

Šis dokuments ir tikai informatīvs, un tam nav juridiska spēka. Eiropas Savienības iestādes neatbild par tā saturu. Attiecīgo tiesību aktu un to preambulu autentiskās versijas ir publicētas Eiropas Savienības “Oficiālajā Vēstnesī” un ir pieejamas datubāzē “Eur-Lex”. Šie oficiāli spēkā esošie dokumenti ir tieši pieejami, noklikšķinot uz šajā dokumentā iegultajām saitēm

► **B****KOMISIJAS REGULA (EEK) Nr. 2568/91****(1991. gada 11. jūlijs)****par olīveļļas un olīvu izspaidu eļļas īpašībām un attiecīgajām analīzes metodēm**

(OV L 248, 5.9.1991., 1. lpp.)

Grozīta ar:

Oficiālais Vēstnesis

		Nr.	Lappuse	Datums
► <u>M1</u>	Komisijas Regula (EEK) Nr. 3682/91 (1991. gada 17. decembris)	L 349	36	18.12.1991.
► <u>M2</u>	Komisijas Regula (EEK) Nr. 1429/92 (1992. gada 26. maijs)	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>	Komisijas Regula (EEK) Nr. 3288/92 (1992. gada 12. novembris)	L 327	28	13.11.1992.
► <u>M6</u>	Komisijas Regula (EEK) Nr. 183/93 (1993. gada 29. janvāris)	L 22	58	30.1.1993.
► <u>M7</u>	grozīta ar Komisijas Regulu (EEK) Nr. 826/93 (1993. gada 6. aprīlis)	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>	Komisijas Regula (EK) Nr. 177/94 (1994. gada 28. janvāris)	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>	Komisijas Regula (EK) Nr. 656/95 (1995. gada 28. marts)	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>	Komisijas Regula (EK) Nr. 282/98 (1998. gada 3. februāris)	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>	Komisijas Regula (EK) Nr. 379/1999 (1999. gada 19. februāris)	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>	Komisijas Regula (EK) Nr. 1989/2003 (2003. gada 6. novembris)	L 295	57	13.11.2003.
► <u>M21</u>	Komisijas Regula (EK) Nr. 702/2007 (2007. gada 21. jūnijs)	L 161	11	22.6.2007.
► <u>M22</u>	Komisijas Regula (EK) Nr. 640/2008 (2008. gada 4. jūlijs)	L 178	11	5.7.2008.
► <u>M23</u>	Komisijas Regula (ES) Nr. 61/2011 (2011. gada 24. janvāris)	L 23	1	27.1.2011.
► <u>M24</u>	Komisijas Īstenošanas regula (ES) Nr. 661/2012 (2012. gada 19. jūlijs)	L 192	3	20.7.2012.

(*) Šis tiesību akts nekad nav publicēts latviešu valodā.

► <u>M25</u>	Komisijas Īstenošanas regula (ES) Nr. 299/2013 (2013. gada 26. marts)	L 90	52	28.3.2013.
► <u>M26</u>	Komisijas Īstenošanas regula (ES) Nr. 1348/2013 (2013. gada 16. decembris)	L 338	31	17.12.2013.
► <u>M27</u>	Komisijas Deleģētā regula (ES) 2015/1830 (2015. gada 8. jūlijs)	L 266	9	13.10.2015.
► <u>M28</u>	Komisijas Īstenošanas regula (ES) 2015/1833 (2015. gada 12. oktobris)	L 266	29	13.10.2015.
► <u>M29</u>	Komisijas Īstenošanas regula (ES) 2016/1227 (2016. gada 27. jūlijs)	L 202	7	28.7.2016.
► <u>M30</u>	Komisijas Īstenošanas regula (ES) 2016/1784 (2016. gada 30. septembris)	L 273	5	8.10.2016.
► <u>M31</u>	Komisijas Deleģētā regula (ES) 2016/2095 (2016. gada 26. septembris)	L 326	1	1.12.2016.
► <u>M32</u>	Komisijas Īstenošanas regula (ES) 2019/1604 (2019. gada 27. septembris)	L 250	14	30.9.2019.

Labota ar:

- **C1** Kļūdu labojums, OV L 211, 17.8.2017., 58. lpp. (2016/2095)

▼B**KOMISIJAS REGULA (EEK) Nr. 2568/91****(1991. gada 11. jūlijs)****par olīveļļas un olīvu izspaidu eļļas īpašībām un attiecīgajām
analīzes metodēm****▼M20***1. pants*

1. Eļļas, kuru īpašības atbilst šīs regulas I pielikuma 1. un 2. punktā noteiktajām īpašībām, uzskata par neapstrādātām olīveļļām Regulas Nr. 136/66/EEK pielikuma 1. punkta a) un b) apakšpunkta nozīmē.

2. Eļļu, kuras īpašības atbilst šīs regulas I pielikuma 3. punktā noteiktajām īpašībām, uzskata par spīdīgo olīveļļu Regulas Nr. 136/66/EEK pielikuma 1. punkta c) apakšpunkta nozīmē.

3. Eļļu, kuras īpašības atbilst šīs regulas I pielikuma 4. punktā noteiktajām īpašībām, uzskata par rafinētu olīveļļu Regulas Nr. 136/66/EEK pielikuma 2. punkta nozīmē.

4. Eļļu, kuras īpašības atbilst šīs regulas I pielikuma 5. punktā noteiktajām īpašībām, uzskata par olīveļļu, kas sastāv no rafinētām olīveļļām un neapstrādātām olīveļļām Regulas Nr. 136/66/EEK pielikuma 3. punkta nozīmē.

5. Eļļu, kuras īpašības atbilst šīs regulas I pielikuma 6. punktā noteiktajām īpašībām, uzskata par neapstrādātu olīvu izspaidu eļļu Regulas Nr. 136/66/EEK pielikuma 4. punkta nozīmē.

6. Eļļu, kuras īpašības atbilst šīs regulas I pielikuma 7. punktā noteiktajām īpašībām, uzskata par rafinētu olīvu izspaidu eļļu Regulas Nr. 136/66/EEK pielikuma 5. punkta nozīmē.

7. Eļļu, kuras īpašības atbilst šīs regulas I pielikuma 8. punktā noteiktajām īpašībām, uzskata par olīvu izspaidu eļļu Regulas Nr. 136/66/EEK pielikuma 6. punkta nozīmē.

▼ **M26***2. pants*

1. Eļļas īpašības, kas paredzētas I pielikumā, nosaka saskaņā ar šādām analīzes metodēm:

- a) brīvās taukskābes, ko izsaka oleīnskābes procentos, nosaka ar II pielikumā izklāstīto metodi;
- b) peroksīda skaitli nosaka ar III pielikumā izklāstīto metodi;
- c) vaska saturu nosaka ar IV pielikumā izklāstīto metodi;
- d) sterīnu un triterpēndiolu sastāvu un saturu nosaka ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju saskaņā ar V pielikumā izklāstīto metodi;
- e) 2-glicerilmonopalmitāta saturu nosaka ar VII pielikumā izklāstīto metodi;
- f) spektrofotometriskajai analīzei izmanto IX pielikumā izklāstīto metodi;

▼ **M28**

- g) taukskābju sastāvu nosaka ar X pielikumā izklāstīto metodi;

▼ **M26**

- h) gaistošos halogenētos šķīdinātājus nosaka ar XI pielikumā izklāstīto metodi;
- i) neapstrādātas olīveļļas organoleptisko īpašību novērtēšanai izmanto XII pielikumā izklāstīto metodi;
- j) stigmastadiēnus nosaka ar XVII pielikumā izklāstīto metodi;
- k) triglicerīdu sastāva noteikšanai ar ECN42 izmanto XVIII pielikumā izklāstīto metodi;

▼ **M32**

- l) sterīnu sastāva un satura noteikšanai un spirtu savienojumu noteikšanai ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju izmanto XIX pielikumā izklāstīto metodi;

▼ **M26**

- m) vasku, taukskābju metilesteru un taukskābju etilesteru saturu nosaka ar XX pielikumā izklāstīto metodi.

▼ **M28**

▼ **M26**

- 2. Valstu iestāžu vai to pārstāvju pārbaudes attiecībā uz neapstrādātu eļļu organoleptiskajām īpašībām īsteno dalībvalstu apstiprinātas degustētāju žūrijas.

▼ M26

Pirmajā daļā minētās eļļas organoleptiskās īpašības atzīst par atbilstīgām deklarētajai kategorijai, ja dalībvalsts apstiprinātā žūrija apliecina eļļas šķiru.

▼ M32

Ja žūrija attiecībā uz organoleptiskajām īpašībām deklarēto kategoriju neaplicina, valsts iestādes vai to pārstāvji pēc ieinteresētās personas pieprasījuma nekavējoties organizē divus kontrolnovērtējumus, ko veic citas apstiprinātas žūrijas. Vismaz viena žūrija ir attiecīgās ražotājas dalībvalsts apstiprinātā žūrija. Attiecīgās īpašības atzīst par deklarētajām īpašībām atbilstošām, ja abi kontrolnovērtējumi apliecina deklarēto šķiru. Ja tas tā nav, neatkarīgi no kontrolnovērtējumos konstatēto defektu veida šķiru atzīst par attiecīgajām īpašībām neatbilstošu, un ieinteresētā persona sedz kontrolnovērtējumu izmaksas.

▼ M26

3. Kad valstu iestādes vai to pārstāvji pārbauda eļļas īpašības atbilstīgi 1. punktam, paraugus ņem saskaņā ar starptautisko standartu EN ISO 661 par paraugu sagatavošanu analīzēm un EN ISO 5555 par paraugu ņemšanu. Tomēr neatkarīgi no standarta EN ISO 5555 6.8. punkta, ja šādas eļļu partijas ir tiešajā iepakojumā, paraugu ņem saskaņā ar šīs regulas Ia pielikumu. Nefasētas eļļas gadījumā, kad paraugus nevar noņemt saskaņā ar EN ISO 5555, tos ņem saskaņā ar dalībvalsts kompetentās iestādes norādījumiem.

Neskarot standartu EN ISO 5555 un standarta EN ISO 661 6. nodaļu, noņemtos paraugus pēc iespējas ātrāk novieto tumšā vietā, nepieļaujot spēcīgu karstuma avotu iedarbību, un nosūta uz laboratoriju analīzes veikšanai ne vēlāk kā piektajā darb dienā pēc to noņemšanas, pretējā gadījumā paraugus glabā tā, lai nepazeminātos to kvalitāte vai lai tie netiktu sabojāti transportēšanas vai glabāšanas laikā pirms nosūtīšanas uz laboratoriju.

4. Lai veiktu 3. punktā paredzētās pārbaudes, II, III, IX, XII un XX pielikumā minētās analīzes un, attiecīgā gadījumā, visas kontrolanalīzes, kas nepieciešamas saskaņā ar valsts tiesību aktiem, iepakotu produktu gadījumā veic pirms minimālā derīguma termiņa beigām. Ja paraugus ņem no nefasētas eļļas, šīs analīzes veic ne vēlāk kā sestajā mēnesī pēc mēneša, kurā ņemts paraugs.

Citām šajā regulām paredzētajām analīzēm laika ierobežojumu nepiemēro.

Ja analīžu rezultāti neatbilst olīveļļas vai olīvu izspaidu eļļas deklarētās kategorijas īpašībām, attiecīgajai personai paziņo ne vēlāk kā vienu mēnesi pirms pirmajā daļā noteiktā perioda beigām, ja vien paraugs netika ņemts mazāk nekā divus mēnešus pirms minimālā derīguma termiņa.

▼ M26

5. Lai noteiktu olīveļļu īpašības ar 1. punkta pirmajā daļā paredzētajām metodēm, analīžu rezultātus tieši salīdzina ar šajā regulā noteiktajām robežvērtībām.

▼ M25*2.a pants*

1. Šajā pantā jēdziens “pārdotā olīveļļa” nozīmē to attiecīgās dalībvalsts olīveļļas un olīvu izspaidu eļļas kopējo daudzumu, kas ir patērēts šajā dalībvalstī vai eksportēts no šīs dalībvalsts.

2. Dalībvalstis nodrošina, ka atbilstības pārbaudes notiek izlases veidā, pamatojoties uz riska analīzi, un pietiekami bieži, lai nodrošinātu, ka pārdotā olīveļļa atbilst deklarētajai kategorijai.

3. Kritēriji riska novērtēšanai var būt šādi:

a) eļļas kategorija, ražošanas periods, eļļas cena salīdzinājumā ar citu augu eļļu cenu, jaukšanas un iepakšanas operācijas, glabātavas un glabāšanas apstākļi, izcelsmes valsts, galamērķa valsts, transporta veids vai partijas apjoms;

b) uzņēmumu pozīcija tirgus ķēdē, uzņēmumu tirgotās produkcijas apjoms un/vai vērtība, tirgots eļļas kategoriju klāsts, veiktā saimnieciskā darbība, piemēram, malšana, glabāšana, rafinēšana, sajaukšana, iepakšana vai mazumtirdzniecība;

c) iepriekšējo pārbažu rezultāti, tai skaitā atklāto defektu skaits un veids, pārdotās eļļas parastā kvalitāte, izmantotā tehniskā aprīkojuma līmenis;

d) uzņēmumu kvalitātes nodrošinājuma sistēmu vai pašpārbaudes sistēmu uzticamība attiecībā uz atbilstību tirdzniecības standartiem;

e) pārbaudes norises vieta, jo īpaši, ja tā ir pirmā produkcijas ieviešanas vieta Savienībā, pēdējā izvešanas vieta no Savienības vai vieta, kur notiek eļļu ražošana, iepakšana, iekraušana vai pārdošana galapatērētājam;

f) visa citu informācija, kas var liecināt par neatbilstības risku.

4. Dalībvalstis jau iepriekš nosaka:

a) kritērijus partiju neatbilstības riska noteikšanai;

b) pamatojoties uz riska analīzi katrai riska kategorijai, minimālo uzņēmumu skaitu vai partiju skaitu un/vai daudzumu, kam veiks atbilstības pārbaudi.

▼ M25

Gadā veic vismaz vienu atbilstības pārbaudi katrām tūkstoš tonnām olīveļļas, ko pārdod dalībvalstī.

5. Dalībvalstis atbilstību pārbauda:

a) jebkādā kārtībā veicot analīzes, kas paredzētas I pielikumā; vai

▼ M32

b) secībā, kas noteikta Ib pielikumā iekļautajā plūsmkartē, līdz tiek sasniegts viens no plūsmkartē norādītajiem lēmumiem.

▼ M19**▼ M25***3. pants*

Ja konstatē, ka kāda eļļa neatbilst tās kategorijas aprakstam, attiecīgā dalībvalsts, neskarot jebkādas citas sankcijas, piemēro efektīvas, samērīgas un preventīvas sankcijas, kas nosakāmas atkarībā no atklātā pārkāpuma smaguma.

Ja pārbaudēs konstatē būtiskus pārkāpumus, dalībvalstis palielina pārbaudīto biežumu attiecībā uz pārdošanas posmu, eļļas kategoriju, izcelsmi vai citiem kritērijiem.

▼ M5*4. pants***▼ 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. Ja dalībvalstīm rodas grūtības izveidot savā teritorijā degustēšanas žūrijas, tās var pieaicināt degustēšanas žūriju, kas apstiprināta kādā citā dalībvalstī.

3. Katra dalībvalsts izveido degustētāju žūriju sarakstu, ko veido profesionālās vai starpnozaru organizācijas saskaņā ar 1. punktā izklāstītajiem nosacījumiem, un nodrošina šo nosacījumu izpildi.

▼ M19**▼ B***6. pants*

1. Raušu un citu olīveļļas ieguves izspaidu (KN kodi 2306 90 11 un 2306 90 19) eļļas saturu nosaka ar XV pielikumā izklāstīto metodi.

▼ B

2. Šā panta 1. punktā minēto eļļas saturu izsaka eļļas svara procentos no sausā materiāla svara.

▼ M20*7. pants*

Piemēro Kopienas noteikumus, kas attiecas uz piemaisījumu klātbūtni.

Attiecībā uz halogenētiem šķīdinātājiem ierobežojumi visām olīveļļu kategorijām ir šādi:

- katra konstatētā halogenētā šķīdinātāja maksimālais saturs: 0,1 mg/kg,
- konstatēto halogenēto šķīdinātāju kopējais maksimālais saturs: 0,2 mg/kg.

▼ M25*7.a pants*

Fiziskām vai juridiskām personām vai personu grupām, kas jebkādos profesionālos vai komerciālos nolūkos glabā olīveļļu un olīvu izspaidu eļļu ražošanas posmos no eļļas ekstrakcijas spiestuvē līdz tās iepildīšanai pudelēs (ieskaitot), ir jākārtoto ieviešanas un izvešanas reģistrs par katru šādu eļļas kategoriju.

Dalībvalsts nodrošina, ka pirmajā daļā paredzētais pienākums tiek pienācīgi pildīts.

8. pants

1. Dalībvalstis paziņo Komisijai par šīs regulas īstenošanas pasākumiem. Tās informē Komisiju par visiem turpmākajiem grozījumiem.
2. Ne vēlāk kā katra gada 31. maijā dalībvalstis nosūta Komisijai ziņojumu par šīs regulas piemērošanu iepriekšējā kalendāra gada laikā. Ziņojumā iekļauj vismaz olīveļļas atbilstības pārbaūžu rezultātus saskaņā ar XXI pielikumā ietverto paraugu.
3. Šajā Regulā minētos paziņojumus sniedz saskaņā ar Komisijas Regulu (EK) Nr. 792/2009 ⁽¹⁾.

▼ B*9. pants*

Ar šo ir atcelta Regula (EEK) Nr. 1058/77.

10. pants

1. Šī regula stājas spēkā trešajā dienā pēc tās publicēšanas *Eiropas Kopienu Oficiālajā Vēstnesī*.

Tomēr XII pielikumā izklāstīto metodi piemēro ► **M1** no 1992. gada 1. novembra ◀, ja vien darbības neattiecas uz intervences sistēmu.

⁽¹⁾ OV L 228, 1.9.2009., 3. lpp.

▼ **M5**

Metode neattiecas uz neapstrādātu olīveļļu, kas sagatavota tirgum pirms 1992. gada 1. novembra.

▼ **B**

2. Šo regulu nepiemēro olīveļļai un olīvu izspaidu eļļai, kas ir iepakota pirms šīs regulas stāšanās spēkā un laista tirgū līdz 1992. gada 31. oktobrim.

Šī regula ir saistoša kopumā un tieši piemērojama visās dalībvalstīs.

▼ **M32***PIELIKUMI***KOPSAVILKUMS**

I pielikums	Olīveļļas īpašības
Ia pielikums	Paraugu ņemšana no olīveļļas vai olīvu izspaidu eļļas, kas piegādāta tiešā iepakojumā
Ib pielikums	Plūsmkarte, ko izmanto, lai verificētu olīveļļas parauga atbilstību deklarētajai kategorijai
II pielikums	Brīvo taukskābju noteikšana pēc aukstās metodes
III pielikums	Peroksīda skaitļa noteikšana
IV pielikums	Vasku satura noteikšana ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju
VII pielikums	2-glicerilmonopalmitāta satura noteikšana
IX pielikums	Spektrofotometriskā analīze UV spektrā
X pielikums	Taukskābju metilesteru noteikšana ar gāzu hromatogrāfiju
XI pielikums	Gaistošo halogenēto šķīdinātāju noteikšana olīveļļā
XII pielikums	Starptautiskās Olīvu padomes metode, ko piemēro neapstrādātas olīveļļas organoleptiskajai novērtēšanai
XV pielikums	Eļļas saturs olīvu izspaidās
XVI pielikums	Joda skaitļa noteikšana
XVII pielikums	Stigmastadiēnu noteikšanas metode augu eļļās
XVIII pielikums	Faktiskā un teorētiskā triglicerīdu ar ECN 42 satura starpības noteikšana
XIX pielikums	Sterīnu sastāva un satura un spirtu savienojumu noteikšana ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju
XX pielikums	Vasku, taukskābju metilesteru un taukskābju etilesteru satura noteikšana ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfijas metodi
XXI pielikums	Saskaņā ar 8. panta 2. punktu veikto olīveļļas atbilstības pārbažu rezultāti

I PIELIKUMS

OLĪVEĻĻAS ĪPAŠĪBAS

Kvalitāte

Kategorija	Skābums (%) (*)	Peroksīda skaitlis (mekv. O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₆₈ vai K ₂₇₀	Delta-K	Organoleptiskais novērtējums		Taukskābju etilesteri (mg/kg)
						Defektu mediāna (Md) (*)	Augļainuma mediāna (Mf)	
1. Neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Neapstrādāta olīveļļa	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Spīdīgā olīveļļa	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 (1)	—	—
4. Rafinēta olīveļļa	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16	—	—	—
5. Olīveļļa, kas sastāv no rafinētas olīveļļas un neapstrādātām olīveļļām	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15	—	—	—
6. Neattīrīta olīvu izspaidu eļļa	—	—	—	—	—	—	—	—
7. Rafinēta olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—	—
8. Olīvu izspaidu eļļa	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—	—

(1) Defektu mediāna var būt mazāka vai vienāda ar 3,5, ja augļainuma mediāna ir vienāda ar 0,0.

Tīrība

Kategorija	Taukskābju sastāvs ⁽¹⁾						Kopā transoleīnskābes izomēri (%)	Kopā translinolskābes un translinolēnskābes izomēri (%)	Stigmastadiēni (mg/kg) ⁽²⁾	Starpība: ECN42 (HPLC) un ECN42 (teorētiskais aprēķins)	2-glicerilmonopalmitāts (%)
	Mirisīnskābe (%)	Linolēnskābe (%)	Arahīnskābe (%)	Eikozēnskābe (%)	Behēnskābe (%)	skābe (%)					
1. Neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9, ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14,00 %
											≤ 1,0, ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14,00 %
2. Neapstrādāta olīveļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9, ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14,00 %
											≤ 1,0, ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14,00 %
3. Spīdīgā olīveļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,9, ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14,00 %
											≤ 1,1, ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14,00 %
4. Rafinēta olīveļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9, ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14,00 %
											≤ 1,1, ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14,00 %
5. Olīveļļa, kas sastāv no rafinētas olīveļļas un neapstrādātām olīveļļām	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9, ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14,00 %
											≤ 1,0, ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14,00 %

▼ M32

Kategorija	Taukskābju sastāvs ⁽¹⁾						Kopā transoleīnskābes izomēri (%)	Kopā translinolēnskābes un translinolēnskābes izomēri (%)	Stigmastadiēni (mg/kg) ⁽²⁾	Starpība: ECN42 (HPLC) un ECN42 (teorētiskais aprēķins)	2-glicerilmonopalmitāts (%)
	Miristīnskābe (%)	Linolēnskābe (%)	Arahīnskābe (%)	Eikozēnskābe (%)	Behēnskābe (%)	skābe (%)					
6. Neattīrīta olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ 0,60	≤ 1,4
7. Rafinēta olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,4
8. Olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,2

⁽¹⁾ Pārējo taukskābju saturs (%): palmitīnskābe: 7,50–20,00; palmitoleīnskābe: 0,30–3,50; heptadekānskābe: ≤ 0,40; heptadecēnskābe: ≤ 0,60; stearīnskābe: 0,50–5,00; oleīnskābe: 55,00–83,00; linolēnskābe: 2,50–21,00.

⁽²⁾ Kapilārajā kolonnā atdalāmo (vai neatdalāmo) izomēru summa.

Kategorija	Sterīnu sastāvs						Kopā sterīni (mg/kg)	Eritrodiols un uvaols (%) ^(**)	Vaski (mg/kg) ^(**)
	Holesterīns (%)	Brasikasterīns (%)	Kampestērīns ⁽¹⁾ (%)	Stigmasterīns (%)	Nosac. β-sitos-terīns ⁽²⁾ (%)	Delta-7-stigma-sterīns ⁽¹⁾ (%)			
1. Neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Neapstrādāta olīveļļa	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Spīdīgā olīveļļa	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 300$ ⁽³⁾
4. Rafinēta olīveļļa	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$

▼ M32

Kategorija	Sterīnu sastāvs						Kopā sterīni (mg/kg)	Eritrodiols un uvaols (%) (**)	Vaski (mg/kg) (**)
	Holesterīns (%)	Brasikasterīns (%)	Kampesterīns ⁽¹⁾ (%)	Stigmasterīns (%)	Nosac. β-sitosterīns ⁽²⁾ (%)	Delta-7-stigmasterīns ⁽¹⁾ (%)			
5. Olīveļļa, kas sastāv no rafinētas olīveļļas un neapstrādātām olīveļļām	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Neattīrīta olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ ⁽⁴⁾
7. Rafinēta olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

⁽¹⁾ Skatīt šā pielikuma papildinājumu.

⁽²⁾ Nosacītais β-sitosterīns: delta-5,23-stigmastadienols+klerosterīns+beta-sitosterīns+sitostanols+delta-5-avenasterīns+delta-5,24-stigmastadienols.

⁽³⁾ Eļļas ar vasku saturu no 300 mg/kg līdz 350 mg/kg uzskata par spīdīgajām olīveļļām, ja alifātisko spirtu kopējais saturs ir zemāks par vai vienāds ar 350 mg/kg vai ja eritrodiola un uvaola saturs ir zemāks par vai vienāds ar 3,5 %.

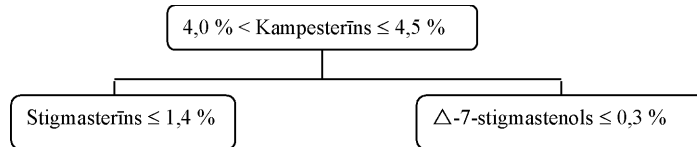
⁽⁴⁾ Eļļas ar vasku saturu no 300 mg/kg līdz 350 mg/kg uzskata par neattīrītām olīvu izspaidu eļļām, ja alifātisko spirtu kopējais saturs ir augstāks par 350 mg/kg un ja eritrodiola un uvaola saturs ir augstāks par 3,5 %.

Piezīmes

- Analīžu rezultāti jāuzrāda ar tādu pašu decimālzīmju skaitu aiz komata kā attiecīgās īpašības skaitliskā vērtība. Pēdējais cipars jānoapaļo uz augšu, ja nākamais cipars, kas jāatmet, ir lielāks par 4.
- Ja kaut viena īpašība norādītajām vērtībām neatbilst, šīs regulas piemērošanas vajadzībām eļļas kategoriju var mainīt vai deklarēt eļļu par kategorijai neatbilstīgu.
- Spīdīgās olīveļļas gadījumā abas kvalitātes īpašības, kas apzīmētas ar zvaigznīti (*), drīkst vienlaikus atšķirties no attiecīgajai kategorijai noteiktajām robežvērtībām.
- Ja īpašība ir atzīmēta ar divām zvaigznītēm (**), neattīrītas olīvu izspaidu eļļas gadījumā tas nozīmē, ka abas attiecīgās robežvērtības drīkst vienlaikus atšķirties no norādītajām vērtībām. Olīvu izspaidu eļļas un rafinētas olīvu izspaidu eļļas gadījumā tas nozīmē, ka viena no attiecīgajām robežvērtībām drīkst atšķirties no norādītajām vērtībām.

▼ **M32***Papildinājums***Lēmumu pieņemšanas shēmas**

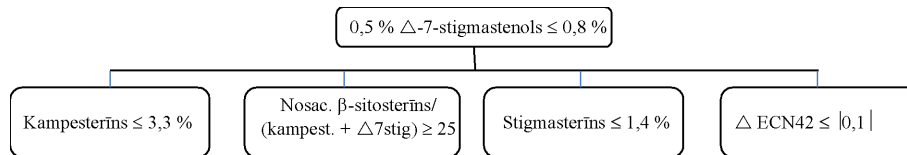
Kampesterīna lēmumu pieņemšanas shēma attiecībā uz neapstrādātu olīveļļu un neapstrādātu augstākā labuma olīveļļu



Pārējie parametri atbilst šajā regulā noteiktajām robežvērtībām.

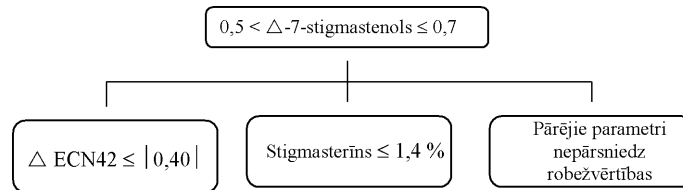
Delta-7-stigmasterīna lēmumu pieņemšanas shēma attiecībā uz:

— neapstrādātu augstākā labuma olīveļļu un neapstrādātu olīveļļu



Pārējie parametri atbilst šajā regulā noteiktajām robežvērtībām.

