterolių frakcijos atskyrimas

- 5.2.1. Ruošiamos bazinės PSC plokštelės. Silikageliu dengtos plokštelės (4.4) 10 sekundžių visiškai įmerkiamos į 0,2 mol/l kalio hidroksido tirpalą (4.5), pakui paliekamos dvi valandas džiūti traukos spintoje ir vėliau vieną valandą laikomos 100 °C temperatūroje džiovinimo spintoje.

Plokštelės išimamos iš džiovinimo spintos ir laikomos eksikatoriuje su kalcio chloridu, kol jų prireikia. (Taip apdorotos plokštelės turi būti panaudotos per 15 dienų.)

2 pastaba. Kai sterolių frakcijai atskirti naudojamos bazinės silikagelio plokštelės, nemuolinamų medžiagų nebūtina apdoroti Al_2O_3 , nes visi rūgštinės prigimties junginiai (riebiosios rūgštys ir kiti) sulaikomi užlašinimo linijoje, ir sterolių juosta aiškiai atsiskiria nuo alifatinių ir terpenų alkoholių juostos.

- 5.2.2. Į ryškinimo indą maždaug 1 cm storio sluoksniu įpilama benzeno ir acetono mišinio, kurio tūrių santykis 95:5. Vietoj šio mišinio gali būti naudojamas heksano ir dietileterio mišinys, kurio tūrių santykis 65:35. Indas uždaromas ir paliekamas ne mažiau kaip pusė valandos pusiausvyrai tarp garų ir skysčio nusistovėti. Ant vidinių indo sienelių gali būti uždėdamos filtro popieriaus juostelės. Tai maždaug trečdaliu sutrumpina ryškinimo trukmę ir komponentų išplovimas būna vienodesnis bei pastovesnis.

3 pastaba. Visiškai pakartojamoms ryškinimo sąlygoms užtikrinti, ryškinimo tirpalas turi būti pakeičiamas kiekvienai analizei.

- 5.2.3. Ruošiamas maždaug 5 % nemuolinamų medžiagų (5.1.5) tirpalas chloroforme, 300 µl šio tirpalo 100 µl talpos mikrošvirkštu užlašinama vienodo ir kuo mažesnio storio juostele ant PSC plokštelės (5.2.1), maždaug per 2 cm nuo jos apačios. Vienoje linijoje su šia juostele užlašinama 2–3 µl sterolių etaloninio tirpalo (4.11) jų juostai identifikuoti ryškinimą užbaigus.

- 5.2.4. Plokštelė dedama į ryškinimo indą, paruoštą kaip nurodyta 5.2.2 punkte. Palaikoma 15–20 °C aplinkos temperatūra. Indas iš karto uždengiamas ir plaunama, kol tirpiklio frontas atsiduria 1 cm atstumu nuo plokštelės viršaus. Plokštelė išimama iš ryškinimo indo, tirpiklis išgarinamas karšto oro srovėje arba plokštelė trumpam paliekama traukos spintoje.

- 5.2.5. Plokštelė plonai ir vienodai apipurškiama 2',7'-dichlorfloresceino tirpalu. Žiūrint ultravioletinėje šviesoje, sterolių juosta gali būti atpažinta pagal buvimą viename lygyje su etaloninio tirpalo dėme. Juostos ribos pagal fluorescuojančius kraštus pažymimos juodu pieštuku.

- 5.2.6. Silikagelis pažymėtame plote nugrandomas metaline mentele. Gerai susmulkinta medžiaga supilama į stiklinį filtrą (3.7). Įpilama 10 ml karšto chloroformo, mišinys kruopščiai sumaišomas metaline mentele ir vakuumu filtruojamas į prie filtro prijungtą kūginę kolbą (3.8).

Likutis ant filtro 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 10 ml talpos mėgintuvėlį (3.9), kuris prieš tai pasveriamas. Mėgintuvėlio turinys džiovinamas nestipriai kaitinant nedidelėje azoto srovėje, iš naujo tirpinamas keliuose acetono lašuose, vėl sausinamas, paskui mėgintuvėlis su likučiu maždaug 10 minučių dedamas į 105 °C temperatūros džiovinimo spintą, išimtas aušinamas eksikatoriuje ir pasveriamas.

Likutį mėgintuvėlyje sudaro sterolių frakcija.

5.3. Trimetilsilileteriu ruošimas

- 5.3.1. Į mėgintuvėlį su sterolių frakcija, vengiant bet kokio drėgmės patekimo (5 pastaba), įpilama sililino reagento, kurį sudaro piridino, heksametildisilazano ir trimetilchlorsilano mišinys tūrių santykiu 9:3:1 (4 pastaba), vienam sterolių miligramui imant 50 µl mišinio.

▼B

4 pastaba. Galima pirkti paruoštą naudoti tirpalą. Yra pirkti kitų sililimo reagentų, pvz., N,O-bis(trimetilsilil)trifluoracetamido + 1 % trimetilchlorsilano mišinys, kuris turi būti praskiestas tuo pačiu sauso piridino tiriu.

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

5 pastaba. Nedidelė opalescencija yra įprastas reiškinys ir nesukelia trukdymų. Baltų dribsnių susidarymas ir rožinė spalva yra drėgmės patekimo arba reagento sugedimo požymiai. Šiuo atveju bandymas pakartojamas.

5.4. Dujų chromatografinė analizė

5.4.1. Paruošiamieji darbai, kolonėlės užpildymas.

- 5.4.1.1. Kapiliarinė kolonėlė prijungiama prie dujų chromatografo, kolonėlės įėjimą sujungiant per garintuvą su bandinio dozatoriumi, išėjimą – su detektoriumi.

Atliekamas bendras dujų chromatografavimo įrenginio patikrinimas (nutekėjimai dujų sistemoje, detektoriaus, dozatoriaus įtaiso ir savirašio veikimas, t. t.).

- 5.4.1.2. Pirmą kartą naudojamą kapiliarinę kolonėlę rekomenduojama kondicionuoti. Per kolonėlę paleidžiama nestipri dujų nešiklio srovė, paskui įjungiamas chromatografas ir atliekamas laipsniškas kaitinimas, kol temperatūra nepakyla bent 20 °C aukščiau nei naudojama darbe (6 pastaba). Šioje temperatūroje kolonėlė laikoma ne mažiau kaip dvi valandas, vėliau įrenginys nustatomas darbo režimu (reguliuojamas dujų srautas, uždegama ugnis, prijungiamas elektroninis savirašis, nustatoma kapiliarinės kolonėlės krosnies, detektoriaus ir inžektoriaus temperatūra ir t. t.) ir užrašomas signalas bent du kartus didesniu jautrumu, nei bus naudojamas analizei atlikti. Pagrindo linija turi būti brėžiama tiesi, be bet kokio pobūdžio smailių ir dreifo požymių.

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

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

5.4.2. Darbo sąlygų parinkimas

5.4.2.1. Orientacinės darbo sąlygos yra tokios:

- kolonėlės temperatūra: 260 °C ± 5 °C,
- garintuvo temperatūra: 280 °C,
- detektoriaus temperatūra: 290 °C,
- dujų nešiklio linijinis greitis: helio 20–35 cm/s, vandenilio 30–50 cm/s,
- padalinimo santykis nuo 1:50 iki 1:100,
- prietaiso jautrumas: 4–16 kartų didesnis nei minimalus silpninimas,
- užrašymo jautrumas: 1–2 mV per visą skalę,
- popieriaus slinkimo greitis: 30–60 cm/val,
- įpurkštos medžiagos kiekis: 0,5–1 µl TMSE tirpalo.

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

- β-sitosterolio sulaikymo trukmė turi būti 20 ± 5 minutės,
- kampesterolio smailės aukštis turi būti: alyvuogių aliejui (vidutinis kiekis 3 %) 15 ± 5 % visos skalės aukščio; sojos aliejui (vidutinis kiekis 20 %) 80 ± 10 % visos skalės aukščio,
- visi esantys steroliai turi būti atskirti. Be to, jų smailės turi būti visiškai atsiskyrusios, t. y. smailės trajektorija turi sugrįžti iki pagrindo linijos, kol prasideda kilimas atsiradus naujai smilei.

▼B

Tačiau neviseiškas atsiskyrimas leidžiamas, jei smailės su santykinė sulaikymo trukme 1,02 plotas gali būti apskaičiuotas naudojant statmenį.

5.4.3. Analizė

- 5.4.3.1. 10 µl talpos mikrošvirkštu įsiurbama 1 µl heksano, paskui 0,5 µl oro ir 0,5–1 µl bandinio tirpalo. Mikrošvirkšto plunžeris pakeliamas aukštin, kad adata ištuštėtų. Adata įkišama per įpurškimo įtaiso membraną ir po vienos dviejų sekundžių tirpalas greitai išvirkščiamas, paskui po kokių penkių sekundžių adata lėtai ištraukiama.

- 5.4.3.2. Užrašymas atliekamas, kol bus visiškai išplauti esančių sterolių TMSE.

Pagrindo linija turi visą laiką atitikti reikalavimus (5.4.1.2).

5.4.4. Smailių identifikavimas

Atskirų smailių identifikavimas atliekamas pagal sulaikymo trukmes ir lyginant su etaloniniu TMSE mišiniu, analizuojamu tomis pačiomis sąlygomis.

Steroliai išplaunami tokia eilės tvarka: cholesterolis, brasikasterolis, 24-metilencholesterolis, kampesterolis, kampestanolis, stigmasterolis, Δ-7-kampesterolis, Δ-5,23-stigmastadienolis, klerosterolis, β-sitosterolis, sitostanolis, Δ-5-avenasterolis, Δ-5,24-stigmastadienolis, Δ-7-stigmastanolis, Δ-7-avenasterolis.

Sitosterolio sulaikymo trukmės kolonėlėje su SE-52 ir SE-54 yra parodytos I lentelėje.

1 ir 2 brėžiniuose vaizduojamos tipiškos kai kurių aliejų chromatogramos.

5.4.5. Kiekybinis vertinimas

- 5.4.5.1. Naudojant integratorių, apskaičiuojamas β-cholestanolio ir sterolių smailių plotas. Neatsižvelgiama į I lentelėje nenurodytų junginių smailės. β-cholestanolio kalibravimo koeficientas turi būti lygus 1.

- 5.4.5.2. Kiekvieno sterolio kiekis, skaičiuojant miligramais 100 g riebalinės medžiagos, nustatomas pagal formulę:

$$\text{sterolio kiekis} = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 100}{A_s \cdot m},$$

kurioje:

A_x = x sterolio smailės plotas ► **M6** ————— ◀;

A_s = β-cholestanolio smailės plotas ► **M6** ————— ◀;

m_s = įdėto β-cholestanolio masė, miligramais;

m = nustatymui paimto bandinio masė, gramais.

6. REZULTATŲ PATEIKIMAS

- 6.1. Užrašomos atskirų sterolių koncentracijos, miligramais 100 g riebalinės medžiagos, ir jų „bendro kiekio“ vertė.

- 6.2. Pagal atskiro sterolio smailės ploto santykį su visų sterolių smailių plotu apskaičiuojamas procentinis kiekvieno sterolio kiekis.

$$\text{sterolio } x\% = \frac{A_x}{\sum A} \cdot 100,$$

kurioje:

A_x = x sterolio smailės plotas;

$\sum A$ = visų sterolių smailių plotas.



PRIEDĖLIS

Dujų linijinio greičio nustatymas

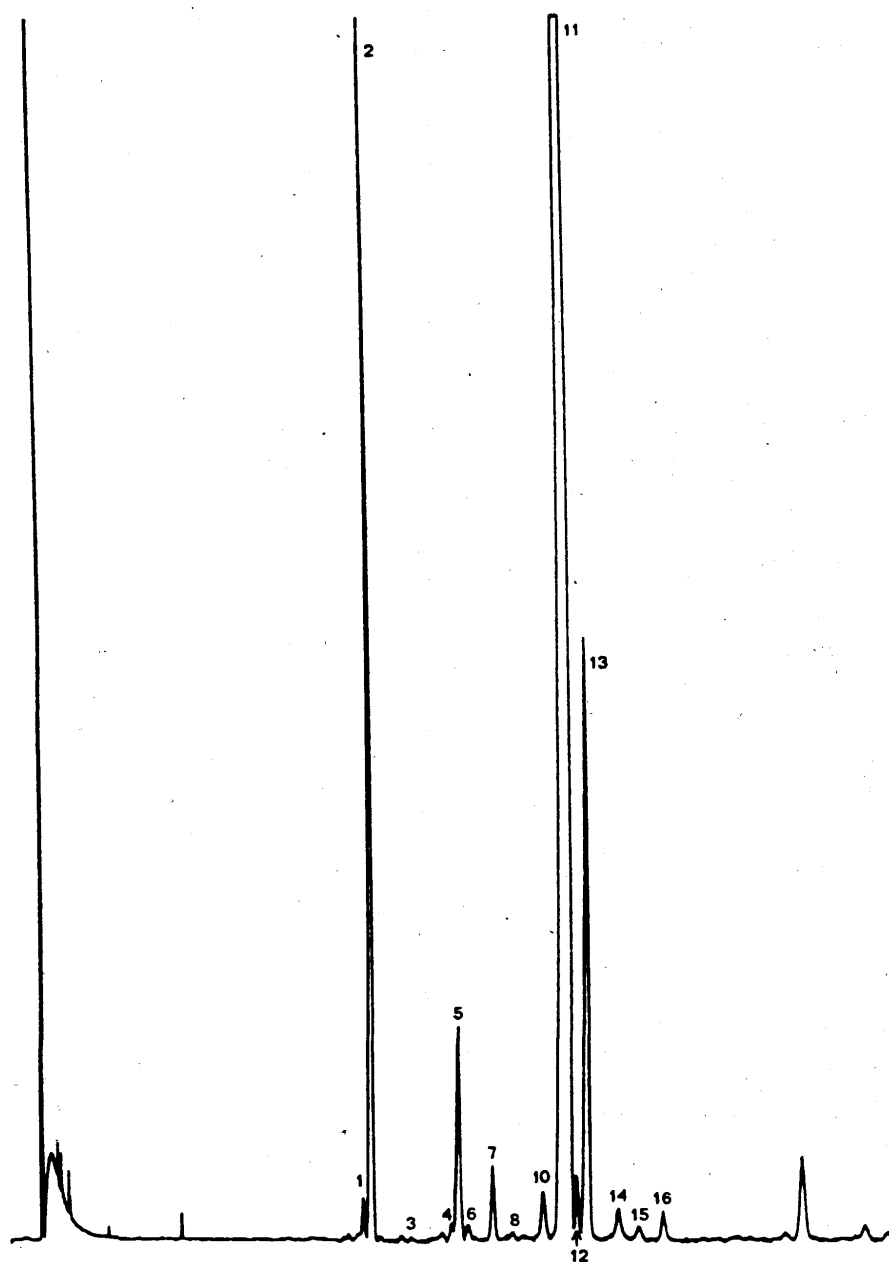
[normalioms darbo sąlygoms sureguliuotą dujų chromatografą įpurškiama 1–3 μ l metano (arba propano) ir matuojamas laikas, kurį dujos užtruks tekėdamos per kolonėlę nuo įpurškimo momento iki smailės išplovimo momento (t_M).

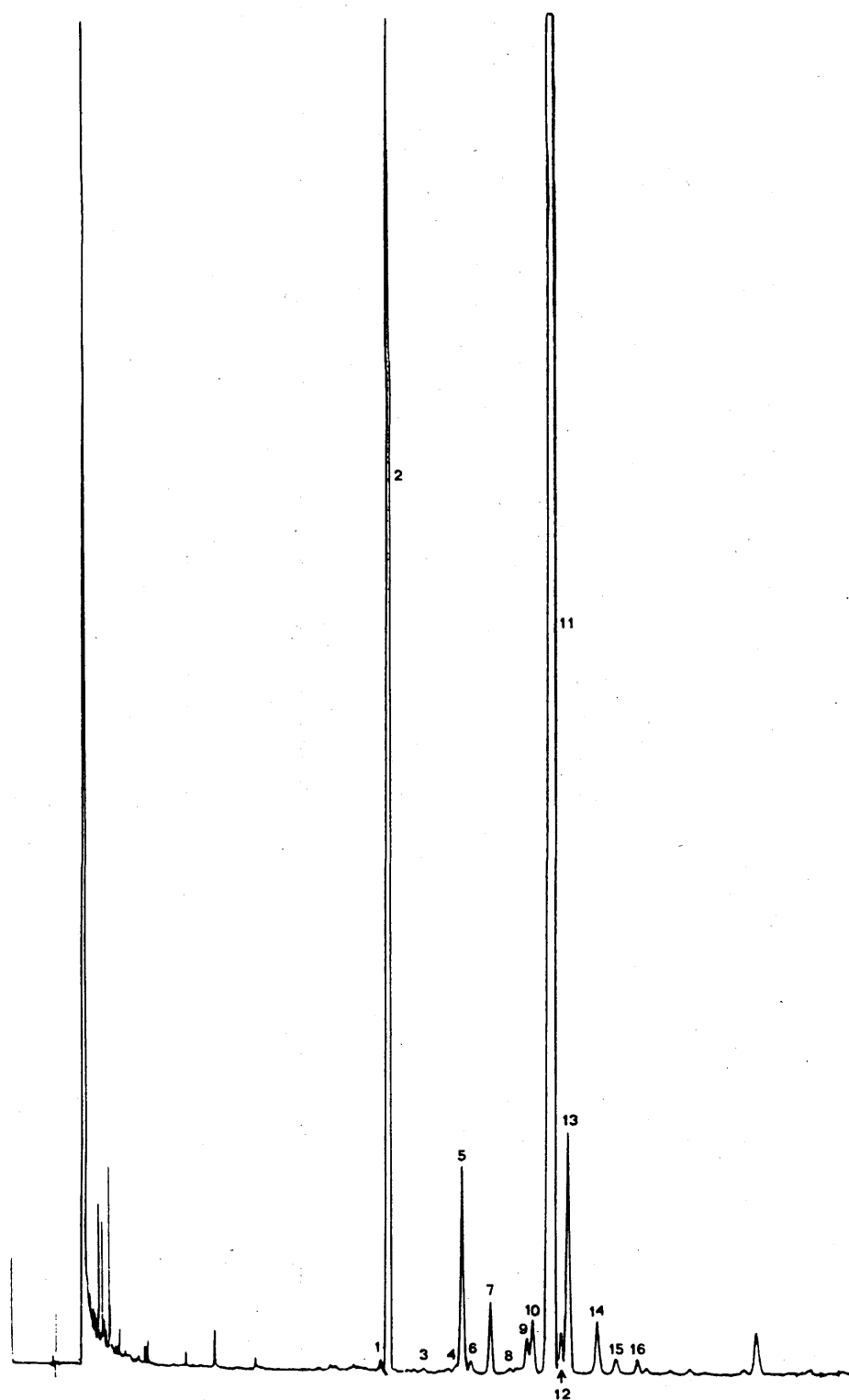
Linijinis greitis, cm/s, gaunamas pagal formulę L/t_M , kurioje L yra kolonėlės ilgis centimetrais, t_M yra sekundėmis išmatuotas laikas.