— olīvu izspaidu eļļu (neatīrītu un rafinētu)



Pārējie parametri atbilst šajā regulā noteiktajām robežvērtībām.

▼ **M26***Ia PIELIKUMS***PARAUGU ŅEMŠANA NO OLĪVEĻĻAS VAI OLĪVU IZSPAIDU EĻĻAS, KAS PIEGĀDĀTA TIEŠĀ IEPAKOJUMĀ**

Šo paraugu ņemšanas metodi piemēro olīveļļas vai olīvu izspaidu eļļas partijām, kas iesaiņotas tiešā iepakojumā. Atkarībā no tā, vai tiešā iepakojuma tilpums pārsniedz vai nepārsniedz 5 litrus, piemēro atšķirīgas paraugu ņemšanas metodes.

“Partija” ir tādu pārdošanas vienību kopums, kas ražotas, izgatavotas un iepakotas tādos apstākļos, ka eļļu, kuru satur katra pārdošanas vienība, attiecībā uz visām analītiskajām īpašībām uzskata par viendabīgu. Partijas individualizēšana ir jāveic saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Direktīvu 2011/91/ES ⁽¹⁾.

“Parauga vienība” ir eļļas daudzums, ko satur tiešais iepakojums un kas paņemts no nejauši izvēlētas partijas vietas.

1. PRIMĀRO PARAUGU SATURS**1.1. Tiešais iepakojums, kura tilpums nepārsniedz 5 litrus**

“Primārais paraugs” no tiešā iepakojuma, kura tilpums nepārsniedz 5 litrus, ir parauga vienības, kas paņemtas no partijas atbilstīgi 1. tabulai.

*1. tabula***Primārā parauga minimālajam lielumam jāatbilst turpmāk norādītajam**

Ja tiešā iepakojuma tilpums ir	Primārajā paraugā jābūt eļļai no
a) 1 litrs vai vairāk	a) 1 tiešā iepakojuma
b) mazāk par 1 litru	b) minimālā skaita iepakojumu ar kopējo tilpumu vismaz 1,0 litrs

Katra dalībvalsts atkarībā no savām vajadzībām (piemēram, organoleptiskajam novērtējumam citā laboratorijā, nevis tajā, kas veica ķīmisko analīzi, kontrolanalīzi utt.) var palielināt 1. tabulā minēto iepakojumu skaitu, kurš veido primāro paraugu.

1.2. Tiešais iepakojums, kura tilpums pārsniedz 5 litrus

“Primārais paraugs” no tiešā iepakojuma, kura tilpums pārsniedz 5 litrus, ir visu parauga vienību reprezentatīva daļa, kas iegūta samazināšanas procesā atbilstīgi 2. tabulai. Primārajā paraugā ir jābūt vairākiem piemēriem.

Primārā parauga “piemērs” ir ikviens iepakojums, kas ietilpst primārajā paraugā.

*2. tabula***Atlasāmo parauga vienību minimālais skaits**

Iepakojumu skaits sērijā	Atlasāmo parauga vienību minimālais skaits
Līdz 10	1
No ... 11 līdz 150	2

⁽¹⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes 2011. gada 13. decembra Direktīva 2011/91/ES par norādēm vai zīmēm, kas identificē pārtikas produkta partiju (OV L 334, 16.12.2011., 1. lpp.).

▼ **M26**

Iepakojumu skaits sērijā	Atlasāmo parauga vienību minimālais skaits
No ... 151 līdz 500	3
No ... 501 līdz 1 500	4
No ... 1 501 līdz 2 500	5
> 2 500; uz 1 000 iepakojumiem	vēl 1 parauga vienība

Lai samazinātu tiešo iepakojumu parauga tilpumu, parauga vienību saturu homogenizē, lai sagatavotu primāro paraugu. Dažādu parauga vienību porcijas, pēc iespējas labāk aizsargājot no gaisa ietekmes, ielej kopīgā tvertnē, kurā tās maisot homogenizē.

Primārā parauga saturs ir jāielej vairākos iepakojumos ar minimālo tilpumu 1,0 litrs, un katrs no tiem ir primārā parauga piemērs.

Katra dalībvalsts atkarībā no savām vajadzībām (piemēram, organoleptiskajam novērtējumam citā laboratorijā, nevis tajā, kas veica ķīmisko analīzi, kontrolanalīzi utt.) var palielināt primāro paraugu skaitu.

Visi iepakojumi ir jāpiepilda tā, lai pēc iespējas samazinātu gaisa virsslāni, un atbilstīgi jānoslēdz un jāaizplombē, lai nodrošinātu produkta aizsardzību pret iejaukšanos.

Šie piemēri ir jāmērķē, lai nodrošinātu pareizu identificēšanu.

2. ANALĪZES UN REZULTĀTI

▼ **M32**

- 2.1. Katrs primārais paraugs ir jāsadala laboratorijas paraugos saskaņā ar standarta EN ISO 5555 2.5. punktu un jāanalizē Ib pielikumā iekļautajā plūsmkartē noteiktajā secībā vai jebkādā citā nejausi izvēlētajā secībā.

▼ **M26**

- 2.2. Ja visi analīžu rezultāti atbilst eļļas deklarētās kategorijas īpašībām, visu partiju atzīst par atbilstīgu.

Ja kaut viens analīžu rezultāts neatbilst eļļas deklarētās kategorijas īpašībām, visu partiju atzīst par neatbilstīgu.

3. PARTIJAS KATEGORIJAS PĀRBAUDE

- 3.1. Lai pārbaudītu partijas kategoriju, kompetentā iestāde saskaņā ar turpmāk norādīto tabulu var palielināt primāro paraugu skaitu, ko ņem no dažādām partijas vietām.

3. tabula

Primāro paraugu skaits atkarībā no partijas lieluma

Partijas lielums (litri)	Primāro paraugu skaits
Mazāk par 7 500	2
No 7 500 līdz mazāk par 25 000	3
No 25 000 līdz mazāk par 75 000	4
No 75 000 līdz mazāk par 125 000	5
125 000 un vairāk	6 + 1 par katriem nākamajiem 50 000 litriem

▼ **M26**

Katra primārā parauga vienība ir jāņem no turpmākas vietas partijā; ir jāievēro katra primārā parauga vieta, un tā ir skaidri jāidentificē.

Visi primārie paraugi ir jāgatavo saskaņā ar 1.1. un 1.2. punktā minētajām procedūrām.

Pēc tam katram primārajam paraugam veic 2. panta 1. punktā minētās analīzes.

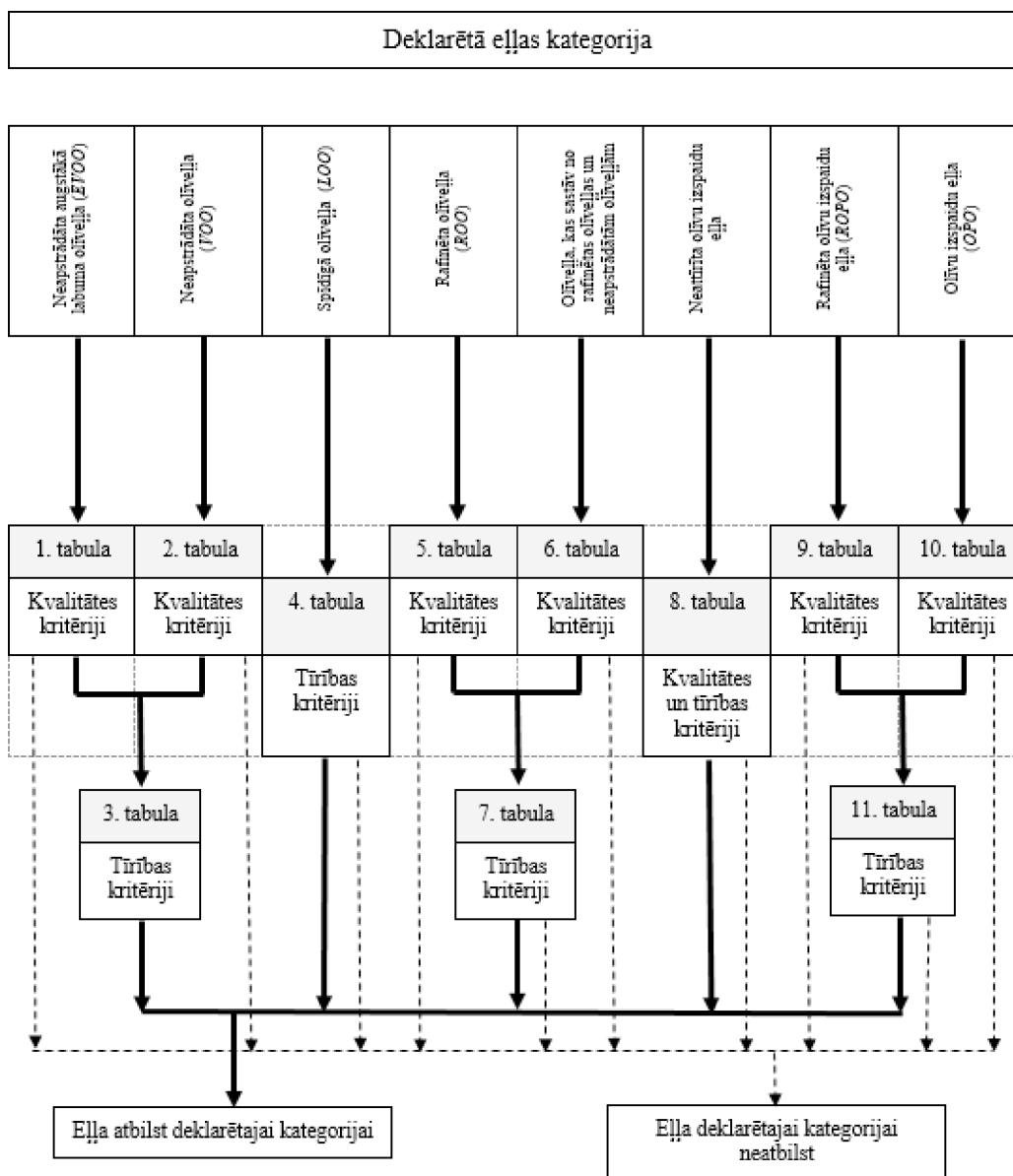
- 3.2. Ja viens no 2. panta 1. punktā minēto analīžu rezultātiem attiecībā uz vismaz vienu primāro paraugu neatbilst eļļas deklarētās kategorijas īpašībām, visu partiju atzīst par neatbilstīgu.

▼ M32

Ib PIELIKUMS

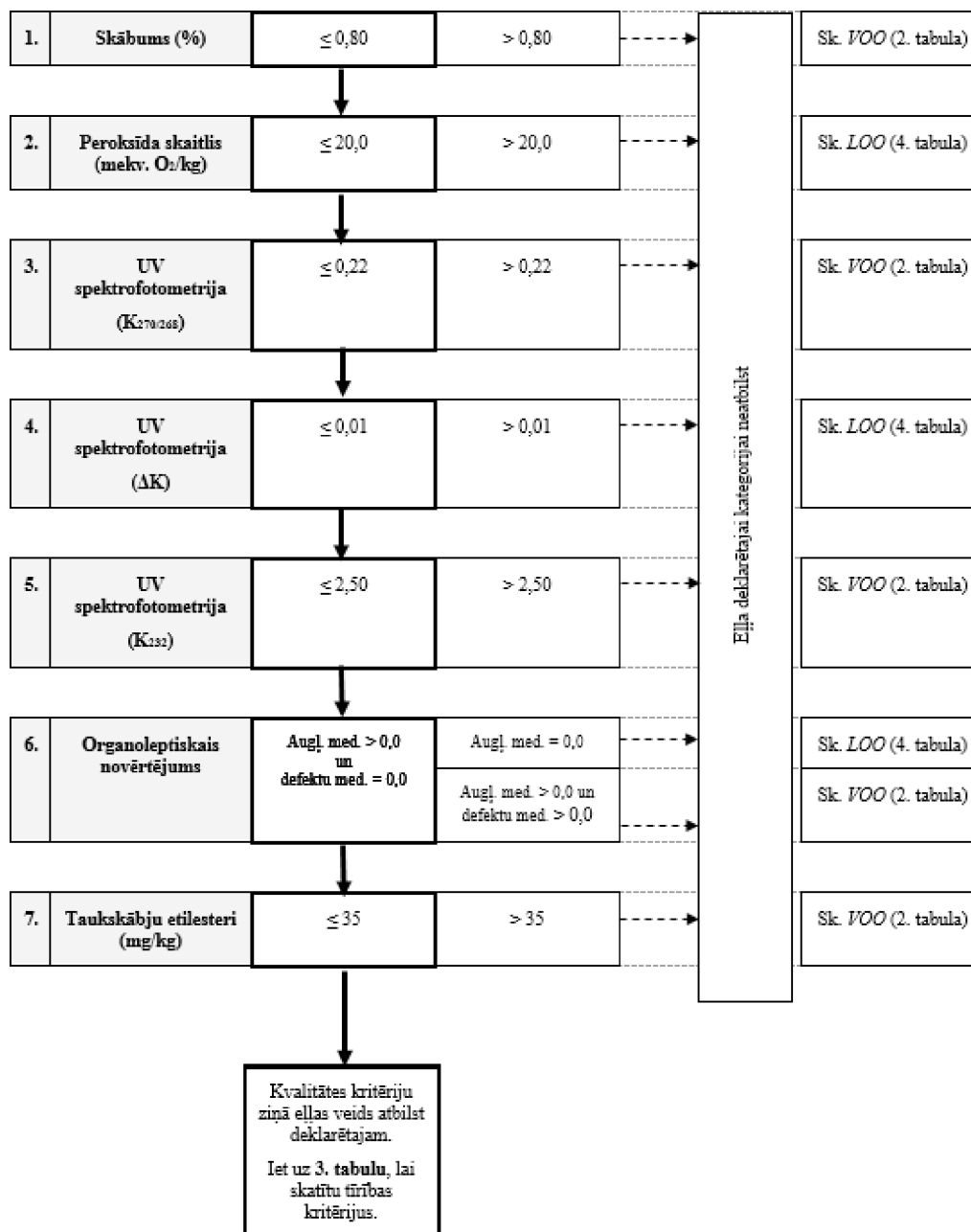
PLŪSMKARTE, KO IZMANTO, LAI VERIFICĒTU OLĪVELĻAS
PARAUGA ATBILSTĪBU DEKLARĒTAJAI KATEGORIJAI

Vispārīgā tabula



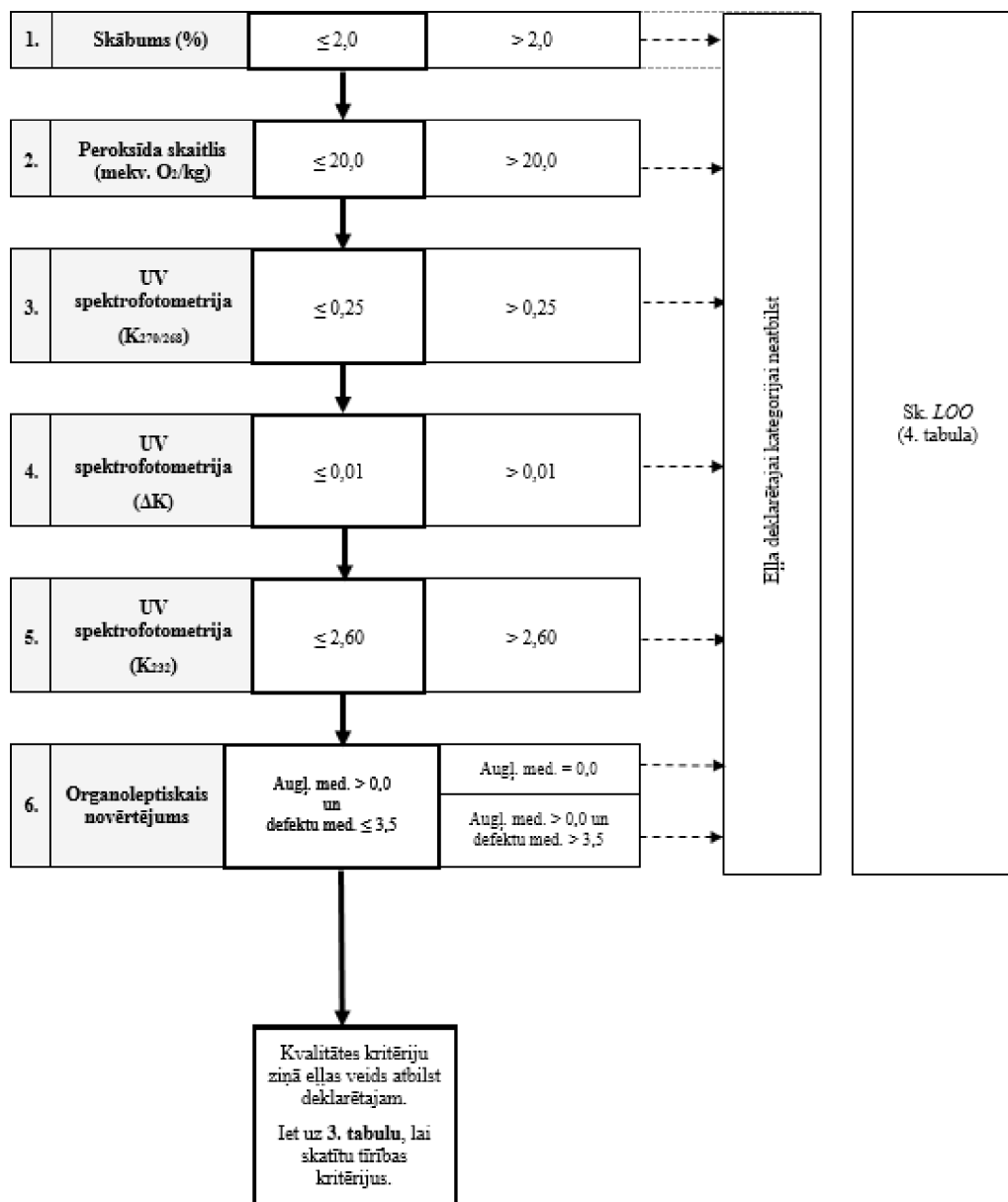
▼ M32

1. tabula. Neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa: kvalitātes kritēriji



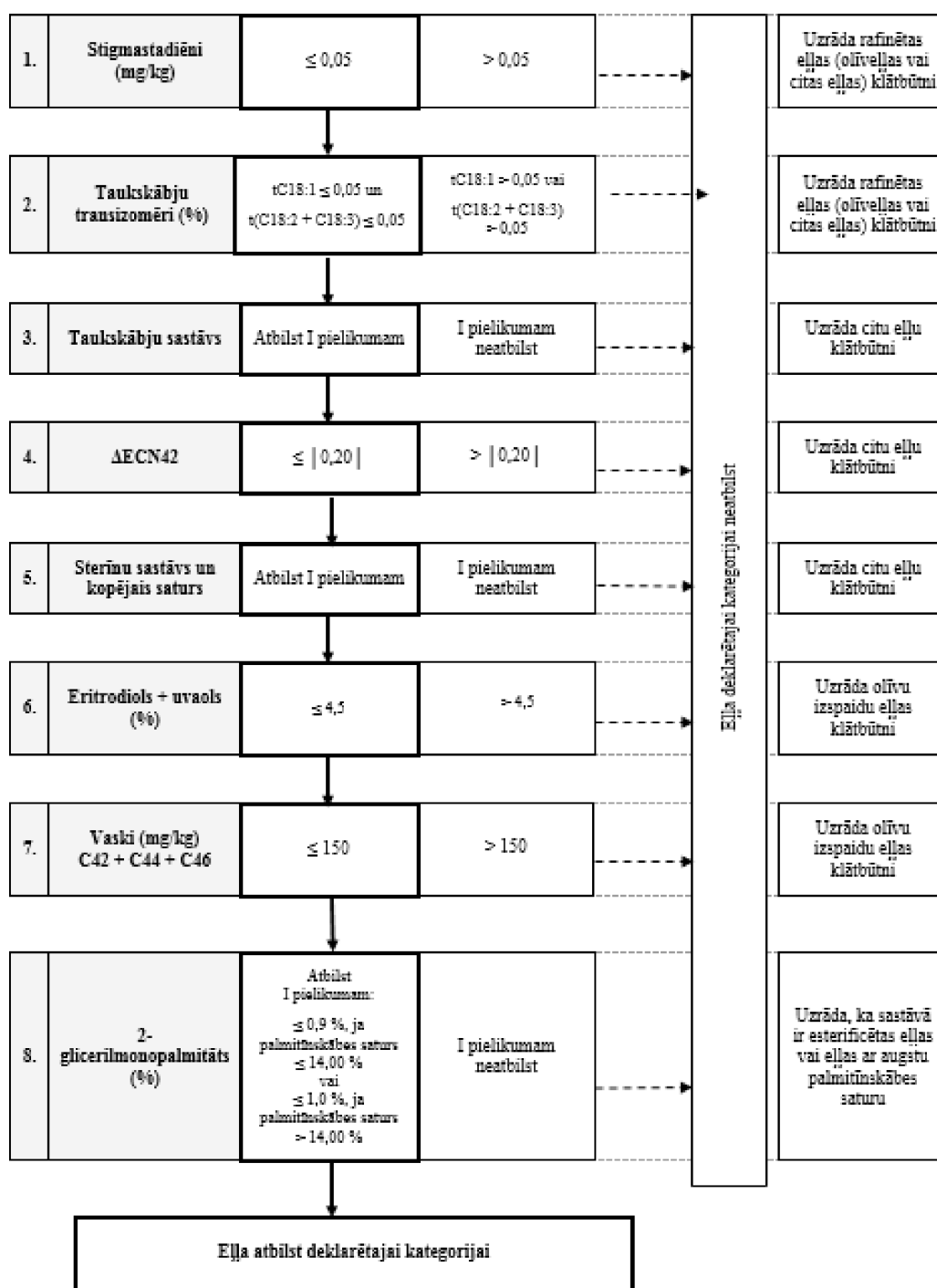
▼ M32

2. tabula. Neapstrādāta olīveļļa: kvalitātes kritēriji



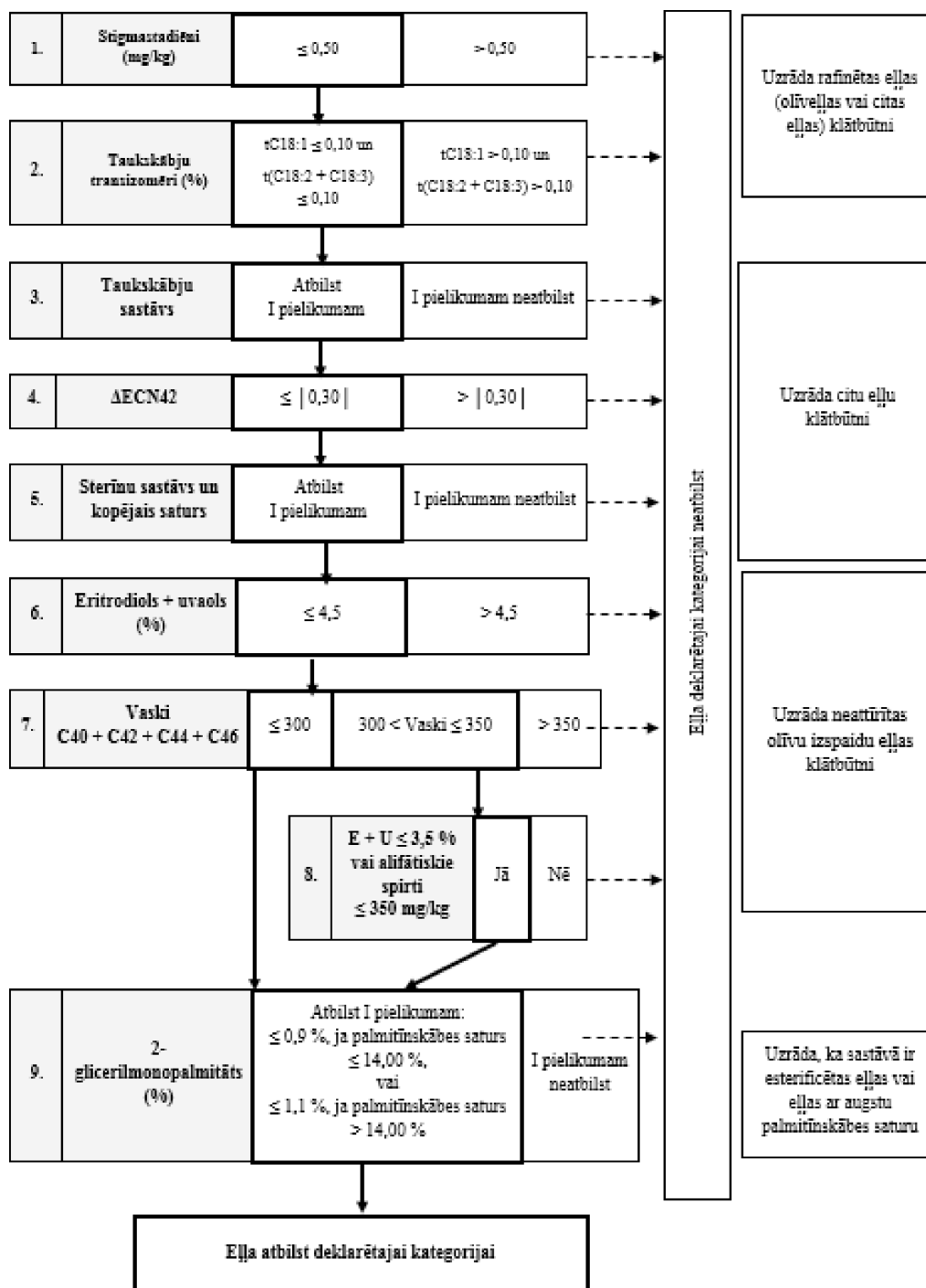
▼ M32

3. tabula. Neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa un neapstrādāta olīveļļa: tīrības kritēriji