I lentelė

Santykinė sterolių sulaikymo trukmė

Sma- ilė	Pavadinimas		Santykinė sulaikymo trukmė	
			SE 54 kolo- nėlė	SE 52 kolo- nėlė
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
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	[24R]-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-5-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 -7,24-cholestadien-3 β -olis	1,12	1,12
16	Δ -7-avenasterolis	[24Z]-24-etiliden- Δ -7-cholesten-3 β -olis	1,16	1,16

▼ **B****1 brėžinys***Negryninto alyvuogių aliejaus sterolių frakcijos chromatograma*

▼ **B****2 brėžinys***Gryninto alyvuogių aliejaus sterolių frakcijos chromatograma*



VI PRIEDAS

ERITRODIOLIO IR UVAOLIO NUSTATYMAS

IVADAS

Eritrodiolis (paprastai suprantamas kaip du glikoliai, eritrodiolis ir uvaolis, kartu) yra kai kurių rūšių riebalinėms medžiagoms būdingos nemuilingos frakcijos sudedamoji dalis. Jo ženkliai didesnių koncentracijų randama tirpikliais ekstrahuojamose aliejuose, nei kituose aliejuose, pvz., spaudimo būdu gautame alyvuogių aliejuje ir vynuogių kauliukų aliejuje, kuriuose jo taip pat yra. Taigi eritrodiolio buvimas gali rodyti, kad yra tirpikliais ekstrahuoto aliejaus.

1. TIKSLAS

Šiame metode aprašytas eritrodiolio nustatymo riebalinėse medžiagose būdas.

2. METODO ESMĖ

Riebalinė medžiaga muilinama kalio hidroksido tirpalu etanolyje. Nemuilinama dalis ekstrahuojama dietileteriu ir gryninama leidžiant per kolonėlę su aliuminio oksidu.

Nemuilingos medžiagos chromatografuojamos plonasluoksnės chromatografijos metodu ant silikagelio plokštelių, kol atskiriamos sterolių ir eritrodiolio frakcijos atitinkančios juostos. Nuo plokštelių regeneruoti steroliai ir eritrodiolis paverčiami trimetilsilileteriais ir mišinys analizuojamas dujų chromatografijos metodu.

Rezultatas apskaičiuojamas eritrodiolio procentiniu kiekiu eritrodiolio ir sterolių mišinyje.

3. APARATŪRA

3.1. V priede aprašyta aparatūra (sterolių kiekio nustatymas).

4. REAGENTAI

4.1. V priede aprašyti reagentai (sterolių kiekio nustatymas).

4.2. Etaloninis 0,5 % eritrodiolio tirpalas chloroforme.

5. DARBO EIGA

5.1. Nemuilnamų medžiagų paruošimas

Kaip aprašyta V priedo 5.1.2 skirsnyje.

5.2. Eritrodiolio ir sterolių frakcijos atskyrimas

5.2.1. Žr. V priedo 5.2.1 skirsnį.

5.2.2. Žr. V priedo 5.2.2 skirsnį.

5.2.3. Ruošiamas maždaug 5 % nemuilingų medžiagų tirpalas chloroforme.

0,1 ml talpos mikrošvirkštu 0,3 ml šio tirpalo vienodo ir kuo mažesnio storio juostele užlašinama ant chromatografinės plokštelės, maždaug per 1,5 cm nuo jos apačios.

Viename plokštelės gale užlašinama keli mikrolitrai etaloninių cholesterolio ir eritrodiolio tirpalų.

5.2.4. Plokštelė dedama į ryškinimo indą, paruoštą kaip nurodyta 5.2.1 punkte. Palaikoma maždaug 20 °C aplinkos temperatūra. Indas iš karto užden-giamas ir plaunama, kol tirpiklio frontas atsiduria 1 cm atstumu nuo plokštelės viršaus. Plokštelė išimama iš ryškinimo indo, tirpiklis išgarinamas karšto oro srovėje.

5.2.5. Plokštelė plonai ir vienodai apipurškiama 2',7'-dichlorfloresceino tirpalu alkoholyje. Žiūrint ultravioletinėje šviesoje, sterolių ir eritrodiolio juostos gali būti atpažintos pagal buvimą viename lygyje su etaloninių tirpalų dėmėmis. Fluorescuojančios vietos pažymimos išilgai kraštų.

5.2.6. Silikagelis pažymėtame plote nugrandomas metaline mentele. Medžiaga nuo plokštelės supilama į 50 ml kolbą. Įpilama 15 ml karšto chloroformo, gerai sumaišoma ir filtruojama per stiklinį filtrą, silikagelį supilant ant filtro. Filtras tris kartus plaunamas chloroformu (maždaug po 10 ml kiekvieną kartą), filtratas kaupiamas 100 ml kolboje. Filtratas nugarinamas iki

▼ **B**

4–5 ml tūrio, tirpalas supilamas į 10 ml talpos graduotą centrifugavimo mėgintuvėlį su kūginės formos dugnu. Mėgintuvėlio turinys džiovinamas nestipriai kaitinant azoto srovėje ir pasveriamas.

5.3. **Trimetilsilileterių ruošimas**

Kaip aprašyta V priedo 5.3 skirsnyje.

5.4. **Dujų chromatografinė analizė**

Kaip aprašyta anksčiau minėto metodo aprašymo 5.4 skirsnyje. Analizuojant chromatografo darbo sąlygos turi būti tokios, kad būtų galima atlikti sterolių analizę ir atskirti jų TMSE (trimetilsilileterius) nuo eritrodiolio ir uvaolio.

Išvirkštus bandinį, užrašymas tęsiamas, kol, išplovus sterolius, išplaunami eritrodiolis ir uvaolis. Tuomet identifikuojamos smailės (santykinės eritrodiolio ir uvaolio sulaikymo trukmės pagal β -sitosterolį yra atitinkamai apie 1,45 ir 1,55) ir nustatomas jų plotas, kaip tai daroma sterolių atveju.

6. **REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS**

$$\text{Eritrodiol io\%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \sum A_{\text{sterolių}}} \times 100,$$

kurioje:

A_1 = eritrodiolio smailės plotas ► **M6** ————— ◀;

A_2 = uvaolio smailės plotas ► **M6** ————— ◀;

$\Sigma A_{\text{sterolių}}$ = visų sterolių smailių plotas ► **M6** ————— ◀.

Rezultatas pateikiamas vieno ženklo po kablelio tikslumu.



VII PRIEDAS

ALIEJUS IR RIEBALUS SUDARANČIŲ TRIGLICERIDŲ 2-OJE PADĖ-
TYJE ESANČIŲ RIEBIŲJŲ RŪGŠČIŲ NUSTATYMAS

1. TIKSLAS

Šiame standarte aprašytas nustatymo metodas tos dalies aliejuose ir riebaluose esančių riebiųjų rūgščių, kurios esterifikuotos 2-oje (arba vidinėje) glicerolio padėtyje.

2. TAIKYMO SRITIS

Šis standartas dėl kasos lipazės veikimo ypatumų taikytinas aliejams ir riebalams, kurie lydosi žemesnėje nei 45 °C temperatūroje.

Jis netaikomas be išlygų aliejams ir riebalams, kuriuose yra dideli kiekiai: riebiųjų rūgščių su 12 arba mažiau anglies atomų (kokoso ir palmių kauliukų branduolių aliejus, pieno riebalai), ypatingai nesočiųjų riebiųjų rūgščių (su daugiau kaip keturiomis dvigubomis jungtimis), turinčių daugiau kaip 20 anglies atomų (žuvų ir jūros gyvūnų aliejai) arba riebiųjų rūgščių, turinčių kitokių nei karboksilo deguoninių grupių.

3. METODO ESMĖ

Gal būt reikalingas aliejuose ir riebaluose esančių rūgščių neutralizavimas tirpiklyje. Gryninimas leidžiant per kolonėlę su aliuminio oksidu. Dalinė tam tikros trukmės hidrolizė kasos lipaze. Susidariusių monogliceridų atskyrimas taikant plonasluoksne chromatografiją ir jų metanolizė. Gautų metilesterių analizė dujų-skysčių chromatografijos metodu.

4. APARATŪRA

- 4.1. 100 ml talpos apvaliadugnė kolba.
- 4.2. 25 ml talpos apvaliadugnė kolba su šlifo sujungimu.
- 4.3. 1 m ilgio oro kondensatorius, pritaikytas 4.2 kolbai.
- 4.4. 250 ml talpos kūginė kolba.
- 4.5. 50 ml talpos cheminė stiklinė.
- 4.6. 500 ml talpos dalijamasis piltuvas.
- 4.7. Chromatografinė stiklinė kolonėlė, kurios vidinis skersmuo 13 mm, ilgis 400 mm, su sukepinto stiklo disku ir čiaupu.
- 4.8. 10 ml centrifugavimo mėgintuvėlis su šlifo kamščiu.
- 4.9. 5 ml talpos biuretė, sugraduota 0,05 ml padalomis.
- 4.10. 1 ml poodinis švirkštas su plona adata.
- 4.11. Mikrošvirkštas 3–4 µl tūrio lašams dozuoti.
- 4.12. Įtaisas dengti plokštelę sorbentu plonasluoksnei chromatografijai.
- 4.13. Stiklinės plokštelės plonasluoksnei chromatografijai, 20 x 20 cm.
- 4.14. Stiklinis ryškinimo indas plonasluoksnei chromatografijai, su šlifo dangčiu, pritaikytas plokštelėms 20 x 20 cm.
- 4.15. Purkštuvas plonasluoksnei chromatografijai.
- 4.16. Džiovinimo spinta, nustatyta 103 ± 2 °C temperatūrai.
- 4.17. Termostatas, 0,5 °C tikslumu reguliuojamas 30–45 °C temperatūros intervale.
- 4.18. Sukamasis garintuvas.
- 4.19. Vibruojanti elektrinė purtyklė, kuria būtų galima stipriai kratyti centrifugavimo mėgintuvėlį.
- 4.20. Ultravioletinių spindulių lempa tirti plokštelėms plonasluoksne chromatografijoje.

Lipazės aktyvumui tikrinti:

- 4.21. pH-metras.
- 4.22. Spiralinis maišiklis.
- 4.23. 5 ml talpos biuretė.

▼B

4.24. Chronometras.

Jei reikia lipazę gaminti:

4.25. Laboratorinis maišytuvas, pritaikytas disperguoti ir maišyti nevienalytes medžiagas.

5. REAGENTAI

5.1. *n*-heksanas arba petroleteris (virimo temperatūra 30–50 °C), tinkamas chromatografijai.

5.2. 2-propanolis arba 95 % (v/v) etanolis, analiziškai grynas.

5.3. 2-propanolis arba etanolis 1/1 vandeninis tirpalas.

5.4. Dietileteris, be peroksidų.

5.5. Acetonas.

5.6. Skruzdžių rūgštis, ne mažiau kaip 98 % (m/m).

5.7. Ryškinimo tirpiklis: *n*-heksano (5.1), dietileterio (5.4) ir skruzdžių rūgšties (5.6) mišinys santykiu 70/30/1 (v/v/v).

5.8. Aktyvintas aliuminio oksidas chromatografijai, neutralus, *Brockmann I* rūšies.

5.9. Silikagelio milteliai su rišikliu, plonasluoksnei chromatografijai tinkamos kokybės.

5.10. Tinkamos kokybės kasos lipazė (1 ir 2 pastaba).

5.11. Natrio hidroksido 120 g/l vandeninis tirpalas.

5.12. Druskos rūgštis 6 mol/l vandeninis tirpalas.

5.13. Kalcio chlorido (CaCl₂) 220 g/l vandeninis tirpalas.

5.14. Natrio cholato (fermentų kokybės) 1 g/l vandeninis tirpalas.

5.15. Buferinis tirpalas: vandeninis 1 mol/l *tri*(hidroksimetil)aminometano tirpalas parūgštinamas iki pH 8 pripilant druskos rūgštis (5.12) (nustatoma potenciometriškai).

5.16. Fenolftaleino 10 g/l tirpalas 95 % (v/v) etanolyje.

5.17. 2',7'-dichlorfluoresceino 2 g/l tirpalas 95 % (v/v) etanolyje. Truputį pašarminamas, į 100 ml įlašinant lašą 1 N natrio hidroksido tirpalo.

Lipazės aktyvumui tikrinti:

5.18. Neutralizuotas aliejus.

5.19. Natrio hidroksido 0,1 M vandeninis tirpalas.

5.20. Natrio cholato (fermentų kokybės) 200 g/l vandeninis tirpalas.

5.21. Gumiarabiko 100 g/l vandeninis tirpalas.

6. BANDINIO RUOŠIMAS

Jei bandinio rūgštingumas, nustatytas pagal II priedą, mažesnis kaip 3 %, iš karto gryninama aliuminio oksidu pagal 6.2 punktą.

Jei bandinio rūgštingumas, nustatytas pagal II priedą, didesnis kaip 3 %, neutralizuojama tirpiklyje šarmu pagal 6.1 punktą, paskui gryninama aliuminio oksidu pagal 6.2 punktą.

6.1. Tirpiklyje ištirpinto bandinio neutralizavimas šarmu

Į dalijamąjį piltuvą (4.6) įpilama apie 10 g neapdoroto aliejaus, 100 ml heksano (5.1), 50 ml 2-propanolio (5.2), įlašinami keli lašai fenolftaleino tirpalo (5.16) ir įpilama natrio hidroksido tirpalo (5.11), kurio kiekis atitinka laisvųjų rūgščių kiekį, ir dar 0,3 % pertekliaus. Mišinys stipriai plakamas vieną minutę, įpilama 50 ml distiliuoto vandens, vėl plakama ir paliekama nusistovėti.

Sluoksniams atsiskyrus, apatinis muilo sluoksnis išpilamas. Taip pat išleidžiamas bet koks tarpinis sluoksnis (gleivės, netirpios medžiagos). Neutralizuoto aliejaus tirpalas heksane pakartotinai plaunamas 25–30 ml 2-propanolio tirpalo (5.3) porcijomis, kol pranyksta rožinė fenolftaleino spalva.

▼B

Didesnioji heksano dalis šalinama distiliuojant vakuume sukamajame garintuve (4.18), paskui vakuume 30–40 °C temperatūroje aliejus džiovinamas gryno azoto srovėje, kol heksanas visiškai pašalinamas.

6.2. Gryninimas, leidžiant per aliuminio oksidą

Paruošiama 15 g aktyvinto aliuminio oksido (5.8) suspensija 50 ml heksano (5.1) maišant supilama į chromatografinę kolonėlę (4.7). Aliuminio oksidui leidžiama vienodai nusėsti, tirpiklio išleidžiama tiek, kad jo aukštis virš absorbento būtų 1–2 mm. Į kolonėlę atsargiai supilama 5 g aliejaus tirpalo 25 ml heksano (5.1); visas iš kolonėlės ištekančias skystis surenkamas į apvaliadugnę kolbą (4.1).

7. Chromatografinių plokštelių ruošimas

Stiklinės plokštelės (4.13) kruopščiai nuplaunamos etanolio, petroleteriu ir acetonu, kad būtų pašalinami visi riebalų likučiai.

Į kūginę kolbą (4.4) įberiama 30 g silikagelio miltelių (5.9). Įpilama 60 ml distiliuoto vandens. Kolba užkemšama ir vieną minutę stipriai kratoma. Gauta tyrė greitai supilama į įtaisą plokštelėms dengti (4.12) ir švarios plokštelės padengiamos 0,25 mm storio sluoksniu.

Plokštelės 15 minučių džiovinamos ore, paskui valandą džiovinimo spintoje (4.16) 103 ± 2 °C temperatūroje. Prieš naudojant plokštelės ataušinamos iki kambario temperatūros eksikatoriuje.

Gatavų plokštelių galima nusipirkti.

8. DARBO EIGA

8.1. Hidrolizė kasos lipaze

Centrifugavimo mėgintuvėlyje (4.8) pasveriamas apie 0,1 g paruošto bandinio ir, jeigu bandinys yra skystas aliejus, iš karto daroma kaip nurodyta toliau.

Įdedama 20 mg lipazės (5.10) ir 2 ml buferinio tirpalo (5.15). Gerai, tačiau atsargiai suplakama ir įpilama 0,5 ml natrio cholato tirpalo (5.14) bei 0,2 ml kalcio chlorido tirpalo (5.13). Mėgintuvėlis uždaromas šlifo kamščiu, atsargiai (kad nesusivilgytų kamštis) pakratomas ir iš karto dedamas į termostatą (4.17), kuriame palaikoma $40 \pm 0,5$ °C temperatūra, ir lygiai vieną minutę kratomas ranka.

Mėgintuvėlis išimamas iš termostato ir lygiai dvi minutes stipriai kratomas ant elektrinės purtyklės (4.19).

Greitai ataušinama po tekančiu iš krano vandeniu; įpilama 1 ml druskos rūgšties (5.12) ir 1 ml dietileterio (5.4). Užkemšama ir stipriai maišoma ant elektrinės purtyklės. Paliekama nusistovėti ir organinis sluoksnius nusiurbiamas švirkštu (4.10), jei reikia, tai po centrifugavimo.

8.2. Monogliceridų atskyrimas plonasluoksnės chromatografijos metodu

Ekstraktas kiek įmanoma plonesnės, vienodo storio linijos pavidalu švirkštu (4.11) užlašinamas ant chromatografinės plokštelės, maždaug per 1,5 cm nuo jos apačios. Plokštelė dedama į gerai prisotintą ryškinimo indą (4.14) ir maždaug 20 °C temperatūroje ryškinama tirpikliu (5.7), kol iki plokštelės viršaus lieka 1 cm.

Plokštelė džiovinama ore esant tokiai pačiai temperatūrai, kokia buvo ryškinimo inde, ir apipurškiama 2',7'-dichlorfluoresceino tirpalu (5.17). Monoglicerido juosta (R_f apie 0,035) identifikuojama ultravioletinėje šviesoje (4.20).

8.3. Monogliceridų analizė dujų ir skysčių chromatografijos metodu

Pagal 8.2 punktą gautos juostos turinys nugrandomas mentele (reikia išvengti komponentų, likusių chromatogramos pradžioje, nuėmimo) ir supilamas į metilinimo kolbą (4.2).

Surinktas silikagelis tiesiogiai apdorojamas pagal X B priede aprašytus metodus, tik tiek pakeistus, kad monogliceridai paverčiami metilesteriais, paskui esteriai analizuojami dujų chromatografijos metodu, kaip aprašyta X A priede.

9. REZULTATŲ PATEIKIMAS

Riebiųjų rūgščių sudėtis 2-oje padėtyje apskaičiuojama vieno ženklo po kablelio tikslumu (3 pastaba).

▼ **B**

10. PASTABOS

1 pastaba. Lipazės aktyvumo tikrinimas

Tinkamame maišytuve, plakant mišinį, kurį sudaro 165 ml gumiarabiko tirpalo (5.21), 15 g smulkinto ledo ir 20 ml neutralizuoto aliejaus (5.18), ruošiama aliejaus emulsija.

I cheminę stiklinę (4.5) įpilama 10 ml šios emulsijos, paskui nurodyta tvarka 0,3 ml natrio cholato tirpalo (5.20) ir 20 ml distiliuoto vandens.

Cheminė stiklinė dedama į termostatą, kuriame palaikoma $37 \pm 0,5$ °C temperatūra (4 pastaba), į stiklinę įstatomi pH-metro elektrodai (4.21) ir spiralinis maišiklis (4.22).

Iš biuretės (4.23) lašinama natrio hidroksido tirpalo (5.19) tol, kol pH pasiekia 8,5.

Įpilamas pakankamas kiekis lipazės suspensijos (žr. toliau). Kai tik pH rodo 8,3, paleidžiamas chronometras (4.24) ir natrio hidroksido tirpalas (5.19) lašinamas tokiu greičiu, kad pH visą laiką būtų 8,3. Pasižymimas kas minutę sunaudoto natrio hidroksido tirpalo tūris.