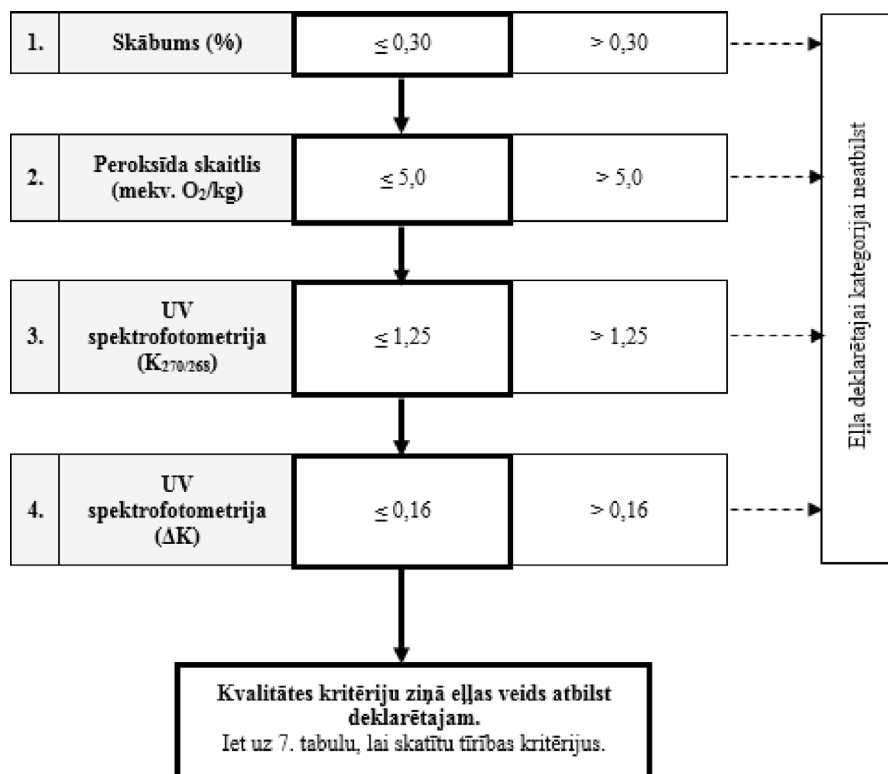
▼ M32

4. tabula. Spīdīgā olīveļļa: tīrības kritēriji

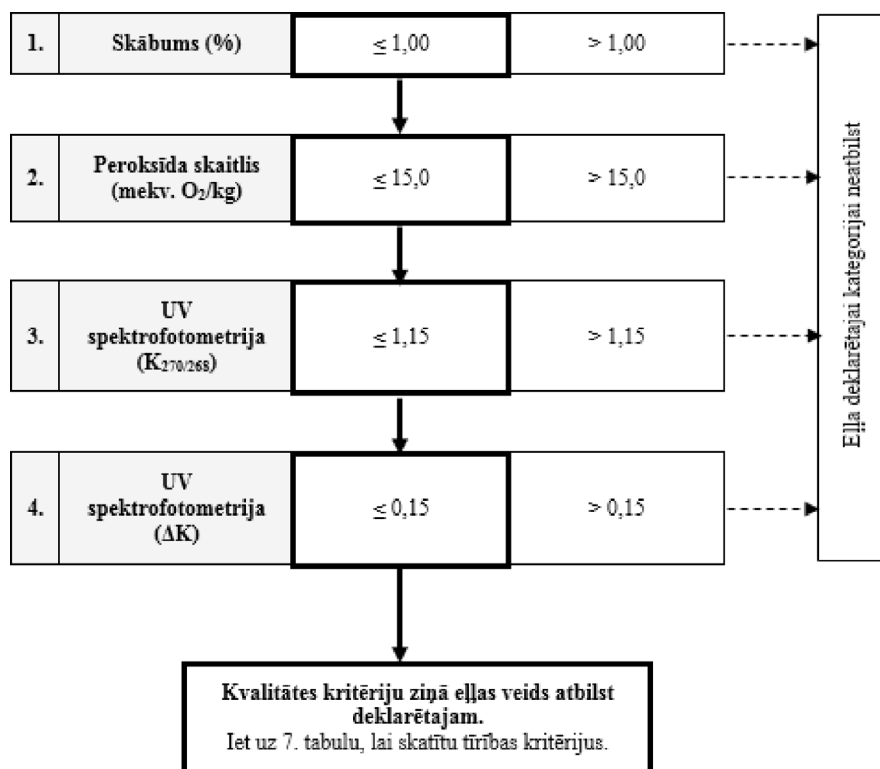


▼ M32

5. tabula. Rafinēta olīveļļa: kvalitātes kritēriji

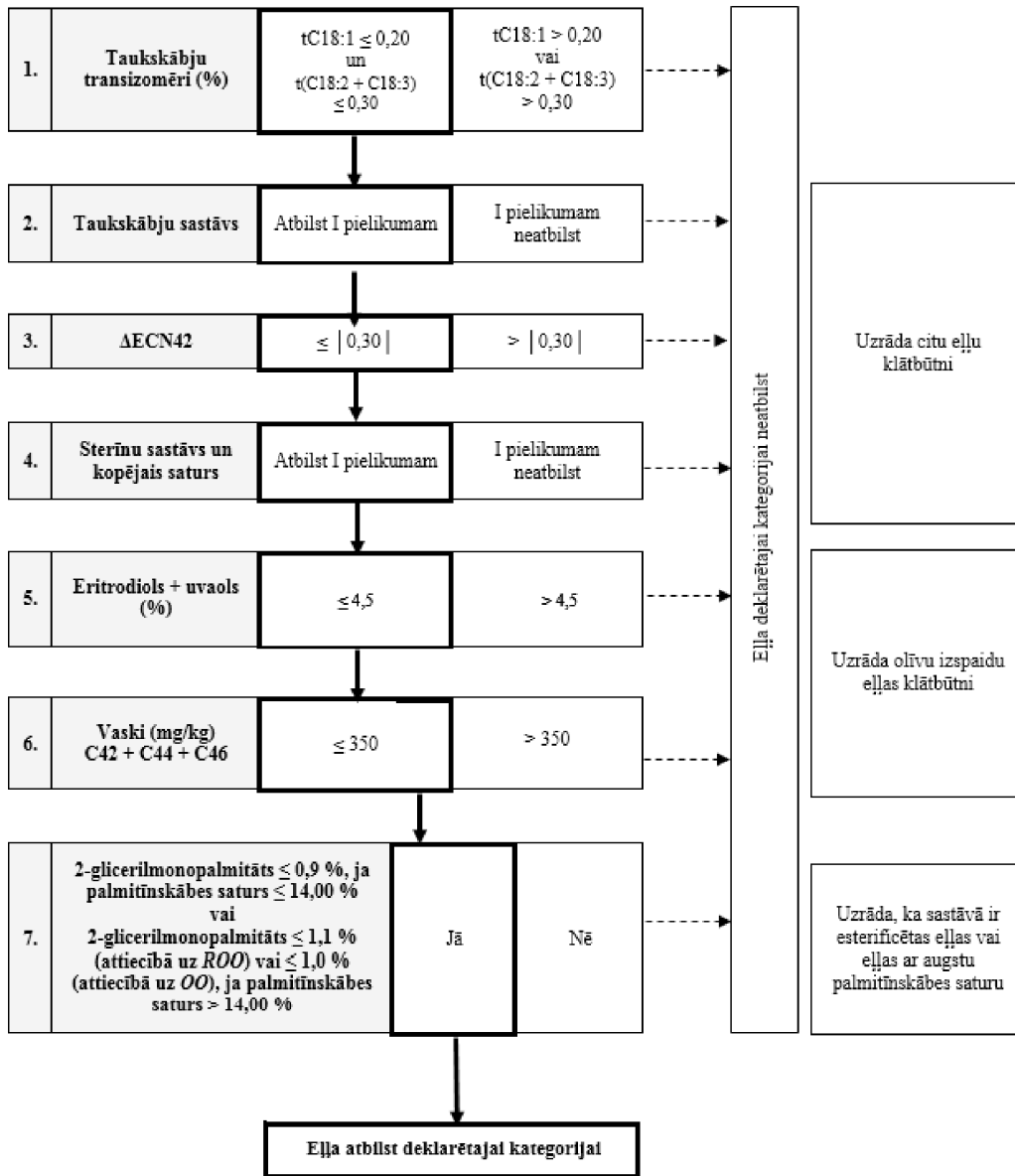


6. tabula. Olīveļļa, kas sastāv no rafinētas olīveļļas un neapstrādātām olīveļļām: kvalitātes kritēriji



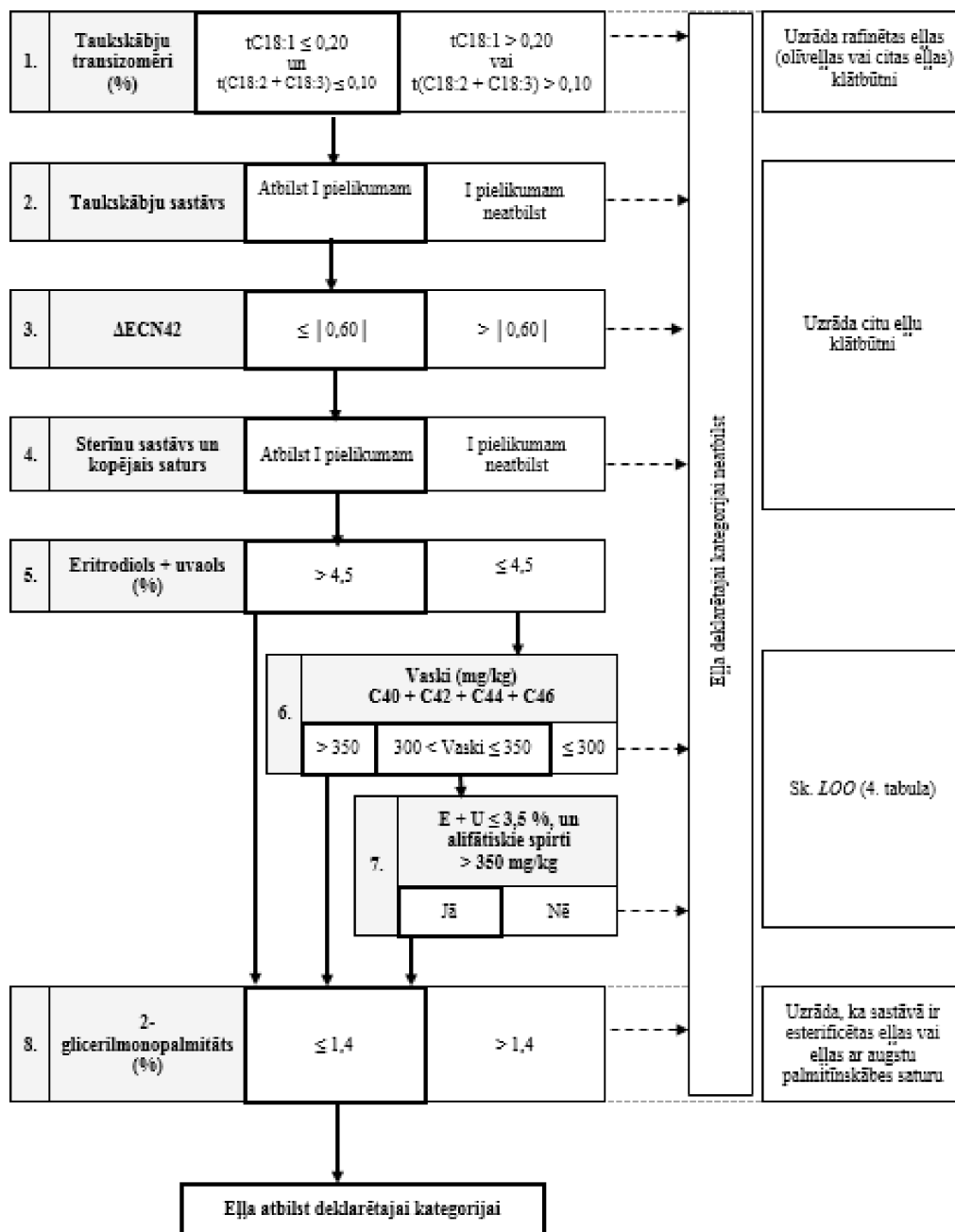
▼ M32

7. tabula. Rafinēta olīveļļa un olīveļļa, kas sastāv no rafinētas olīveļļas un neapstrādātām olīveļļām: tīrības kritēriji



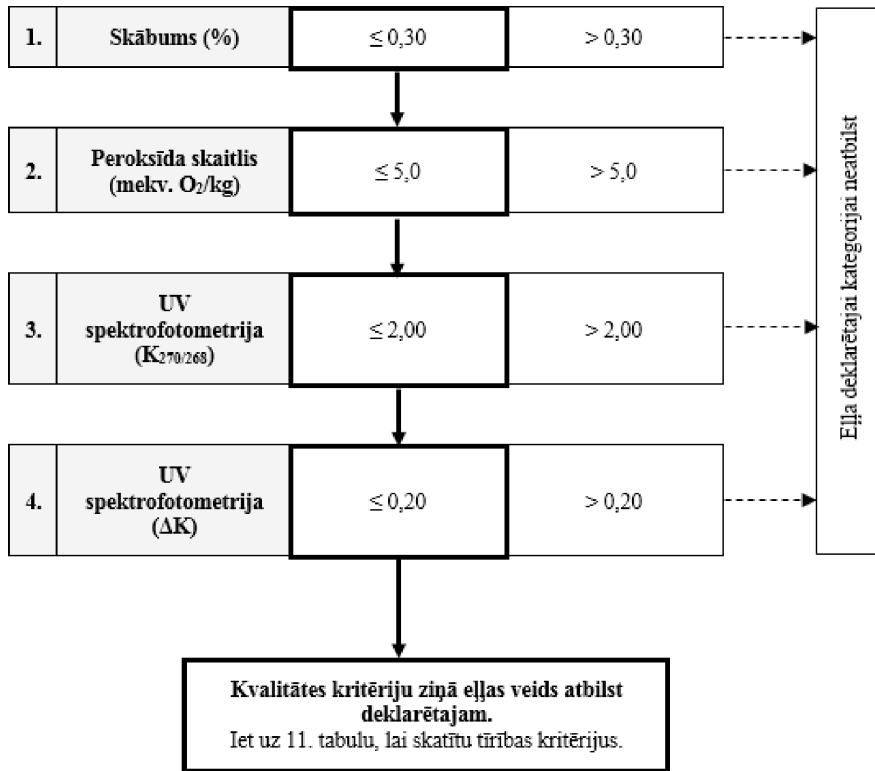
▼ M32

8. tabula. Neattīrīta olīvu izspaidu eļļa: tīrības kritēriji

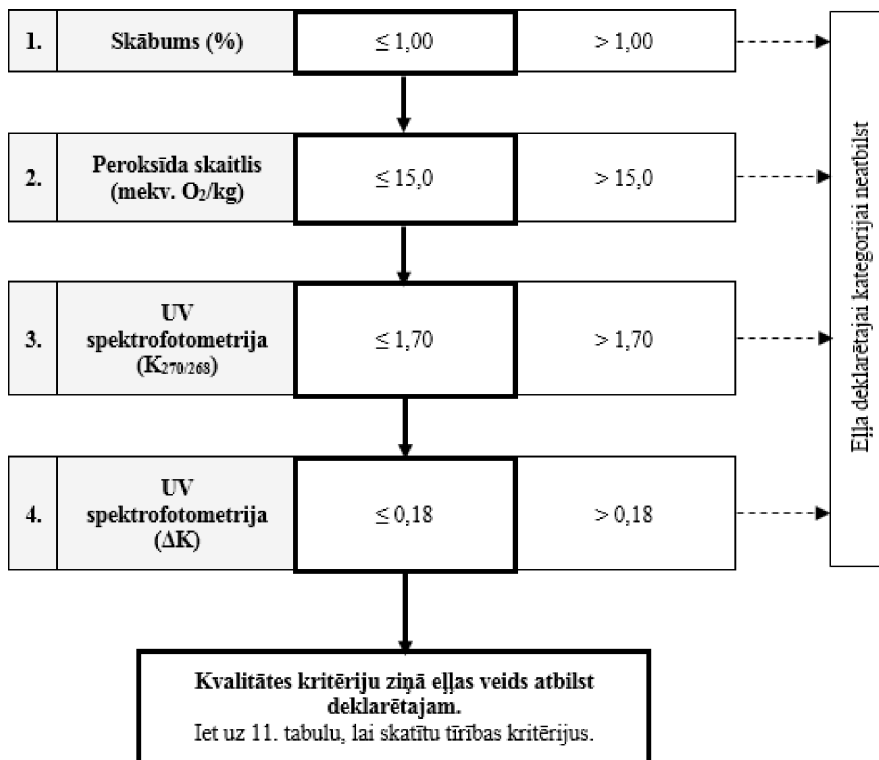


▼ M32

9. tabula. Rafinēta olīvu izspaidu eļļa: kvalitātes kritēriji

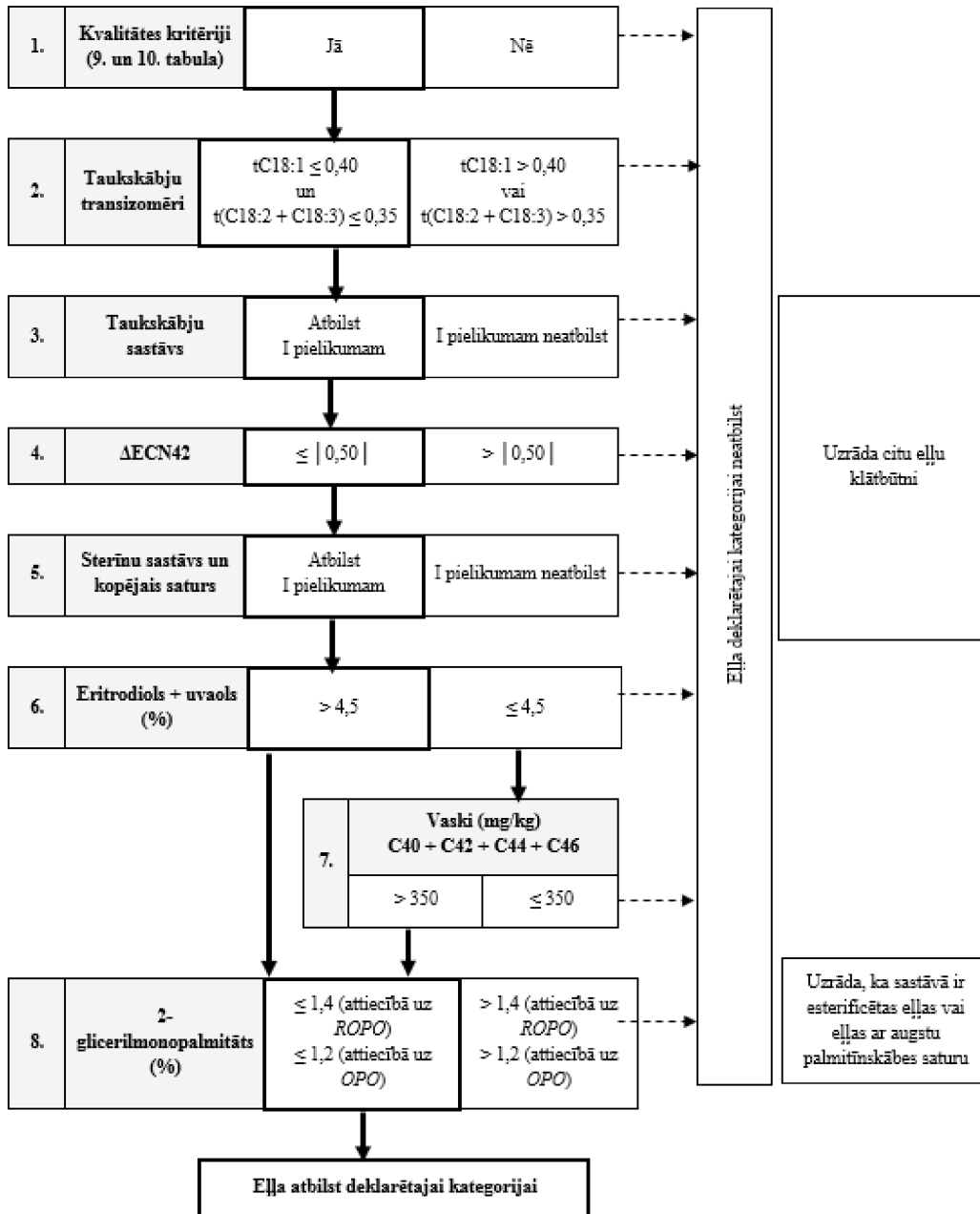


10. tabula. Olīvu izspaidu eļļa: kvalitātes kritēriji



▼ M32

11. tabula. Rafinēta olīvu izspaidu eļļa un olīvu izspaidu eļļa: tīrības kritēriji



▼ **M29***II PIELIKUMS***BRĪVO TAUKSKĀBJU NOTEIKŠANA PĒC AUKSTĀS METODES****1. MĒRĶIS UN PIEMĒROŠANAS JOMA**

Ar šo metodi nosaka brīvās taukskābes olīveļļā un olīvu izspaidu eļļā. Brīvo taukskābju saturu izsaka kā skābumu, ko aprēķina oleīnskābes procentuālā satura veidā.

2. PRINCIPS

Paraugu izšķīdina šķīdinātāju maisījumā, un paraugā ietilpstošās brīvās skābes titrē ar kālija hidroksīda vai nātrija hidroksīda šķīdumu etanolā.

3. REAKTĪVI

Visiem reaktīviem ir jābūt atzītā analītiskā kvalitātē, bet izmantojamajam ūdenim jābūt vai nu destilētam, vai ūdenim ar līdzvērtīgu tīrības pakāpi.

3.1. Dietilēteris; etanols (95 tilp. %), maisījums vienādās tilpuma daļās.

Maisījumu tieši pirms lietošanas neitralizēt ar kālija hidroksīda šķīdumu (3.2.), pievienojot uz 100 ml maisījuma 0,3 ml fenolftaleīna šķīduma (3.3.).

1. piezīme. Dietilēteris ir viegli uzliesmojošs un var veidot sprādzienbīstamus peroksīdus. To lietojot, ir jābūt īpaši piesardzīgiem.

2. piezīme. Ja nav iespējams lietot dietilēteri, var lietot šķīdinātāju maisījumu, kas sastāv no etanola un toluola. Vajadzības gadījumā etanolu var aizstāt ar 2-propanolu.

3.2. Kālija hidroksīds vai nātrija hidroksīds, titrēts etanola šķīdums vai ūdensšķīdums, c(KOH) [vai c(NaOH)] (aptuveni 0,1 mol/l) vai, ja vajadzīgs, c(KOH) [vai c(NaOH)] (aptuveni 0,5 mol/l). Tirdzniecībā pieejami lietošanai gatavi šķīdumi.

Ir jābūt zināmai kālija hidroksīda šķīduma (vai nātrija hidroksīda šķīduma) etanolā precīzai koncentrācijai, un tā ir jāpārbauda tieši pirms lietošanas. Lietot šķīdumu, kas ir pagatavots vismaz piecas dienas pirms lietošanas un dekantēts brūna stikla pudelē ar gumijas aizbāzni. Šķīdumam jābūt bezkrāsainam vai iedzeltenam.

Ja, izmantojot kālija hidroksīda vai nātrija hidroksīda ūdensšķīdumu, novērojama fāzu atdalīšanās, tad ūdensšķīdumu aizstāj ar etanola šķīdumu.

3. piezīme. Stabīlu bezkrāsainu kālija hidroksīda (vai nātrija hidroksīda) šķīdumu var pagatavot šādi. Uzkaršē līdz vārīšanās temperatūrai 1 000 ml etanola vai ūdens ar 8 g kālija hidroksīda (vai nātrija hidroksīda) un 0,5 g alumīnija skaidiņu un vienu stundu vāra ar atteces dzesinātāju. Tūlīt pārdestilē. Destilātā izšķīdina vajadzīgo kālija hidroksīda (vai nātrija hidroksīda) daudzumu. Atstāj uz dažām dienām un dzidro supernatantu dekantē no kālija karbonāta (vai nātrija karbonāta) nogulsniem.

Šķīdumu var pagatavot arī bez destilācijas šādi: 1 000 ml etanola (vai ūdens) pievieno 4 ml alumīnija butilāta un maisījumu atstāj uz dažām dienām. Dekantē supernatantu un izšķīdina vajadzīgo daudzumu kālija hidroksīda (vai nātrija hidroksīda). Šķīdums ir gatavs lietošanai.

▼ **M29**

- 3.3. Fenolftaleīns, 10 g/l šķīdums 95–96 tilp. % etanolā, vai sārmainais zilais 6B vai timolftaleīns, 20 g/l šķīdums 95–96 tilp. % etanolā. Ja eļļa ir stipri krāsota, izmanto sārmaini zilo vai timolftaleīnu.

4. APARATŪRA

Parastais laboratoriju aprīkojums, tai skaitā:

- 4.1. analītiskie svāri;
- 4.2. 250 ml koniskā kolba;
- 4.3. A klases 10 ml birete ar iedaļām līdz 0,05 ml vai līdzvērtīga automātiskā birete.

5. PROCEDŪRA

5.1. **Analizējamā parauga sagatavošana**

Ja paraugs ir duļķains, tas ir jāfiltrē.

5.2. **Analīzes paraugs**

Paraugu ņem atkarībā no paredzamā skābuma saskaņā ar šādu tabulu:

Paredzamais skābums (oleīnskābes saturs (g/100g))	Parauga masa (g)	Svēršanas precizitāte (g)
0–2	10	0,02
> 2–7,5	2,5	0,01
> 7,5	0,5	0,001

Paraugu nosver koniskajā kolbā (4.2.).

5.3. **Noteikšana**

Paraugu (5.2. punkts) izšķīdina 50–100 ml iepriekš neitralizētā dietilētera un etanola maisījumā (3.1.).

Maisot titrē ar 0,1 mol/l kālija hidroksīda (vai nātrija hidroksīda) šķīdumu (3.2. punkts) (sk. 4. piezīmi), līdz indikatora krāsa mainās (iekrāsotā indikatora krāsa saglabājas vismaz 10 sekundes).

4. *piezīme.* Ja vajadzīgā 0,1 mol/l kālija hidroksīda (vai nātrija hidroksīda) šķīduma daudzums ir lielāks par 10 ml, lietot 0,5 mol/l šķīdumu vai mainīt parauga masu atkarībā no paredzamā brīvā skābuma un ierosinātās tabulas.

5. *piezīme.* Ja šķīdums titrēšanas laikā kļūst duļķains, pievienot pietiekami daudz šķīdinātāju maisījuma (3.1. punkts), lai šķīdums kļūtu dzidrs.

Otro noteikšanu veikt tikai tad, ja pirmais rezultāts ir lielāks nekā attiecīgajai eļļas kategorijai noteiktais ierobežojums.

▼ M29

6. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

Skābums, kas izteikts oleīnskābes masas procentos, ir vienāds ar:

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

kur:

V = izlietotā titrētā kālija hidroksīda (vai nātrija hidroksīda) tilpums mililitros;

c = izlietotā titrētā kālija hidroksīda (vai nātrija hidroksīda) precīzā koncentrācija molos litrā;

M = 282 g/mol, oleīnskābes molmasa gramos molā;

m = analīzes parauga masa gramos.

Oleīnskābes saturs tiek norādīts, kā minēts turpmāk:

- a) ar precizitāti līdz divām zīmēm aiz komata, vērtības no 0 līdz 1 ieskaitot;
- b) ar precizitāti līdz vienai zīmei aiz komata, vērtības no 1 līdz 100 ieskaitot.

▼ **M30***III PIELIKUMS***PEROKSĪDA SKAITĻA NOTEIKŠANA****1. Darbības joma**

Šajā pielikumā ir aprakstīta metode peroksīda skaitļa noteikšanai dzīvnieku un augu eļļām un taukiem.

2. Definīcija

Peroksīda skaitlis, kas izteikts aktīvā skābekļa miliekvivalentos uz kilogramu, ir to vielu daudzums paraugā, kuras oksidē kālija jodīdu aprakstītajos eksperimenta apstākļos.

3. Princips

Analīzes parauga apstrāde ar kālija jodīda šķīdumu etiķskābes un hloroforma šķīdumā. Atbrīvotā joda titrēšana ar standartizētu nātrija tiosulfāta šķīdumu.

4. Aparatūra

Visam aprīkojumam jābūt brīvam no reducējošām vai oksidējošām vielām.

Piezīme 1. Slīpētās virsmas nav jāeļļo.

4.1. 3 ml stikla svēršanas laiviņa.

4.2. Aptuveni 250 ml kolbas ar pieslīpētiem kakliem un aizbāžņiem, iepriekš izžāvētas un piepildītas ar tīru, sausu inerti gāzi (slāpekli vai, labāk, oglekļa dioksīdu).

4.3. 5 ml, 10 ml vai 25 ml birete, graduēta vismaz ik pa 0,05 ml, vēlams ar automātisko nulles korekciju vai līdzvērtīga automātiskā birete.

4.4. Analītiskie sviri.

5. Reāģenti

5.1. Hloroforms, kam ir analītiska reaktīva kvalitāte, atbrīvots no skābekļa, burbuļojot tam cauri tīras, sausas inertas gāzes straumīti.

5.2. Ledus etiķskābe, kam ir analītiska reaktīva kvalitāte, atbrīvota no skābekļa, burbuļojot tai cauri tīras, sausas inertas gāzes straumīti.

5.3. Kālija jodīda piesātināts ūdens šķīdums, nesen pagatavots, kas nesatur jodu un jodātus. Aptuveni 14 g kālija jodīda izšķīdina apmēram 10 ml ūdens istabas temperatūrā.

5.4. Nātrija tiosulfāta 0,01 mol/l (ekvivalents 0,01 n) precīzi standartizēts ūdens šķīdums, kas standartizēts īsi pirms lietošanas.

Katru dienu īsi pirms lietošanas no 0,1 mol/l nātrija tiosulfāta standartšķīduma sagatavo 0,01 mol/l nātrija tiosulfāta šķīdumu vai precīzi nosaka tā molāro koncentrāciju. Pieredze liecina, ka stabilitāte ir ierobežota un ir atkarīga no pH un brīvā oglekļa dioksīda satura. Atšķaidīšanai jāizmanto tikai svaigi novārīts ūdens, kas, iespējams, attīrīts ar slāpekli.