Matavimai užrašomi grafiko pavidalu, abscisėje nurodant laiką, ordinatėje – sunaudoto natrio hidroksido tūrį, kurio reikia išlaikyti pastoviai pH vertei. Turi būti gauta tiesė.

Anksčiau minėta lipazės suspensija yra 1:1000 (m/m) suspensija vandenyje. Kiekviename tikrinime turi būti naudojama pakankamai šios suspensijos, t. y. tiek, kad per keturias penkias minutes būtų sunaudota maždaug 1 ml šarmo tirpalo. Paprastai reikia 1–5 mg miltelių.

Lipazės vienetas apibrėžiamas kaip fermento kiekis, kuris išskiria 10 mikroekvivalentų rūgšties per minutę. Taigi naudotų miltelių aktyvumas A, matuojamas lipazės vienetais miligramui lipazės, apskaičiuojamas pagal formulę:

$$A = \frac{V \times 10}{m},$$

kurioje V yra pagal grafiką apskaičiuotas per minutę sunaudoto natrio hidroksido tirpalo (5.19) tūris, m – bandymui paimtų miltelių masė miligramais.

2 pastaba. Lipazės ruošimas

Turinčios pakankamą aktyvumą lipazės galima pirkti. Tačiau taip pat galima jos pasigaminti laboratorijoje.

5 kg šviežios kiaulių kasos atšaldoma iki 0 °C, pašalinami aplinkui esantys kieti riebalai bei jungiamasis audinys ir sumalama, kad susidarytų pastos pavidalo skysta masė. Ši pasta keturias-šešias valandas maišoma maišikliu (4.25) kartu su 2,5 l absoliutaus 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.

Kad gauti milteliai būtų patvarūs, likutis 48 valandas džiovinamas vakuume. Milteliai turi būti laikomi šaldytuve.

3 pastaba. Kiekvienu atveju patartina nustatyti to paties bandinio bendrą riebiųjų rūgščių sudėtį, nes lyginimas su rūgščių 2-oje padėtyje sudėtimi padės interpretuoti gautus skaičius.*4 pastaba.* Hidrolizės temperatūra yra 37 °C, kadangi yra naudojamas skystas aliejus. Tačiau bandiniui ji nustatoma 40 °C, kad būtų galima tirti riebalus, kurių lydymosi temperatūra iki 45 °C.

▼B*IX PRIEDAS***SPEKTROFOTOMETRINIS TYRIMAS
SPEKTRO DALYJE ULTAVIOLETINĖJE****IŽANGA**

Spektrofotometrinis tyrimas ultravioletinėje spektro dalyje gali suteikti informacijos apie riebalų kokybę, jų išsilaikymo būklę ir technologinių procesų metu įvykusius pasikeitimus.

Absorbcija metode nurodytų bangų ilgių srityje vyksta dėl konjuguotų dienų ir trienų sistemų buvimo. Ši absorbcija reiškia savitosios ekstinkcijos $E_{1\%}^{1\text{ cm}}$ pavidalu (1 cm sluoksnio storio 1 % riebalų tirpalo tam tikrame tirpiklyje ekstinkcija), pagal susitarimą žymimos K raide (taip pat vadinamos „ekstinkcijos koeficientu“).

1. TIKSLAS

Metode aprašyta riebalų tyrimo ultravioletinėje spektro dalyje atlikimo metodika.

2. METODO ESMĖ

Analizuojami riebalai ištirpinami reikiamame tirpiklyje, paskui, esant nustatytam bangos ilgiui, matuojama šio tirpalo ekstinkcija, lyginant su grynu tirpikliu. Pagal spektrofotometrinius duomenis skaičiuojamos savitosios ekstinkcijos vertės.

3. APARATŪRA

- 3.1. Spektrofotometras ekstinkcijai ultravioletinėje spektro dalyje tarp 220 ir 360 nm matuoti su galimybe turėti nanometro eilės rodmenis.
- 3.2. Stačiakampės 1 cm storio kiuvetės iš kvarcinio stiklo, su dangčiais. Ekstinkcijos skirtumas tarp vandeniu arba kitu tinkamu tirpikliu užpildytų kiuvečių neturi būti didesnis kaip 0,01 ekstinkcijos vieneto.
- 3.3. 25 ml talpos matavimo kolbos.

▼M6

- 3.4. Chromatografinė kolonėlė, kurios viršutinės dalies ilgis 270 mm, skersmuo 35 mm, apatinės dalies ilgis 270 mm, skersmuo maždaug 10 mm.

▼B**4. REAGENTAI**

- 4.1. Spektrofotometriškai grynas izooktanas (2,2,4-trimetilpentanas). Pagal distiliuotą vandenį jo pralaidumas turi būti ne mažesnis kaip 60 %, esant 220 nm, ir ne mažesnis kaip 95 %, esant 250 nm, arba
— spektrofotometriškai grynas cikloheksanas: pagal distiliuotą vandenį jo pralaidumas turi būti ne mažesnis kaip 40 %, esant 220 nm, ir ne mažesnis kaip 95 %, esant 250 nm.

▼M6**▼B**

- 4.2. Bazinis aliuminio oksidas kolonėlinei chromatografijai, paruoštas ir tikrinamas kaip aprašyta I priedėlyje.
- 4.3. Chromatografijai tinkamas *n*-heksanas.
5. DARBO EIGA
- 5.1. Analizuojamas bandinys turi būti visiškai vienalytis ir be įtartinų priemaišų. Kambario temperatūroje skystas aliejus turi būti nufiltruotas per filtro popierių, esant maždaug 30 °C temperatūrai. Kieti riebalai turi būti homogenizuoti ir nufiltruoti, esant temperatūrai ne aukštesnei kaip 10 °C virš lydimosi temperatūros.
- 5.2. Apie 0,25 g taip paruošto bandinio tiksliai pasverama 25 ml matavimo kolboje, praskiedžiama iki žymės nurodytu tirpikliu ir sumaišoma. Gautas tirpalas turi būti visiškai skaidrus. Jei atsiranda opalescencija arba drums-tumas, reikia greitai nufiltruoti per filtro popierių.
- 5.3. Kiuvetė užpildoma gautu tirpalu ir, esant reikiamam bangos ilgiui tarp 232 ir 276 nm, matuojama tirpalo ekstinkcija, palyginimui naudojant tirpiklį.

▼ B

Gaunamos ekstinkcijos vertės turi būti 0,1–0,8 dydžių intervale. Jei taip nėra, matavimai turi būti pakartoti, naudojant kur reikia labiau praskiestus arba labiau koncentruotus tirpalus.

- 5.4. Kai reikia nustatyti savitąją ekstinkciją po apdorojimo aliuminio oksidu, daroma taip: 30 g bazinio aliuminio oksido suspensijos heksane supilama į chromatografinę kolonėlę. Absorbentui nusėdus, heksano perteklius išleidžiamas maždaug iki 1 cm lygio virš aliuminio oksido sluoksnio viršaus.

10 g riebalų, homogenizuotų ir nufiltruotų kaip aprašyta 5.1 punkte, tirpinama 100 ml heksano ir tirpalas supilamas į kolonėlę. Eliuatas surenkamas, visas tirpiklis išgarinamas vakuume, esant žemesnei kaip 25 °C temperatūrai.

Su taip gautais riebalais iš karto daroma kaip nurodyta 5.2 punkte.

6. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

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

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s},$$

kurioje:

K_{λ} = savitoji ekstinkcija, esant bangos ilgiui λ ;

E_{λ} = ekstinkcija, išmatuota esant bangos ilgiui λ ;

c = tirpalo koncentracija g/100 ml;

s = kiuvetės storis, cm.

Rezultatai turi būti pateikiami dviejų ženklų po kablelio tikslumu.

- 6.2. Atliekant spektrofotometrinę alyvuogių aliejaus analizę pagal oficialų metodą, aprašytą EEB reglamentuose, savitąją ekstinkciją nurodyta matuoti izooktano tirpale, esant 232 ir 270 nm bangos ilgiams, ir nustatyti ΔK , kuris apibrėžiamas lygtimi:

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

kurioje K_m yra savitoji ekstinkcija esant bangos ilgiui m . Tai didžiausios absorbcijos 270 nm srityje bangos ilgis.

*I PRIEDĖLIS**Aluminio oksido ruošimas ir jo aktyvumo tikrinimas*

A.1.1. Aluminio oksido ruošimas

Aluminio oksidas, prieš tai krosnyje džiovintas tris valandas 380–400 °C temperatūroje, supilamas į hermetiškai uždaramą indą, įpilama distiliuoto vandens, santykiu 5 ml vandens 100 g aliuminio oksido, indas tuojau pat uždaromas, kelis kartus pakratomas ir prieš naudojant paliekamas stovėti mažiausiai 12 valandų.

A.1.2. Aluminio oksido aktyvumo tikrinimas

Paruošiama chromatografinė kolonėlė su 30 g aliuminio oksido. Pagal 5.4 punkte pateiktą aprašymą, per kolonėlę leidžiamas mišinys, sudarytas iš:

- 95 % pirmo spaudimo alyvuogių aliejaus, kurio savitoji ekstinkcija, esant bangos ilgiui 268 nm, mažesnė kaip 0,18,
- 5 % gryninimo procese diatomitu apdoroto žemės riešutų aliejaus, kurio savitoji ekstinkcija, esant bangos ilgiui 268 nm,

ne mažesnė kaip 4.

Jei, mišiniui praėjus per kolonėlę, jo savitoji ekstinkcija, esant bangos ilgiui 268 nm, yra didesnė kaip 0,11, aliuminio oksidas tinkamas naudoti, jei ne – jame reikia sumažinti vandens kiekį.



II PRIEDĖLIS

Spektrofotometro kalibravimas

- A.2. Po tam tikro laiko tarpo (ne rečiau kaip kas šeši mėnesiai) turi būti tikrinamos prietaiso bangos ilgio ir tikslumo savybės.
- A.2.1. Bangos ilgis gali būti tikrinamas, naudojant gyvsidabrio garų lempą arba atitinkamus filtrus.
- A.2.2. Norint patikrinti fotocelės ir fotodaugintuvo veikimą, daroma taip: pasverama 0,2000 g spektrofotometriškai gryno kalio chromato, ištirpinama 1 000 ml talpos matavimo kolboje 0,05 N kaliohidroksido tirpale ir praskiedžiama iki žymės. Paimama lygiai 25 ml gauto tirpalo ir tuo pačiu kalio hidroksido tirpalu 500 ml talpos matavimo kolboje praskiedžiama iki žymės.

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



X A PRIEDAS

RIEBIŲJŲ RŪGŠČIŲ METILESTERIŲ ANALIZĖ DUJŲ CHROMATO- GRAFIJOS METODU

1. TIKSLAS

Šiame metode aprašyti bendri nurodymai, kaip taikyti dujų chromatografiją su užpildomomis arba kapiliarinėmis kolonėlėmis, nustatant pagal X B priede nurodytą metodą gautų riebiųjų rūgščių metilesterių kokybinę ir kiekybinę sudėtį.

Metodas netinka polimerizuotoms riebiosioms rūgštims.

2. REAGENTAI

2.1. Dujos nešiklis

Inertinės dujos (azotas, helis, argonas, vandenilis ir t. t.), visiškai išdžiovintos, turinčios mažiau kaip 10 mg/kg deguonies.

1 pastaba. Vandenilis, kuris kaip dujos nešiklis naudojamas tik kapiliarinėse kolonėlėse, gali du kartus padidinti analizės greitį, tačiau yra pavojingas. Galima pirkti 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.

2.3. Palyginamasis etalonas

Grynų riebiųjų rūgščių metilesterių mišinys arba žinomos sudėties riebalų, geriausiai tokių, kurie yra panašūs į analizuojamą riebalinę medžiagą, metilesteriai.

Reikia imtis atsargumo priemonių, kad būtų išvengta nesočiųjų riebiųjų rūgščių su dideliu dvigubų jungčių skaičiumi oksidacijos.

3. APARATŪRA

Pateikiamuose nurodymuose kalbama apie įprastą įrangą, kuri naudojama dujų chromatografijoje, turinčią užpildomas ir (arba) kapiliarines kolonėles ir dujų jonizacinį detektorių. Tinka bet koks prietaisas, kuriuo gaunamas 4.1.2 punkte nurodytas efektyvumas ir atskiriamoji galia.

3.1. Dujų chromatografas

Dujų chromatografą sudaro:

3.1.1. Įpurškimo įtaisas

Įpurškimo įtaisas naudojamas:

- a) su užpildytomis kolonėlėmis, turinčiomis kuo mažesnę nenaudingą tūrį (šiuo atveju įpurškimo įtaisą būtų galima kaitinti iki temperatūros, 20–50 °C aukštesnės nei kolonėlės temperatūra); arba
- b) su kapiliarinėmis kolonėlėmis, kurių atveju įpurškimo įtaisas kuriamas specialiai darbui su jomis. Jis gali būti su bandinio dozatoriumi arba tiesioginio kolonėlės inžektoriaus tipo be bandinio padalinimo.

2 pastaba. Kai nėra mažiau kaip 16 atomų turinčių riebiųjų rūgščių, galima naudoti išimamą adatinį inžektorių.

3.1.2. Krosnis

Krosnis turi įkaitinti kolonėlę bent iki 260 °C ir pasirinktą temperatūrą užpildomose kolonėlėse palaikyti 1 °C tikslumu, kapiliarinėse kolonėlėse – 0,1 °C tikslumu. Pastarasis reikalavimas ypač svarbus, kai naudojamas lydyto kvarco vamzdis.

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

3.1.3. Užpildoma kolonėlė

3.1.3.1. Kolonėlė pagaminta iš medžiagų, inertiškų analizuojamiems junginiams (t. y. iš stiklo arba nerūdijančio plieno), kurios matmenys tokie:

▼B

a) ilgis: 1–3 m. Kai yra riebiųjų rūgščių su ilga anglies atomų grandine (ilgesne nei C_{20}), turi būti naudojama palyginus trumpa kolonėlė. Kai analizuojamos rūgštys su 4–6 anglies atomais, rekomenduojama naudoti 2 m ilgio kolonėlę;

b) vidinis skersmuo: 2–4 mm.

3 *pastaba*. Jei yra nesočiųjų junginių su daugiau kaip trimis dvigubomis jungtimis, jie kolonėlėje iš nerūdijančio plieno gali suskilti.

4 *pastaba*. Gali būti naudojama sistema su dviem užpildomomis kolonėlėmis.

3.1.3.2. Užpildymas, susidedantis iš tokių elementų:

a) *kieto nešiklio*: rūgštyje plauto ir silanizuoto diatomito arba kito tinkamo inertiško kieto nešiklio su siauru grūdėtumo intervalu (25 μ m intervalas 125–200 μ m dalelių dydžio ribose), vidutiniam grūdėliui dydžiui esant susietam su kolonėlės vidiniu skersmeniu ir ilgiu;

a) *nejudančiosios fazės*: poliško poliesterių tipo skysčio (pvz., dietilenglikolio polisukcinato, butandiolio polisukcinato, etilenglikolio poliadipato ir t. t.), cianpolisiloksanų arba kurio nors kito skysčio, užtikrinančio reikiamą chromatografinį atskyrimą (žr. 4 punktą). Nejudančioji fazė turi sudaryti 5–20 % (m/m) užpildymo masės. Kai kuriems atskyrimams galima naudoti nepolišką nejudančiąją fazę.

3.1.3.3. Kolonėlės kondicionavimas

Kolonėlei esant atjungtai, jei tai įmanoma, nuo detektoriaus, krosnis laipsniškai kaitinama iki 185 °C ir, esant šiai temperatūrai, per iš naujo užpildytą kolonėlę bent 16 valandų 20–60 ml/min. greičiu leidžiama inertinių dujų srovė, vėliau dar dvi valandas, temperatūrą pakėlus iki 195 °C.

3.1.4. Kapiliarinė kolonėlė

3.1.4.1. Vamzdis pagamintas iš medžiagos, inertiškos analizuojamoms medžiagoms (paprastai stiklinio arba lydyto kvarco). Vidinis skersmuo yra 0,2–0,8 mm. Prieš padengiant nejudančiąją fazę, vidinis paviršius atitinkamai apdorojamas (pvz., paviršius paruošiamas, inaktyvinamas). Daugeliu atvejų užtenka 25 mm ilgio vamzdžio.

3.1.4.2. Nejudančioji fazė paprastai yra poliglikolių tipo (polietilenglikolis 20 000), poliesteris (butandiolio polisukcinatas) arba poliškas polisiloksanas (ciansiloksanai). Tinka kolonėlės su susiūtos struktūros (erdvinės struktūros) fazė.

5 *pastaba*. Poliškų polisiloksanų atvejų gali būti sunkiau identifikuoti ir atskirti linoleno rūgštį bei C_{20} rūgštis.

Dangos turi būti plonos, t. y. 0,1–0,2 μ m.

3.1.4.3. Kolonėlės surinkimas ir kondicionavimas

Surenkant kapiliarines kolonėles, laikomasi įprastų atsargumo priemonių, t. y. kolonėlės įstatymas į krosnį (tvirtinimas), sujungimų pasirinkimas ir darymas (sandarumas), kolonėlės galų jungimas su inžektoriumi ir detektoriumi (nenaudingų tūrių sumažinimas). Prie kolonėlės prijungiamos dujos nešiklis (pvz., 0,3 barų (30 kPa) slėgio, kai naudojama 25 mm ilgio ir 0,3 mm vidinio skersmens kolonėlė).

Kolonėlė kondicionuojama programuojant krosnies temperatūros kilimą 3 °C/min. greičiu nuo kambario temperatūros iki 10 °C mažesnės už nejudančiosios fazės skilimo temperatūrą. Krosnis šioje temperatūroje laikoma vieną valandą, kol nusistovi pagrindo linija. Paskui temperatūra darbiui izoterminėmis sąlygomis sumažinama iki 180 °C.

6 *pastaba*. Tinkamai iš anksto kondicionuotų kolonėlių galima pirkti.

3.1.5. Detektorius, geriausiai toks, kurį galima būtų kaitinti iki temperatūros, aukštesnės nei kolonėlės temperatūra.

3.2. Švirkštas

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

3.3. Savirašis

Jei savirašio brėžiama kreivė bus naudojama analizuojamo mišinio sudėčiai apskaičiuoti, reikalingas elektroninis didelio tikslumo savirašis, suderinamas su naudojamu prietaisu. Savirašio savybės turi būti tokios:

▼B

- a) inertiškumas turi būti mažesnis kaip 1,5 s, geriausiai 1 s (inertiškumas matuojamas laiku, kurį rašanti plunksna sugaišta pakildama nuo 0 iki 90 %, kai staigiai paduodamas 100 % signalas);
- b) popieriaus plotis ne mažesnis kaip 20 cm;
- c) popieriaus greitis reguliuojamas 0,4–2,5 cm/min intervale.

3.4. Integratorius

Greitai ir tiksliai apskaičiuoti galima elektroniniu integratoriumi. Jis turi reikiamo jautrumo linijinį atsaką, bei turi patenkinamai atlikti korekciją dėl pagrindo linijos dreifo.

4. DARBO EIGA

4.1–4.3 punktuose aprašytuose veiksmuose naudojama įranga su liepsnos jonizaciniu detektoriumi.

Kaip alternatyva gali būti naudojamas dujų chromatografas su katarometru (veikiančiu šilumos laidumo pokyčio matavimo principu). Tuo atveju darbo sąlygos keičiasi, kaip tai aprašyta 6 punkte.

4.1. Analizės sąlygos

4.1.1. Optimalių darbo sąlygų pasirinkimas

4.1.1.1. Užpildoma kolonėlė

Renkantis analizės sąlygas, atsižvelgiama į šiuos kintamus parametrus:

- a) kolonėlės ilgis ir skersmuo;
- b) nejudančiosios fazės pobūdis ir kiekis;
- c) kolonėlės temperatūra;
- d) dujų nešiklio srauto greitis;
- e) reikalinga atskiriamaoji galia;
- f) analizuojamos bandinio dalies dydis, parinktas taip, kad detektoriaus ir elektrometro derinio atsakas būtų tiesinis;
- g) analizės trukmė.

Dažniausiai 1 ir 2 lentelėje pateiktos vertės duoda norimus rezultatus, t. y. ne mažiau kaip 2 000 teorinių lėkščių vienam kolonėlės ilgio metrui metilsteirato atveju ir jo išplovimas įvyksta maždaug per 15 minučių.

Kai aparatūra tai leidžia, inžektoriaus temperatūra turi būti apie 200 °C, o detektoriaus temperatūra lygi kolonėlės temperatūrai arba didesnė.

Paprastai liepsnos jonizaciniam detektoriumi tiekiamo vandenilio ir dujų nešiklio srauto greičių santykis yra nuo 1:2 iki 1:1, priklausomai nuo kolonėlės skersmens. Deguonies srauto greitis maždaug 5–10 kartų didesnis už vandenilio.

1 lentelė

Kolonėlės vidinis skersmuo, mm	Dujų nešiklio srauto greitis, ml/min.
2	15–25
3	20–40
4	40–60

2 lentelė

Nejudančiosios fazės koncentracija, % (m/m)	Kolonėlės temperatūra, °C
5	175
10	180
15	185
20	185

▼ B

4.1.1.1. Kapiliarinė kolonėlė

Kapiliarinių kolonėlių efektyvumo ir pralaidumo savybės reiškia, kad komponentų atskyrimas ir analizės trukmė labai priklauso nuo dujų nešiklio srauto kolonėlėje greičio. Todėl, optimizuojant darbo sąlygas, būtina veikti šį parametą (arba, paprasčiau, slėgio kritimą kolonėlėje), priklausomai nuo to, ar norima pagerinti atskyrimą, ar pagreikinti analizę.

4.1.2. Teorinių lėkščių (efektyvumo) ir atskiriamosios galios nustatymas (žr. 1 brėžinį)

Atliekama maždaug lygiais kiekiais paimtų metilstearto ir metiloleato mišinio analizė (pvz., kakao aliejaus metilesterių analizė).

Kolonėlės temperatūra ir dujų nešiklio srauto greitis pasirenkami tokie, kad metilstearto smailė užrašoma praėjus maždaug 15 minučių po tirpiklio smailės užrašymo. Naudojamas pakankamas metilesterių kiekis, kad metilstearto smailė būtų per tris ketvirčius visos skalės aukščio.

Teorinių lėkščių skaičius n (efektyvumas) apskaičiuojamas pagal formulę:

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

ir atskiriamoji galia, R , apskaičiuojama pagal formulę:

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

kuriose:

- dr_1 yra sulaikymo atstumas nuo chromatogramos pradžios iki metilstearto smailės viršūnės, milimetrais;
- ω_1 ir ω_2 yra atitinkamai metilstearto ir metiloleato smailių pločiai, išmatuoti tarp kreivių perlinkio liečiamųjų susikirtimo su pagrindo linija taškų, milimetrais;
- Δ yra atstumas tarp metilstearto ir metiloleato smailių viršūnių, milimetrais;

▼ M2

ir atskiriamosios galios koeficientas I_r , taikant formulę

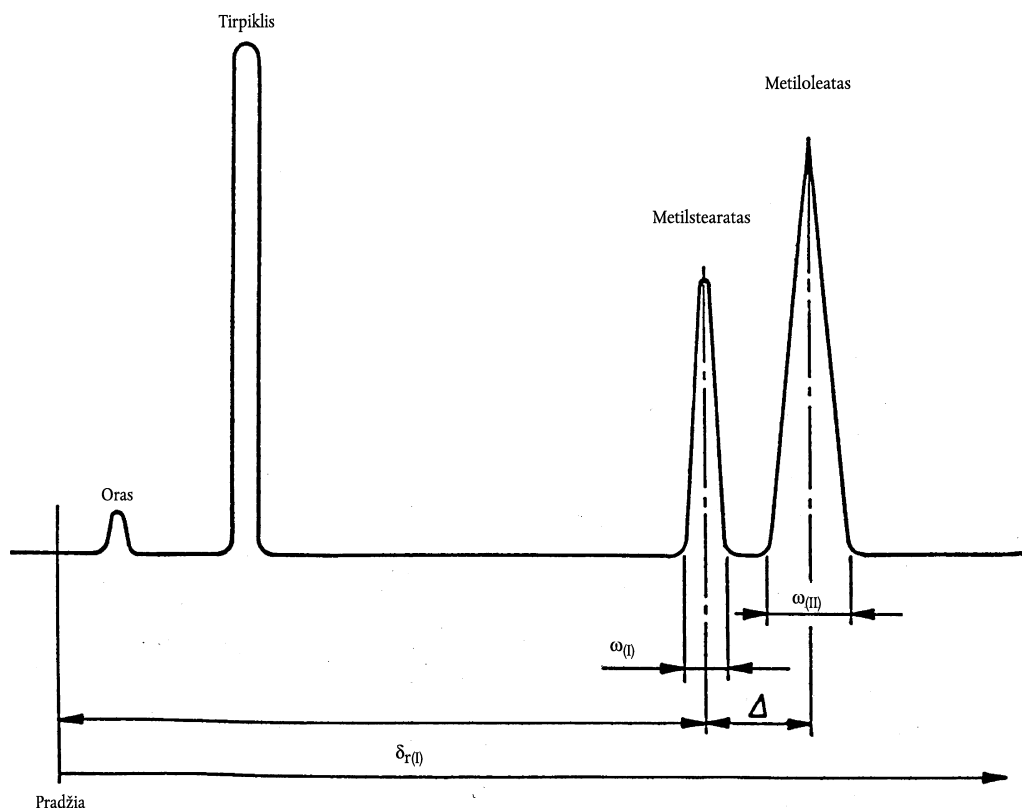
$$\frac{a}{b},$$

kurioje:

- a = nuo pagrindo linijos išmatuotos žemiausios smailės aukštis;
- b = žemiausio taško tarp dviejų gretimų smailių atstumas išmatuotas nuo pagrindo linijos.

▼ **B****1 brėžinys**

Chromatograma teoriniam lėkščių skaičiui (efektyvumui) ir atskiriamajai galiai nustatyti



Reikia pasirinkti tokias darbo sąlygas, kurios leistų analizuojant metilsteartatą turėti bent 2000 teorinių lėkščių vienam kolonėlės ilgio metrui ir ne mažesnę kaip 1,25 atskiriamąją galią.

4.2. Analizei imama bandinio dalis

Mikrošvirkštą (3.2) paimama 0,1–2 μl pagal X B priedą paruoštą metilsteartatą ir išvirkščinama į kolonėlę.

Kai esteriai neištirpinti, ruošiamas jų maždaug 100 mg/ml koncentracijos tirpalas chromatografiškai gryname heptane, ir išvirkščinama 0,1–1 ml šio tirpalo.

Jei analizuojamų komponentų yra tik pėdsakai, analizuojama bandinio dalis gali būti padidinta (iki 10 kartų).

4.3. Analizė

Paprastai naudojamos 4.1.1 punkte apibrėžtos darbo sąlygos.

Tačiau kolonėlė gali dirbti žemesnėje temperatūroje, kai reikia analizuoti riebiąsias rūgštis su mažiau kaip 12 anglies atomų, arba aukštesnėje temperatūroje, kai analizuojamos riebiosios rūgštys su daugiau kaip 20 anglies atomų. Kartais abiem šiais atvejais galima naudoti temperatūros programavimą. Pavyzdžiui, jei bandinį sudaro mažiau nei 12 anglies atomų turinčių riebiųjų rūgščių metilsteriai, bandinys išvirkščiamas 100 °C temperatūroje (arba 50–60 °C, jei yra sviesto rūgšties) ir iš karto temperatūra 4–8 °C/min. greičiu keliama iki optimalios. Kai kuriais atvejais abi metodikos gali būti naudojamos kartu.

Po programuojamo temperatūros pakėlimo, išplovimas tęsiamas pastovioje temperatūroje, kol išplaunami visi komponentai. Jei prietaisas neturi programuoto kaitinimo, jis naudojamas esant dviem fiksuotoms temperatūroms tarp 100 ir 195 °C.

Prireikus patikrinti, ar nėra paslėptų smailių, pvz., kartu esant konjuguotiems

$C_{18:3}$ ir $C_{20:0}$ arba $C_{18:3}$ ir $C_{18:2}$ junginiams, rekomenduojama analizę atlikti su dviem nejudančiomis fazėmis, turinčiomis skirtingą poliškumą.

▼ B

4.4. Etaloninės chromatogramos ir etaloninių grafikų ruošimas

Tomis pačiomis sąlygomis, kurios naudojamos bandiniui analizuoti, analizuojamas etaloninis mišinys (2.3), išmatuojamos mišinį sudarančių riebiųjų rūgščių sulaikymo trukmės arba sulaikymo atstumai. Kiekvienam nesotumo laipsniui pusiau logaritminiame popieriuje braižomas sulaikymo trukmės arba atstumo logaritmo priklausomybės nuo anglies atomų skaičiaus grafikas. Pastovios temperatūros sąlygomis linijinės grandinės rūgščių su tuo pačiu nesotumo laipsniu grafikai turi būti tiesės. Šios tiesės turi būti daugiau arba mažiau lygiagrečios.

Būtina išvengti sąlygų, kuriomis galėtų atsirasti „paslėptų smailių“, t. y. kai atskiriamoji galia yra nepakankama dviems komponentams atskirti.

5. REZULTATŲ APSKAIČIAVIMAS

5.1. Kokybinė analizė

Iš grafikų, gautų pagal 4.4 punktą, identifikuojamos bandinio metilesterių smailės, prireikus taikant interpoliaciją.

5.2. Kiekybinė analizė

5.2.1. Sudėties nustatymas

Išskyrus ypatingus atvejus, naudojamas vidinio normalizavimo metodas, t. y. daroma prielaida, kad chromatogramoje yra visi bandinio komponentai, todėl bendras smailių plotas atstovauja 100 % visų išplautų komponentų.

Jei įranga turi integratorių, naudojami juo gauti skaičiai. Jei integratoriaus nėra, kiekvienos smailės plotas apskaičiuojamas, padauginant jos aukštį iš pusaukščio pločio, kur reikia atsižvelgiant į užrašymo metu naudotus skirtingus signalo silpninimo laipsnius.

5.2.2. Apskaičiavimo metodas

5.2.2.1. Bendras atvejis

Duoto komponento i kiekis, reiškiamas metilesterių masės procentine dalimi, apskaičiuojamas nustatant procentinę atitinkamos smailės ploto dalį visų smailių plote pagal formulę:

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

kurioje:

A_i yra i komponentą atitinkančios smailės plotas;

$\sum A$ yra visų smailių plotų suma.

Rezultatas pateikiamas vieno ženklo po kablelio tikslumu.

7 pastaba. Šiuo bendru atveju laikoma, kad apskaičiavimų, kurie remiasi santykiniais plotais, rezultatas reiškia masės procentinę dalį. Apie atvejus, kuriems ši prielaida netaikytina, žr. 5.2.2.2 punkte.

5.2.2.2. Korekcijos koeficientų naudojimas

Kai kuriais atvejais, pvz., esant riebiosioms rūgštims, turinčioms mažiau kaip aštuonis anglies atomus, arba rūgštims su kitomis funkcinėmis grupėmis, kai naudojami šilumos laidumo detektoriai arba kai yra svarbu didesnis tikslumas, procentinei smailių ploto daliai paversti masės procentine dalimi turi būti naudojami korekcijos koeficientai.

Korekcijos koeficientai nustatomi pasinaudojant chromatogramomis, gautomis analizuojant žinomos sudėties metilesterių etaloninį mišinį sąlygomis, atitinkančiomis bandinio analizės sąlygas.

Šiam etaloniniam mišiniui i komponento masės dalis apskaičiuojama pagal formulę:

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

kurioje:

m_i yra etaloninio mišinio i komponento masė;

$\sum m$ yra įvairių etaloninio mišinio komponentų masių suma.

Pagal etaloninio mišinio chromatogramą (4.4) i komponento ploto procentinė dalis apskaičiuojama taikant formulę:

▼ B

$$\frac{A_i}{\sum A},$$

kurioje:

A_i yra i komponentą atitinkančios smailės plotas;

$\sum A$ yra visų smailių plotų suma.

Tokiu būdu korekcijos koeficientas apskaičiuojamas pagal formulę:

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

Paprastai skaičiuojamas korekcijos koeficientų santykis su K_{C16} , todėl santykiniai koeficientai atrodo taip:

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

Bandiniui kiekvienos i sudėtinės dalies kiekis, skaičiuojant metilesterių masės procentais, yra lygus:

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

Rezultatai pateikiami vieno ženklo po kablelio tikslumu.

5.2.2.3. Vidinio etalono naudojimas

Kai kurių analizių atvejų (pvz., kai skaičiavimuose naudojamos ne visos rūgštys, pvz., kai neskaičiuojamos kartu su 16 ir 18 anglies atomų turinčiomis rūgštimis esančios keturis ir šešis anglies atomus turinčios rūgštys, arba kai būtina nustatyti absoliutų riebiųjų rūgščių kiekį bandinyje) būtina naudoti vidinį etaloną. Dažnai naudojamos riebiųjų rūgštys su penkiais, 15 arba 17 anglies atomų. Vidiniam etalonui turi būti nustatytas korekcijos koeficientas (jei toks naudojamas).

Procentinė i komponento masės dalis, skaičiuojant metilesteriais, nustatoma pagal formulę:

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

kurioje:

A_i yra i -ąją sudėtinę dalį atitinkančios smailės plotas;

A_s yra vidinį etaloną atitinkančios smailės plotas;

K'_i yra i -osios sudėtinės dalies santykinis korekcijos koeficientas pagal K_{C16} ;

K'_s yra vidinio etalono santykinis korekcijos koeficientas pagal K_{C16} ;

m yra analizuojamos bandinio dalies masė, miligramais;

m_s yra vidinio etalono dalies masė, miligramais.

Rezultatai pateikiami vieno ženklo po kablelio tikslumu.

▼ M2

6. ATSKIRAS ATVEJIS – TRANS-IZOMERŲ NUSTATYMAS

Galima nustatyti riebiųjų rūgščių, turinčių 10–24 anglies atomus, *trans*-izomerų kiekį, jų metilo esteriams atskirti naudojant dujų chromatografinės kapiliarinės kolonėlės su tam tikru poliškumu.

- 6.1. Kvarcinė kapiliarinė kolonėlė, kurios vidinis skersmuo 0,25–0,32 mm, ilgis 50 m, padengta 0,1–0,3 μ m storio cianpropilsiloksano plėvele (tipas SP 2380, C.P. sil. 88, *silor 10* ir panašaus tipo).
- 6.2. Metilesteriai gaminami, taikant X B priede nurodytą metodiką. Atsargumo dėlei riebalinės medžiagos, kuriose laisvų rūgščių kiekis didesnis kaip 3 %, turi būti neutralizuojamos pagal VII priedo 6.1 punktą.
- 6.3. Darbinės sąlygos dujų chromatografijoje bendru atveju yra tokios:
 - kolonėlės temperatūra nustatoma tarp 150 °C ir 230 °C (pvz., 165 °C 15 minučių, toliau didinama 5 °C per minutę iki 200 °C),
 - inžektoriaus temperatūra: 250 °C, naudojant bandinio dozavimo įtaisą, arba kolonėlės pradinę temperatūrą, jei naudojamas tiesioginio įpurškimo įtaisas,

▼ **M2**

— detektoriaus temperatūra: 260 °C,

— dujų nešiklio srauto greitis (helio arba vandenilio): 1,2 ml per minutę.

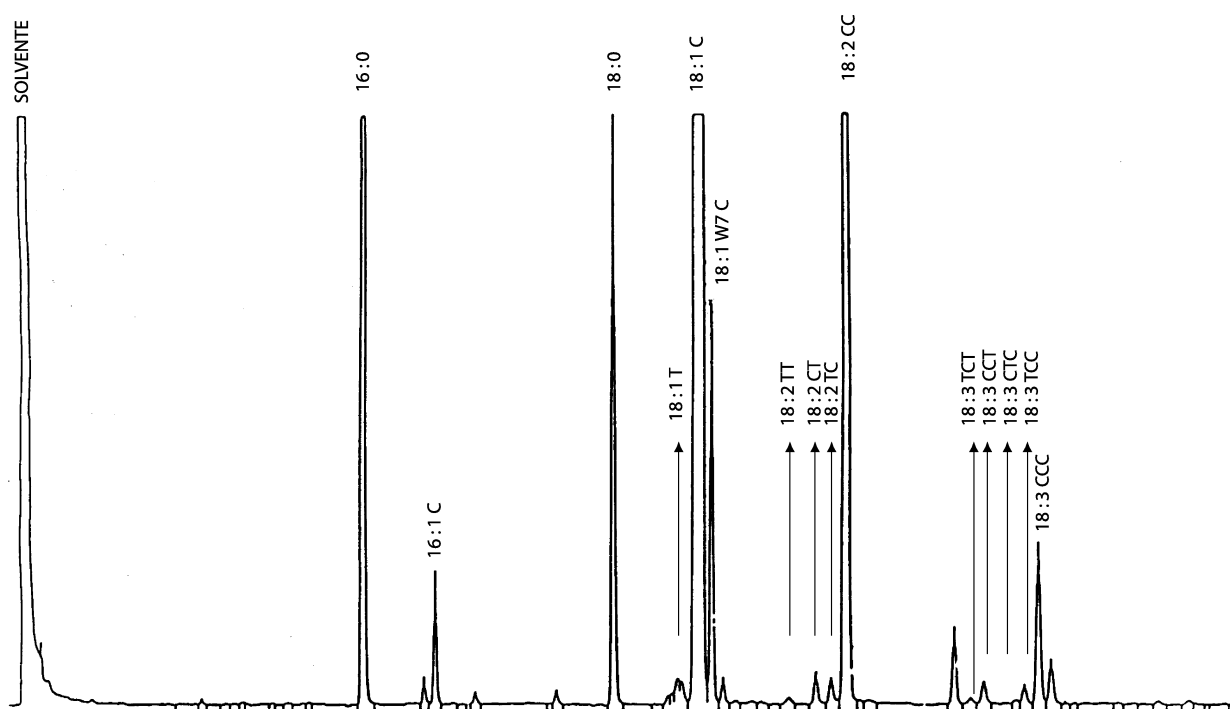
Bandinio turi būti įpurškiama tiek, kad naudojamo jautrumo sąlygomis eikozano rūgšties metilo esterį atitinkančios smailės aukštis sudarytų 20 % visos skalės arba daugiau.

- 6.4. Įvairių metilesterių identifikavimas atliekamas pagal sulaikymo trukmes, kurios lyginamos su etaloninių mišinių sulaikymo trukmėmis (kaip pažymėta 2.3 punkte).