Lai noteiktu precīzu nātrija tiosulfāta šķīduma molāro koncentrāciju, ieteicams izmantot šādu procedūru:

▼ **M30**

Ar precizitāti līdz tuvākajam 0,001 g mērkolbā (250 ml vai 500 ml) nosver 0,27 g līdz 0,33 g kālija jodāta (m_{KIO_3}) un atšķaida līdz atzīmei ar tikko uzvārtu ūdeni (V_2), kas atdzesēts līdz istabas temperatūrai. Izmantojot pipeti, 5 ml vai 10 ml šā kālija jodāta šķīduma (V_1) iepilina 250 ml Erlenmeijera kolbā. Pievieno 60 ml svaigi novārīta ūdens, 5 ml 4 mol/l sālskābes un 25 mg līdz 50 mg kālija jodīda vai 0,5 ml piesātināta kālija jodīda šķīduma. Lai noteiktu precīzu nātrija tiosulfāta šķīduma molāro koncentrāciju, šo šķīdumu titrē ar nātrija tiosulfāta šķīdumu (V_3).

$$T = \frac{m_{KIO_3} \times V_1 \times 6 \times 10 \times w_{KIO_3}}{M_{KIO_3} \times V_2 \times V_3}$$

kur:

m_{KIO_3} – kālija jodāta masa gramos;

V_1 – kālija jodāta šķīduma tilpums mililitros (5 ml vai 10 ml);

V_2 – kālija jodāta šķīduma kopējais tilpums mililitros (250 ml vai 500 ml);

V_3 – nātrija tiosulfāta šķīduma tilpums mililitros;

w_{KIO_3} – kālija jodāta tīrība gramos;

M_{KIO_3} – kālija jodāta molekulmasa gramos (214 g/mol);

T – nātrija tiosulfāta šķīduma precīzā molārā koncentrācija (mol/l).

5.5. Cietes šķīdums, 10 g/l ūdens dispersija, nesēn pagatavota no dabiskās šķīstošās cietes. Var izmantot arī līdzvērtīgu reaktīvu.

6. Paraugs

Jārūpējas par to, lai paraugu paņemtu un glabātu tumšā, turētu aukstumā un pilnīgi piepildītos stikla traukos, kas ir hermētiski noslēgti ar pieslīpētiem stikla vai korķa aizbāžņiem.

7. Procedūra

Analīze jāizdara izkļiedētā dienasgaismā vai mākslīgā apgaismojumā. Analizējamo paraugu ar precizitāti līdz tuvākajam 0,001 g iesver svēršanas laiviņā (4.1. punkts) vai, ja tādas nav, kolbā (4.2. punkts) saskaņā ar šādu tabulu atbilstīgi sagaidāmajam peroksīda skaitlim:

Sagaidāmais peroksīda skaitlis (mekv.)	Analizējamā parauga masa (g)
0 līdz 12	5,0 līdz 2,0
12 līdz 20	2,0 līdz 1,2
20 līdz 30	1,2 līdz 0,8
30 līdz 50	0,8 līdz 0,5
50 līdz 90	0,5 līdz 0,3

Atver kolbu (4.2. punkts), un tajā ieliek stikla svēršanas laiviņu ar analīzes paraugu. Pievieno 10 ml hloroforma (5.1. punkts). Strauji maisot, analīzes paraugu izšķīdina. Pievieno 15 ml etiķskābes (5.2. punkts), pēc tam pievieno 1 ml kālija jodīda šķīduma (5.3. punkts). Nekavējoties aizkorķē, vienu minūti krata un atstāj tieši piecas minūtes tumšā vietā 15–25 °C temperatūrā.

▼ M30

Pievieno aptuveni 75 ml destilēta ūdens. Enerģiski kratot, izdalījušos jodu titrē ar nātrija tiosulfāta šķīdumu (5.4. punkts), par indikatoru izmantojot cietes šķīdumu (5.5. punkts).

Vienam analizējamam paraugam izdara divas noteikšanas.

Vienlaikus izdara tukšo mēģinājumu. Ja tukšā mēģinājuma rezultāts pārsniedz 0,05 ml 0,01 N nātrija tiosulfāta šķīduma (5.4. punkts), tad netīros reaktīvus nomaina.

8. Rezultātu izteikšana

Peroksīda skaitli (PV), izteiktu aktīvā skābekļa miliekvivalentos kilogramā, aprēķina pēc formulas:

$$PV = \frac{V \times T \times 1\,000}{m}$$

kur:

V – standartizēta nātrija tiosulfāta šķīduma (5.4. punkts) ml skaits, kas izlietoti analizē, kas ir koriģēts, lai ņemtu vērā tukšo mēģinājumu;

T – lietotā nātrija tiosulfāta šķīduma (5.4. punkts) precīzā molārā koncentrācija;

m – analīzes parauga masa gramos.

Rezultāts ir divu izdarīto noteikšanu aritmētiskais vidējais.

Rezultātu nosaka līdz līdz vienai zīmei aiz komata.

▼ **M21***IV PIELIKUMS***VASKU SATURA NOTEIKŠANA AR KAPILĀRĀS KOLONNAS GĀZU
HROMATOGRĀFIJU****1. IZMANTOŠANAS JOMA**

Šajā metodē aprakstīta vasku satura noteikšana olīveļļās. Vaskus sadala pēc oglekļa atomu skaita molekulā. Šo metodi var jo īpaši izmantot, lai atšķirtu ar spiešanas paņēmieni iegūtu olīveļļu no olīvu izspaidu eļļas, ko iegūst pēc ekstrakcijas paņēmiena.

2. PRINCIPS

Taukiem vai eļļai pievieno piemērotu iekšējo standartu, pēc tam hromatogrāfiski sadala hidrēta silikagela kolonnā. Testēšanas apstākļos iegūst frakciju, kas eluējas vispirms (kas satur savienojumus, kuru polaritāte ir mazāka nekā triglicerīdiem), un to tieši analizē ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju.

3. APARATŪRA**3.1. 25 ml tilpuma Erlenmeijera kolba****3.2. Stikla kolonna gāzes hromatogrāfijai, iekšējais diametrs 15,0 mm, augstums 30 līdz 40 cm, ar krānu****3.3. Piemērots gāzes hromatogrāfs ar kapilāro kolonnu, kas aprīkots ar tiešās ievadīšanas sistēmu kolonnā, kas sastāv no šādiem mezgliem:****3.3.1. Termostata kamera kolonnām (kolonnu krāsns) ar programmējamu temperatūru****3.3.2. Aukstās inžekcijas iekārta tiešai ievadīšanai kolonnā****3.3.3. Liesmas jonizācijas detektors un pārveidotājs/pastiprinātājs****3.3.4. Reģistrējošā iekārta/integrators ar maināmu papīra ātrumu darbam ar pārveidotāju/pastiprinātāju (3.3.3.), kuras atbildes reakcijas laiks ir ne lielāks par 1 s. (Var izmantot arī datorizētas sistēmas, kas nodrošina gāzes hromatogrāfijas datu iegūšanu, izmantojot personālo datoru.)****3.3.5. Stikla vai kvarca stikla kapilārā kolonna ar iekšējo diametru 0,25 līdz 0,32 mm, kas ir 8 līdz 12 m gara, ar vienādu no 0,10 līdz 0,30 μm šķidrās fāzes slāni. (Šim nolūkam piemērotas gatavas nopērkamās SE-52 un SE-54 tipa šķidrās fāzes.)****3.4. 10 μl tilpuma mikrošļirce ar rūdītu adatu inžekcijai uz kolonnas****3.5. Elektrovibrators****3.6. Rotācijas ietvaicētājs****3.7. Mufelkrāsns****3.8. Analītiskie svāri ar svēršanas precizitāti + 0,1 mg****3.9. Laboratorijas trauki****4. REAKTĪVI****4.1. Silikagels ar daļiņu izmēru no 60 līdz 200 μm**

Silikagelu uz vismaz 4 h ievieto mufelkrāsnī 500 °C temperatūrā. Atdzesē un pievieno 2 % ūdens no ņemtā silikagela daudzuma. Lai maistījumu homogenizētu, to rūpīgi sakrata. Pirms lietošanas vismaz 12 h glabā tumšā vietā

▼ **M21**

- 4.2. n-heksāns, hromatogrāfijai
- 4.3. Etilēteris, hromatogrāfijai
- 4.4. n-heptāns, hromatogrāfijai
- 4.5. Laurilarahidāta standarta 0,1 % (m/v) šķīdums heksānā (iekšējais standarts). (*Var izmantot arī palmitilpalmitātu vai miristilsteāru.*)
- 4.5.1. *Sudāns 1 (1-fenil-azo-2-naftols)*
- 4.6. Nesējgāze: ūdeņradis vai hēlijs, gāzes hromatogrāfijai
- 4.7. Palīgģāzes:

— tīrs ūdeņradis gāzes hromatogrāfijai,

— tīrs gaiss gāzes hromatogrāfijai.

5. PROCEDŪRA

5.1. **Hromatogrāfijas kolonnas sagatavošana**

Suspendē 15 g silikagela (4.1.) n-heksānā (4.2.) un pārnes kolonnā (3.2.). Nostādina. Sablīvē, izmantojot elektrovibratoru (3.5.), lai hromatogrāfijas slānis būtu homogēns. Perkolē 30 ml n-heksāna attīrīšanai no piemaisījumiem. Ar svāriem (3.8.) iesver precīzi 500 mg parauga 25 ml tilpuma Erlenmeijera kolbā (3.1.), un atbilstoši sagaidāmajam vasku saturam pievieno vajadzīgo daudzumu iekšējā standarta (4.5.). Piemēram, pievieno 0,1 mg laurilarahidāta, analizējot olīveļļu, vai 0,25 līdz 0,5 mg, analizējot olīvu izspaidu eļļu. Sagatavoto paraugu pārnes hromatogrāfijas kolonnā, izmantojot divas 2 ml porcijas n-heksāna (4.2.).

Šķīdinātājam ļauj izplūst no kolonnas, līdz tā līmenis pazeminās līdz apmēram 1 mm virs absorbenta, un tad, lai attīrītu no dabīgi saturošajiem n-alkāniem, perkolē vēl 70 ml n-heksāna. Tad sāk eluēšanu hromatogrāfijai, savācot 180 ml n-heksāna/etilētera maisījuma (attiecībā 99:1) ar ātrumu apmēram 15 pilieni desmit sekundžu laikā. Parauga eluēšana jāveic istabas temperatūrā 22 ± 4 °C temperatūrā.

NB! — n-heksāna/etilētera maisījums (99:1) jāgatavo tajā pašā dienā.

- Vasku pareizas eluēšanas vizuālai kontrolei maisījumam var pievienot 100 µl Sudānas 1 krāsvielas 1 % šķīdumu tajā. Tā kā krāsvielas aiztures laiks ir lielāks nekā vaskiem un mazāks nekā triglicerīdiem, eluēšana jāpārtrauc tūlīt pēc tam, kad krāsojums sasniedzis kolonnas apakšējo daļu, jo tas liecina, ka visi vaski jau ir eluēti no kolonnas.

Šādi iegūto parauga frakciju ietvaicē rotācijas ietvaicētājā (3.6.) gandrīz sausu. Pēdējos apmēram 2 ml šķīdinātāja ietvaicē ar vāju slāpekļa plūsmu; pievieno 2–4 ml n-heptāna.

5.2. **Gāzes hromatogrāfijas analīze**5.2.1. *Sagatavošana*

Kolonnā uzstāda gāzes hromatogrāfam (3.3.), pievienojot ieeju kolonnā virskolonnas sistēmai, bet kolonnas izeju detektoram. Veic gāzes hromatogrāfijas aparātūras vispārēju pārbaudi (gāzes kontūru, detektora un reģistrācijas ierīces darbību, u. c.).

▼ **M21**

Ja kolonnu izmanto pirmo reizi, tā vispirms jākondicionē. Nedaudz nesējgāzes izlaiž caur kolonnu, un tad ieslēdz gāzes hromatogrāfu. Pakāpeniski iesilda tā, lai apmēram četru stundu laikā sasniegtu 350 °C temperatūru. Šādu temperatūru uztur vismaz divas stundas, un pēc tam iekārtai noregulē vajadzīgos darba apstākļus (iestata gāzes plūsmu, aizdedz liesmu, pievieno elektroniskajai reģistrācijas iekārtai (3.3.4.), iestata kolonnas krāsns temperatūru, detektoru, u. c.), reģistrē signālu ar jutību, kas ir vismaz divas reizes augstāka par analīzei nepieciešamo jutību. Nulles līnijai jābūt taisnai, bez jebkādiem izsitieniem, un tā nedrīkst novirzīties.

Negatīvas taisnvirziena novirzes liecina par neblīvumiem kolonnas savienojumu vietās; savukārt pozitīvas novirzes liecina, ka kolonna ir nepietiekami kondicionēta.

5.2.2. *Darba apstākļu izvēle*

Parasti izmanto šādus apstākļus:

— kolonnas temperatūra –

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

— detektora temperatūra – 350 °C;

— ievadītās vielas daudzums: 1 µl no n-heptāna šķīduma (2–4 ml);

— nesējgāze: hēlijs vai ūdeņradis ar attiecīgajai gāzei pareizu lineāro ātrumu (sk. papildinājumā);

— instrumenta jutība: atbilst turpmāk aprakstītajiem nosacījumiem.

Apstākļus var izmainīt atbilstoši kolonnas un hromatogrāfa raksturlielumiem tā, lai tiktu izdalīti visi vaski un panākta pietiekama signālu izšķirtspēja (sk. attēlu); C₃₂ iekšējā standarta aiztures laikam ir jābūt 18 ± 3 min. Visvairāk reprezentatīvā vaska signālam jābūt vismaz 60 % no pilnas skalas.

Signālu integrēšanas parametri jānosaka tā, lai tiktu iegūts attiecīgo signālu laukumu pareizs novērtējums.

NB! Ņemot vērā, ka beigu temperatūra ir augsta, pieļaujama līdz 10 % novirze no pilnas skalas vērtības.

5.3. **Analīzes veikšana**

Ar 10 µl tilpuma mikrošļirci ņem 1 µl šķīduma paraugu; atvelk šļirces virzuli tā, lai iztukšotu adatu. Adatu ievieto inžektorā un pēc 1–2 sekundēm ātri ievada; pēc apmēram piecām sekundēm adatu lēnām izvelk.

Veic reģistrāciju, līdz visi vaski ir pilnībā eluēti.

▼ **M21**

Nulles līnijai noteikti jāatbilst nepieciešamajiem nosacījumiem.

5.4. **Signālu identifikācija**

Signālus identificē pēc aiztures laikiem, tos salīdzinot ar tādos pašos apstākļos analizētiem tādu vasku maisījumiem, kuru aiztures laiki ir zināmi.

Attēlā redzama neapstrādātas augstākā labuma olīveļļas vasku hromatogramma.

5.5. **Daudzuma noteikšana**

Izmantojot integratoru, nosaka iekšējā standarta un alifātisko esteru C₄₀ līdz C₄₆ signālu laukumu.

Aprēķina katra vaska estera saturu mg/kg eļļas pēc šādas formulas:

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

kur

A_x = katra estera signāla laukums, kvadrātmilimetros;

A_s = iekšējā standarta signāla laukums, kvadrātmilimetros;

m_s = pievienotā iekšējā standarta masa, miligramos;

m = analīzei ņemtā parauga masa, gramos.

6. **REZULTĀTU IZTEIKŠANA**

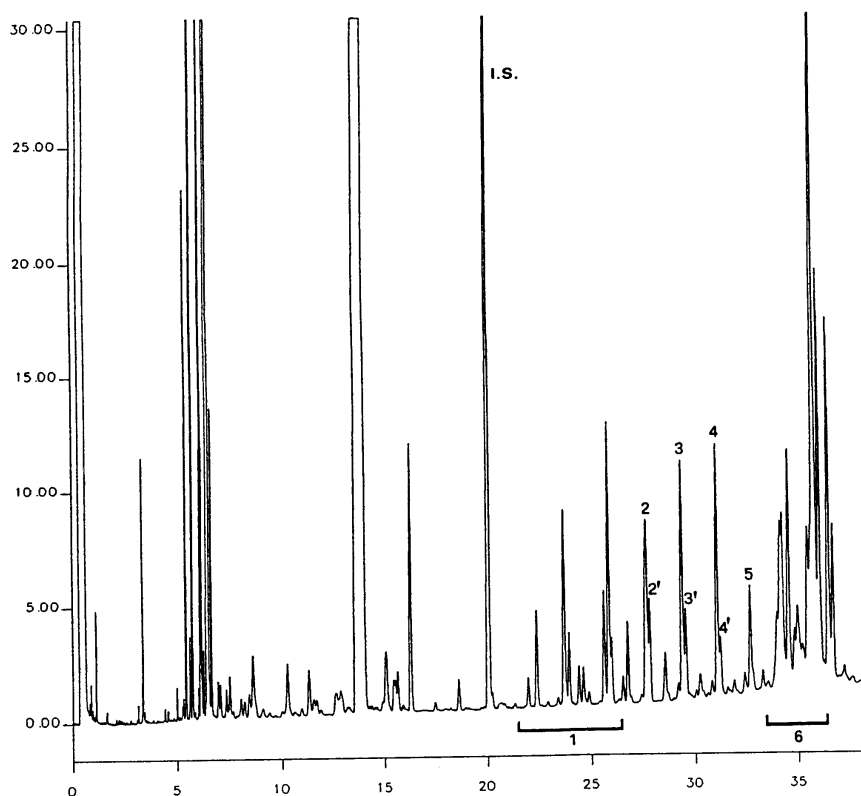
Norāda dažādu C₄₀ līdz C₄₆ vasku kopīgo saturu mg/kg eļļas (*ppm*).

NB! Kvantitatīvi nosakāmie komponenti saistāmi ar C₄₀ līdz un C₄₆ esteru signāliem, izmantojot par paraugu olīveļļas vasku hromatogrammu turpmāk redzamajā attēlā. Ja esteris C₄₆ parādās divas reizes, tad, lai to identificētu, ieteicams analizēt olīvu izspaidu eļļas vasku frakciju, kur C₄₆ signāls ir viegli identificējams tāpēc, ka tas ir izteiktā pārkumā.

Rezultātus uzdod ar precizitāti līdz vienam ciparam aiz komata.

▼ M21

Attēls.

Olīveļļas vasku hromatogramma ⁽¹⁾

Paskaidrojumi:

- I.S. = laurilārahidāts;
- 1. = diterpēnesteri;
- 2 + 2' = C₄₀ esteri
- 3 + 3' = C₄₂ esteri
- 4 + 4' = C₄₄ esteri;
- 5. = C₄₆ esteri
- 6. = sterīna esteri un triterpēnspirts.

⁽¹⁾ Pēc sterīna esteri eluēšanas hromatogrammā nedrīkst būt nekādu būtisku signālu (triglicerīdi).

▼ M21*Papildinājums***Gāzes lineārā ātruma noteikšana**

Pēc noregulēšanas darba normāliem darba apstākļiem gāzes hromatogrāfā ievada 1–3 μ l metāna (vai propāna). Uzņem laiku, kādā gāze iziet cauri kolonnai no ievadīšanas mirkļa līdz tā signāla parādīšanās brīdim (t_M).

Gāzes lineāro ātrumu aprēķina pēc formulas L/t_M , kur L ir kolonnas garums centimetros un t_M ir laiks sekundēs.

▼ M32

▼ M26

▼ **M21***VII PIELIKUMS***2-GLICERILMONOPALMITĀTA SATURA NOTEIKŠANA**

1. IZMANTOŠANAS JOMA

Šajā metodē aprakstīta triglicerīdu molekulā 2. pozīcijā saistītās palmīnskābes noteikšana pēc 2-glicerilmonopalmitāta.

Šo metodi var izmantot istabas temperatūrā (20 °C) šķidrām augu eļļām.

2. PRINCIPS

Pēc sagatavošanas eļļas paraugu šķeļ ar aizkuņģa dziedzeru lipāzi: triglicerīdu daļējā selektīvā hidrolīzē 1. un 3. pozīcijā rodas 2-monoglicerīdi. 2-glicerilmonopalmitāta saturu monoglicerīdu frakcijā pēc sililēšanas nosaka ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju.

3. APARATŪRA UN MATERIĀLI

- 3.1. 25 ml tilpuma Erlenmeijera kolba
- 3.2. 100, 250 un 300 ml tilpuma vārglāzes
- 3.3. Hromatogrāfijas kolonna no stikla, iekšējais diametrs 21–23 mm, garums 400 mm, ar poraina stikla disku un krānu
- 3.4. 10, 50, 100 un 200 ml tilpuma mērcilindri
- 3.5. 100 un 250 ml tilpuma kolbas
- 3.6. Rotācijas ietvaicētājs
- 3.7. 10 ml tilpuma centrifūgas mēģenes ar konisku apakšdaļu un slīpēta stikla aizbāzni
- 3.8. Centrifūga 10 un 100 ml tilpuma mēģenēm
- 3.9. Termostats, kurā var uzturēt $40 \pm 0,5$ °C temperatūru
- 3.10. 1 un 2 ml tilpuma graduētas pipetes
- 3.11. 1 ml tilpuma šļirce zemādas injekcijām
- 3.12. 100 µl tilpuma mikrošļirce
- 3.13. 1 000 ml tilpuma šķirpiltuve
- 3.14. Kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfs ar virskolonnas auksto inžekciju parauga tiešai ievadīšanai kolonnā un krāsni, kurā var uzturēt vajadzīgo temperatūru ar precizitāti apm. 1 °C
- 3.15. Virskolonnas aukstais inžektors parauga tiešai ievadīšanai kolonnā
- 3.16. Liesmas jonizācijas detektors un elektrometrs
- 3.17. Elektrometram piemērota reģistrējošā iekārta/integrators ar maināmu papīra ātrumu, kuras atbildes reakcijas laiks ir ne lielāks par 1 s
- 3.18. Stikla vai kvarca stikla kapilārā kolonna, garums 8–12 metri, iekšējais diametrs 0,25–0,32 mm, kas pārklāta ar metilpolisiloksānu vai fenilmetilpolisiloksānu 5 %, 0,10–0,30 µm slānis, izmantojama 370 °C temperatūrā

▼ M21

- 3.19. 10 µl tilpuma mikrošķirce ar vismaz 7,5 cm garu rūdītu adatu tiešai virskolonnas ievadīšanai

4. REAKTĪVI

- 4.1. Silikagels ar daļiņu izmēru no 0,063 līdz 0,200 mm (70/280 *mesh*), kas sagatavots šādi: Silikagelu porcelāna tīģeli žāvskapī 4 stundas žāvē 160 °C temperatūrā, atdzesē eksikatorā istabas temperatūrā. Pievieno ūdeni 5 % no silikagela masas turpmāk aprakstītajā veidā. Erlenmeijera kolbā iesver 152 g silikagela, pievieno 8 g destilēta ūdens, noslēdz ar aizbāzni un uzmanīgi krata, lai ūdens sadalītos masā vienmērīgi. Pirms lietošanas jāiztur vismaz 12 stundas

▼ M32

- 4.2. n-heksāns (hromatogrāfijai). Heksānu drīkst aizstāt ar izooktānu (2,2,4-trimetilpentāns, hromatogrāfijai), ja vien tiek sasniegtas salīdzināmas precizitātes vērtības.

▼ M21

- 4.3. Izopropanols
- 4.4. Izopropanols, 1/1 (v/v) ūdens šķīdums
- 4.5. Aizkuņģa dziedzeru lipāze. Tās aktivitātei jābūt no 2,0 līdz 10 lipāzes vienībām uz miligramu. (Aizkuņģa dziedzeru lipāzes ar aktivitāti no 2 līdz 10 vienībām uz miligramu fermenta ir nopērkamas.)
- 4.6. *Tris*-hidroksimetilaminometāna buferšķīdums: 1 M ūdens reakciju ar konc. HCl (1/1 v/v) noregulē līdz pH 8 (nosaka potenciometriski)
- 4.7. Enzīma kvalitātes nātrija holāts, 0,1 % ūdens šķīdums (šis šķīdums pēc pagatavošanas ir derīgs divas nedēļas)
- 4.8. Kalcija hlorīds, 22 % ūdens šķīdums
- 4.9. Dietilēteris, hromatogrāfijai
- 4.10. Šķīdinātājs attīstīšanai: n-heksāna/dietilētera (87:13 v:v) maisījums
- 4.11. Nātrija hidroksīds, 12 % šķīdums
- 4.12. Fenoltaleīns, 1 % šķīdums etanolā
- 4.13. Nesējgāze: ūdeņradis vai hēlijs, gāzes hromatogrāfijai
- 4.14. Palīgāzāze: ūdeņradis, tīrība vismaz 99 %, sauss un attīrīts no organiskajām vielām; un gaiss, gāzes hromatogrāfijai, ar tādu pašu tīrības pakāpi
- 4.15. Silanizācijas reaģents: piridīna/heksametildisilazāna, trimetilhlorsilāna 9/3/1 (v/v/v) maisījums. (Nopērkami arī lietošanai sagatavoti šķīdumi. Var izmantot citus sililēšanas reaģentus, konkrēti bis-trimetilsililtri-fluoracetamīds + 1 % trimetilhlorsilāns, kas atšķaidīts ar tādu pašu tilpumu bezūdens piridīna.)
- 4.16. Standartparaugi: tīri monoglicerīdi vai monoglicerīdu maisījumi ar zināmu sastāvu, kas ir līdzīgs analizējamam paraugu sastāvam
5. METODE
- 5.1. **Paraugu sagatavošana**
- 5.1.1. Eļļas, kuru brīvais skābums ir mazāks par 3 %, pirms hromatografēšanas silikagela kolonnā nav obligāti jāneitralizē. Eļļas, kuru brīvais skābums ir lielāks par 3 %, jāneitralizē, kā aprakstīts 5.1.1.1. punktā.

▼ M21

- 5.1.1.1. Pārnes 50 g eļļas un 200 ml n-heksāna 1 000 ml tilpuma šķirpiltuvē (3.13.). Pievieno 100 ml izopropanola un 12 % nātrija hidroksīda (4.11.) daudzumā, kas ir ekvivalents eļļas brīvajam skābumam plus 5 %. Vienu minūti enerģiski krata. Pievieno 100 ml destilēta ūdens, vēlreiz sakrata un nostādina.

Pēc dekantēšanas atdala apakšējo ziepes saturošo slāni. Atdala arī visus pārējos starpslāņus (duļķes un nešķīstošās vielas). Neitralizētā eļļas parauga šķīdumu heksānā vairākas reizes mazgā ar 50–60 ml izopropanola/ūdens 1/1 (v/v) šķīdumu (4.4.), līdz izzūd tā sārtais krāsojums ar fenolftaleīnu.

Lielāko daļu heksāna atdala ar vakuumdestilāciju (izmantojot, piemēram, rotācijas ietvaicētāju), un eļļu pārnes 100 ml tilpuma kolbā (3.5.). Eļļu vakuumā žāvē, līdz pilnībā atdalīts viss šķīdinātājs.

Šīs procedūras beigās eļļas skābumam jābūt mazākam par 0,5 %.

- 5.1.2. Šādi sagatavotas eļļas 1,0 g lielu iesvaru pārnes 25 ml tilpuma Erlenmeijera kolbā (3.1.), un to izšķīdina 10 ml attīstīšanas maisījumā (4.10.). Pirms hromatogrāfijas silikagela kolonnā šķīdumu nostādina vismaz 15 minūtes.

Lai nodrošinātu hromatogrāfijai optimālus apstākļus, ja šķīdums nav dzidrs, to centrifugē (var izmantot lietošanai sagatavotus 500 mg SPE silikagela kartridžus).

- 5.1.3. *Hromatogrāfijas kolonnas sagatavošana*

Apmēram 30 ml attīstītāja šķīdinātāja (4.10.) pārnes kolonnā (3.3.), izmantojot stikla spieķīti, kolonnas apakšā ievieto kokvilnas auduma gabaliņu, saspiež, lai aizvadītu gaisu.

Vārglāzē sagatavo 25 g silikagela (4.1.) suspensiju apmēram 80 ml attīstītāja šķīdinātāja, un pārnes kolonnā, izmantojot piltuvi.

Pārbauda, vai viss silikagels pārņests kolonnā; mazgā ar attīstītāja šķīdinātāju (4.10.), atver krānu un šķīduma līmeni pazemina tā, lai tas būtu apmēram 2 mm virs silikagela līmeņa.

- 5.1.4. *Kolonnas hromatogrāfija*

No parauga, kas sagatavots, kā aprakstīts iepriekš 5.1. punktā, 25 ml tilpuma Erlenmeijera kolbā (3.1.) ņem precīzi 1,0 g lielu iesvaru.

Parauga iesvaru izšķīdina 10 ml attīstītāja šķīdinātāja (4.10.). Šķīdumu pārnes hromatogrāfijas kolonnā, kas sagatavota saskaņā ar 5.1.3. punktu. Jāraugās, lai netiktu aizskarta kolonnas virsma.

Atver krānu un parauga šķīdumu pārnes kolonnā, līdz tas sasniedz silikagela līmeni. Attīsta ar 150 ml attīstītāja šķīdinātāja. Noregulē plūsmas ātrumu 2 ml/min (tā, lai 150 ml šķīduma tiktu pārnesti kolonnā apmēram 60–70 min laikā).

Eļļu savāc iepriekš nosvērtā 250 ml tilpuma kolbā. Šķīdinātāju iztvaicē vakuumā gandrīz sausu, un šķīdinātāja atliekas atdala slāpekļa plūsmā.

Kolbu nosver un aprēķina iegūtā ekstrakta masu.

▼ **M21**

(Ja izmanto lietošanai sagatavotus SPE silikagela kartridžus, rīkojas, kā aprakstīts turpmāk. 1 ml šķīduma (5.1.2.) pārnes sagatavotos kartridžos ar 3 ml n-heksāna.

Pēc šķīduma perkolēšanas attīsta ar 4 ml n-heksāna/dietilētera 9/1 (v/v) maisījumu.

Eluātu savāc 10 ml tilpuma mēģenē un slāpekļa plūsmā ietvaicē sausu.

Uz sauso atlikumu iedarbojas ar aizkuņģa dziedzera lipāzi (5.2.). Jāpārbauda taukskābju sastāvs pirms SPE kartridža un pēc tā.)

5.2. Hidrolīze ar aizkuņģa dziedzera lipāzi

5.2.1. Centrifūgas mēģenē iesver 0,1 g eļļas, kas sagatavotas saskaņā ar 5.1. punktu. Pievieno 2 ml buferšķīduma (4.6.), 0,5 ml nātrija holāta šķīduma (4.7.) un 0,2 ml kalcija hlorīda šķīduma, katru reizi šķīdumu rūpīgi samaisot. Mēģeni noslēdz ar pieslīpēta stikla aizbāzni, un ievieto termostatā $40 \pm 0,5$ °C temperatūrā.

5.2.2. Pievieno 20 mg lipāzes, uzmanīgi sakrata (nesaslapinot aizbāzni), un mēģeni ievieto termostatā precīzi uz 2 min. Pēc tam izņem, enerģiski krata precīzi 1 min un atdzesē.

5.2.3. Pievieno 1 ml dietilētera, noslēdz ar aizbāzni un enerģiski krata, pēc tam centrifugē, un ar mikrošļirci ētera šķīdumu pārnes tīrā sausā mēģenē.

5.3. Silanilatvasinājumu iegūšana un gāzes hromatogrāfija

5.3.1. Ar mikrošļirci 100 µl šķīduma (5.2.3.) pārnes 10 ml tilpuma mēģenē ar konisku apakšdaļu.

5.3.2. Vājā slāpekļa plūsmā atdala šķīdinātāju, pievieno 200 µl silanizācijas reaģenta (4.15.), mēģeni noslēdz ar aizbāzni un 20 min nostādina.

5.3.3. Pēc 20 min pievieno 1 līdz 5 ml n-heksāna (atkārībā no hromatografēšanas apstākļiem): šādi iegūtais šķīdums ir sagatavots gāzes hromatogrāfijai.

5.4. Gāzes hromatogrāfija

Darba apstākļi:

— inžektora temperatūra (virskolonnas inžektors) zem šķīdinātāja viršanas punkta (68 °C);

— detektora temperatūra: 350 °C;

— kolonnas temperatūra: krāsns temperatūras programma: 1 minūti 60 °C, paaugstināšana par 15 °C minūtē līdz 180 °C, tad par 5 °C minūtē līdz 340 °C, tad 13 minūtes 340 °C;

— nesējgāze: ūdeņradis vai hēlijs, ar lineāro ātrumu, kas ir pietiekams 1. att. parādītās izšķirtspējas panākšanai. Aiztures laikam C₅₄ triglicerīdam jābūt 40 ± 5 min (sk. 2. att.). (Norādītie darba apstākļi ir orientējoši. Operatoriem tie jāoptimizē, lai panāktu vajadzīgo izšķirtspēju. Tā signāla augstumam, kas atbilst 2-glicerilmonopalmitātam, jābūt vismaz 10 % no reģistrācijas iekārtas skalas.)

▼ M21

— ievadītās vielas daudzums: 0,5–1 µl n-heksāna šķīduma (5 ml) (5.3.3.).

5.4.1. *Signālu identifikācija*

Atsevišķos monoglicerīdus identificē pēc aiztures laikiem, tos salīdzinot ar monoglicerīdu standartmaisījumiem tādos pašos apstākļos noteiktajiem aiztures laikiem.

5.4.2. *Kvantitatīva noteikšana*

Katra signāla laukumu aprēķina, izmantojot elektronisko integratoru.

6. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

Glicerilmonopalmitāta saturu aprēķina pēc attiecīgā signāla laukuma attiecības pret visu monoglicerīdu signālu laukumu kopējo summu (sk. 2. att.), izmantojot šādu formulu:

$$\text{glicerilmonopalmitāts (\%)} = \frac{A_x}{\sum A} \times 100$$

kur:

A_x = glicerilmonopalmitāta signāla laukums;

$\sum A$ = visu monoglicerīdu signālu laukumu summa.

Rezultātus uzdod ar precizitāti līdz vienam decimālciparam aiz komata.

7. ANALĪZES REZULTĀTU PĀRSKATS

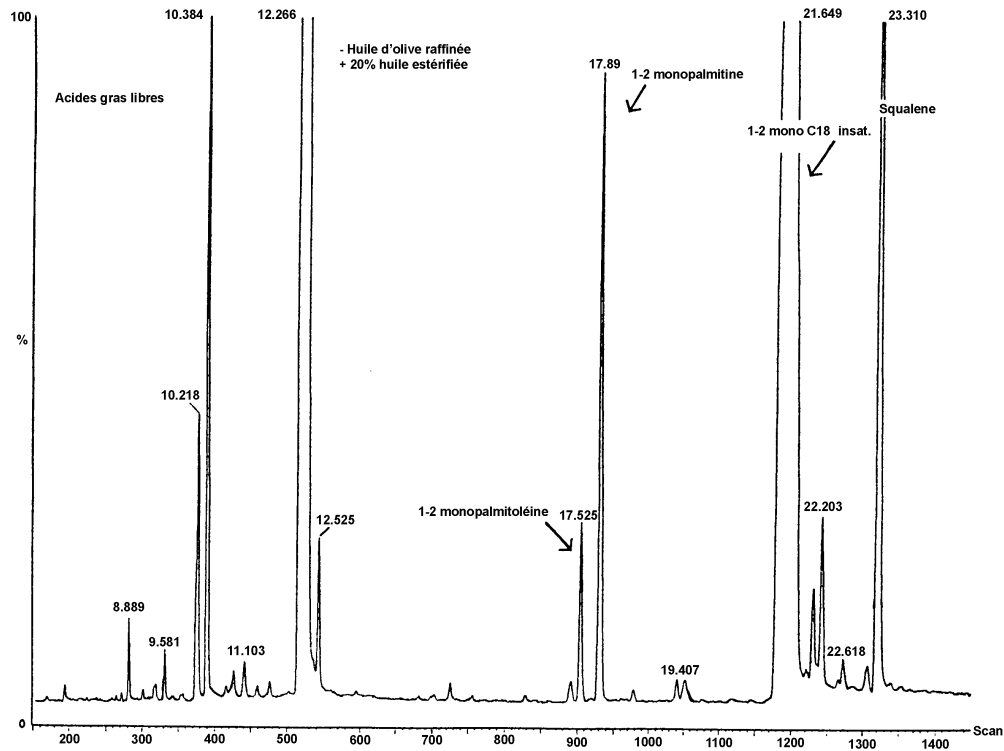
Pārskatā par analīzes rezultātiem jānorāda:

- atsauce uz šo metodi,
- visa informācija, kas vajadzīga parauga pilnīgai identifikācijai,
- analīzes rezultāts,
- ziņas par atkāpēm no šīs metodes, pamatojoties uz ieinteresēto pušu vienošanos, vai kāda cita iemesla dēļ,
- laboratorijas identifikācijas dati, analīzes dienas datums un par analīzes veikšanu atbildīgo personu paraksti.

▼ M21

1. attēls

To silanizēšanas reakcijas produktu hromatogramma, kas iegūti, ar lipāzi iedarbojoties uz rafinētu olīveļļu, kurai pievienoti 20 % esterificētas eļļas (100 %).



Paskaidrojumi: *Acides gras libres* = brīvās tauksābes; *Huile d'olive raffinée* = rafinēta olīveļļa; 20 % *Huile estérifiée* = 20 % esterificēta eļļa; *1-2 monopalmitoléine* = 1-2 monopalmitoleīns; *1-2 monopalmitine* = 1-2 monopalmitīns; *1-2 mono C₁₈ insat.* = 1-2 mono- C₁₈ nepiesāt.; *Squalene* = skvalēns.

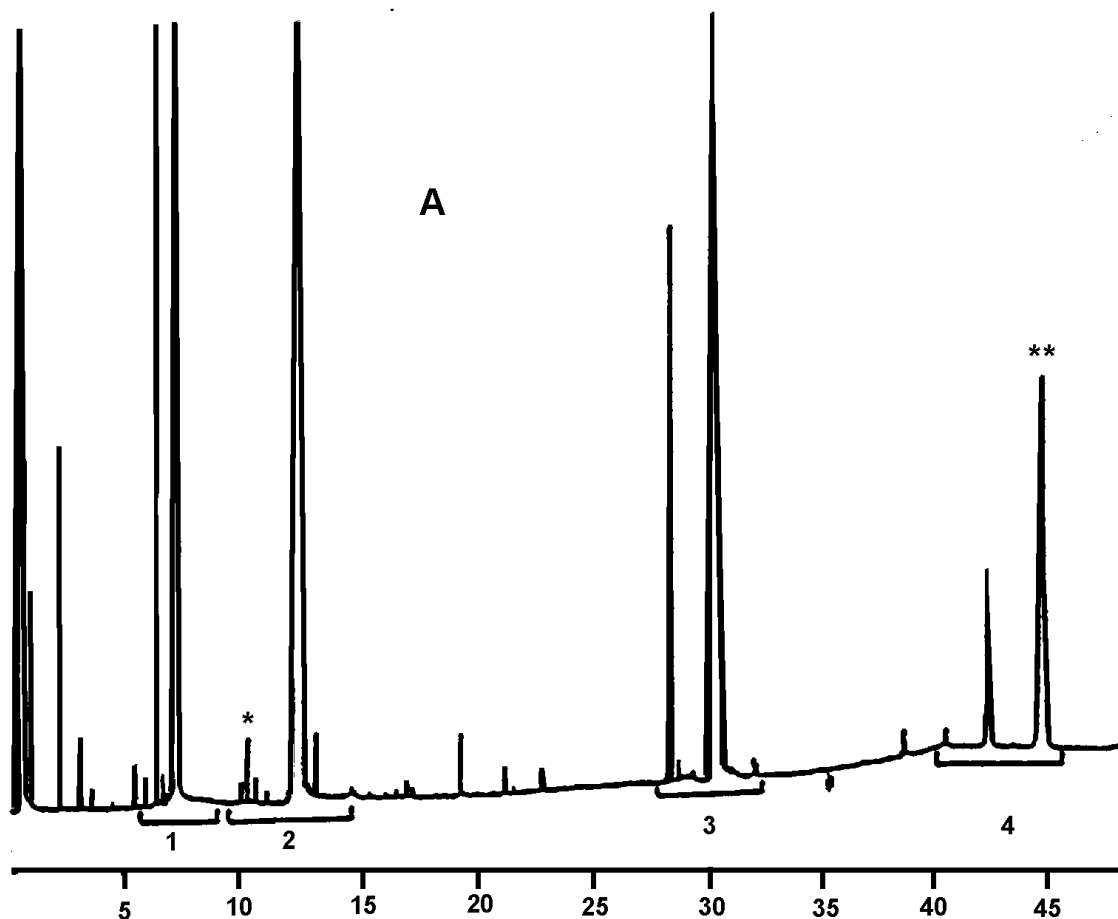
▼ M21

2. attēls

Hromatogrammas:

A) neesterificēta olīveļļa, pēc iedarbības ar lipāzi; pēc silanizēšanas; šādos apstākļos (8–12 m kapilārā kolonna) vasku frakcija eluējas vienlaicīgi ar diglicerīdu frakciju vai pavisam nedaudz vēlāk.

Pēc iedarbības ar lipāzi triglicerīdu saturs nedrīkst būt augstāks par 15 %.



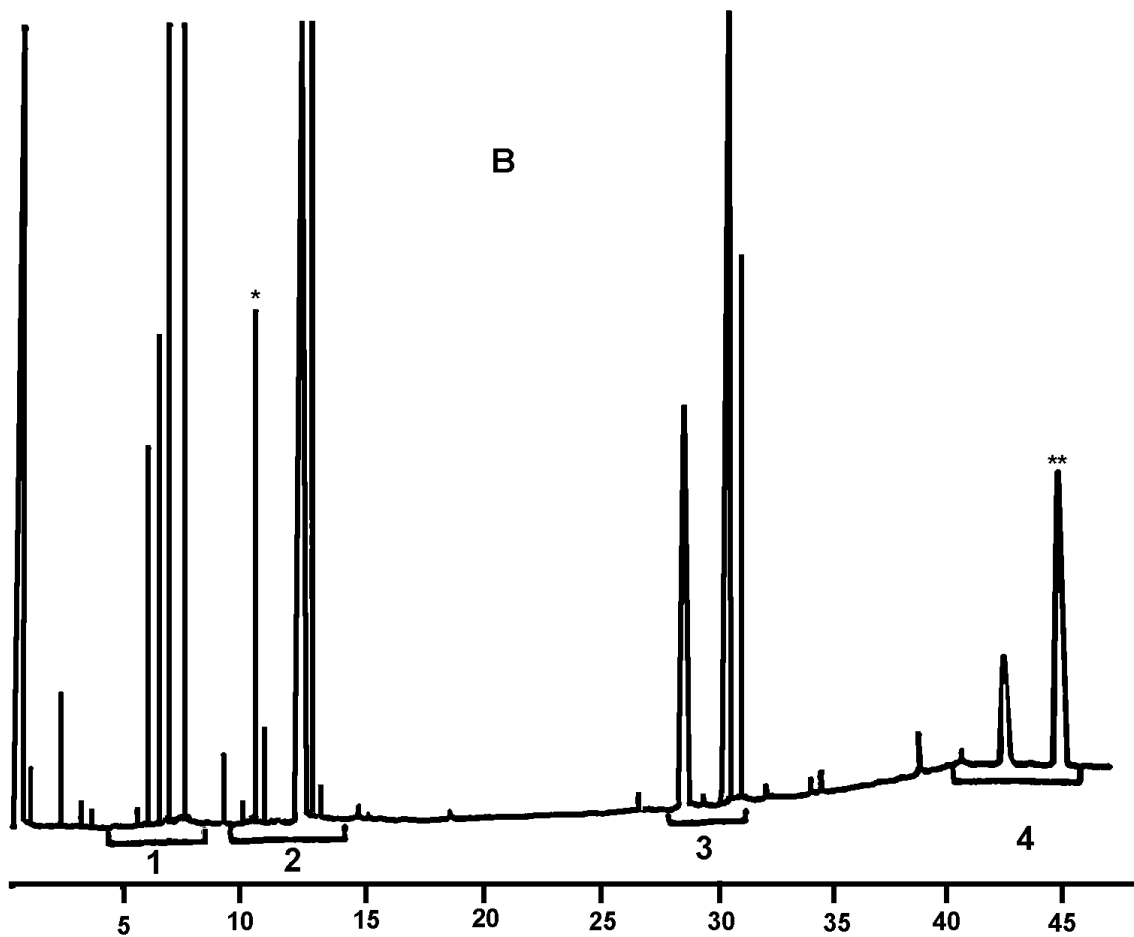
Paskaidrojumi:

- 1 = Brīvās taukskābes
- 2 = Monoglicerīdi
- 3 = Diglicerīdi
- 4 = Triglicerīdi
- * = 2-monopalmitīns
- ** = C₅₄ triglicerīds

▼ M21**Hromatogrammas:**

B) esterificēta eļļa pēc iedarbības ar lipāzi; pēc silanizēšanas; šādos apstākļos (8–12 m kapilārā kolonna) vasku frakcija eluējas vienlaicīgi ar diglicerīdu frakciju vai pavisam nedaudz vēlāk.

Pēc iedarbības ar lipāzi triglicerīdu saturs nedrīkst būt augstāks par 15 %.

*Paskaidrojumi:*

- 1 = Brīvās taukskābes
- 2 = Monoglicerīdi
- 3 = Diglicerīdi
- 4 = Triglicerīdi
- * = 2-monopalmitīns
- ** = C₅₄ triglicerīds

▼ **M21**

8. PIEZĪMES

1. *piezīme.* LIPĀZES SAGATAVOŠANA

Ir nopērkamas lipāzes ar pietiekamu aktivitāti. Tās var sagatavot arī laboratorijā šādi.

Atdzesē līdz 0 °C temperatūrai 5 kg svaigu cūkas aizkuņģa dziedzeru. Atdala apkārtējos cietos taukus un saistaudus, un pēc tam blenderī sasmalcina šķidrās pastas veidā. Pastai pievieno 2,5 l bezūdens acetona, 4–6 stundas maisa, pēc tam centrifugē. Atlikumu vēl trīs reizes ekstrahē ar tādu pašu daudzumu bezūdens acetona, pēc tam divas reizes ar acetona/dietilētera (1/1 v/v) maisījumu, un divas reizes ar dietilēteri.

Atlikumu 48 h žāvē vakuumā, lai iegūtu stabilu pulveri, ko var ilgstoši glabāt ledusskapī, sargājot no mitruma iedarbības.

2. *piezīme.* LIPĀZES AKTIVITĀTES KONTROLE

Sagatavo olīveļļas emulsiju šādā veidā.

Mikserī 10 min maisa maisījumu, kas sastāv no 165 ml gumiarabika 100 g/l šķīduma, 15 g sasmalcināta ledus un 20 ml iepriekš neitralizētas olīveļļas.

Pāmes 10 ml šīs emulsijas 50 ml tilpuma vārlāzē, pievieno 0,3 ml nātrija holāta 0,2 g/ml šķīdumu, un pēc tam 20 ml destilēta ūdens.

Vārglāzi novieto termostātā 37 °C temperatūrā; ievieto pH-metra elektrodus un spirāles maisītāju.

Ar bireti pa pilienam pievieno 0,1 N nātrija hidroksīda šķīdumu līdz pH 8,3.

Pievieno alikvotu lipāzes pulvera suspensijas ūdenī (0,1 g/ml lipāzes). Tiklīdz pH-metrs rāda 8,3, palaiž hronometru un pa pilienam pievieno nātrija hidroksīdu ar tādu ātrumu, lai reakcija nemainītos, un visu laiku būtu pH 8,3. Ik pēc minūtes atzīmē patērētā sārma daudzumu.

Iegūtos datus attēlo x/y grafikā, kurā uz abscisu ass atliek laiku, bet uz ordinātu ass – 0,1 N sārma šķīduma tilpumu mililitros, kas patērēts nemainīga pH saglabāšanai. Iegūtajai sakarībai jābūt lineārai.

Lipāzes aktivitāti, kas izteikta lipāzes vienībās vienā miligramā, aprēķina pēc šādas formulas:

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

kur:

A aktivitāte lipāzes vienības/mg;

V mililitri 0,1 N nātrija hidroksīda šķīduma minūtē (aprēķina pēc grafika);

N nātrija hidroksīda šķīduma titrs;

m testējamās lipāzes parauga masa miligramos.

Lipāzes vienība ir fermenta daudzums, kāds fermentatīvās šķelšanas reakcijās vienā minūtē izdala 10 mikroekvivalentus skābes.

▼ **M20**

▼ **M28***IX PIELIKUMS***SPEKTROFOTOMETRISKĀ ANALĪZE UV SPEKTRĀ**

IEVADS

Spektrofotometriskā analīze UV spektrā var dot informāciju par tauku kvalitāti, to saglabāšanas stāvokli un tehnoloģisko procesu izraisītajām pārmaiņām tajos. Absorbēcija pie metodē noteiktajiem viļņa garumiem notiek oksidēšanās un/vai rafinēšanas procesā konjugētu diēnu un triēnu sistēmu klātbūtnes dēļ. Šo absorbēciju izsaka kā īpatnējo ekstinkciju $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (1 % (masas) tauku šķīduma ekstinkcija attiecīgā šķīdinātājā 10 mm kivetē), ko parasti apzīmē ar K (sauc arī par “ekstinkcijas koeficientu”).

1. **DARBĪBAS JOMA**

Šajā pielikumā aprakstīta procedūra olīveļļas spektrofotometriskajai analīzei UV spektrā.

2. **METODES PRINCIPS**

Paraugu šķīdina vajadzīgajā šķīdinātājā un pie noteiktiem viļņa garumiem izmēra šķīduma absorbēciju attiecībā pret tīru šķīdinātāju.

Vielas koncentrācijai 1 % (masas) 10 mm kivetē aprēķina īpatnējo ekstinkciju pie 232 nm un 268 nm izooktānā vai 232 nm un 270 nm cikloheksānā.

3. **IEKĀRTA**

3.1. Spektrofotometrs mērījumiem ultravioletajā spektra daļā (starp 220 un 360 nm) ar iespēju nolasīt atsevišķas nanometru vienības. Ieteicams regulāri pārbaudīt spektrometra viļņa garuma un absorbēcijas skalu precizitāti un reproducējamību, kā arī izkļaidēto gaismu.

3.1.1. *Viļņa garuma skala.* To var pārbaudīt, izmantojot referenes materiālu – optiskā stikla filtru, kas satur holmija oksīdu vai holmija oksīda šķīdumu (var būt hermētisks), kam ir izteiktas absorbēcijas joslas. References materiāli ir paredzēti, lai verificētu un kalibrētu viļņa garuma skalas spektrofotometriem, kuri darbojas redzamajā un ultravioletajā starojuma apgabalā un kuriem nominālais spektrālās joslas platums ir ne vairāk par 5 nm. Mērījumus salīdzina ar gaisa tukšo paraugu 640–240 nm viļņa garuma diapazonā, ievērojot referenes materiāliem pievienotās instrukcijas. Ikreiz, kad maina spraugas platumu, izdara bāzes līnijas korekciju ar baltas gaismas kūli. Attiecīgie viļņa garumi ir uzskaitīti standarta referenes materiāla sertifikātā.

3.1.2. *Absorbēcijas skala.* To var pārbaudīt, izmantojot komerciāli pieejamus hermētiskus referenes materiālus – paskābinātus kālija dihromāta šķīdumus noteiktās koncentrācijās un ar sertificētām absorbēcijas vērtībām pie λ_{max} (4 kālija dihromāta šķīdumi perhlorskābē, kas hermētiski ievietoti četrās UV paredzētās kvarca kivetēs, lai noteiktu linearitātes un fotometriskās pareizības referenci UV). Pēc bāzes līnijas korekcijas kālija dihromāta šķīdumus salīdzina ar tukšo izmantotās skābes paraugu, ievērojot referenes materiālam pievienotās instrukcijas. Attiecīgās absorbēcijas vērtības ir uzskaitītas referenes materiāla sertifikātā.

Alternatīvs veids, kādā pārbaudīt fotoelementa un fotomultiplikatora signālu, ir šāds: spektrofotometrijas veikšanai iesver 0,2000 g kālija hromāta un 1 000 ml mērkolbā to izšķīdina 0,05 N kālija hidroksīda šķīdumā, un uzpilda līdz zīmei. Ņem precīzi 25 ml iegūtā šķīduma, pārnes 500 ml mērkolbā un uzpilda līdz zīmei ar to pašu kālija hidroksīda šķīdumu.

▼ **M28**

Izmēra šādi iegūtā šķīduma ekstinkciju pie 275 nm, lietojot kālija hidroksīda šķīdumu kā references šķīdumu. Lietojot 1 cm kivetī, izmēritajai ekstinkcijai jābūt $0,200 \pm 0,005$.

- 3.2. Spektra UV daļas (220 līdz 360 nm) mērījumiem piemērotas taisnstūra kvarca kivetes ar vāciņiem, optiskais ceļa garums 10 mm. Ja kivetes papildītas ar ūdeni vai citu piemērotu šķīdinātāju, tās savā starpā nedrīkst atšķirties par vairāk nekā 0,01 ekstinkcijas vienību.
- 3.3. Mērkolbas ar vienu zīmi, tilpums 25 ml, A klase.
- 3.4. Analītiskie svāri ar nolasiņuma precizitāti līdz 0,0001 g.

4. REAKTĪVI

Ja nav noteikts citādi, veicot analīzi, lieto vienīgi atzītas analītiskas tīrības pakāpes reaktīvus un destilētu vai demineralizētu ūdeni vai vismaz līdzvērtīgas tīrības pakāpes ūdeni.

Šķīdinātājs: izooktāns (2,2,4-trimetilpentāns) mērījumiem pie 232 nm un 268 nm un cikloheksāns mērījumiem pie 232 nm un 270 nm, ar absorbciju mazāk par 0,12 pie 232 nm un mazāk par 0,05 pie 270 nm salīdzinājumā ar destilētu ūdeni, mērot 10 mm kivetē.

5. PROCEDŪRA

- 5.1. Paraugam jābūt pilnīgi homogēnam un bez suspendētiem piemaisījumiem. Pretējā gadījumā tas jāfiltrē caur filtrpapīru aptuveni 30 °C temperatūrā.
- 5.2. Rūpīgi iesver 0,25 g (ar precizitāti līdz 1 mg) šādi sagatavota parauga 25 ml mērkolbā, uzpilda līdz zīmei ar norādīto šķīdinātāju un homogenizē. Iegūtajam šķīdumam ir jābūt pilnīgi dzidram. Ja novērojama opalescence jeb duļķainība, ātri izfiltrē caur filtrpapīru.

PIEZĪME. Neapstrādātu olīveļļu un neapstrādātu augstākā labuma olīveļļu absorbcijas mērīšanai pie 268 nm un 270 nm parasti pietiek ar 0,25–0,30 g materiāla. Mērījumiem pie 232 nm parasti ir vajadzīgs 0,05 g parauga, un visbiežāk gatavo divus atsevišķus šķīdumus. Olīvu izspaidu eļļu, rafinētu olīveļļu un eļļu, kam piejaukta olīveļļa, absorbcijas mērīšanai parasti vajadzīgs mazāks paraugs, piemēram, 0,1 g, jo šo eļļu absorbcētspēja ir lielāka.

- 5.3. Ja vajadzīgs, abās kvarca kivetēs (parauga un standartšķīduma kivetē) bāzes līniju (220–290 nm) koriģē ar šķīdinātāju, tad piepilda parauga kvarca kivetī ar testa šķīdumu un izmēra ekstinkciju pie 232, 268 un 270 nm, šķīdinātāju izmantojot par standartšķīdumu.

Izmēritajām ekstinkcijas vērtībām jābūt starp 0,1 un 0,8 vai verificētā spektrofotometra linearitātes diapazonā. Ja tā nav, mērījumi jāatkārto, lietojot pēc vajadzības koncentrētākus vai atšķaidītākus šķīdumus.

- 5.4. Kad izmērīta absorbcija pie 268 vai 270 nm, mēra absorbciju pie λ_{\max} , $\lambda_{\max+4}$ un $\lambda_{\max-4}$. Šīs absorbcijas vērtības izmanto, lai noteiktu īpatnējās ekstinkcijas variāciju (ΔK).

PIEZĪME. Uzskata, ka λ_{\max} izooktānam, ko izmanto par šķīdinātāju, ir 268 nm un ka cikloheksānam tas ir 270 nm.

▼ **M28**

6. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

- 6.1. Pieraksta pie dažādiem viļņa garumiem iegūtās īpatnējās ekstinkcijas (ekstinkcijas koeficientus), ko aprēķina šādi:

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

kur:

$K\lambda$ = īpatnējā ekstinkcija pie viļņa garuma λ ;

$E\lambda$ = ekstinkcija, kas izmērīta pie viļņa garuma λ ;

c = šķīduma koncentrācija g/100 ml;

s = kvarca kivetes ceļa garums centimetros;

rezultātus izsaka ar precizitāti līdz divām zīmēm aiz komata.