Trans-riebiųjų rūgščių esteriai išplaunami anksčiau kaip jų atitinkami *cis*-izomerai. Chromatogramos pavyzdys pateiktas 2 brėžinyje.

2 brėžinys

Riebiųjų rūgščių *trans*-izomerų dujų chromatograma, naudojant kapiliarinę kolonėlę



- 6.5. Kolonėlės efektyvumas, nustatytas pagal 4.1.2 punktą, turi būti toks, kad būtų galima atskirti kai kurias visiškai greta esančias poras, pvz., grupės *trans*-izooleino rūgščių ir oleino rūgšties smailės sudarytą porą, *trans* C18: 1/*cis* C18: 1, esant atskiriamosios galios koeficientui didesniau kaip 2.
- 6.6. Įvairių *trans*-riebiųjų rūgščių procentinis kiekis apskaičiuojamas, remiantis atitinkamos smailės ploto ir visų turimų smailių plotų sumos santykiu.

Atsižvelgiama į procentinį kiekį:

- *trans*-oktadeceno rūgščių (T 18: 1), kuris šio reglamento I priede pažymėtas kaip *trans*-oleino izomerų bendras kiekis,
- *cis-trans* ir *trans-cis* oktadekadieno rūgščių [(CT/TC) 18: 2], kuris šio reglamento I priede pažymėtas kaip *trans*-linoleinų izomerų bendras kiekis,
- *trans-cis-trans*, *cis-cis-trans*, *cis-trans-cis*, *trans-cis-cis* oktadekatrieno rūgščių [(TCT + CCT + CTC + TCC) 18: 3], kuris šio reglamento I priede pažymėtas kaip *trans*-linoleinų izomerų

bendras kiekis.

8 pastaba. Atsižvelgiant į šio metodo ypatingas charakteristikas, prašome rezultatus pateikti 2 skaitmenų po kablelio tikslumu.

▼ **B**► **M2** 7. ◀ **ATSKIRAS ATVEJIS – KATAROMETRINIO DETEKTORIAUS (VEIKIANČIO ŠILUMOS LAIDUMO KITIMO PRINCIPU) NAUDOJIMAS**

Riebiųjų rūgščių metilesterių kokybinei ir kiekybinei sudėčiai nustatyti taip pat gali būti naudojamas dujų chromatografas, naudojantis detektoriu, veikiantį šilumos laidumo kitimo principu (katarometrą). Jei naudojamas katarometras, 3 ir 4 punkte nurodytos sąlygos turi būti pakeistos, kaip parodyta 3 lentelėje.

Kiekybinėje analizėje naudojami 5.2.2.2 punkte apibrėžti korekcijos koeficientai.

3 lentelė

Kintamasis	Parametro vertė
Kolonėlė	Ilgis: 2–4 m Vidinis skersmuo: 4 mm
Kietas nešiklis	Grūdelių dydis 160–200 µm
Nejudančiosios fazės koncentracija	15–25 % (m/m)
Dujos nešiklis	Helis arba, jo neturint, vandenilis su kiek galima mažesniu deguonies kiekiu
Pagalbinės dujos	Nereikia
Inžektoriaus temperatūra	40–60 °C aukštesnė nei kolonėlės
Kolonėlės temperatūra	180–200 °C
Dujų nešiklio srauto greitis	Paprastai 60–80 ml/min.
Įpurškiamos bandinio dalies dydis	Paprastai 0,5–2 µl

► **M2** 8. ◀ **ANALIZĖS ATASKAITA**

Analizės ataskaitoje nurodomi metilesterių gamyboje ir dujų chromatografinėje analizėje naudoti metodai ir gauti rezultatai. Joje taip pat nurodomos visos darbo detalės, neapibrėžtos šiame tarptautiniame standarte, arba laikomos pasirinktinėmis, kartu nurodant bet kokių atsitikimų, galėjusių turėti įtakos rezultatams, aplinkybes.

Analizės ataskaitoje nurodoma išsami visiškam bandinio identifikavimui reikalinga informacija.

▼ **M19***ANNEX X B***PREPARATION OF THE FATTY ACID METHYL ESTERS FROM OLIVE OIL AND OLIVE-POMACE OIL**

The following two methods are recommended for preparing the fatty acid methyl esters from olive oils and olive-pomace oils:

Method A: Trans-esterification with cold methanolic solution of potassium hydroxide

Method B: Methylation by heating with sodium methylate in methanol followed by esterification in acid medium.

Each method will be applied according to the analytical parameter to be determined and the oil category as indicated below:

- (a) determination of difference between actual and theoretical content of triglycerides with ECN42 (Δ ECN42):
 - method A will be applied to samples of all the oil categories after purification of the oil by passing it through a silica gel column;
- (b) determination of the fatty acid composition:
 - method A will be applied directly to samples of the following oil categories:
 - virgin olive oils with an acidity of less than 3,3 %,
 - refined olive oil,
 - olive oil (blend of virgin olive oils and refined olive oil),
 - refined olive-pomace oil,
 - olive-pomace oil (blend of virgin olive oils and refined olive-pomace oil);
 - method B will be applied directly to samples of the following oil categories:
 - virgin olive oil with an acidity of more than 3,3 %,
 - crude olive-pomace oil;
- (c) determination of trans-isomers of fatty acids:
 - method A will be applied directly to samples of the following oil categories:
 - virgin olive oils with an acidity of less than 3,3 %,
 - refined olive oil,
 - olive oil (blend of virgin olive oils and refined olive oil),
 - refined olive-pomace oil,
 - olive-pomace oil (blend of virgin olive oils and refined olive-pomace oil);
 - method A will be applied to the following categories of oils after purification of the oil by passing it through a silica gel column:
 - virgin olive oil with an acidity of more than 3,3 %,
 - crude olive-pomace oil.

PURIFICATION OF OIL SAMPLES

When necessary, the samples will be purified by passing the oil through a silica gel column, eluting with hexane/diethyl ether (87:13, v/v) as described in IUPAC method 2.507.

Alternatively, solid-phase extraction on silica gel phase cartridges can be used. A silica gel cartridge (1 g, 6 ml) is placed in a vacuum elution apparatus and washed with 6 ml of hexane. The vacuum is released to prevent the column from becoming dry and then a solution of the oil (0,12 g approximately) in 0,5 ml of hexane is loaded into the column and vacuum is applied. The solution is pulled down and then eluted with 10 ml of hexane/diethyl ether (87:13 v/v) under vacuum. The combined eluates are homogenised and divided in two similar volumes. An aliquot is evaporated to dryness in a rotary evaporator under reduced pressure at room temperature. The pomace is dissolved in 1 ml of heptane and the solution is ready for fatty acid analysis by GC. The second aliquot is evaporated and the pomace is dissolved in 1 ml of acetone for triglyceride analysis by HPLC, if necessary.

▼ **M19****METHODS FOR PREPARING THE FATTY ACID METHYL ESTERS****1. *Method A: Trans-esterification with cold methanolic solution of potassium hydroxide*****1.1. Purpose**

This rapid method is applicable to olive oils and olive-pomace oils with a free fatty acid content of less than 3,3 %. Free fatty acids are not esterified by potassium hydroxide. Fatty acid ethyl esters are trans-esterified at a lower rate than glyceridic esters and may be only partially methylated.

1.2. Principle

Methyl esters are formed by trans-esterification with methanolic potassium hydroxide as an intermediate stage before saponification takes place (title 5 in ISO-5509:2000, title 5 in IUPAC method 2.301).

1.3. Reagents

Methanol containing not more than 0,5 % (m/m) water.

Heptane, chromatographic quality.

Potassium hydroxide, approximately 2 N methanolic solution: dissolve 11,2 g of potassium hydroxide in 100 ml of methanol.

1.4. Apparatus

Screw-top test tubes (5 ml volume) with cap fitted with a PTFE joint.

Graduated or automatic pipettes, 2 ml and 0,2 ml

1.5. Procedure

In a 5 ml screw-top test tube weigh approximately 0,1 g of the oil sample. Add 2 ml of heptane, and shake. Add 0,2 ml of 2 N methanolic potassium hydroxide solution, put on the cap fitted with a PTFE joint, tighten the cap, and shake vigorously for 30 seconds. Leave to stratify until the upper solution becomes clear. Decant the upper layer containing the methyl esters. The heptane solution is suitable for injection into the gas chromatograph. It is advisable to keep the solution in the refrigerator until gas chromatographic analysis. Storage of the solution for more than 12 hours is not recommended.

2. *Method B: Methylation by heating with sodium methylate in methanol followed by esterification in acid medium***2.1. Purpose**

This method is applicable to olive oils and olive-pomace oils with a free fatty acid content of more than 3,3 %.

2.2. Principle

Neutralisation of the free fatty acids and alkaline methanolysis of the glycerides, followed by esterification of the fatty acids in acid medium (title 4.2. in IUPAC method 2.301).

2.3. Reagents

— heptane, chromatographic quality,

— methanol containing not more than 0,05 % (m/m) water,

— sodium methylate, 0,2 N methanolic solution: dissolve 5 g of sodium in 1 000 ml of methanol (this may be prepared from commercial solutions),

— phenolphthalein, 0,2 % methanolic solution,

— sulphuric acid, 1 N in methanolic solution: add 3 ml of 96 % sulphuric acid to 100 ml of methanol,

— saturated solution of sodium chloride in water.

2.4. Apparatus

— 50 ml flat-bottomed volumetric flask with long, narrow, ground neck,

— reflux condenser: air condenser (1 m long) with ground joint appropriate to the neck of the flask,

— boiling chips,

— glass funnel.

▼ **M19****2.5. Procedure**

Transfer about 0,25 g of the oil sample into a 50 ml ground-necked volumetric flask. With the aid of a funnel, add 10 ml of 0,2 N sodium methylate in methanol and the boiling chips. Fit a reflux condenser, shake, and bring to the boil. The solution should become clear, which usually occurs in about 10 minutes. The reaction is complete after 15 minutes. Remove the flask from the source of heat, wait until the reflux stops, remove the condenser, and add two drops of phenolphthalein solution. Add a few ml of 1 N sulphuric acid in methanol solution until the solution becomes colourless and then add 1 ml in excess. Fit the condenser and boil again for 20 minutes. Withdraw from the source of heat and cool the flask under running water. Remove the condenser, add 20 ml of saturated sodium chloride solution, and shake. Add 5 ml of heptane, plug the flask, and shake vigorously for 15 seconds.

Leave to settle until the two phases have separated. Add saturated sodium chloride solution again until the aqueous layer reaches the lower end of the flask neck. The upper layer containing the methyl esters fills the flask neck. This solution is ready to be injected in the GC.

Caution: Methylation by method B must be done under a hood.

2.6. Alternatives to methylation Method B**2.6.1. Method C****2.6.1.1. Principle**

The fatty matter undergoing analysis is treated with methanol-hydrochloric acid, in a sealed vial, at 100 °C.

2.6.1.2. Apparatus

- Strong glass vial of a capacity of about 5 ml (height 40 to 45 mm, diameter 14 to 16 mm).
- 1 and 2 ml graduated pipettes.

2.6.1.3. Reagents

Solution of hydrochloric acid in 2 % methanol. This is prepared from gaseous hydrochloric acid and anhydrous methanol (Note 1).

Hexane, chromatographic quality.

Note 1: Commercial solutions of hydrogen chloride in methanol can be used. Small amounts of gaseous hydrochloric acid can easily be prepared in the laboratory by simple displacement from the commercial solution ($p = 1,18$) by dripping concentrated sulphuric acid. Since hydrochloric acid is very rapidly absorbed by methanol, it is advisable to take the usual precautions when dissolving it, e.g. introduce the gas through a small inverted funnel with the rim just touching the surface of the liquid. Large quantities of methanolic hydrochloric acid solution can be prepared in advance, as it keeps perfectly in glass-stoppered bottles stored in the dark. Alternatively, this reagent can be prepared by dissolution of acetyl chloride in anhydrous methanol.

2.6.1.4. Procedure

- Place in the glass vial 0,2 g of the fatty matter, which has previously been dried out on sodium sulphate and filtered, and 2 ml of hydrochloric acid-methanol solution. Heat seal the vial.
- Immerse the vial at 100 °C for 40 minutes.
- Cool the vial under running water, open, add 2 ml of distilled water and 1 ml of hexane.
- Centrifuge and remove the hexane phase, which is ready for use.

2.6.2. Method D**2.6.2.1. Principle**

The fatty matter undergoing analysis is heated under reflux with methanol-hexane-sulphuric acid. The methyl esters obtained are extracted with petroleum ether.

2.6.2.2. Apparatus

- Test tube of a capacity of about 20 ml, fitted with an air reflux condenser approximately 1 m in length, with ground glass joints.

▼ **M19**

- 5 ml graduated pipette.
- 50 ml separating funnel.
- 10 ml and 25 ml measuring beakers.
- 15 ml test tube with conical base.

2.6.2.3. Reagents

- Methylation reagent: anhydrous methanol-hexane-concentrated sulphuric acid ($p = 1,84$) in the ratio 75:25:1 (V/V/V).
- 40 to 60 °C petroleum ether.
- Anhydrous sodium sulphate.

2.6.2.4. Procedure

Place 0,1 g of oil in the 20 ml test tube and add 5 ml of methylation reagent.

Fit the reflux condenser and heat for 30 minutes in a boiling water bath (Note 2).

Transfer quantitatively the mixture into a 50 ml separating funnel, with the aid of 10 ml distilled water and 10 ml petroleum ether. Shake vigorously, and allow the phases to separate, remove the aqueous phase and wash the ether layer twice with 20 ml distilled water. Add to the separating funnel a small quantity of anhydrous sodium sulphate, shake, allow to settle for a few minutes and filter, collecting the filtrate in a 15 ml test tube with a conical base.

Evaporate the solvent over a water bath in a current of nitrogen.

Note 2: To control boiling, insert a glass rod into the test tube and limit the temperature of the water bath to 90 °C.

3. *Precision parameters*

The statistical evaluation of the precision of methods A and B was published by the International Olive Oil Council in its method COI/T.20/CO. No 24.

RECOMMENDATIONS FOR GAS CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF THE FATTY ACID ESTERS FROM OLIVE OIL AND OLIVE-POMACE OIL

1. *Procedure*

The gas chromatographic analysis of solutions of fatty esters in heptane is to be carried out according to standard ISO-5508 using a capillary column (50 m length x 0,25 or 0,32 mm i.d.) impregnated with cyanopropylsilicone phase as indicated for the determination of fatty acid trans-isomers (COI/T.20/Doc. no. 17).

Figure 1 gives the typical gas chromatographic profile of an olive-pomace oil containing methyl and ethyl esters of fatty acids, and trans-isomers of methyl esters.

2. *Calculations*2.1. For the calculation of the fatty acid composition and ΔE_{CN42} , all the following fatty acids will be taken into account:

Myristic (C14:0).

Palmitic (C16:0). Sum of the areas of the peaks corresponding to the methyl and ethyl esters.

Palmitoleic (C16:1). Sum of the areas of the peaks corresponding to the $\omega 9$ and $\omega 7$ isomers of the methyl ester.

Margaric (C17:0).

Margaroleic (C17:1).

Stearic (C18:0).

Oleic (C18:1). Sum of the areas of the peaks corresponding to the $\omega 9$ and $\omega 7$ isomers of the methyl ester, ethyl ester, and trans-isomers of the methyl ester.

Linoleic (C18:2). Sum of the areas of the peaks corresponding to the methyl and ethyl esters, and the trans-isomers of the methyl ester.

Arachidic (C20:0).

Linolenic (C18:3). Sum of the areas of the methyl ester and the trans-isomers of the methyl ester.

▼ M19

Eicosenoic (C20:1).

Behenic (C22:0).

Lignoceric (C24:0).

Squalene will not be taken into account for the calculation of the total area.

- 2.2. For the calculation of the percentage of trans-C18:1 the peak corresponding to the methyl esters of this fatty acid is to be used. For the sum [trans-C18:2 + trans-C18:3], all the peaks corresponding to the trans-isomers of these two fatty acids are to be added together. For the calculation of the total area, all the peaks mentioned in 2.1. are to be taken into account (see COI/T.20/Doc. No. 17).

The calculation of the percentage of each fatty acid will be carried out according to the formula:

$$\% X = (\text{Area X} \times 100) / (\text{total area})$$

▼ M19

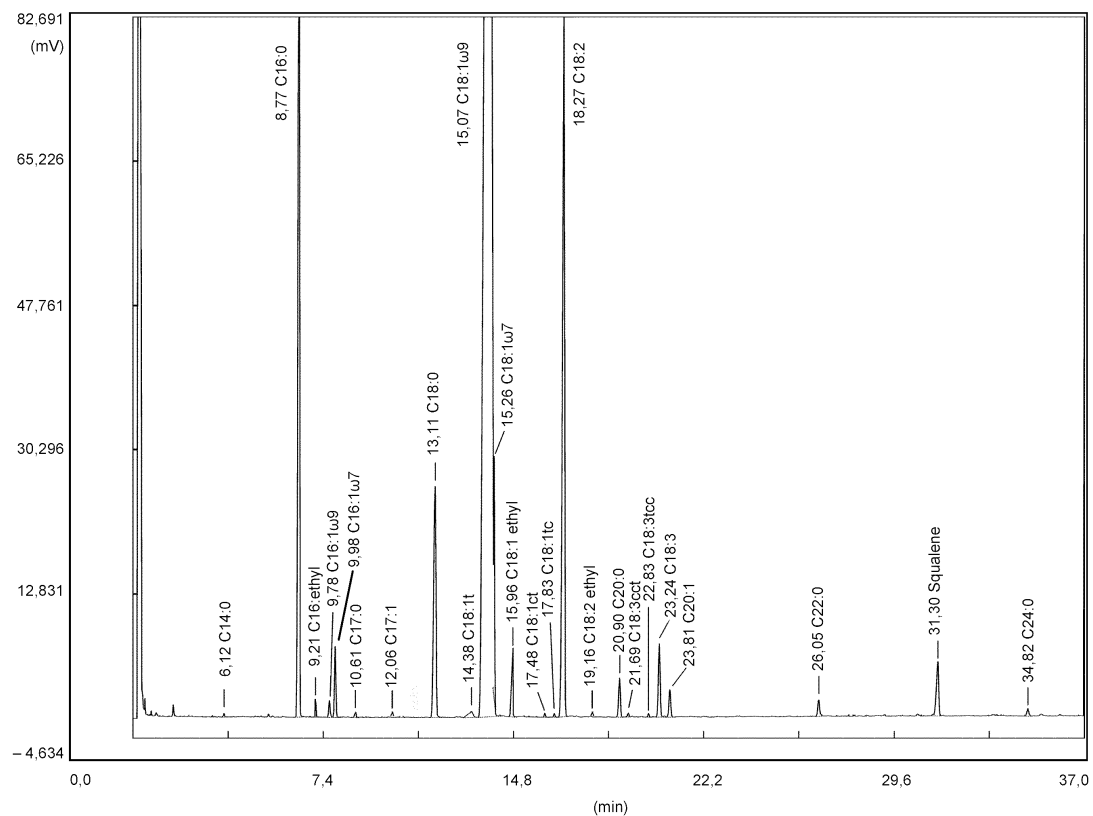


Figure 1: Gas chromatographic profile obtained by the cold methylation method from olive-pomace oil. The chromatographic peaks correspond to the methyl and ethyl esters except where otherwise indicated.