- 6.2. Īpatnējās ekstinkcijas variācija (ΔK)

Ekstinkcijas absolūtās vērtības variāciju (ΔK) nosaka pēc šādas formulas:

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

kur K_m ir īpatnējā ekstinkcija pie maksimālajai absorbcijai atbilstošā viļņa garuma – 270 nm vai 268 nm atkarībā no izmantotā šķīdinātāja;

rezultātus izsaka ar precizitāti līdz divām zīmēm aiz komata.

▼ **M28***X PIELIKUMS***TAUKSKĀBJU METILESTERU NOTEIKŠANA AR GĀZU HROMATOGRĀFIJU****1. DARBĪBAS JOMA**

Šajā pielikumā sniegti norādījumi par to, kā ar gāzu hromatogrāfiju noteikt brīvās un saistītās taukskābes augu taukos un eļļās pēc tam, kad šīs taukskābes pārvērstas taukskābju metilesteros (*FAME*).

Saistītās taukskābes no triacilglicerīdiem (*TAG*) un – atkarībā no esterifikācijas metodes – brīvās taukskābes (*FFA*) tiek pārvērstas taukskābju metilesteros (*FAME*), kurus nosaka ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju.

Šajā pielikumā aprakstītā metode ļauj kvantitatīvi noteikt *FAME* ar oglekļa atomu virknes garumu C_{12} - C_{24} , ieskaitot piesātināto, *cis*- un *trans*-mononepiesātināto un *cis*- un *trans*-polinepiesātināto taukskābju metilesterus.

2. PRINCIPS

FAME kvantitatīvajai analīzei izmanto gāzu hromatogrāfiju (*GH*). *FAME* sagatavo saskaņā ar A daļu. Pēc tam tos ievada un iztvaicē inžektorā. *FAME* izdalīšana notiek noteiktas polaritātes un garuma analītiskajās kolonnās. *FAME* noteikšanai izmanto liesmas jonizācijas detektoru (*LJD*). Analīzes nosacījumi ir izklāstīti B daļā.

FAME gāzu hromatogrāfijā, kuru veic ar *LJD*, par nesējgāzi var izmantot ūdeņradi vai hēliju (mobilā fāze). Ūdeņradis palielina izdalīšanas ātrumu un dod izteiktākas smailes. Stacionārā fāze ir mikroskopiski plāns šķidrums slānis uz inertas cietas virsmas, kas izgatavota no kausēta kvarca.

Kad iztvaicētie savienojumi šķērso kapilāro kolonnu, analīzes procesā tie mijiedarbojas ar stacionāro fāzi, kura klāj kapilārās kolonnas iekšējo virsmu. Tā kā dažādiem savienojumiem šī mijiedarbība ir atšķirīga, tie eluējas atšķirīgā laikā, un to sauc par savienojuma aiztures laiku pie konkrētajiem analīzes parametriem. Dažādos savienojumos ir iespējams identificēt, salīdzinot to aiztures laikus.

A DAĻA**TAUKSKĀBJU METILESTERU SAGATAVOŠANA NO OLĪVEĻĻAS UN OLĪVU IZSPAIDU EĻĻAS****1. DARBĪBAS JOMA**

Šajā daļā aprakstīta taukskābju metilesteru sagatavošana. Tā aptver metodes taukskābju metilesteru sagatavošanai no olīveļļām un olīvu izspaidu eļļām.

2. PIEMĒROŠANAS JOMA

Taukskābju metilesteru sagatavošanu no olīveļļām un olīvu izspaidu eļļām veic, kālija hidroksīdu istabas temperatūrā transesterificējot ar metanola šķīdumu. Tas, vai paraugu pirms transesterifikācijas nepieciešams attīrīt, ir atkarīgs no brīvo taukskābju satura paraugā un no analītiskā rādītāja, kas jānosaka. Var izmantot šādu tabulu:

▼ **M28**

Eļļas kategorija	Metode
Neapstrādāta olīveļļa ar skābes saturu $\leq 2,0$ %	1. Taukskābes 2. <i>trans</i> -taukskābes
Rafinēta olīveļļa	3. Δ ECN42 (pēc attīrīšanas ar silikagelu SPE)
Olīveļļa, kas sastāv no rafinētas olīveļļas un neapstrādātām olīveļļām	
Rafinēta olīvu izspaidu eļļa	
Olīvu izspaidu eļļa	
Neapstrādāta olīveļļa ar skābes saturu $> 2,0$ %	1. Taukskābes (pēc attīrīšanas ar silikagelu SPE)
Neattīrta olīvu izspaidu eļļa	2. <i>trans</i> -taukskābes (pēc attīrīšanas ar silikagelu SPE) 3. Δ ECN42 (pēc attīrīšanas ar silikagelu SPE)

3. METODIKA

3.1. **Kālija hidroksīda transesterifikācija istabas temperatūrā ar metanola šķīdumu**3.1.1. *Princips*

Metilesteri veidojas kā starposma produkts kālija hidroksīda transesterifikācijā ar metanola šķīdumu, pirms sākas pārziepjošanās.

3.1.2. *Reaktīvi*

3.1.2.1. Metanols, kas satur ne vairāk kā 0,5 % (masas daļa %) ūdens.

3.1.2.2. Heksāns, hromatogrāfijas kvalitātes.

3.1.2.3. Heptāns, hromatogrāfijas kvalitātes.

3.1.2.4. Dietilēteris, stabilizēts analīzes vajadzībām.

3.1.2.5. Acetons, hromatogrāfijas kvalitātes.

3.1.2.6. Eluēšanas šķīdinātājs eļļas attīrīšanai kolonnas/SPE hromatogrāfijā: heksāna/dietilētera maisījums 87/13 (tūluma daļa %).

3.1.2.7. Kālija hidroksīds, aptuveni 2M šķīdums metanolā: 11,2 g kālija hidroksīda izšķīdina 100 mililitros metanola.

3.1.2.8. Silikagela kasetnes, 1 g (6 ml), cietās fāzes ekstrakcijai.

3.1.3. *Aparatūra*

3.1.3.1. 5 ml tūluma mēģenes ar aizskrūvējamu aizbāzni, kuram ir politetrafluoretilēna apmale.

3.1.3.2. Mērpipetes vai automātiskās pipetes, 2 ml un 0,2 ml.

▼ **M28**3.1.4. *Eļļas paraugu attīrīšana*

Ja vajadzīgs, paraugus attīra, laižot eļļu caur silikagela cietās fāzes ekstrakcijas kasetni. Silikagela kasetni (3.1.2.8.) ievieto vakuuma eluēšanas iekārtā un mazgā ar 6 ml heksāna (3.1.2.2.); mazgāšana tiek veikta bez vakuuma. Pēc tam kolonnā ievada eļļas (aptuveni 0,12 g) šķīdumu 0,5 ml heksānā (3.1.2.2.). Šķīdumu izvelk tai cauri un pēc tam eluē ar 10 ml heksāna/dietilētera (87:13, tilpuma daļa %) (3.1.2.6.). Apvienotus eluātus homogenizē un sadala divos aptuveni vienādos tilpumos. Vienu alikvotu ietvaicē sausu rotācijas ietvaicētājā pie samazināta spiediena un istabas temperatūrā. Atlikumu izšķīdina 1 mililitrā heptāna, un šķīdums ir gatavs taukskābju analizēšanai ar gāzu hromatogrāfiju. Otru alikvotu ietvaicē un atlikumu izšķīdina 1 mililitrā acetona, lai vajadzības gadījumā veiktu triglicerīdu analīzi ar HPLC.

3.1.5. *Procedūra*

5 ml tilpuma stikla mēģenē ar aizskrūvējamu aizbāzni (3.1.3.1.) iesver aptuveni 0,1 g eļļas parauga. Pievieno 2 ml heptāna (3.1.2.2.) un sakrata. Pievieno 0,2 ml kālija hidroksīda šķīduma metanolā (3.1.2.7.), aizdara ar aizbāzni, kuram ir politetrafluoretilēna apmale, stingri aizskrūvē un 30 sekundes enerģiski krata. Atstāj noslāņoties, līdz augšējais slānis kļūst dzidrs. Dekantē augšējo slāni, kurš satur metilesterus. Heptāna šķīdums ir gatavs ievadīšanai gāzu hromatogrāfā. Līdz gāzu hromatogrāfiskās analīzes uzsākšanai šķīdumu ieteicams glabāt ledusskapī. Šķīdumu nav ieteicams glabāt ilgāk par 12 stundām.

B DAĻA**TAUKSKĀBJU METILESTERU ANALIZĒŠANA AR GĀZU HROMATOGRĀFIJU**1. **DARBĪBAS JOMA**

Šī daļa ietver vispārīgus norādījumus par gāzu hromatogrāfijas pielietošanu, izmantojot kapilāro kolonnu, lai noteiktu tāda taukskābju metilesteru maisījuma kvalitatīvo un kvantitatīvo sastāvu, kas iegūts saskaņā ar A daļā norādīto metodi.

Šī daļa nav piemērojama polimerizētām taukskābēm.

2. **REAKTĪVI**2.1. **Nesējgāze**

Inerta gāze (hēlijs vai ūdeņradis), kas ir rūpīgi izžāvēta un kas satur mazāk par 10 mg/kg skābekļa.

1. piezīme. Ūdeņradis var divkārt palielināt analīzes ātrumu, bet tas ir bīstams. Ir pieejamas drošības ierīces.

2.2. **Palīgāze**

2.2.1. Ūdeņradis (tīrība $\geq 99,9$ %), bez organiskiem piemaisījumiem.

2.2.2. Gaiss vai skābeklis, bez organiskiem piemaisījumiem.

2.2.3. Slāpeklis: (tīrība > 99 %).

2.3. **Salīdzināšanas standarts**

Tīru taukskābju metilesteru maisījums vai zināma sastāva tauku metilesteri, vēlamams, līdzīgi analizējamās taukainās vielas sastāvam. Nepiesātināto skābju transizomēru noteikšanā noderīgi ir oktadecēn-, oktadekadiēn- un oktadekatriēnskābes metilesteru *cis*- un *trans*- izomēri.

Jāparūpējas par to, lai polinepiesātinātās taukskābes neoksidētos.

▼ **M28****3. APARATŪRA**

Šie norādījumi ir par parasto gāzu hromatogrāfijas aprīkojumu, kurā izmanto kapilārās kolonnas un liesmas jonizācijas detektoru.

3.1. Gāzu hromatogrāfs

Gāzu hromatogrāfa sastāvdaļas ir šādas.

3.1.1. Inžekcijas sistēma

Izmanto inžekcijas sistēmu ar kapilārajām kolonnām; šādā gadījumā inžekcijas sistēmai vajadzētu būt īpaši veidotai izmantošanai kopā ar šādām kolonnām. Inžekcijas sistēma var būt ar plūsmas dalīšanu vai ar virskolonnas inžekciju, bez plūsmas dalīšanas.

3.1.2. Krāsns

Krāsni jāspēj sildīt kapilāro kolonnu vismaz līdz 260 °C un uzturēt vēlamo temperatūru 0,1 °C robežās. Pēdējā prasība ir īpaši svarīga, ja lieto kvarca kolonnu.

Visos gadījumos ir ieteicams izmantot sildīšanu ar temperatūras programmēšanu, jo īpaši taukskābēm, kurās ir mazāk par 16 oglekļa atomiem.

3.1.3. Kapilārā kolonna

3.1.3.1. Caurule, izgatavota no materiāla, kas ir inerts pret analizējamām vielām (parasti stikls vai kvarcs). Iekšējais diametrs ir starp 0,20 un 0,32 mm. Iekšējo virsmu pirms pārklāšanas ar stacionāro fāzi attiecīgi apstrādā (piemēram, sagatavo virsmu, inaktīvē). Taukskābju un taukskābju *cis*- un *trans*-izomēru gadījumā pietiekams garums ir 60 m.

3.1.3.2. Stacionārā fāze, piemērotas ir polāra polisiloksāna (ciānpropilsiloksāna) kolonnas ar ķīmiski piesaistītu stacionāro fāzi.

2. piezīme. Pastāv risks, ka polārie polisiloksāni varētu radīt grūtības ar linolēnskābes un skābju ar C₂₀ identificēšanu un izdalīšanu.

Pārklājums ir plāns, t. i., 0,1 līdz 0,2 μm.

3.1.3.3. Kolonnas montēšana un kondicionēšana

Kapilāro kolonnu montēšanā, t. i., kolonnas ievietošanā krāsni (atbalsts), pievienojumu montēšanā (hermētiskums), kolonnas galu ievietošanā inžektorā un detektorā (nelietderīgo tilpumu samazināšana) jāievēro parastā piesardzība. Kolonnu pievieno nesējgāzes plūsmai (piemēram, 0,3 bar (30 kPa) 25 m garai kolonnai ar iekšējo diametru 0,3 mm).

Kolonnu kondicionē, programmējot krāsns temperatūru 3 °C/min. no apkārtējās vides temperatūras līdz temperatūrai, kas ir par 10 °C zemāka nekā stacionārās fāzes sadalīšanās temperatūras robeža. Krāsni uztur šajā temperatūrā vienu stundu, līdz stabilizējas nulles līnija. Pēc tam atgriežas pie 180 °C un turpina darbu izotermiskos apstākļos.

3. piezīme. Pārdošanā ir pieejamas piemērotas iepriekš kondicionētas kolonnas.

3.1.4. Liesmas jonizācijas detektors un pārveidotājs-pastiprinātājs**3.2. Šļirce**

Šļirces maksimālā ietilpība ir 10 μl, un tā ir graduēta 0,1 μl iedaļās.

3.3. Datu ieguves sistēma

Datu ieguves sistēma, kas tiešsaistē savienota ar detektoriem un tiek lietota kopā ar datorprogrammu, kura ir piemērota smaiļu integrēšanai un normalizēšanai.

▼ **M28**

4. PROCEDŪRA

Darbības, kas aprakstītas 4.1.–4.3. punktā, attiecas uz liesmas jonizācijas detektora lietošanu.

4.1. **Testēšanas apstākļi**4.1.1. *Optimālu kapilārās kolonnas darbības apstākļu izraudzīšanās*

Kapilārās kolonnas efektivitāte un caurlaidība ir tāda, ka sastāvdaļu izdalīšana un analīzes ilgums lielā mērā ir atkarīgs no nesējgāzes plūsmas ātruma kolonnā. Tāpēc ir jāoptimizē darbības apstākļi, pielāgojot šo parametru (vai vienkārši kolonnas priekšgala zudumus) atkarībā no tā, vai mērķis ir uzlabot izdalīšanu vai paātrināt analīzi.

Turpmāk minētie apstākļi ir izrādījušies palīdzīgi *FAME* (C₄–C₂₆) izdalīšanā. Hromatogrammu piemēri ir doti B papildinājumā.

Inžektora temperatūra:	250 °C
Detektora temperatūra:	250 °C
Krāsns temperatūra:	165 °C (8 min) līdz 210 °C, uzsilšanas ātrums 2 °C/min
Nesējgāze-ūdeņradis:	kolonnas priekšgala spiediens, 179 kPa
Kopējā plūsma:	154,0 ml/min
Dalīšanas attiecība:	1:100
Inžekcijas tilpums:	1 µl

4.1.2. *Izšķirtspējas noteikšana (sk. A papildinājumu)*

Izšķirtspēju *R* aprēķina no divām blakusesošām smailem I un II pēc šādas formulas:

$$R = 2 \times ((d_{r(II)} - d_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ vai } R = 2 \times ((t_{r(II)} - t_{r(I)})/(\omega_{(I)} + \omega_{(II)})) \text{ (USP) (United States Pharmacopeia)}$$

vai

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

kur:

$d_{r(I)}$ ir I smailes aiztures attālums;

$d_{r(II)}$ ir II smailes aiztures attālums;

$t_{r(I)}$ ir I smailes aiztures laiks;

$t_{r(II)}$ ir II smailes aiztures laiks;

$\omega_{(I)}$ ir I smailes pamatnes platums;

$\omega_{(II)}$ ir II smailes pamatnes platums;

$\omega_{0,5}$ ir konkrētā savienojuma smailes platums, kuru mēra smailes augstuma pusceļā.

Ja $\omega_{(I)} \approx \omega_{(II)}$, *R* aprēķina pēc šādas formulas:

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

kur:

σ ir standartnovirze (sk. A papildinājuma 1. attēlu).

▼ **M28**

Ja attālums d_i starp abām smailem $d_{r(II)} - d_{r(I)}$ ir vienāds ar 4σ , izšķirtspējas koeficients $R = 1$,

Ja divas smailes ir nodalītas nepilnīgi, abu smaīļu pārliekuma punktus novilktais tangentes krustojas punktā C. Lai abas smailes atdalītu pilnībā, attālumam starp tām jābūt vienādam ar:

$$d_{r(II)} - d_{r(I)} = 6 \sigma, \text{ attiecīgi } R = 1,5 \text{ (sk. A papildinājuma 3. attēlu).}$$

5. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

5.1. **Kvalitatīvā analīze**

Pēc B papildinājuma 1. attēla hromatogrammas paraugā identificē metilesteru smailes, vajadzības gadījumā interpolējot vai salīdzinot ar metilesteru standartmaisījumu (kā norādīts 2.3. punktā).

5.2. **Kvantitatīvā analīze**5.2.1. *Sastāva noteikšana*

Aprēķina masas frakciju, w_i atsevišķajiem taukskābju metilesteriem, izsaka metilesteru masas procentos, un to dara šādi.

5.2.2. *Aprēķina metode*5.2.2.1. *Vispārīgs gadījums*

Aprēķina un metilesteru masas procentos izsaka dotā komponenta i saturu, nosakot attiecīgās smailes laukumu procentos attiecībā pret visu smaīļu laukumu summu pēc šādas formulas:

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

kur:

A_i ir laukums zem individuālas taukskābes metilesterā i smailes;

ΣA ir visu laukumu summa zem visu individuālo taukskābju metilesteru smaīlēm.

Rezultātus izsaka ar divām zīmēm aiz komata.

4. *piezīme.* Taukiem un eļļām taukskābju metilesteru masas frakcija ir vienāda ar triacilglicerīnu masas frakciju, izsakot gramos uz 100 g. Ja šis pieņēmums nav pieļaujams, sk. 5.2.2.2. punktu.

5.2.2.2. *Korekcijas koeficientu lietošana*

Dažos gadījumos, piemēram, tādu taukskābju klātbūtnē, kas satur mazāk par astoņiem oglekļa atomiem, vai tādu skābju klātbūtnē, kam ir otrējās grupas, laukumus koriģē ar īpašiem korekcijas koeficientiem (Fci). Šos koeficientus nosaka katram instrumentam atsevišķi. Šim nolūkam izmanto piemērotus references materiālus, kuriem ir sertificēts taukskābju sastāvs attiecīgajā spektrā.

5. *piezīme.* Šie korekcijas koeficienti atšķiras no teorētiskajiem *FID* korekcijas koeficientiem, kas norādīti A papildinājumā, jo tie aptver arī inžekcijas sistēmas darbību u. c. Tomēr lielāku atšķirību gadījumā būtu jāpārbauda visas sistēmas darbība.

▼ **M28**

Šim standartmaisījumam taukskābes metilesteru i masas procentus apraksta formula:

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

kur:

m_i ir taukskābes metilesteru i masa standartmaisījumā;

Σm ir dažādo komponentu, izteiktu kā taukskābes metilesteru, masas summa standartmaisījumā.

No standartmaisījuma hromatogrammas aprēķina taukskābes metilesteru i procentuālo laukumu:

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

kur:

A_i ir taukskābes metilesteru i laukums standartmaisījumā;

ΣA ir visu taukskābes metilesteru laukumu summa standartmaisījumā.

Tad korekcijas koeficients F_c ir:

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

Paraugā masas procenti katram taukskābes metilesterim i ir:

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

Rezultātus izsaka ar divām zīmēm aiz komata.

6. *piezīme.* Aprēķinātā vērtība atbilst tādas individuālas taukskābes masas procentiem, kas aprēķināta kā triacilglicerīni uz 100 g tauku.

5.2.2.3. Iekšējā standarta lietošana

Dažās analīzēs (piemēram, ja visas taukskābes nav kvantitatīvi jānosaka, kā tas ir gadījumā, ja skābes ar četriem vai sešiem oglekļa atomiem ir kopā ar skābēm, kurās ir 16 un 18 oglekļa atomi, vai ja ir jānosaka taukskābes absolūtais daudzums paraugā) ir jālieto iekšējais standarts. Bieži lieto taukskābes ar 5, 15 vai 17 oglekļa atomiem. Būtu jānosaka iekšējā standarta korekcijas koeficients (ja tāds ir vajadzīgs).

Komponenta i masas procentus, izteiktus kā metilesterus, iegūst pēc formulas:

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

kur:

A_i ir taukskābes metilesteru i laukums;

A_{IS} ir iekšējā standarta laukums;

F_i ir taukskābes i , kas izteikta kā taukskābes metilesteris, korekcijas koeficients;

F_{IS} ir iekšējā standarta korekcijas koeficients;

m ir analizējamā parauga masa miligramos;

m_{IS} ir iekšējā standarta masa miligramos.

Rezultātus izsaka ar divām zīmēm aiz komata.

▼M28**6. TESTĒŠANAS PĀRSKATS**

Testēšanas pārskatā norāda metilesteru sagatavošanā un gāzu hromatogrāfijā lietotās metodes. Tajā norāda arī visus datus par darbu, kas nav norādīti šajā standartmetodē vai tiek uzskatīti par neobligātiem, kā arī datus par incidentiem, kuri varētu būt ietekmējuši rezultātus.

Testēšanas pārskatā iekļauj visu informāciju, kas vajadzīga, lai pilnībā identificētu paraugu.

7. PRECIZITĀTE**7.1. Starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultāti**

Sīkāka informācija par starplaboratoriju salīdzinošo testēšanu, kurā testēta metodes precizitāte, ir izklāstīta standartā IOC/T.20/Doc. Nr. 33 un konkrēti tā C pielikumā. Vērtības, kas iegūtas šajā starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā, drīkst piemērot tikai šeit minētajiem analizējamu vielu koncentrācijas diapazoniem un matricēm.

7.2. Atkārtojamība

Absolūtā starpība starp diviem neatkarīgiem viena testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot to pašu metodi un identisku testa materiālu, tajā pašā laboratorijā, tam pašam operatoram izmantojot to pašu iekārtu neilgā laika posmā, ne vairāk kā 5 % gadījumu drīkst pārsniegt r vērtību, kas norādīta standartā IOC/T.20/Doc. Nr. 33 un konkrēti tā C pielikuma 1.–14. tabulā.

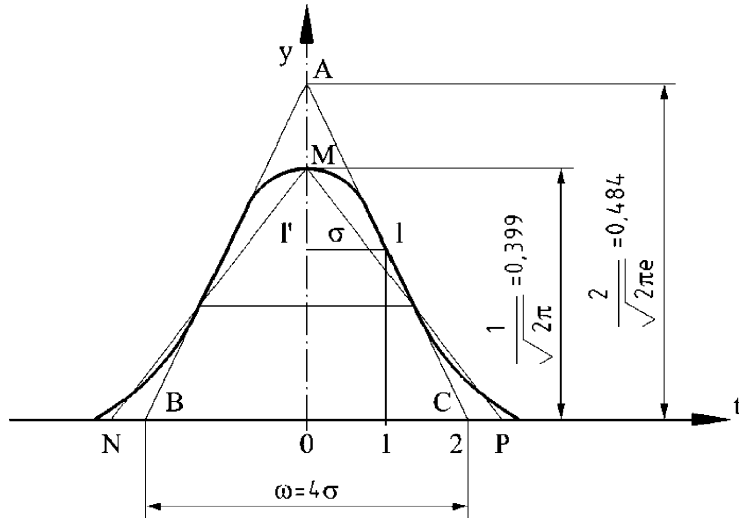
7.3. Reproducējamība

Absolūtā starpība starp diviem viena testa rezultātiem, kas iegūti, izmantojot to pašu metodi un identisku testa materiālu, dažādās laboratorijās, dažādiem operatoriem izmantojot dažādas iekārtas, ne vairāk kā 5 % gadījumu drīkst pārsniegt R vērtību, kas norādīta standartā IOC/T.20/Doc. Nr. 33 un konkrēti tā C pielikuma 1.–14. tabulā.

▼ M28

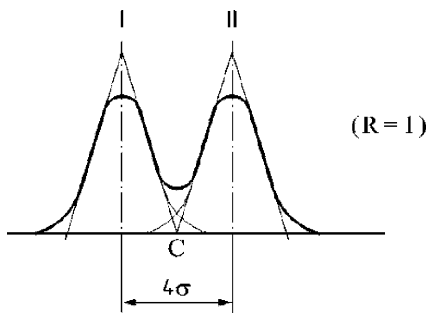
A pielikums

1. attēls

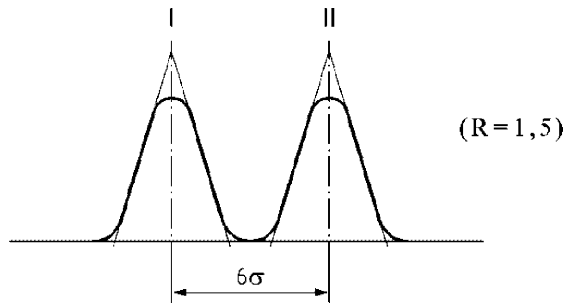


$\omega_{0,5}$ platums trijstūra ABC augstuma pusceļā un b platums trijstūra NPM augstuma pusceļā.

2. attēls



3. attēls

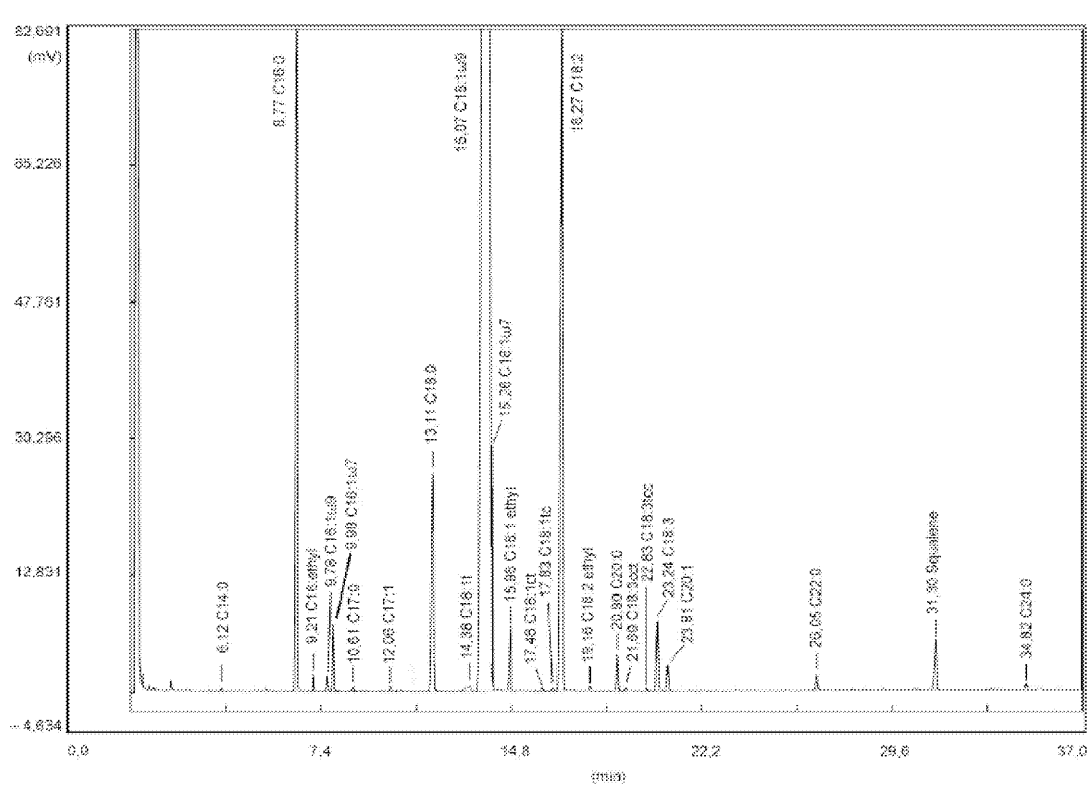


▼M28

B papildinājums

1. attēls

Gāzu hromatogrāfijas profils, kas ar auksto metilona metodi iegūts no olīvu izspaidu eļļas parauga



Ja nav norādīts citādi, hromatogrāfiskās smailes atbilst metilesterim un etilesterim.



XI PIELIKUMS

GAISTOŠO HALOGENĒTO ŠĶĪDINĀTĀJU SATURA NOTEIKŠANA
OLĪVEĻĻĀ

1. METODE

Gāzu hromatogrāfiskā analīze, ņemot paraugu gāzes fāzē (*head space* paņēmiens).