XI PRIEDAS

LAKIŲJŲ HALOGENINTŲ TIRPIKLIŲ KIEKIO ALYVUOGIŲ ALIEJUJE NUSTATYMAS

1. METODAS

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

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 įtaisu 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 analizei.

4. DARBO EIGA

- 4.1. Į stiklinę kolbą (pakartotinai nenaudoti) tiksliai pasveriami 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.

▼ **M19***ANNEX XII***ORGANOLEPTIC ASSESSMENT OF VIRGIN OLIVE OILS****1. PURPOSE AND SCOPE**

This Annex sets the criteria required for organoleptic assessment of the virgin oils defined at 1 in the Annex to Regulation No 136/66/EEC and describes the method of grading them with reference to characteristics.

This method can be used only for grading virgin oils on the basis of fruitiness and intensity of defects by a group of selected trained tasters operating as a panel in line with section 4.

2. GENERAL

For the general basic vocabulary, the tasting room, the general methodology and the tasting glass compliance with the stipulations of the International Olive Oil Council is recommended.

3. SPECIFIC VOCABULARY**3.1. Positive attributes**

Fruity: range of smells (dependent on variety) characteristic of oil from healthy fresh fruit, green or white, perceived directly or retronasally.

Bitter: characteristic taste of oil from green olives or olives turning colour.

Pungent: tingling sensation characteristic of oil made at the beginning of the season mainly from olives that are still green.

3.2. Negative attributes

Atrojado (fusty): characteristic flavour of oil from piled olives in advanced anaerobic fermentation.

Mustiness/humidity: characteristic flavour of oil from olives in which large numbers of fungi and yeasts had developed as a result of storage for several days in humid conditions.

Muddy sediment: characteristic flavour of oil that has remained in contact with sediment in vats and tanks.

Winey/vinegary: characteristic flavour of certain oils reminiscent of wine or vinegar, due basically to formation of acetic acid, ethyl acetate and ethanol by fermentation of the olives.

Metallic: flavour reminiscent of metal, characteristic of oil that has been in prolonged contact with metal surfaces during crushing, mixing, pressing or storage.

Rancid: flavour of oil that has become oxidised.

Heated or burnt: characteristic flavour caused by excessive and/or prolonged heating during production, particularly by thermo-mixing of the paste in unsuitable conditions.

Hay/wood: characteristic flavour of certain oils from dry olives.

Rough: thick and pasty mouthfeel produced by some oils.

Greasy: flavour reminiscent of diesel, grease or mineral oil.

Vegetable water: flavour acquired by oil through prolonged contact with the vegetable water.

Brine: flavour of oil from olives preserved in salt solution.

Esparto: characteristic flavour of oil from olives pressed in new esparto mats. It can vary according to whether the mats are of green or dried esparto.

Earthy: flavour of oil from olives collected with earth or mud on them and not washed.

Grubby: flavour of oil from olives heavily attacked by grubs of the olive fly (*Bactrocera oleae*).

Cucumber: characteristic flavour of oil kept too long in hermetically sealed containers, notably in tins, attributed to formation of 2,6-nonadienal.

▼ **M19****4. PANEL**

The panel is appointed by the Member State and consists of a panel head and from eight to twelve tasters. However, for the 2001/02 marketing year, the panel may consist of fewer than eight tasters.

The panel head must be a soundly trained expert in the various types of oil. He or she is responsible for the panel and its organisation and operation, including preparation, coding and presentation of the samples to the tasters and collection and processing of the data.

He or she selects the testers, sees to their training and checks that their performance remains of adequate standard.

The testers must be selected and trained on account of their skill in distinguishing between similar samples. The International Olive Oil Council's manual on the selection, training and monitoring of qualified virgin oil tasters must be followed.

Panels must undertake to participate in national, Community and international organoleptic assessments organised for the purposes of periodic monitoring and harmonisation of perception criteria. They must also provide the Member State concerned with full information each year on the composition of the panel and the number of assessments made in their capacity as an approved panel.

5. PROCEDURE FOR ORGANOLEPTIC ASSESSMENT AND GRADING**5.1. Use of profile sheet by taster**

The profile sheet to be used by the taster is reproduced as Appendix A.

Tasters must each smell and then taste ⁽¹⁾ the oil submitted for examination contained in the tasting glass, analysing their olfactory, gustatory, tactile and kinaesthetic perceptions and mark on the sheet the intensity of their perception of each negative and positive attribute.

If negative attributes not listed on the profile sheet are perceived these must be noted under "Other" using those of the terms defined in 3.2 above that best describe them.

5.2. Processing of data by panel head

The panel head collects the profile sheets completed by the tasters and scrutinises the intensities assigned. In the event of an anomaly he or she will ask tasters to re-examine their sheet and if necessary repeat the test.

The panel head may feed each tester's data into a computer programme for calculating the median (Appendix B). Input of each sample shall be made with the help of a grid of 10 vertical columns for the 10 sensory attributes and one line for each panel member.

If a negative attribute is mentioned under "Other" by 50 % of the panel the head must calculate the median for this attribute and grade accordingly.

In cases of assessment in connection with monitoring of conformity to standards and of counter-assessment the panel head shall arrange for the assessment to be repeated twice at intervals of at least one day. The attribute medians shall be calculated using the data from the profile sheets of the three assessments.

5.3. Grading of oils

The oil is graded as follows in line with the median of the defects and the median for "fruity". By this is understood the median of the negative attribute perceived with greatest intensity. The value of the robust variation coefficient for this negative attribute must be no greater than 20 %.

- (a) *extra virgin olive oil*: the median of the defects is 0 and the median for "fruity" is above 0;
- (b) *virgin olive oil*: the median of the defects is above 0 but not above 2,5 and the median for "fruity" is above 0;
- (c) *ordinary virgin olive oil*: the median of the defects is above 2,5 but not above 6,0; or the median of the defects is not above 2,5 and the median for "fruity" is 0;
- (d) *lampante virgin olive oil*: the median of the defects is above 6,0.

From 1 November 2003 categories c) and d) are replaced by:

⁽¹⁾ But may refrain from tasting if they note some extremely intense negative attributes; they will note this exceptional circumstance on the profile sheet.

▼ M19

- (c) *lampante olive oil*: the median of the defects is above 2,5; or the median of the defects is not above 2,5 and the median for "fruity" is 0.

5.4. Special case

If the median of a positive attribute other than "fruity" is above 5,0 the panel head must note this on the analysis certificate.

▼ **M19***APPENDIX A***Profile sheet**

(for use by taster)

DEFECTS PERCEIVED	INTENSITY
“Atrojado” (fusty)	
Mustiness/humidity	
Winey/vinegary	
Muddy sediment	
Metallic	
Rancid	
Other (specify)	
POSITIVE ATTRIBUTES PERCEIVED	
Fruity	
Bitter	
Pungent	

Name of tasterSample codeDate

▼ **M19***APPENDIX B***METHOD OF CALCULATING MEDIAN AND CONFIDENCE INTERVALS****Median**

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

The median is the real number X_m characterised by the fact that the probability (P) that the values of the distribution (X) are below that number (X_m) is not more than 0,5 and that simultaneously the probability (P) that the values of the distribution (X) are not above X_m is not less than 0,5. Another definition considers the median to be the 50th percentile of a distribution of numbers ranked in order of increase. In other terms the median represents the central value of an ordered series of uneven numbers or the average of the two central values of an ordered series of even numbers.

Robust standard deviation

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

To obtain a reliable estimate of the variability that arises around the median recourse is required to the Stuart and Kendall method of estimating the robust standard deviation. The formula for the asymptotic standard deviation S involves N and IQR. N is the number of observations and IQR the interquartile range, i.e. the robust estimate of the variability of the data under consideration (the interquartile range covers exactly 50 % of the cases of any probability distribution). The interquartile range is given by calculating the size of the deviation between the 75th and the 25th percentiles.

$$\text{IQR} = 75\text{th percentile} - 25\text{th percentile}$$

The percentile is the value X_{pc} characterised by the fact that the probability (P) that the values of the distribution are below X_{pc} is not more than a determined hundredth and that simultaneously the probability (P) that the values of the distribution are not above X_{pc} is not less than the said hundredth. The hundredth indicates the distribution fraction used. In the case of the median this is 50/100.

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

In other words the percentile is the distribution value corresponding to a determined area plotted from the distribution or density curve. For example, the 25th percentile represents the distribution value corresponding to an area equal to 0,25 or 25/100.

Robust variation coefficient %

$$\text{CVR} = \frac{S}{Me} 100$$

The RVC represents a pure number, i.e. without dimension, that indicates the percentage of variability of the series of numbers analysed against the Av value of the median. For that reason it is very useful for verifying the reliability of the panel members.

Confidence intervals at 95 % on the median

The confidence intervals (C.I.) at 95 % (value of the error of first kind equal to 0,05 or 5 %) represent the range in which the value of the median would be able to vary should it be possible to repeat the experiment an infinite number of times. In practice this interval indicates the range of variability of the test under the operating conditions selected should it be possible to repeat the test several times. The interval helps evaluate, as in the case of the RVC, the reliability of the test.

▼ M19

$$\text{Upper C.I.} = A_v + (c.S)$$

$$\text{Lower C.I.} = A_v - (c.S)$$

where c in the case of a confidence interval of 0,95 is equal to 1,96.

Grading is effected by comparing the median values with the reference ranges set in section 5.3. The software package permits a visualised grading on a table of the statistics or on a graph.

▼ M20

▼ M19



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,
- džiovinimo spinta, reguliuojama ne daugiau kaip iki 80 °C temperatūros,
- elektrinė džiovinimo spinta su 103 ± 2 °C temperatūrai nustatytu termostataavimo įtaisu, per kurį 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 pasveriami 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 džiovinimo spintoje, kaitinamoje ne daugiau kaip iki 80 °C, kad drėgmės ir lakiųjų medžiagų kiekis sumažėtų iki mažiau kaip 10 %.

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, pasveriami 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.

▼B

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 džiovavimo 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:

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

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=ektrakto 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 sąlygoms.

Jodo skaičius skaičiuojamas jodo gramais 100 g bandinio.

3. METODO ESMĖ

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 sausas.

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.

1 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

▼B

Analizuojama bandinio dalis 0,1 mg tikslumu sveriamą 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 *Wjjs* reagento (4.6), užkemšama kamščiu, turinys sumaišomas ir kolba pastatoma tamsioje vietoje. *Wjjs* reagentui imti nenaudojama pipetė, į kurią siurbiamą burna.

Panašiai paruošiamas tuščiasis bandymas, įpilant tirpiklio ir *Wjjs* 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:

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

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;

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***AUGALINIUOSE 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 sukepinto 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.

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 priemonėmis 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.

▼ **M11**

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 kolonėlinei 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 mažiau-siai 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.

6. DARBO EIGA

6.1. Nemuilinamos medžiagos gavimas

- 6.1.1. 250 ml tūrio kolboje (4.1) pasveriamas $20 \pm 0,1$ g aliejaus, įpilama 1 ml etaloninio cholesta-3,5-dieno (20 µg) 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), plau-namas 20 ml heksano ir esant sumažintam slėgiui 30 °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 frakcio-navimo 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 išpi-lami ir surenkama 40 ml paskesnės frakcijos. Surinkus tokį tūrį, frakcija supilama į 100 ml apvaliadugnę kolbą (4.3).

▼ **M11**

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 išplaunamų komponentų geras. Visgi aukštos skvalenui priskiriamos smailės, turinčios maždaug 1,5 minutės mažesnę nei etalonas sulaikymo trukmę, buvimas rodo, kad atskyrimas blogas.

6.2.2. Antroji frakcija 30 °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.

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, izomerai gali atsirasti kaip maža smailė prieš pat 3,5-stigmastadieno smailę (2 brėžinys). Norint užtikrinti, kad stigmastadienai būtų išplaunami vienos smailės apvaldalu, patartina kolonėlę pakeisti į mažiau polišką arba į turinčią didesnę 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.

▼ **M11**

6.3.3. Kiekybinė analizė

Stigmastadienų kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

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

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

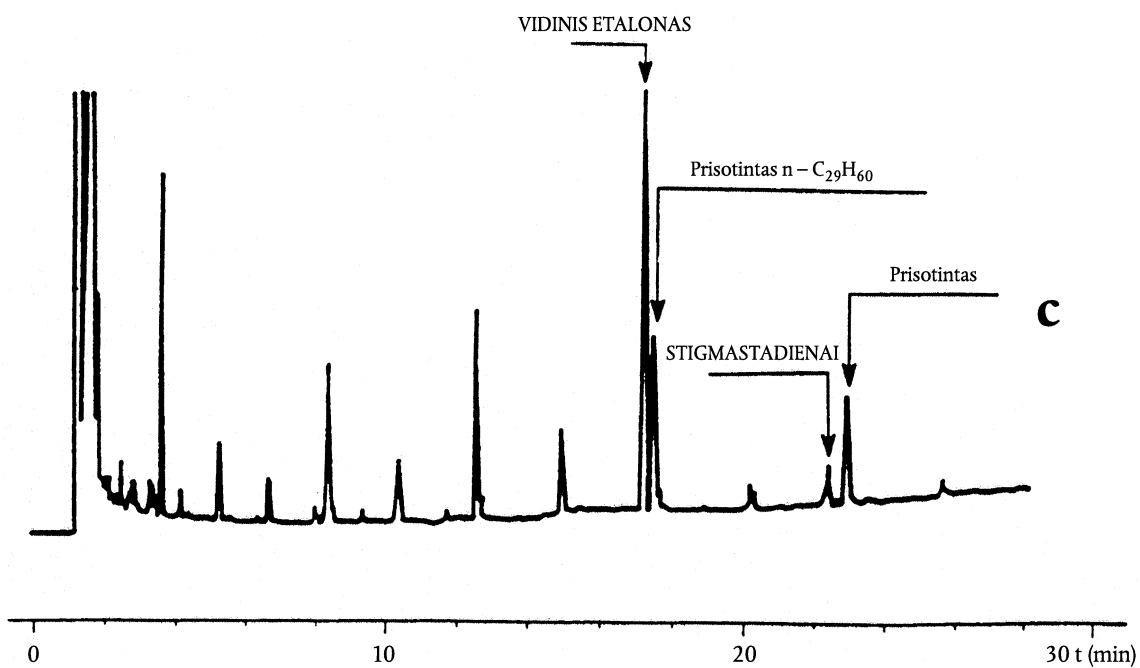
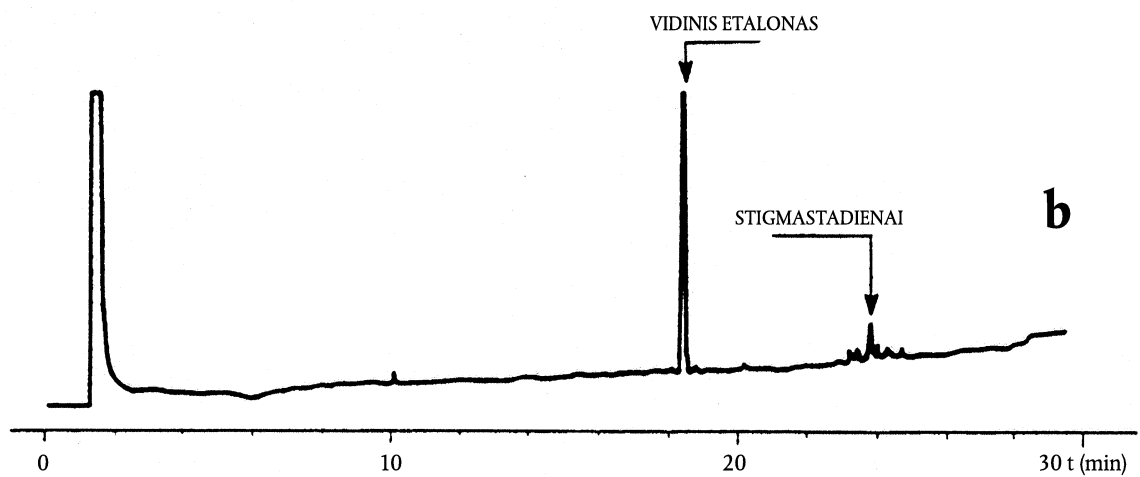
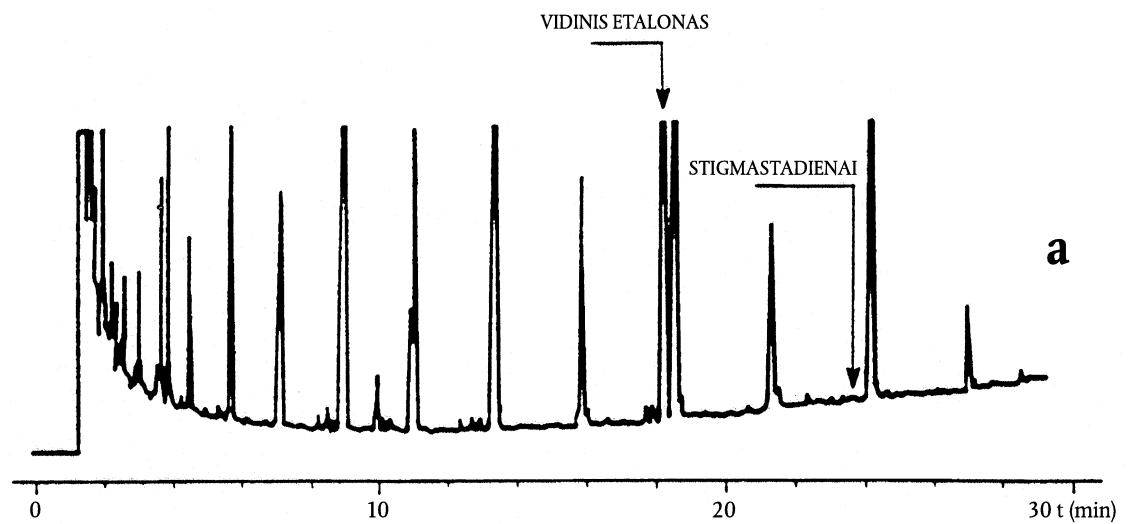
A_c = vidinio etalono smailės plotas (cholestadieno),

M_c = įpurkšto etalono kiekis, mikrogramais,

M_o = paimto aliejaus kiekis, gramais.

Radimo riba: apie 0,01 mg/kg.

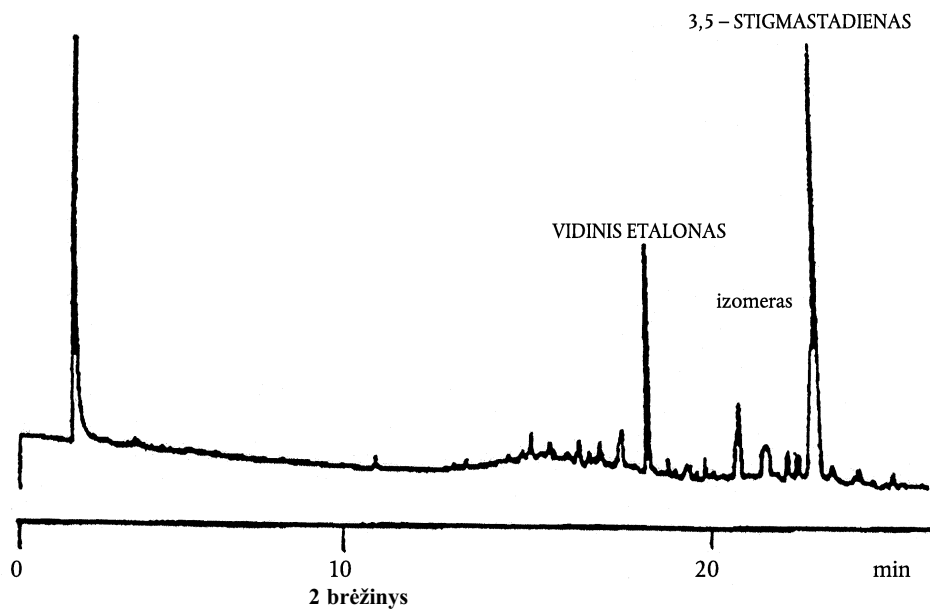
▼ M11



▼ **M11**

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

- 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.



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

▼ **M13***ANNEX XVIII***DETERMINATION OF TRIACYLGLYCEROLS WITH ECN 42 (DIFFERENCE BETWEEN HPLC DATA AND THEORETICAL CONTENT)****1. Scope**

Determination of the composition of triacylglycerols (TAGs) in olive oils, in terms of their equivalent carbon number by differences between the analytical results obtained by high performance liquid chromatography (HPLC) and the theoretical content, calculated starting from the fatty acid composition.

2. Field application

The standard is applicable to olive oils. The method is applicable to the detection of the presence of small amounts of seed oils (rich in linoleic acid) in every class of olive oils.

3. Principle

The content of triacylglycerols with ECN42 determined by HPLC analysis and the theoretical content of triacylglycerols with ECN42 (calculated on the basis of GLC determination of fatty acid composition) correspond within a certain limit for pure oils. A difference larger than the values stated in the Regulation for each type of oil points out that the oil contains seed oils.

4. Method

The method for calculation of theoretical content of triacylglycerols with ECN42 and of the difference between the HPLC data and this one essentially is made by the coordination of analytical data obtained by means of other methods: it is possible to distinguish three phases: determination of fatty acid composition by capillary gas chromatography, calculation of theoretical composition of triacylglycerols with ECN42, HPLC determination of ECN42 triacylglycerols

4.1. Apparatus

- 4.1.1. Round bottom flasks, 250 and 500 ml.
- 4.1.2. Beakers 100 ml.
- 4.1.3. Glass chromatographic column, 21 mm internal diameter, 450 mm length, with cock and normalized cone (female) at the top.
- 4.1.4. Separator funnels, 250 ml, with normalized cone (male) at the bottom, suitable to be connected with the top of the column.
- 4.1.5. Glass rod, 600 mm length.
- 4.1.6. Glass funnel, 80 mm diameter.
- 4.1.7. Volumetric flasks, 50 ml.
- 4.1.8. Volumetric flasks, 20 ml.
- 4.1.9. Rotative evaporator.
- 4.1.10. High performance liquid chromatography, allowing thermostatic control of column temperature.
- 4.1.11. Injection units for 10 µl delivery.
- 4.1.12. Detector: differential refractometer. The full scale sensitivity should be at least 10^{-4} units of refractive index.
- 4.1.13. Column: stainless steel tube 250 mm length and 4,5 mm internal diameter packed with 5 µm diameter particles of silica with 22 to 23 % carbon in the form of octadecylsilane (note 2).
- 4.1.14. Recorder and/or integrator.

4.2. Reagents

The reagents should be of analytical purity. Elution solvents should be de-gassed, and may be recycled several times without effect on the separations.

- 4.2.1. Petroleum ether 40 to 60 °C chromatographic grade.
- 4.2.2. Ethil ether, peroxides free, freshly distilled.

▼ **M13**

- 4.2.3. Glass chromatographic elution solvent: mixture petroleum ether/ethyl ether 87/13 (v/v).
- 4.2.4. Silicagel, 70-230 mesh, type Merck 7734, with water content standardized at 5 % (w/w).
- 4.2.5. Glass wool.
- 4.2.6. Acetone.
- 4.2.7. Acetonitrile.
- 4.2.8. HPLC elution solvent: acetonitrile + acetone (proportions to be adjusted to obtain the desired separation; begin with 50:50 mixture).
- 4.2.9. Solubilization solvent: acetone.
- 4.2.10. Reference triglycerides commercial triglycerides tripalmitin, triolein, etc.) may be used and the retention times thence plotted in accordance with the equivalent carbon number, or alternatively reference chromatograms obtained from soya oil, mixture 30:70 soya oil/olive oil and pure olive oil (see notes 3 and 4 and figure 1, 2, 3, 4).

4.3. **Sample preparation**

As a number of interfering substances can rise false positive results, the sample must always be purified according to IUPAC method 2.507, used for determination of polar substances in oxidised oils.

4.3.1. **Chromatographic column preparation**

Fill the column (4.1.3) with about 30 ml of elution solvent (4.2.3), then introduce inside the column some glass wool (4.2.5) pushing it to the bottom of the column by means of the glass rod (4.1.5).

In a 100 ml beaker, suspend 25 g of silicagel (4.2.4) in 80 ml of elution mixture (4.2.3), then transfer it inside the column, by means of a glass funnel (4.1.6).

To ensure the complete transfer of silicagel inside the column, wash the beaker with the elution mixture and transfer the washing portions inside the column, too.

Open the cock and let solvent elute from the column until its level is about 1 cm over the silicagel.

4.3.2. **Column chromatography**

Weigh with the accuracy of 0,001 g, $2,5 \pm 0,1$ g of oil, previously filtered, homogenized and anhydriified, if necessary, in a 50 ml volumetric flask (4.1.7). Solve it in about 20 ml of elution solvent (4.2.3), if necessary, slightly heat it to make the dissolution easily. Cool at room temperature and adjust the volume with elution solvent.

By means of a volumetric pipette, introduce 20 ml of solution inside the column prepared according to 4.3.1, open the cock and let solvent elute to the silicagel layer level.

Then elute with 150 ml of elution solvent (4.2.3), adjusting the solvent rate at about 2 ml/min (150 ml will take about 60 to 70 minutes to pass through the column).

The eluted is recovered in a 250 ml round bottom flask (4.1.1) previously tared in an oven and exactly weighted. Eliminate solvent at reduce pressure (Rotavapor) and weigh the residue that will be used to prepare the solution for HPLC analysis and for methyl ester preparation.

The sample recovery from the column must be 90 % at least for extra virgin, virgin, ordinary refined and olive oil categories, and a minimum of 80 % for lampante and residue olive oils.

4.4. **HPLC analysis**4.4.1. **Preparation of the samples for chromatographic analysis**

A 5 % solution of the sample to be analysed is prepared by weighing $0,5 \pm 0,001$ g of the sample into a 10 ml graduated flask and making up to 10 ml with the solubilization solvent (4.2.9).

4.4.2. **Procedure**

Set up the chromatographic system. Pump elution solvent (4.2.8) at a rate of 1,5 ml/min to purge the entire system. Wait until a stable base line is obtained. Inject 10 μ l of the sample prepared as in 4.3.

▼ **M13**

4.4.3. Calculation and expression of results

Use the area normalization method, i.e. assume that the sum of the areas of the peaks corresponding to TAGs from ECN42 up to ECN52 is equal to 100 %. Calculate the relative percentage of each triglyceride using the formula:

$$\% \text{ triglyceride} = \text{area of peak} \times 100 / \text{sum of peak areas.}$$

The results are to be given to within at least two decimal places.

Note 1: The elution order can be determined by calculating the equivalent carbon numbers, often defined by the relation $\text{ECN} = \text{CN} - 2n$, where CN is the carbon number and n is the number of double bounds, it can be calculated more precisely by taking into account the origin of the double bond. If n_o , n_i and n_{in} are the numbers of double bonds attributed to oleic, linoleic and linolenic acids respectively, the equivalent carbon number can be calculated by means of the relation of the formula:

$$\text{ECN} = \text{CN} - d_o n_o - d_i n_i - d_{in} n_{in},$$

where the coefficient d_o , d_i and d_{in} can be calculated by means of the reference triglycerides. Under the conditions specified in this method, the relation obtained will be close in:

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

Note 2: Examples: Lichrosorb (Merck) RP 18 Art 50333
Lichrosphere or equivalent (Merck) 100 CH18 Art 50377.

Note 3: With several reference triglycerides, it is also possible to calculate the resolution with respect to triolein:

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

by use of the reduced retention time $\text{RT}' = \text{RT} - \text{RT solvent}$.

The graph of $\log \alpha$ against f (number of double bonds) enables the retention values to be determined for all the triglycerides of fatty acids contained in the reference triglycerides — see figure 2.

Note 4: The efficiency of the column should permit clear separation of the peak of trilinolein from the peaks of the triglycerides with an adjacent RT. The elution is carried out up to ECN52 peak.

Note 5: A correct measure of the areas of all peaks of interest for the present determination is ensured if the second peak corresponding to ECN50 is 50 % of full scale of the recorder.

4.5. **Calculation of triacylglycerols composition**

4.5.1. Determination of fatty acid composition

Fatty acid composition is carried out by means of the EEC gas chromatographic method reported in Annex X A of Regulation (EEC) No 2568/91, by means of a capillary column. The methyl esters preparation is carried out according to Annex X B (sodium methylate alcohol solution).

4.5.2. Fatty acids for calculation

Glycerides are grouped by their equivalent carbon number (ECN), taking into account the following equivalencies between ECN and fatty acids. Only fatty acids with 16 and 18 carbon atoms were taken in consideration, because only these are important for olive oil.

Fatty acid (FA)	Abbreviation	Molecular weight (MW)	ECN
Palmatic acid	P	256,4	16
Palmatoleic acid	Po	254,4	14
Stearic acid	S	284,5	18
Oleic acid	O	282,5	16
Linoleic acid	L	280,4	14
Linolenic acid	Ln	278,4	12

▼ **M13**

4.5.3. Conversion of area % into moles for all fatty acids

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

4.5.4. Normalization of fatty acids to 100 %

$$\left. \begin{aligned} \text{moles \% P (1,2,3)} &= \frac{\text{moles P} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% S (1,2,3)} &= \frac{\text{moles S} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% Po (1,2,3)} &= \frac{\text{moles Po} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% O (1,2,3)} &= \frac{\text{moles O} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% L (1,2,3)} &= \frac{\text{moles L} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \\ \text{moles \% Ln (1,2,3)} &= \frac{\text{moles Ln} * 100}{\text{moles (P + S + Po + O + L + Ln)}} \end{aligned} \right\} \quad (2)$$

The result gives the percentage of each fatty acid in moles % in the overall (1,2,3-) position of the TAGs.

Then the sum of the saturated fatty acids P and S (SFA) and the unsaturated fatty acids Po, O, L and Ln (UFA) are calculated:

$$\left. \begin{aligned} \text{moles \% SFA} &= \text{moles \% P} + \text{moles \% S} \\ \text{moles \% UFA} &= 100 - \text{moles \% SFA} \end{aligned} \right\} \quad (3)$$

4.5.5. Calculation of the fatty acid composition in 2- and 1,3-positions of TAGs

The fatty acids are distributed to three pools as follows: two identical for 1- and 3- positions and one for 2- position, with different coefficients for the saturated (P and S) and unsaturated acids (Po, O, L and Ln).

4.5.5.1. Saturated fatty acids in 2- position [P(2) and S(2)]

$$\left. \begin{aligned} \text{moles \% P(2)} &= \text{moles \% P (1,2,3)} * 0,06 \\ \text{moles \% S(2)} &= \text{moles \% S (1,2,3)} * 0,06 \end{aligned} \right\} \quad (4)$$

4.5.5.2. Unsaturated fatty acids in 2- position [Po(2), O(2), L(2) and Ln(2)]:

$$\left. \begin{aligned} \text{moles \% Po(2)} &= \frac{\text{moles \% Po(1,2,3)}}{\text{moles \% UFA}} * [100 - \text{moles \% P(2)} - \text{moles \% S(2)}] \\ \text{moles \% O(2)} &= \frac{\text{moles \% O(1,2,3)}}{\text{moles \% UFA}} * [100 - \text{moles \% P(2)} - \text{mol \% S(2)}] \\ \text{moles \% L(2)} &= \frac{\text{moles \% L(1,2,3)}}{\text{moles \% UFA}} * [100 - \text{moles \% P(2)} - \text{moles \% S(2)}] \\ \text{moles \% Ln(2)} &= \frac{\text{moles \% Ln(1,2,3)}}{\text{moles \% UFA}} * [100 - \text{moles \% P(2)} - \text{moles \% S(2)}] \end{aligned} \right\} \quad (5)$$

4.5.5.3. Fatty acids in 1,3-positions [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) and Ln(1,3)]:

▼ **M13**

$$\left. \begin{aligned}
 \text{moles \% P1,3} &= \frac{\text{moles \% P1,2,3} - \text{moles \% P(2)}}{2} + \text{moles \% P(1,2,3)} \\
 \text{moles \% S(1,3)} &= \frac{\text{moles \% S(1,2,3)} - \text{moles \% S(2)}}{2} + \text{moles \% S(1,2,3)} \\
 \text{moles \% Po(1,3)} &= \frac{\text{moles \% Po(1,2,3)} - \text{moles \% Po(2)}}{2} + \text{moles \% Po(1,2,3)} \\
 \text{moles \% O(1,3)} &= \frac{\text{moles \% O(1,2,3)} - \text{moles \% O(2)}}{2} + \text{moles \% O(1,2,3)} \\
 \text{moles \% L(1,3)} &= \frac{\text{moles \% L(1,2,3)} - \text{moles \% L(2)}}{2} + \text{moles \% L(1,2,3)} \\
 \text{moles \% Ln(1,3)} &= \frac{\text{moles \% Ln(1,2,3)} - \text{moles \% Ln(2)}}{2} + \text{moles \% Ln(1,2,3)}
 \end{aligned} \right\} (6)$$

4.5.6. Calculation of triacylglycerols

4.5.6.1. TAGs with one fatty acid (AAA, here LLL, PoPoPo)

$$\text{moles \% AAA} = \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% A(1,3)}}{10\,000} \quad (7)$$

4.5.6.2. TAGs with two fatty acids (AAB, here PoPoL, PoLL)

$$\left. \begin{aligned}
 \text{moles \% AAB} &= \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% B(1,3)} * 2}{10\,000} \\
 \text{moles \% ABA} &= \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% B(2)} * \text{moles \% A(1,3)}}{10\,000}
 \end{aligned} \right\} (8)$$

4.5.6.3. TAGs with three different fatty acids (ABC, here OLLn, PLLn, PoOLn, PPOLn)

$$\left. \begin{aligned}
 \text{moles \% ABC} &= \frac{\text{moles \% A(1,3)} * \text{moles \% B(2)} * \text{moles \% C(1,3)} * 2}{10\,000} \\
 \text{moles \% BCA} &= \frac{\text{moles \% B(1,3)} * \text{moles \% C(2)} * \text{moles \% A(1,3)} * 2}{10\,000} \\
 \text{moles \% CAB} &= \frac{\text{moles \% C(1,3)} * \text{moles \% A(2)} * \text{moles \% B(1,3)} * 2}{10\,000}
 \end{aligned} \right\} (9)$$

4.5.6.4. Triacylglycerides with ECN42

The following triglycerides with ECN42 are calculated according equation 7, 8 and 9 in order of expected elution in HPLC (normally only three peaks).

LLL

PoLL and the positional isomer LPoL

OLLn and the positional isomers OLnL and LnOL

PoPoL and the positional isomer PoLPo

PoOLn and the positional isomers OPoLn and OLnPo

PLLn and the positional isomers LLnP and LnPL

PoPoPo

SLnLn and the positional isomer LnSLn

PPOLn and the positional isomers PLnPo and PoPLn

▼ **M13**

The triacylglycerides with ECN42 are given by the sum of the nine triacylglycerols including their positional isomers. The results to be given with at least two decimal places.

5. **Evaluation of the results**

The calculated theoretical content and the content determined by the HPLC analysis are compared. If the difference between HPLC data minus theoretical data is greater than the values states for the appropriate oil category in the Regulation, the sample contains seed oil.

Note: Results are given to within one decimal figure.

6. **Example** (The numbers refer to the sections in the text of the method)4.5.1. **Calculation of moles % fatty acids from GLC data (area %)**

The following data are obtained for the fatty acid composition by GLC:

FA MW	P 256,4	S 284,5	Po 254,4	O 282,5	L 280,4	Ln 278,4
area %	10,0	3,0	1,0	75,0	10,0	1,0

4.5.3. **Conversion of area % into moles for all fatty acids**

$$\text{moles P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ moles P} \quad \text{See formula (1)}$$

$$\text{moles S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ moles S} \quad \text{See formula (1)}$$

$$\text{moles Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ moles Po} \quad \text{See formula (1)}$$

$$\text{moles O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ moles O} \quad \text{See formula (1)}$$

$$\text{moles L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ moles L} \quad \text{See formula (1)}$$

$$\text{moles Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,003594 \text{ moles Ln} \quad \text{See formula (1)}$$

$$\text{Total} = 0,35822 \text{ moles TAGs}$$

4.5.4. **Normalization of fatty acids to 100 %**

$$\text{moles \% P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ moles P} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 10,888 \% \quad \text{See formula (2)}$$

$$\text{moles \% S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ moles S} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 2,944 \% \quad \text{See formula (2)}$$

$$\text{moles \% Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ moles Po} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 1,097 \% \quad \text{See formula (2)}$$

$$\text{moles \% O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ moles O} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 74,113 \% \quad \text{See formula (2)}$$

$$\text{moles \% L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ moles L} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 9,956 \% \quad \text{See formula (2)}$$

$$\text{moles \% Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ moles Ln} * 100}{0,35822 \text{ moles}} = 1,003\% \quad \text{See formula (2)}$$

$$\text{Total moles \%} = 100,0 \%$$

Sum of the saturated and unsaturated fatty acids in the 1,2,3- position of TAGs

$$\text{moles \% SFA} = 10,888 \% + 2,944 \% = 13,831 \% \quad \text{See formula (3)}$$

$$\text{moles \% UFA} = 100,000 \% - 13,831 \% = 86,169 \% \quad \text{See formula (3)}$$

▼ **M13****4.5.5. Calculation of the fatty acid composition in 2- and 1,3- positions of the TAGs****4.5.5.1. Saturated fatty acids in 2- position [P(2) and S(2)]**

$$\text{moles \% P(2)} = 10,888 \% * 0,06 = 0,653 \text{ moles \%}$$

See formula (4)

$$\text{moles \% S(2)} = 2,944 \% * 0,06 = 0,177 \text{ moles \%}$$

See formula (4)

4.5.5.2. Unsaturated fatty acids in 1,3-position [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) and Ln(1,3)]

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

See formula (5)

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

See formula (5)

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

See formula (5)

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

See formula (5)

4.5.5.3. Fatty acids in 1,3-positions [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) and Ln(1,3)]

$$\text{moles \% P(1,3)} = \frac{10,888 - 0,659}{2} 10,888 = 16,005 \text{ moles \%}$$

See formula (6)

$$\text{moles \% S(1,3)} = \frac{2,944 - 0,177}{2} 2,944 = 4,327 \text{ moles \%}$$

See formula (6)

$$\text{moles \% Po(1,3)} = \frac{1,097 - 1,263}{2} 1,097 = 1,015 \text{ moles \%}$$

See formula (6)

$$\text{moles \% O(1,3)} = \frac{74,113 - 85,295}{2} 74,113 = 68,522 \text{ moles \%}$$

See formula (6)

$$\text{moles \% L(1,3)} = \frac{9,956 - 11,458}{2} 9,956 = 9,205 \text{ moles \%}$$

See formula (6)

$$\text{moles \% Ln(1,3)} = \frac{1,003 - 1,154}{2} 1,003 = 0,927 \text{ moles \%}$$

See formula (6)

4.5.6. Calculation of triacylglycerols

From the calculated fatty acid composition in sn-2- and sn-1,3- positions (see above):

FA in	1,3-pos.	2-pos.
P	16,005 %	0,653 %
S	4,327 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,263 %
O	68,522 %	85,295 %
L	9,205 %	11,458 %
Ln	0,927 %	1,154 %
Sum	100,0 %	100,0 %

the following triacylglycerols are calculated:

LLL

PoPoPo

PoLL with 1 positional isomer

SLnLn with 1 positional isomer

PoPoL with 1 positional isomer

PPoLn with 2 positional isomers

OLLn with 2 positional isomers

▼ **M13**

PLLn with 2 positional isomers

PoOLn with 2 positional isomers.