2. APRĪKOJUMS

2.1. Gāzu hromatogrāfs ar elektronu satveres detektoru (ECD).

2.2. Head space iekārta.

2.3. Gāzu hromatogrāfijas kolonna, 2 m gara un ar 2 mm iekšējo diametru. Nekustīgā fāze: OV101 10 % vai līdzvērtīga, ar ko piesūcināts izkarsēts diatomīts ar daļiņu lielumu 80 līdz 100 *mesh*, kas mazgāts ar skābi un silanizēts.

2.4. Nesējgāze un palīgāze: slāpekļis gāzu hromatogrāfijai, piemērots detektēšanai ar elektronu satveri.

2.5. 10 līdz 15 ml stikla pudelītes ar teflona pārklājumu un alumīnija aizbāzni, caur ko var ievadīt šļirci.

2.6. Aizspiedņi hermētiskai noslēgšanai.

2.7. Gāzu šļirce 0,5 līdz 2 ml.

3. REAKTĪVI

Standarts: halogenēti šķīdinātāji, gāzu hromatogrāfijai piemērotas tīrības pakāpes.

4. PROCEDŪRA

4.1. Stikla pudelītē precīzi nosver aptuveni 3 g eļļas (pudelīti izmanto vienu reizi); to hermētiski noslēdz. To ieliek termostatā, kur temperatūra 70 °C, uz vienu stundu. Ar šļirci uzmanīgi paņem 0,2 līdz 0,5 ml no gāzes fāzes. To iešļircina šādi noregulēta gāzu hromatogrāfa kolonnā:

— inžektora temperatūra: 150 °C,

— kolonnas temperatūra: 70 līdz 80 °C,

— detektora temperatūra: 200 līdz 250 °C.

Var izmantot arī citas temperatūras ar nosacījumu, ka rezultāti paliek līdzvērtīgi.

4.2. Standartšķīdumi: pagatavo standarta šķīdumus koncentrāciju diapazonā 0,05 līdz 1 ppm (mg/kg) atbilstīgi paredzamajai parauga koncentrācijai, izmantojot rafinētu olīveļļu, kurā nav šķīdinātāju zīmju. Halogenētos šķīdinātājus var atšķaidīt ar pentānu.

4.3. Kvantitatīvais novērtējums: salīdzina parauga un standartšķīduma ar paredzamo tuvāko koncentrāciju pīķu laukumus vai augstumus. Ja atšķirība ir lielāka par 10 %, analīze ir jāatkārto, salīdzinot ar citu standartšķīdumu, līdz atšķirība ir 10 % robežās. Saturu nosaka, pamatojoties uz atsevišķos iešļircinājumos iegūto vidējo lielumu.

4.4. Rezultātu izteikšana: ppm (mg/kg). Metodes noteikšanas robeža ir 0,01 mg/kg.

▼ **M26**

XII PIELIKUMS

STARPTAUTISKĀS OLĪVU PADOMES METODE, KO PIEMĒRO
NEAPSTRĀDĀTAS OLĪVEĻĻAS ORGANOLEPTISKAJAI
NOVĒRTĒŠANAI▼ **M28**

1. MĒRĶIS UN DARBĪBAS JOMA

Šajā pielikumā aprakstītās starptautiskās metodes mērķis ir noteikt kārtību, kādā novērtē organoleptiskās īpašības neapstrādātai olīveļļai Eiropas Parlamenta un Padomes Regulas (ES) Nr. 1308/2013 ⁽¹⁾ VII pielikuma VIII daļas 1. punkta nozīmē, un noteikt metodi olīveļļas klasificēšanai atkarībā no šīm īpašībām. Turklāt šajā metodē ir paredzēti norādījumi attiecībā uz fakultatīvo marķējumu.

Aprakstītā metode attiecas tikai uz neapstrādātām olīveļļām un šādu eļļu klasificēšanu vai marķēšanu atkarībā no konstatēto defektu un augļainuma intensitātes, ko nosaka atlasītu, kvalificētu un uzraudzītu degustētāju grupa jeb žūrija.

Šajā pielikumā minētos Starptautiskās Olīvu padomes (IOC) standartus izmanto to jaunākajā pieejamajā redakcijā.

▼ **M26**

2. SENSORISKĀS ANALĪZES VISPĀRĪGIE PAMATJĒDZIENI

Skatīt standartu IOC/T.20/Doc. Nr. 4 "Sensoriskā analīze: vispārīgie pamatjēdzieni".

3. SPECIFISKIE JĒDZIENI

3.1. Negatīvās pazīmes

Asa smarža un garša/duļķes: raksturīga buķete eļļām, kas iegūtas no kaudzēs sakrātām vai glabātām olīvām, kuras pārņēmusi anaerobā rūgšana, vai arī buķete, kas raksturo eļļu, kura mucās un tvertnēs bijusi saskarē ar nogulsniem, kuras arī ir pārņēmusi anaerobā rūgšana.

Pelējums/mitra zeme: raksturīga buķete eļļām, kas iegūtas no olīvām, kuras vairākas dienas glabātas mitrumā un kurās tāpēc attīstījušās sēnītes un raugi, vai tādu eļļu buķete, kas iegūtas no zemjainām vai dubļainām olīvām, kuras pēc ievākšanas nav nomazgātas.

Vīns/etiķis/skābums: dažām eļļām raksturīga buķete, kas atgādina vīnu vai etiķi. Pārsvārā tā veidojas tāpēc, ka olīvas vai olīvu masu, kas tiek glabāta netīrās (pavirši izmazgātās) presējamās mašās, pārņēmusi anaerobā rūgšana, kuras rezultātā ir radusies etiķskābe, etilacetāts un etanols.

Sasmakums: raksturīga buķete eļļām, kas ir ātri oksidējušās.

Apsalušas olīvas (mitra koksne): tādu eļļu buķete, kas iegūtas no olīvām, kuras, tām vēl kokā esot, ir skārusi salna.

⁽¹⁾ Eiropas Parlamenta un Padomes 2013. gada 17. decembra Regula (ES) Nr. 1308/2013, ar ko izveido lauksaimniecības produktu tirgu kopīgu organizāciju un atceļ Padomes Regulas (EEK) Nr. 922/72, (EEK) Nr. 234/79, (EK) Nr. 1037/2001 un (EK) Nr. 1234/2007 (OV L 347, 20.12.2013., 671. lpp.).

▼ **M28**3.1.1. *Citas negatīvas pazīmes*

<i>Pārkarsēšana vai piedegums:</i>	raksturīga eļļas buķete, ko rada pārlietu stipra un/vai ilgstoša sildīšana ieguves laikā, jo īpaši olīvu pastas termomaisīšanas gadījumā, ja to veic nepiemērotos temperatūras apstākļos.
<i>Siens/koksne:</i>	buķete, kas raksturīga dažām eļļām, kuras iegūtas no sažuvušām olīvām.
<i>Raupjums:</i>	biezuma un mīklveidīguma sajūta, kas rodas, pagaršojot dažas vecas eļļas.
<i>Smēreļļas:</i>	buķete, kas atgādina dīzeļdegvielu, ziezeļļas vai minerāleļļu.
<i>Izspaidu ūdens:</i>	buķete, kas raksturo eļļu, kura pārāk ilgi bijusi saskarē ar izspaidu ūdeni, kurā notikusi rūgšana.
<i>Sālījums:</i>	buķete, kas raksturo no sāls šķīdumā iekonservētām olīvām iegūtu eļļu.
<i>Metāls:</i>	metālu atgādinoša buķete. Pārsvarā raksturīga eļļām, kas drupināšanas, maisīšanas, spiešanas vai glabāšanas laikā ilgstoši bijušas saskarē ar metāla virsmām.
<i>Esparto:</i>	raksturīga buķete eļļām, kuras iegūst, olīvas spiežot jaunās mašās no esparto zāles. Atkarībā no tā, vai mašas izgatavotas no svaigas vai no žāvētas esparto zāles, buķetes var būt atšķirīgas.
<i>Kāpuri:</i>	tādu eļļu buķete, kas iegūtas no olīvām, kuras stipri bojājuši o līvu mušu (<i>Bactrocera oleae</i>) kāpuri.
<i>Gurķi:</i>	raksturīga buķete, kas rodas, eļļu pārāk ilgi glabājot hermētiski noslēgtos traukos, jo īpaši skārda tvertnēs, kā dēļ veidojas 2,6-nonadienāls.

3.2. **Pozitīvās pazīmes**

<i>Augļainums:</i>	no olīvu šķirnes atkarīgs aromātu kopums, kas raksturīgs eļļām, kuras iegūtas no nebojātiem, svaigiem augļiem, kas var būt zaļi vai gatavi. Tas ir uztverams tieši un/vai retronazāli.
<i>Rūgtums:</i>	pamatgarša, kas raksturīga eļļām, kuras iegūtas no zaļām vai pusgatavām olīvām. Rūgto garšu nosaka ar valnīšveida garšas kārpiņām, kuras atrodas uz robežas starp mēles sakni un ķermeni.
<i>Pikantums:</i>	knūdinoša sajūta, ko parasti rada eļļas, kuras iegūtas sezonas sākumā un – visbiežāk – no olīvām, kas vēl ir zaļas. Pikantumu var sajūst visā mutes dobumā, jo īpaši rīklē.

▼ **M32**3.3. **Fakultatīvs terminu lietojums marķējumā**

Žūrijas priekšsēdētājs pēc pieprasījuma var apliecināt, ka novērtētā eļļa atbilst definīcijām un diapazoniem, kurus raksturo ar turpmāk norādītajiem īpašības vārdiem atkarībā no attiecīgo pazīmju intensitātes un uztveramības.

▼ **M32**

Pozitīvās pazīmes (augļainums, rūgtums un pikantums). Atkarībā no garšas intensitātes:

- *intensīva*, ja attiecīgās pazīmes mediāna ir lielāka par 6,0,
- *vidēji izteikta*, ja attiecīgās pazīmes mediāna ir lielāka par 3,0 un mazāka vai vienāda ar 6,0,
- *viegla*, ja attiecīgās pazīmes mediāna ir mazāka vai vienāda ar 3,0.

<i>Augļainums:</i>	no olīvu šķirnes atkarīgs aromātu kopums, kas raksturīgs eļļām, kuras iegūtas no nebojātām, svaigām olīvām, kur nav ne zaļo, ne gatavo augļu pārsvara. Tas ir uztverams tieši un/vai retronazāli.
<i>Zaļu augļu garša:</i>	no olīvu šķirnes atkarīgs aromātu kopums, kas raksturīgs eļļām, kuras garšo pēc zaļiem augļiem un iegūtas no zaļām, nebojātām, svaigām olīvām. Tas ir uztverams tieši un/vai retronazāli.
<i>Gatavu augļu garša:</i>	no olīvu šķirnes atkarīgs aromātu kopums, kas raksturīgs eļļām, kuras garšo pēc gataviem augļiem un iegūtas no nebojātām, svaigām olīvām. Tas ir uztverams tieši un/vai retronazāli.
<i>Sabalansēta garša:</i>	eļļa, kuras garša nav nesabalansēta, proti, pagaršojot eļļu, nerodas tāda ožas, garšas un kņudinoša sajūta, kurā rūgtuma un/vai pikantuma pazīmes mediāna ir par 2,0 punktiem lielāka par augļainuma mediānu.
<i>Maīga eļļa:</i>	eļļa, kuras rūgtuma un pikantuma pazīmes mediāna ir 2,0 vai mazāka.

Garšas intensitātei atbilstīgo terminu saraksts:

Termini, uz kuriem attiecas eļļas organoleptiskā testa sertifikāts	Attiecīgās pazīmes mediāna
Augļainums	—
Gatavu augļu garša	—
Zaļu augļu garša	—
Viegli izteikts augļainums	$\leq 3,0$
Vidēji izteikts augļainums	$3,0 < Me \leq 6,0$
Stipri izteikts augļainums	$> 6,0$
Vāji izteikta gatavu augļu garša	$\leq 3,0$
Vidēji izteikta gatavu augļu garša	$3,0 < Me \leq 6,0$
Stipri izteikta gatavu augļu garša	$> 6,0$
Vāji izteikta zaļu augļu garša	$\leq 3,0$
Vidēji izteikta zaļu augļu garša	$3,0 < Me \leq 6,0$

▼ **M32**

Termini, uz kuriem attiecas eļļas organoleptiskā testa sertifikāts	Attiecīgās pazīmes mediāna
Stipri izteikta zaļu augļu garša	> 6,0
Vāji izteikts rūgtums	≤ 3,0
Vidēji izteikts rūgtums	3,0 < Me ≤ 6,0
Stipri izteikts rūgtums	> 6,0
Vāji izteikts pikantums	≤ 3,0
Vidēji izteikts pikantums	3,0 < Me ≤ 6,0
Stipri izteikts pikantums	> 6,0
Līdzsvarotas garšas eļļa	Rūgtuma pazīmes mediāna un pikantuma pazīmes mediāna pārsniedz augļainuma mediānu ne vairāk par 2,0 punktiem.
Maīga eļļa	Rūgtuma un pikantuma pazīmes mediāna ir 2,0 vai mazāka.

▼ **M26**

4. EĻĻAS DEGUSTĒŠANAS GLĀZE
Skatīt standartu IOC/T.20/Doc. Nr. 5 “Eļļas degustēšanas glāze”.
5. DEGUSTĀCIJAS TELPA
Skatīt standartu IOC/T.20/Doc. Nr. 6 “Degustācijas telpas sagatavošanas norādījumi”.
6. PIEDERUMI
Katrā kabīnē ir jābūt turpmāk uzskaitītajiem piederumiem, kas ir vajadzīgi degustētājiem, lai viņi varētu pienācīgi pildīt savu uzdevumu, un tiem ir jābūt ērti aizsniedzamiem:
 - (standartizētām) glāzēm ar paraugiem, kuri marķēti ar kodu, pārklāti ar pulksteņstiklu un turēti 28 °C ± 2 °C;
 - profila lapām (skatīt 1. attēlu) papīra formā vai elektroniskā formātā (ar nosacījumu, ka ir izpildīti profila lapas nosacījumi) un, ja vajadzīgs, norādījumiem par profila lapas izmantošanu;
 - pildspalvai vai nedzēšamai tinteij;
 - traukiem ar ābolu šķēlēm un/vai ūdenim, gāzētam ūdenim un/vai sausiņiem;
 - glāzei ūdens apkārtējās vides temperatūrā;
 - lapai ar vispārīgajiem noteikumiem, kas uzskaitīti 8.4. un 9.1.1. iedaļā;
 - splūjamtraukiem.

▼ **M26**

7. ŽŪRIJAS PRIEKŠSĒDĒTĀJS UN DEGUSTĒTĀJI

7.1. Žūrijas priekšsēdētājs

Žūrijas priekšsēdētājam jābūt atbilstīgi kvalificētai personai ar specifiskām zināšanām par eļļu veidiem, ar ko viņš saskarsies darba gaitā. Žūrijas priekšsēdētājs ir galvenais žūrijas pārstāvis un ir atbildīgs par tās organizēšanu un darbību.

Žūrijas priekšsēdētāja darbam ir nepieciešama pamatapmācība darbā ar sensoriskās analīzes rīkiem, sensoriskās prasmes, liela rūpība testu sagatavošanā, organizēšanā un izpildē, kā arī prasmes un pacietība, lai zinātniski plānotu un izpildītu testus.

Žūrijas priekšsēdētājs ir vienīgā persona, kas atbild par degustētāju atlasī, mācībām un uzraudzību, lai nodrošinātu viņu atbilstības līmeni. Tādējādi žūrijas priekšsēdētājs ir atbildīgs par degustētāju novērtējumu, kam vienmēr jābūt objektīvam un kā vajadzībām žūrijas priekšsēdētājs var izstrādāt konkrētas procedūras, kas pamatojas uz testiem un stabiliem pieņemšanas un noraidīšanas kritērijiem. Skatīt standartu IOC/T.20/Doc. Nr. 14 "Neapstrādātas olīveļļas prasmīgu degustētāju atlasē, mācību un uzraudzības norādījumi".

Žūrijas priekšsēdētājs ir atbildīgs par žūrijas darba rezultātiem un tā novērtējumu, kas žūrijas priekšsēdētājam ir ticami un objektīvi jāapliecina. Jebkurā gadījumā žūrijas priekšsēdētājam vienmēr ir jāspēj apliecināt, ka metode un degustētāji tiek kontrolēti. Ir ieteicams periodiski pārskatīt žūriju (IOC/T.20/Doc. Nr. 14, 5. nodaļa).

Žūrijas priekšsēdētājs ir galvenā atbildīgā persona par žūrijas ierakstu glabāšanu. Šiem ierakstiem jābūt izsekojamiem. Tiem ir jāatbilst ticamības un kvalitātes prasībām, kas noteiktas starptautiskajos sensoriskās analīzes standartos, un vienmēr ir jānodrošina paraugu anonimitāte.

Žūrijas priekšsēdētājs ir atbildīgs par inventarizāciju un nodrošina, ka iekārtas un aprīkojums, kas vajadzīgs, lai panāktu atbilstību šīs metodes specifikācijām, tiek pienācīgi tīrīts un uzturēts, un glabā rakstiskas liecības par to un par atbilstību testēšanas nosacījumiem.

Žūrijas priekšsēdētājs ir atbildīgs par paraugu pieņemšanu un glabāšanu, kad tie nonāk laboratorijā, kā arī par to glabāšanu pēc testēšanas. Pildot šo pienākumu, žūrijas priekšsēdētājs vienmēr nodrošina, ka paraugi saglabā anonimitāti un tiek pienācīgi uzglabāti; šim nolūkam žūrijas priekšsēdētājam ir jāizstrādā rakstiskas procedūras, lai nodrošinātu, ka viss process ir izsekojams un sniedz garantijas.

Turklāt žūrijas priekšsēdētājs ir atbildīgs par paraugu sagatavošanu, kodēšanu un pasniegšanu degustētājiem saskaņā ar attiecīgo testa struktūru atbilstīgi iepriekš noteiktiem protokoliem, kā arī par degustētāju iegūto datu apkopošanu un statistisko apstrādi.

Žūrijas priekšsēdētājs ir atbildīgs par jebkādu citu procedūru izstrādi un sagatavošanu, kuras varētu būt vajadzīgas, lai papildinātu šo standartu un nodrošinātu žūrijas pienācīgu darbību.

Žūrijas priekšsēdētājam ir jācenšas rast veidus, kā salīdzināt žūrijas rezultātus ar citu žūriju rezultātiem, kuras analizē nepastrādātu olīveļļu, lai noskaidrotu, vai žūrija pienācīgi darbojas.

▼ **M26**

Žūrijas priekšsēdētāja pienākums ir motivēt žūrijas locekļus, rosinot viņos interesi, zinātkāri un sacensību garu. Lai to panāktu, žūrijas priekšsēdētājam noteikti iesaka nodrošināt vienmērīgu divvirzienu informācijas plūsmu ar žūrijas locekļiem, sniedzot viņiem informāciju par visiem viņu veiktajiem uzdevumiem un iegūtajiem rezultātiem. Turklāt žūrijas priekšsēdētājs nodrošina, ka viņa viedoklis nav zināms, un nepieļauj, ka kāds vadošais loceklis, iespējams, uzspiež savus kritērijus citiem degustētājiem.

Žūrijas priekšsēdētājs degustētājiem laikus ziņo par degustāciju un atbild uz jautājumiem par testu veikšanu, bet atturas izteikt viedokli par paraugiem.

▼ **M28**7.1.1. *Žūrijas priekšsēdētāja vietnieks*

Pamatotos gadījumos žūrijas priekšsēdētāju drīkst aizstāt viņa vietnieks, kurš pilda ar testu veikšanu saistītos žūrijas priekšsēdētāja pienākumus. Šim vietniekam ir jābūt ar visām žūrijas priekšsēdētājam vajadzīgajām prasmēm.

7.2. **Degustētāji**

Cilvēkiem, kas kā degustētāji piedalās olīveļļu organoleptiskajos testos, tas jā dara brīvprātīgi. Tādēļ kandidātiem ir ieteicams iesniegt rakstisku pieteikumu. Kandidātus atlasa, māca un uzrauga žūrijas priekšsēdētājs atkarībā no kandidātu prasmes noteikt atšķirības starp līdzīgiem paraugiem; jāpatur prātā, ka kandidātu precizitāte mācību gaitā uzlabosies.

Degustētājiem ir jā darbojas kā faktiskiem sensoriskajiem novērotājiem, neņemot vērā savu personīgo gaumi un aprakstot vienīgi tās izjūtas, ko viņi ir uztvēruši. Lai to paveiktu, žūrijas locekļiem ir jāstrādā klusumā, atbrīvoti un nesteidzīgi, pievēršot maksimālu sensoro uzmanību degustētajam paraugam.

Katram testam ir vajadzīgi 8–12 degustētāji, lai gan ir ieteicams nodrošināt papildu degustētājus, lai vajadzības gadījumā aizstātu neieradušos locekļus.

▼ **M26**

8. TESTA NOSACĪJUMI

8.1. **Parauga pasniegšana**

Analizēšanai paredzēto eļļas paraugu pasniedz standartizētā degustācijas glāzē, kas atbilst standartam IOC/T.20/Doc. Nr. 5 “Eļļas degustēšanas glāze”.

Glāzē ir 14–16 ml eļļas (vai 12,8–14,6 g eļļas, ja paraugus sver), un tā ir pārsegta ar pulkstenstiklu.

Katru glāzi marķē ar kodu, kas sastāv no nejauši izvēlētiem cipariem vai burtu un ciparu kombinācijas. Marķēšanai izmanto nesmaržīgu līdzekli.

8.2. **Testa un parauga temperatūra**

Degustēšanai paredzētos eļļas paraugus visā testa laikā tur glāzēs 28 °C ± 2 °C temperatūrā. Šāda temperatūra ir izvēlēta tādēļ, ka tā atvieglo organoleptisko atšķirību noteikšanu istabas temperatūrā un ka zemākā temperatūrā šīm eļļām raksturīgajiem aromātiskajiem savienojumiem ir vāja iztvaikošanas spēja, savukārt augstākā temperatūrā veidojas gaistoši savienojumi, kas ir raksturīgi karsētām eļļām. Saistībā ar metodi, ko izmanto glāzēs esošu paraugu uzsildīšanai, skatīt standartu IOC/T.20/Doc. Nr. 5 “Eļļas degustēšanas glāze”.

▼ **M26**

Degustācijas telpas temperatūrai jābūt 20–25 °C (skatīt IOC/T.20/Doc. Nr. 6).

8.3. **Testēšanas laiki**

Labākais eļļu degustēšanas laiks ir rīts. Ir pierādīts, ka dienas gaitā ir periodi, kuros garšas un smaržas uztvere ir optimāla. Ožas un garšas uztvere pirms maltītēm pastiprinās, savukārt pēc tam šī uztveres spēja samazinās.

Tomēr ar šo kritēriju nevajadzētu pārspīlēt, jo izsalkums var traucēt degustētāju darbā, tādējādi pazeminot viņu izšķiršanas spēju; tāpēc degustēšanu ir ieteicams veikt laikā no plkst. 10.00 līdz 12.00.

8.4. **Degustētāji – vispārīgs rīcības kodekss**

Degustētāju rīcībai darba laikā piemēro turpmāk izklāstītos ieteikumus.

Pēc žūrijas priekšsēdētāja uzaicinājuma piedalīties organoleptiskā testēšanā, degustētājiem jāspēj ierasties iepriekš noteiktajā laikā un jāievēro šādi nosacījumi:

- viņi nesmēķē un nedzer kafiju vismaz 30 minūtes pirms noteiktā testa laika;
- viņi nedrīkst lietot smaržas, kosmētiku vai ziepes, kuru smarža saglabātos līdz testa laikam. Roku mazgāšanai viņiem ir jāizmanto nesmaržīgas ziepes, rokas noskalojot un noslaukot tik daudz reižu, cik vajadzīgs, lai likvidētu jebkādas smaržas;
- viņi neēd vismaz vienu stundu pirms degustācijas;
- ja degustētāji jūtas slikti, jo īpaši gadījumā, ja ir ietekmēta viņu ožas vai garšas spēja, vai ja viņi ir psiholoģiskā noskaņojumā, kas viņiem neļauj koncentrēties darbam, degustētāji nepiedalās degustēšanā un attiecīgi informē žūrijas priekšsēdētāju;
- ja degustētāji ir ievērojuši iepriekš izklāstītos nosacījumus, viņi kārtīgi un klusi ieņem savu vietu norādītajā kabīnē;
- viņi rūpīgi izlasa profila lapā dotos norādījumus un nesāk izmeklēt paraugu, līdz nav pilnīgi sagatavojušies veicamajam uzdevumam (atbrīvoti un nesteidzīgi). Šaubu gadījumā viņi privāti apspriežas ar žūrijas priekšsēdētāju;
- uzdevuma izpildes laikā viņiem ir jāievēro klusums;
- lai netraucētu koncentrēšanos un kolēģu darbu, mobilajiem tālruņiem visu laiku jābūt izslēgtiem.

9. **NEAPSTRĀDĀTAS OLĪVEĻĻAS ORGANOLEPTISKĀS NOVĒRTĒŠANAS UN KLASIFICĒŠANAS PROCEDŪRA**9.1. **Degustēšanas metode**▼ **M29**

- 9.1.1. Degustētāji paceļ glāzi, nenoņemot no tās pulksteņstiklu, un to nedaudz sasver; pēc tam viņi glāzi šādā pozīcijā pilnīgi apgriež riņķī, lai pēc iespējas vairāk saslapinātu glāzes iekšējās malas. Kad šis posms ir pabeigts, degustētāji noņem pulksteņstiklu un pasmaržo paraugu, lēnām un dziļi ievēlot elpu, lai novērtētu eļļu. Smaržošana nedrīkst pārsniegt 30 sekundes. Ja šajā laikā nav izdarīti nekādi secinājumi, pirms nākamā mēģinājuma viņi neilgu laiku atpūšas.

▼ **M29**

Kad ožas tests ir paveikts, degustētāji novērtē ar mutes dobumu uztvertās sajūtas (vispārējās retronazālās, garšas un kņudinošās sajūtas). Šim nolūkam viņi iemalko aptuveni 3 ml eļļas. Ir ļoti svarīgi izplatīt eļļu visā mutes dobumā no mutes priekšējās daļas, mēles, mutes malām un pakalējās daļas līdz augslējam un rīklei, jo, kā ir zināms, garšu un kņudinošās sajūtas intensitāte atšķiras atkarībā no mēles, augsļēju un rīkles apvidus.

Jāuzsver, ka ir būtiski, lai pietiekams daudzums eļļas tiktu ļoti lēnām izplatīts pāri mēlei augsļēju un rīkles virzienā, kamēr degustētājs koncentrējas uz secību, kādā parādās rūgta un pikanta garša. Ja tas netiek darīts, dažos eļļu veidos šīs abas sajūtas var palikt nepamanītas vai arī rūgtumu var pārmākt pikantums.

Īsi, secīgi elpas vilcieni, ievēkot gaisu caur muti, ļauj degustētājam ne tikai paraugu plaši izplatīt pa visu muti, bet arī retronazāli uztvert gais-tošos aromātiskos savienojumus, piespiežot sevi izmantot šo kanālu.

NB! Ja degustētāji nejut paraugā augļainumu un ja klasificētās negatīvās pazīmes intensitāte ir 3,5 vai mazāka, žūrijas priekšsēdētājs var nolemt, ka degustētāji analizē paraugu vēlreiz apkārtējās vides temperatūrā (COI/T.20/Doc. No 6/Rev. 1, 2007. gada septembrī, 3. iedaļa – Vispārīgi noteikumi degustācijas zāles ierīkošanai, precizējot kontekstu un apkārtējās vides temperatūras jēdzienu. Ja paraugs ir sasniedzis istabas temperatūru, degustētājiem būtu atkārtoti jāvērtē vienīgi, lai pārbaudītu to, vai augļainums ir uztverts. Ja ir, tad tā intensitāte tiem jāatzīmē uz skalas.

Jāņem vērā pikantuma kņudinošā sajūta. Šim nolūkam ir ieteicams eļļu norīt.

▼ **M26**

- 9.1.2. Veicot neapstrādātas olīveļļas organoleptisko novērtējumu, ir ieteicams katrā testēšanas sesijā novērtēt ne vairāk kā ČETRUS PARAGUS un dienā veikt ne vairāk kā trīs testēšanas sesijas, lai izvairītos no kontrasta efekta, ko varētu radīt citu paraugu tūlītēja degustēšana.