4.5.6.1. TAGs with one fatty acid (LLL, PoPoPo) See formula (7)

$$\text{mol \% LLL} = \frac{9,205 \% * 11,458 \% * 9,205 \%}{10\,000} = 0,09708 \text{ mol LLL}$$

$$\text{mol \% PoPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 1,015 \%}{10\,000} = 0,00013 \text{ mol PoPoPo}$$

4.5.6.2. TAGs with two fatty acids (PoLL, SLnLn, PoPoL) See formula (8)

$$\text{mol \% PoLL} + \text{LLPo} = \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} = 0,02141$$

$$\text{mol \% LPoL} = \frac{9,205 \% * 1,263 \% * 9,205 \%}{10\,000} = 0,01070$$

$$\text{mol \% SLnLn} + \text{LnLnS} = \frac{4,327 \% * 1,154 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,00093$$

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

$$\text{mol \% PoPoL} + \text{LPoPo} = \frac{1,015 \% * 1,263 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} = 0,00236$$

$$\text{mol \% PoLPo} = \frac{1,015 \% * 11,458 \% * 1,015 \%}{10\,000} = 0,00118$$

0,03211 mol PoLL

0,00095 mol SLnLn

0,00354 mol PoPoL

4.5.6.3. TAGs with three different fatty acids (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn) See formula (9)

$$\text{mol \% PPLn} = \frac{16,005 \% * 1,263 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,00375$$

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

$$\text{mol \% PoLnP} = \frac{1,015 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10\,000} = 0,00375$$

$$\text{mol \% OLLn} = \frac{68,522 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,14577$$

$$\text{mol \% LnOL} = \frac{0,927 \% * 85,295 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} = 0,14577$$

$$\text{mol \% LLnO} = \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 68,522 \% * 2}{10\,000} = 0,14577$$

$$\text{mol \% PLLn} = \frac{16,005 \% * 11,458 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,03400$$

$$\text{mol \% LnPL} = \frac{0,927 \% * 0,653 \% * 9,205 \% * 2}{10\,000} = 0,00111$$

$$\text{mol \% LLnP} = \frac{9,205 \% * 1,154 \% * 16,005 \% * 2}{10\,000} = 0,03400$$

$$\text{mol \% PoOLn} = \frac{1,015 \% * 85,295 \% * 0,927 \% * 2}{10\,000} = 0,01605$$

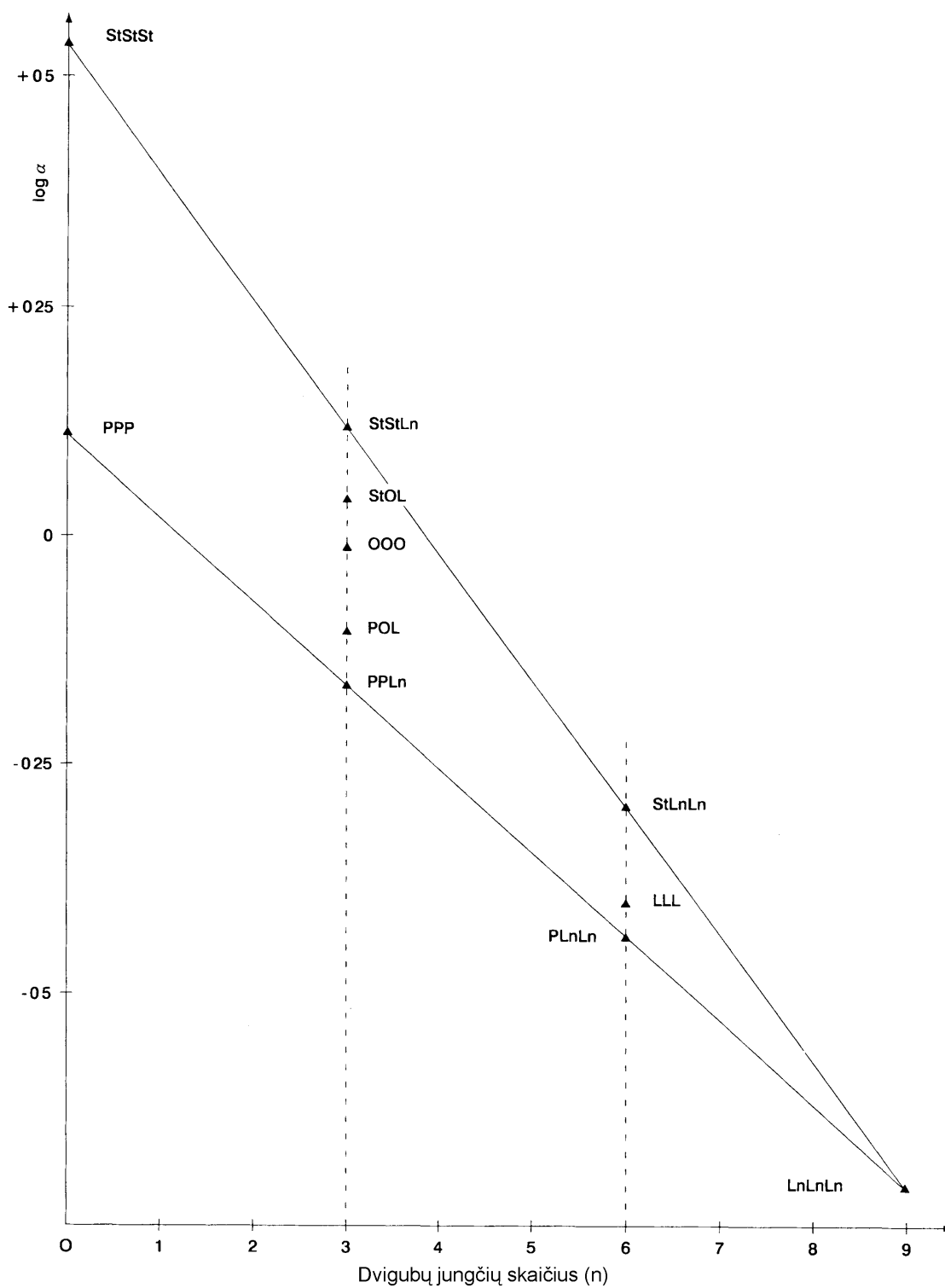
$$\text{mol \% LnPoO} = \frac{0,927 \% * 1,263 \% * 68,522 \% * 2}{10\,000} = 0,01605$$

$$\text{mol \% OLnP} = \frac{68,522 \% * 1,154 \% * 1,015 \% * 2}{10\,000} = 0,01605$$

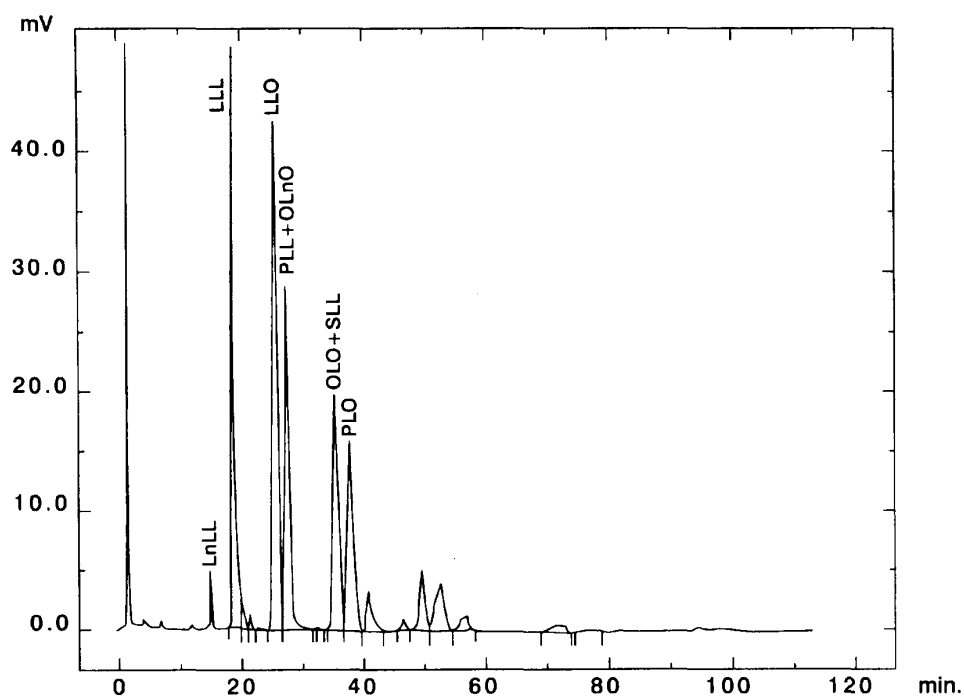
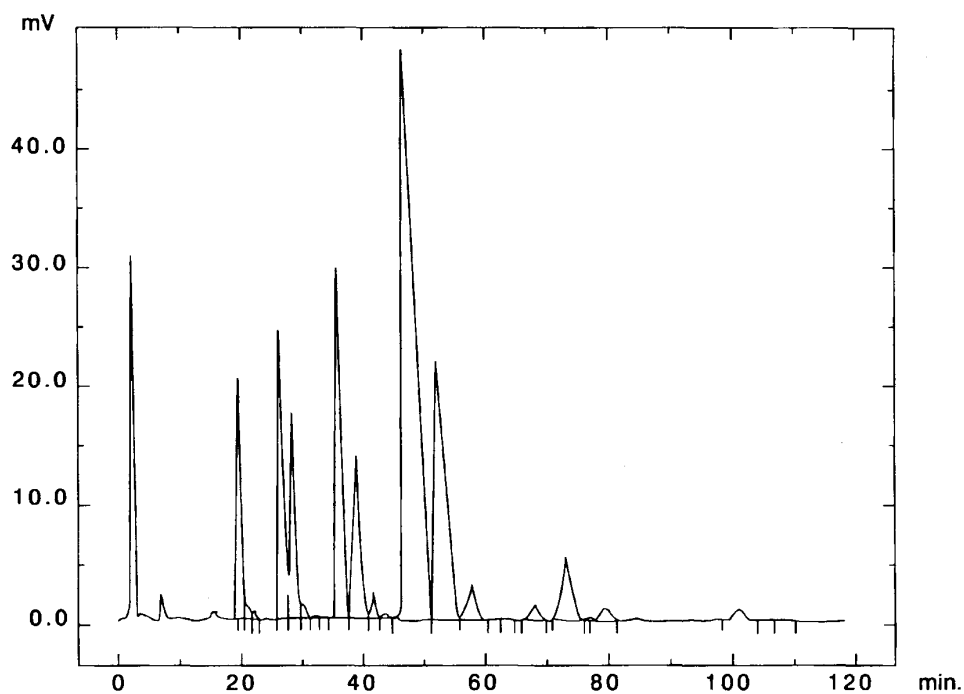
0,06911 mol PLLn

ECN42 = 0,69540 mol TAGs

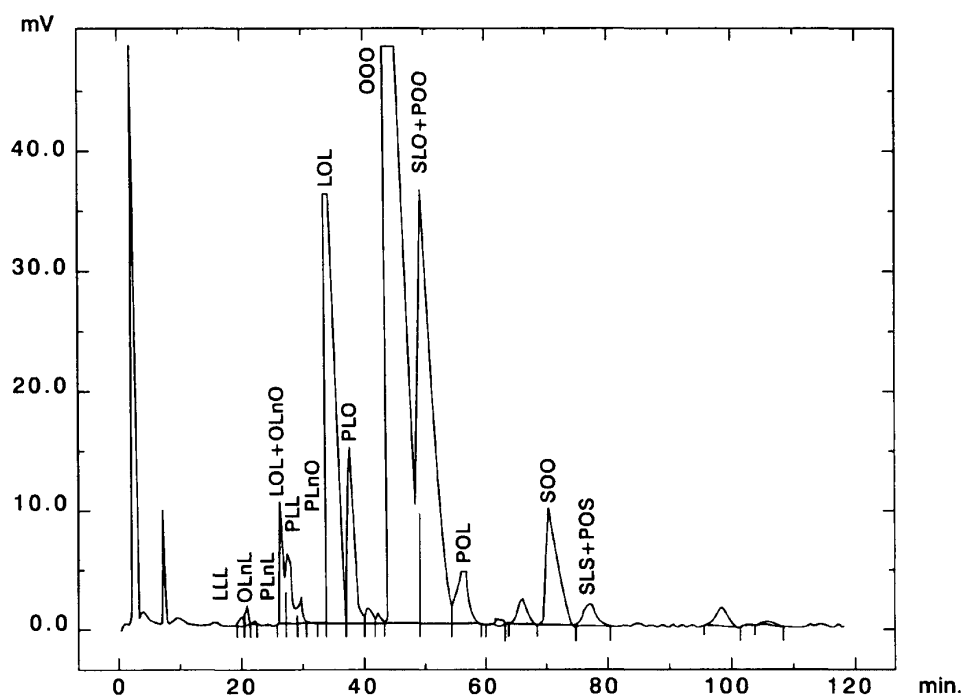
▼ M14

1 brėžinys. $\log \alpha$ priklausomybės nuo f (dvigubų jungčių skaičiaus) grafikas

Pastaba. La = lauro rūgštis; L = linolo rūgštis; My = miristo rūgštis; Ln = linoleno rūgštis; P = palmitino rūgštis; St = stearino rūgštis; O = oleino rūgštis.

▼ **M14****2 brėžinys.***Sojos aliejus***3 brėžinys.***Sojos aliejus/alyvuogių aliejus 30/70*

▼ M14

4 brėžinys. *Alyvuogių aliejus*

▼ **M19***ANNEX XIX***DETERMINATION OF ALIPHATIC ALCOHOLS CONTENT BY CAPILLARY GAS CHROMATOGRAPHY****1. OBJECT**

The procedure describes a method for the determination of aliphatic alcohols content in oils and fats.

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

The fatty substance, with 1-icosanol 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).

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).

▼ **M19**

- 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.
- 4.11. Reference solution for thin-layer chromatography: cholesterol or phytosterols, 5 % solution in chloroform.
- 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.

- 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.

▼ **M19**

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.

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.

- 5.2.5. The plate is sprayed lightly and evenly with the solution of 2', 7'-dichlorofluorescein when the plate is observed under ultra violet light. The aliphatic alcohols band can be identified through being aligned with the stain obtained from the reference solution: mark the limits of the band with a black pencil; outlining the band of aliphatic alcohols and the band immediately above that, which is the terpenic alcohols band, together.

Note 4: The aliphatic alcohols band and the terpenic alcohols band are to be grouped together in view of the possible migration of some aliphatic alcohols into the triterpenic alcohols band.

- 5.2.6. Using a metal spatula scrape off the silica gel in the marked area. Place the finely comminuted material removed into the filter funnel (3.7). Add 10 ml of hot chloroform, mix carefully with the metal spatula and filter under vacuum, collecting the filtrate in the conical flask (3.8) attached to the filter funnel.

Wash the pomace in the flask three times with ethyl ether (approximately 10 ml each time) collecting the filtrate in the same flask attached to the funnel. Evaporate the filtrate to a volume of 4 to 5 ml, transfer the residual solution to the previously weighed 10 ml test tube (3.9), evaporate to dryness by mild heating in a gentle flow of nitrogen, make up again using a few drops of acetone, evaporate again to dryness, place in an oven at 105 °C for approximately 10 minutes and then allow to cool in a desiccator and weigh.

The pomace inside the test tube is composed of the alcoholic fraction.

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).

⁽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 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,
- 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.

▼ **M19**

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.

5.4.4. Peak identification

The identification of individual peaks is effected according to the retention times and by comparison with the standard TMSE mixture, analysed under the same conditions.

A chromatogram of the alcoholic fraction of a virgin olive oil is shown in Figure 1.

5.4.5. Quantitative evaluation

5.4.5.1. The peak areas of 1-eicosanol and of the aliphatic alcohols C_{22} , C_{24} , C_{26} and C_{28} 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.

▼ **M19***APPENDIX**Determination of the linear velocity of the gas*

1 to 3 µl of methane or propane are injected into the gas chromatograph set at normal operating conditions and the time taken for the methane or propane to flow through the column from the instant of injection to the instant the peak elutes (tM) is measured using a stop clock.

The linear velocity in cm/s is given by L/t_M , where L is the length of the column in centimetres and tM is the measured time in seconds.

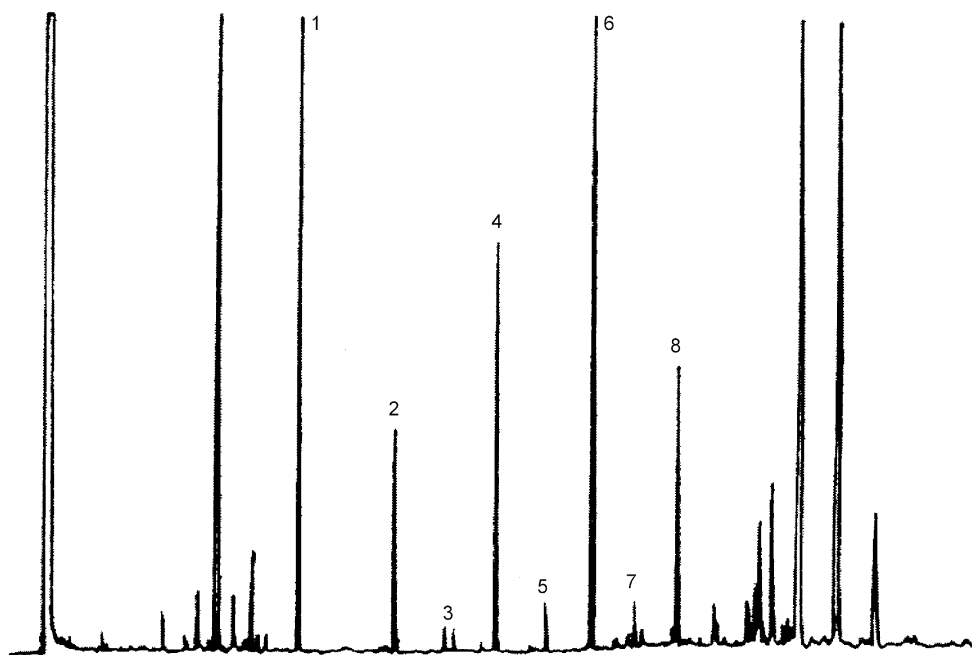


Figure 1 — Chromatogram of the alcoholic fraction of virgin oil

- 1 = Eicosanol
- 2 = Decosanol
- 3 = Tricosanol
- 4 = Tetracosanol
- 5 = Pentacosanol
- 6 = Hexacosanol
- 7 = Heptacosanol
- 8 = Octacosanol