Tā kā secīga degustēšana var izraisīt jūtīguma samazināšanos vai zudumu, ko rada iepriekšējie paraugi, ir jāizmanto produkts, kas likvidē no iepriekšējās degustēšanas mutē atlikušo eļļu.

Ir ieteicams izmantot nelielu šķēli ābola, ko pēc sakošļāšanas var izmest spļaujamtraukā. Pēc tam muti izskalo ar nelielu daudzumu istabas temperatūras ūdens. Starp vienas sesijas beigām un nākamās sākumam jāpaiet vismaz 15 minūtēm.

9.2. Degustētāju profila lapas izmantošana

Degustētājiem paredzētā profila lapa ir norādīta šā pielikuma 1. attēlā.

Katrs žūrijā ietilpstošais degustētājs vispirms nosaka vērtējamās eļļas smaržu, tad garšu⁽¹⁾. Pēc tam degustētāji reģistrē intensitāti, ar kādu viņi uztver katru no negatīvajām un pozitīvajām pazīmēm, izmantojot 10 cm skalu, kas sniegta norādītajā profila lapā.

⁽¹⁾ Degustētāji var negaršot eļļu, ja ar tiešiem ožas paņēmieniem tiek konstatēta ārkārtīgi spēcīga negatīvā pazīme, un tādā gadījumā viņi šo ārkārtējo apstākli reģistrē profila lapā.

▼ **M26**

Ja degustētāji konstatē negatīvas pazīmes, kas nav norādītas 4. iedaļā, viņi tās reģistrē sadaļā "Citas", izmantojot terminu vai terminus, kuri visprecīzāk apraksta pazīmes.

▼ **M28**9.3. **Žūrijas priekšsēdētāja rīcība ar datiem**

Žūrijas priekšsēdētājs savāc degustētāju aizpildītās profila lapas un pārskata dažādām pazīmēm norādīto intensitāti. Ja tiek konstatētas neatbilstības, žūrijas priekšsēdētājs lūdz attiecīgo degustētāju vēlreiz pārbaudīt profila lapu un, ja vajadzīgs, atkārtot testu.

Žūrijas priekšsēdētājs katra žūrijas locekļa novērtējumu datus ievada datorprogrammā, piemēram, datorprogrammā, kāda paredzēta standartā IOC/T.20/Doc. Nr. 15, lai statistiski aprēķinātu analīzes rezultātus, pamatojoties uz to mediānu aprēķiniem. Skatīt šā pielikuma 9.4. punktu un papildinājumu. Konkrēta parauga datus ievada, izmantojot matricu ar 9 slejām, kurās ieraksta 9 sensorās pazīmes, un n rindām, kur "n" ir žūrijā ietilpstošo degustētāju skaits.

Ja vismaz 50 % žūrijas locekļu ir konstatējuši defektu un reģistrējuši to sadaļā "Citas", žūrijas priekšsēdētājs aprēķina šā defekta mediānu un izsecina atbilstīgo klasifikāciju.

Klasifikāciju noteicošā noturīgā variāciju koeficienta vērtība (defekts ar spēcīgāko intensitāti un augļainums) nedrīkst pārsniegt 20 %.

Pretējā gadījumā žūrijas priekšsēdētājam ir jāatkārto konkrētā parauga novērtējums vēl vienā degustēšanas sesijā.

Ja šāda situācija bieži atkārtojas, žūrijas priekšsēdētājam ir ieteicams nodrošināt degustētājiem konkrētas papildu mācības (IOC/T.20/Doc. Nr. 14. 5. nodaļa) un izmantot atkārtojamības indeksu un novirzes indeksu, lai pārbaudītu degustētāju darbības rezultātus (IOC/T.20/Doc. Nr. 14, 6. nodaļa).

▼ **M32**9.4. **Eļļas klasificēšana**

Eļļas šķiru nosaka, ņemot vērā defektu mediānu un augļainuma mediānu. Defektu mediāna ir intensīvākā konstatētā defekta mediāna. Defektu mediānu un augļainuma mediānu norāda ar vienu zīmi aiz komata.

Eļļas šķiru nosaka, defektu mediānu un augļainuma mediānu salīdzinot ar turpmāk norādītajiem atsauces diapazoniem. Diapazonu robežas ir noteiktas, ņemot vērā metodes kļūdu, un tāpēc tiek uzskatītas par absolūtām. Attiecīgas programmatūras pakotnes ļauj iedalījumu šķirās attēlot statistikas datu tabulas vai grafika veidā:

- a) neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa: defektu mediāna ir 0,0, augļainuma mediāna ir lielāka par 0,0;
- b) neapstrādāta olīveļļa: defektu mediāna ir lielāka par 0,0, bet nav lielāka par 3,5, augļainuma mediāna ir lielāka par 0,0;
- c) neapstrādāta spīdīgā olīveļļa: vai nu defektu mediāna ir lielāka par 3,5, vai arī defektu mediāna ir mazāka vai vienāda ar 3,5, bet augļainuma mediāna ir 0,0.

▼ **M32**

1. *piezīme.* Ja rūgtuma un/vai pikantuma mediāna ir lielāka par 5,0, žūrijas priekšsēdētājs to norāda eļļas testa sertifikātā.

Ja novērtējums vajadzīgs, lai uzraudzītu atbilstību, veic vienu testu. Kontrolnovērtējumu gadījumā analīze jāveic divos savstarpēji nesaistītos atkārtojumos. Atkārtotās analīzes rezultātiem jābūt statistiski viendabīgiem. (Skatīt 9.5. punktu.) Ja tas tā nav, paraugs divas reizes jāanalizē no jauna. Klasifikācijas pazīmju mediānas galīgo vērtību aprēķina kā abu mediānu vidējo vērtību.

▼ **M29**9.5. **Kritēriji atkārtojumu pieņemšanai un noraidīšanai**

Standartklūdu, kas definēta turpmāk, izmanto, lai noteiktu, vai abi atkārtotas analīzes rezultāti ir viendabīgi vai statistiski pieņemami:

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

ja Me_1 un Me_2 ir abu atkārtojumu (resp., pirmās un otrās analīzes) mediānas un ja U_1 un U_2 ir paplašinātās nenoteiktības attiecībā uz vērtībām, kas aprēķinātas, kā norādīts turpmāk un noteikts papildinājumā:

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

attiecībā uz paplašināto neprecizitāti $c = 1,96$; tādējādi:

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

kur CV_r ir noturīgais variācijas koeficients.

Jānorāda, ka abas iegūtās vērtības nav statistiski atšķirīgas, E_n jābūt vienādam ar vai mazākam par 1,0.

▼ **M28***1. attēls***NEAPSTRĀDĀTAS OLĪVEĻĀS PROFILA LAPA****Konstatēto defektu intensitāte**

Asa smarža un garša/duļķes _____

Pelējums/mitra zeme _____

Vīns/etiķis/
skābums _____Apsalušas olīvas
(mitra koksne) _____

Sasmakums _____

Citas negatīvas pazīmes: _____

Apraksts: Metāls Siens Kāpuri Raupjums
 Sāļjums Pārkarsēšana vai piedegums Izspaidu ūdens
 Esparto Gurķi Smēreļļas

Konstatēto pozitīvo pazīmju intensitāte

Augļainums _____

Zaļi augļi Gatavi augļi

Rūgtums _____

Pikantums _____

Degustētāja vārds, uzvārds:

Degustētāja kods:

Parauga kods:

Paraksts:

Datums:

Piezīmes:

▼ **M26***Papildinājums***Mediānas un ticamības intervālu aprēķināšana****Mediāna**

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

Mediāna ir reālais skaitlis X_m , kuru raksturo tas, ka varbūtība (p), ka sadalījuma vērtības (X) ir mazākas par šo skaitli (X_m), nepārsniedz 0,5, un vienlaikus varbūtība (p), ka sadalījuma vērtības (X) ir mazākas vai vienādas ar X_m , ir vienāda ar 0,5 vai lielāka par to. Saskaņā ar praktiskāku definīciju mediāna ir 50. procentile sadalījumā, kurā skaitļi ir sakārtoti augošā secībā. Vienkāršāk sakot, tā ir tādas sakārtotas rindas viduspunkts, kurā ir nepāra skaits skaitļu, vai arī tādas sakārtotas rindas divu viduspunktu vidējais, kurā ir pāra skaits skaitļu.

Robustā standartnovirze

Lai ticami novērtētu varianšu izkliedi ap vidējo vērtību, ir jāizmanto Stjuarta un Kendela (4) metode robustās standartnovirzes noteikšanai. Pēc turpmāk norādītās formulas aprēķina asimptotisko standartnovirzi, proti, apskatāmo datu variācijas robusto novērtējumu, kur N ir novērojumu skaits un IQR ir interkartilais intervāls, kurš atbilst tieši 50 % gadījumu, lai kāds būtu varbūtības sadalījums:

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

Interkartilo intervālu iegūst, aprēķinot novirzes lielumu intervālā starp 75. un 25. procentili.

$$IQR = 75. \text{ procentile} - 25. \text{ procentile}$$

Kur procentile ir vērtība X_{pc} , kuru raksturo tas, ka varbūtība (p), ka sadalījuma vērtības ir mazākas par X_{pc} , nepārsniedz noteiktu simtdaļu, un vienlaikus varbūtība (p), ka sadalījuma vērtības ir lielākas par vai vienādas ar X_{pc} , ir vienāda minēto simtdaļu vai pārsniedz to. Attiecīgā simtdaļa norāda izvēlēto sadalījuma fraktili. Mediānas gadījumā tā ir 50/100.

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

Praktisku apsvērumu dēļ procentile ir sadalījuma vērtība, kas atbilst noteiktam apgabalam, kurš atlikts uz sadalījuma jeb blīvuma līknes. Piemēram, 25. procentile atbilst sadalījuma vērtībai, kuru raksturojošais apgabals ir vienāds ar 0,25 jeb 25/100.

Šīs metodes ietvaros procentiles aprēķina, pamatojoties uz faktiskajām vērtībām, ko iegūst no datu matricas (procentiņu aprēķināšanas procedūra).

Robustais variāciju koeficients (%)

CV_r % ir tikai skaitlis, kas procentuāli izsaka analizētas skaitļu rindas variabilitāti. Šā iemesla dēļ šis koeficients lieti noder, kad jāpārlicinās par to, vai žūrijas locekļu spriedumam var uzticēties.

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

▼ M26**Ticamības intervālu atbilstība 95 % no mediānas intervāla**

Ticamības intervāls, kas atbilst 95 % (pirmās pakāpes kļūdas vērtība ir 0,05 jeb 5 %), ir tas, kurā mediānas vērtība mainītos, ja testu atkārtotu bezgalīgi daudz reizi. Praksē ar šo intervālu izsaka variācijas intervālu, kāds tas būtu konkrētajam testam izraudzītajos apstākļos, ja minēto testu varētu atkārtot vairākkārt. Tāpat kā CVr % gadījumā, ar šā intervāla palīdzību var novērtēt testa rezultātu ticamību.

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

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

kur $C = 1,96$, ja ticamības intervāls ir 95 %.

Aprēķinu lapas piemērs ir sniegts standarta IOC/T 20/Doc. Nr. 15 I pielikumā.

Atsauces

- (1) Wilkinson, L. 1990. Systat: The system for statistics. Evanston, IL.SYSTAT Inc.
- (2) Cicchitelli, G. 1984. Probabilità e Statistica. Maggioli Editore, Rimini.
- (3) Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, Y.; Michotte, L. 1988. Chemometrics. A textbook. Elsevier. Amsterdam.
- (4) Kendall, M.G.; Stuart, A. 1967. The advanced theory of statistics. Vol. 1. Hafner Publishing Co.
- (5) McGill, R.; Tukey, J.W.; Larsen, W.A. 1978. Variation of Box Plots. The American Statistician, 32, (2), 12-16.
- (6) IOC/T.28/Doc. No 1 September 2007, Guidelines for the accreditation of sensory testing laboratories with particular reference to virgin olive oil according to standard ISO/IEC 17025:2005.
- (7) IOC/T.20/Doc. Nr. 14.
- (8) IOC/T.20/Doc. Nr. 15.
- (9) ISO/IEC 17025:05.

▼ M20

▼ M19

▼B*XV PIELIKUMS*

1. EĻĻAS SATURS OLĪVU IZSPAIDĀS

1.1. Aparatūra

- piemērots ekstrakcijas aparāts ar 200 līdz 250 ml apaļkolbu,
- ar elektrisko strāvu sildāma vanna (piem., smilšu vanna, ūdens vanna) vai elektriskā plītiņa,
- analītiskie svāri,
- žāvēšanas skapis, kura maksimālā temperatūra noregulēta uz 80 °C,
- ar elektrisko strāvu sildāms termostatējams žāvēšanas skapis, kas noregulēts uz 103 ± 2 °C un kurā var pūst gaisa strāvu vai darbināt skapi pie samazināta spiediena,
- viegli tīrāmas mehāniskās dzirnavas, ar ko olīvu izspaidas var samalt, nepaceļot to temperatūru vai neradot jūtamas izmaiņas to mitruma, gaistošo vielu vai ar heksānu ekstrahējamo vielu saturā,
- ekstrahēšanas patrona un vate vai filtrpapīrs, no kura ir jau aizvāktas ar heksānu ekstrahējamas vielas,
- eksikators,
- siets ar atverēm 1 mm diametrā,
- iepriekš izžāvēta pumeka sīkas daļiņas.

1.2. Reaktīvs

Normālais heksāns, tehniskas kvalitātes, kas, pilnīgi iztvaicējot, atstāj atlikumu mazāk par 0,002 g uz 100 ml.

2. PROCEDŪRA

2.1. Analizējamā parauga sagatavošana

Vajadzības gadījumā laboratorijas parauga samalšanai, lai to sasmalcinātu daļiņās, kas pilnībā iziet cauri sietam, izmanto iepriekš labi iztīrītas mehāniskās dzirnavas.

Lai pabeigtu dzirnavu tīrīšanas procesu, izmanto aptuveni vienu divdesmito daļu no parauga, izmet samalto materiālu, samaļ atlikumu un savāc, rūpīgi sajauc un tūlīt analizē.

2.2. Analīzes paraugs

Tūlīt pēc malšanas pabeigšanas analīzei nosver aptuveni 10 g parauga ar precizitāti līdz tuvākajiem 0,01 g.

2.3. Ekstrakcijas patronas sagatavošana

Analīzes paraugu ievieto patronā un aizbāž ar vati. Ja lieto filtrpapīru, analīzes paraugu ietin tajā.

2.4. Iepriekšēja žāvēšana

Ja olīvu izspaidas ir ļoti mitras (t.i., mitrums un gaistošo vielu saturs ir vairāk par 10 %), paraugu iepriekš izžāvē, ievietojot pielādēto patronu (vai filtrpapīru) sildāmā žāvēšanas skapī, kur temperatūra nav augstāka par 80 °C, uz vajadzīgo laiku, lai mitrums un gaistošo vielu saturs kļūtu mazāks par 10 %.

▼B**2.5. Apaļkolbas sagatavošana**

Nosvērt kolbu ar precizitāti līdz tuvākajam 1 mg, kurā ir viena vai divas pumeka daļiņas, kas iepriekš izžāvētas žāvēšanas skapī 103 ± 2 °C un pēc tam atdzesētas eksikatorā ne mazāk par vienu stundu.

2.6. Sākotnējā ekstrakcija

Ekstrakcijas aparātā ievieto patronu (vai filtrpapīru), kurā ir analīzes paraugs. Kolbā ielej vajadzīgo heksāna daudzumu. Pievieno kolbu ekstrakcijas aparātā un visu kopā novieto uz vannas, ko silda ar elektrisko strāvu. Sildīšanas ātrumu noregulē tā, lai atceses ātrums nebūtu lielāks par trim pilieniem sekundē (mērena, ne strauja vārīšanās). Pēc četrām ekstrakcijas stundām ļauj atdzist. Patronu izņem no ekstrakcijas aparāta un ievieto gaisa strauvē, lai izvadītu lielāko daļu šķīdinātāja, ar ko paraugs ir piesātināts.

2.7. Otrā ekstrakcija

Patronas saturu ieber mikrodzirnāvās un iespējami smalki samaļ. Bez zudumiem pārnes samalto maisījumu atpakaļ patronā un to ievieto atpakaļ ekstrakcijas aparātā.

Turpina ekstrakciju vēl divas stundas, izmantojot to pašu apaļkolbu, kas satur sākotnējo ekstraktu.

Beigu šķīdumam ekstrakcijas kolbā ir jābūt dzidram. Ja tā nav, nofiltrē caur filtrpapīru un sākotnējo kolbu un filtrpapīru vairākas reizes mazgā ar heksānu. Savāc filtrātu un mazgāšanas šķīdinātāju otrā apaļkolbā, kas ir izžāvēta un nosvērta ar precizitāti līdz tuvākajam 1 mg.

2.8. Šķīdinātāja aizvākšana un ekstrakta svēršana

Lielāko daļu šķīdinātāja destilē, sildot uz vannas ar elektrisko strāvu. Pēdējās šķīdinātāja zīmes aizvāc, sildot kolbu 20 minūtes žāvēšanas skapī 103 ± 2 °C. Aizvākšanas procesu veicina, vai nu ar pārtraukumiem pūšot gaisu vai, labāk, inertiem gāzi, vai arī izmantojot samazinātu spiedienu.

Atstāj kolbu eksikatorā atdzist vismaz vienu stundu un nosver ar precizitāti līdz tuvākajam 1 mg.

Vēlreiz silda 10 minūtes tādos pašos apstākļos, atdzesē eksikatorā un vēlreiz nosver.

Starpība starp abiem svērumiem nedrīkstētu pārsniegt 10 mg. Ja tā ir lielāka, atkārti 10 minūšu sildīšanas, pēc tam atdzesēšanu un svēršanu, līdz svara starpība ir 10 mg vai mazāka. Pieraksta kolbas pēdējo svaru.

Vienam analizējamam paraugam izdara divas noteikšanas.

3. REZULTĀTU IZTEIKŠANA**3.1. Aprēķina metode un formula**

a) Ekstrakts, kas izteikts izejas produkta masas procentos, ir vienāds:

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

▼B

kur: S = ekstrakta masas procenti izejas produktā,
 m_0 = analīzes parauga masa gramos,
 m_1 = ekstrakta masa gramos pēc žāvēšanas.

Rezultāts ir divu noteikšanu aritmētiskais vidējais ar nosacījumu, ka ir izpildīti atkārtojamības nosacījumi.

Rezultātu izsaka līdz pirmajai zīmei aiz komata.

b) Ekstraktu izsaka kā sauso vielu, izmantojot formulu:

$$S \times \frac{100}{100 - U} = \text{eļļas procenti ekstraktā, rēķinot uz sausu vielu,}$$

kur: S = ir ekstrakta masas procenti izejas produktā (sk. a) punktā),

U = ir tā mitruma un gaistošās masas saturs.

3.2. Atkārtojamība

Starpība starp divām noteikšanām, ko vienlaikus vai drīz vienu pēc otra veicis viens un tas pats analītiķis, nav lielāka par 0,2 g heksāna ekstrakta uz 100 g parauga.

Ja šis nosacījums nav izpildīts, analīzi atkārtoti ar diviem citiem analīzes paraugiem. Ja arī šajā gadījumā starpība ir lielāka par 0,2 g, par rezultātu pieņem četru noteikšanu aritmētisko vidējo.



XVI PIELIKUMS

JODA SKAITĻA NOTEIKŠANA

1. DARBĪBAS JOMA

Šis starptautiskais standarts norāda joda skaitļa noteikšanas metodi dzīvnieku un augu taukos un eļļās, še turpmāk, tauki.

2. DEFINĪCIJA

Šajā starptautiskajā standartā piemēro šādu definīciju.

2.1. *Joda skaitlis*. Joda masa, ko absorbē paraugs šajā starptautiskajā standartā noteiktajos analīzes apstākļos.

Joda skaitli izsaka joda gramos uz 100 g parauga.

3. PRINCIPS

Analīzes parauga šķīdināšana šķīdinātājā un veisa reaktīva pielikšana. Pēc noteikta laika kālija jodīda un ūdens pievienošana un atbrīvotā joda titrēšana ar nātrija tiosulfāta šķīdumu.

4. REAKTĪVI

Visi reaktīvi ir atzītas analītiskas kvalitātes.

4.1. *Ūdens*, kas atbilst ISO 3696, 3. kategorijas prasībām.

4.2. *Kālija jodīda šķīdums* 100 g/l, kas nesatur jodātu vai brīvu jodu.

4.3. *Cietes šķīdums*.

Sajauc 5 g šķīstošās cietes un 30 ml ūdens, pievieno šo maisījumu 1 000 ml vāroša ūdens, vāra trīs minūtes un atstāj atdzist.

4.4. *Nātrija tiosulfāta* standarta volumetrisks šķīdums $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1$ mols/l, standartizēts ne agrāk kā septiņas dienas pirms lietošanas.

4.5. *Šķīdinātājs*, kas sagatavots, sajaucot vienādus tilpumus cikloheksāna un etiķskābes.

4.6. *Veisa reaktīvs*, kas satur joda monohlorīdu etiķskābē. Lieto tirdzniecībā pieejamo Veisa reaktīvu.

5. APARATŪRA

Parastā laboratorijas aparatūra un jo īpaši šāda:

5.1. *Stikla svēršanas laiviņas*, piemērotas analīzes paraugam un ievietošanai kolbās (6.2. punkts).

5.2. *Koniskās kolbas* ar 500 ml tilpumu, ar pieslēpētiem aizbāžņiem, pilnīgi sausas.

6. ANALIZĒJAMĀ PARAUGA SAGATAVOŠANA

Homogenizētu paraugu žāvē virs nātrija sulfāta un nofiltrē.

7. PROCEDŪRA

7.1. Analīzes paraugs

Analīzes parauga masa mainās atkarībā no sagaidāmā joda skaitļa, kā parādīts 1. tabulā.

▼B

1. tabula

Sagaidāmais joda skaits	Analizējamās daļas masa (g)
mazāks par 5	3
5 līdz 20	1
21 līdz 50	0,4
51 līdz 100	0,2
101 līdz 150	0,13
151 līdz 200	0,1

Stikla svēršanas laiviņā (5.1. punkts) nosver analīzes paraugu līdz tuvākajam 0,1 mg.

7.2. Noteikšana

Analīzes paraugu ieliek 500 ml kolbā (6.2. punkts). Pievieno 20 ml šķīdinātāja (4.5. punkts), lai izšķīdinātu taukus. Pievieno tieši 25 ml Veisa reaktīva (4.6. punkts), ieliek aizbāzni, saskalo saturu un noliek kolbu tumšā. Veisa reaktīvam neizmanto mutes pipeti.

Līdzīgi sagatavo tukšo mēģinājumu ar šķīdinātāju un reaktīvu, bet nepieliek analīzes paraugu.

Kolbas ar paraugiem, kuru joda skaits ir zem 150, vienu stundu atstāj tumšā; kolbas ar paraugiem, kuru joda skaits ir virs 150, un polimerizētiem produktiem vai ievērojamā mērā oksidētiem produktiem atstāj tumšā divas stundas.

Kad šis laiks pagājis, katrā kolbā pievieno 20 ml kālija jodīda šķīduma (4.2. punkts) un 150 ml ūdens (4.1. punkts).

Titrē ar standarta volumetrisku nātrija tiosulfāta šķīdumu (4.4. punkts), līdz joda dzeltenā krāsa ir gandrīz pazudusi. Pievieno dažus pilienus cietes šķīduma (4.3. punkts) un turpina titrēt, līdz zilā krāsa pēc ļoti enerģiskas kratīšanas tikko pazūd.

Piezīme: ir atļauta beigu punkta potenciometriskā titrēšana.

7.3. Noteikšanu skaits

Vienam analizējamam paraugam izdara divas noteikšanas.

8. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

Joda skaitli iegūst no izteiksmes

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

kur:

c_1 = ir lietotā standarta volumetriskā nātrija tiosulfāta šķīduma (4.4. punkts) precīzās koncentrācijas skaitliskais lielums molos litrā;

V_1 = ir tukšajā mēģinājumā izlietotā standarta volumetriskā nātrija tiosulfāta šķīduma (4.4. punkts) tilpuma skaitliskais lielums mililitros;

▼B

V_2 = ir noteikšanā izlietotā standarta volumetriskā nātrija tiosulfāta šķīduma (4.4. punkts) tilpuma skaitliskais lielums mililitros;

m = ir analīzes parauga (7.1. punkts) masas skaitliskais lielums gramos.

Rezultātu izsaka kā divu noteikšanu aritmētisko vidējo ar nosacījumu, ka ir izpildīti atkārtojamības (9.2. punkts) nosacījumi.

▼ **M11***XVII PIELIKUMS***STIGMASTADIĒNU NOTEIKŠANAS METODE AUGU EĻĻĀS**

1. MĒRĶIS

Stigmastadiēnu noteikšana augu eļļās, kas satur nelielas šo ogļūdeņražu koncentrācijas, jo īpaši neapstrādātā olīveļļā un nerafinētā olīvu atlikumu eļļā.

2. LIETOŠANAS JOMA

Metodi var izmantot visām augu eļļām, kaut arī mērījumi ir ticami tikai, ja šo ogļūdeņražu saturs ir starp 0,01 un 4,0 mg/kg. Metode ir īpaši piemērota, lai noteiktu rafinētu augu eļļu (olīveļļas, olīvu atlikumu eļļas, saulespuķu eļļas, palmu eļļas utt.) klātbūtni neapstrādātā olīveļļā, jo rafinētas eļļas satur stigmastadiēnus, bet neapstrādātas eļļas tos nesatur.

3. PRINCIPS

Nepārziņojamās vielas izolēšana. Ogļūdeņražu steroīdu frakcijas atdalīšana ar kolonnas hromatogrāfiju uz silikagēla un analīze ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju.

4. APARATŪRA

- 4.1. 250 ml kolbas, kas piemērotas lietošanai ar atteces dzesinātāju.
- 4.2. 500 ml dalāmās piltuves.
- 4.3. 100 ml apaļkolbas.
- 4.4. Rotācijas iztvaicētājs.
- 4.5. Stikla hromatogrāfijas kolonna (iekšējais diametrs 1,5 līdz 2,0 cm, garums 50 cm) ar teflona krānu un stikla vates aizbāzni vai poraina stikla disku apakšā. Lai sagatavotu silikagēla kolonnu, hromatogrāfijas kolonnā ielej heksānu aptuveni 5 cm augstumā un pēc tam piepilda ar silikagēla suspensiju heksānā (15 g 40 mililitros), izmantojot vairākas porcijas heksāna. Atstāj nogulsnēties un pabeidz nogulsnēšanu, viegli klauvējot pa kolonnu. Pievieno bezūdens nātrija sulfātu aptuveni 0,5 cm augstumā, pēc tam eluē heksāna pārākumu.
- 4.6. Gāzu hromatogrāfs ar liesmas jonizācijas detektoru, ar plūsmas dalīšanu vai ar aukstu "on column" inžektoru un krāsni, kas programmējama ± 1 °C robežās.
- 4.7. Kvarca kapilārā kolonna gāzu hromatogrāfijai (iekšējais diametrs 0,25 vai 0,32 mm, garums 25 m), pārklāta ar 5 % fenilmetilsilikona nekustīgo fāzi, plēves biezums 0,25 μm.

1. piezīme:

Var izmantot citas kolonnas ar līdzīgu vai mazāku polaritāti.

- 4.8. Integrators/reģistrējošā iekārta, kas var integrēt starp diviem minimumiem.
- 4.9. 5 līdz 10 ml mikrošļirce gāzu hromatogrāfijai ar nemaināmu adatu.
- 4.10. Elektriskais sildīšanas apvalks vai elektriskā plītiņa.

▼ **M11**

5. REAĢENTI

Visiem reaģentiem jābūt analīzes kvalitātes, ja nav noteikts citādi. Izmantojamam ūdenim ir jābūt destilētam vai vismaz līdzvērtīgas tīrības ūdenim.

▼ **M32**

- 5.1. Heksāns vai alkānu maisījums ar viršanas punktu starp 65 un 70 °C, destilēts ar rektifikācijas kolonnu. Heksānu drīkst aizstāt ar izooktānu (2,2,4-trimetilpentāns, hromatogrāfijai), ja vien tiek iegūtas salīdzināmas precizitātes vērtības. Var pārbaudīt atlikumu pēc 100 ml šķīdinātāja iztvaicēšanas. Šķīdinātāji, kuriem ir augstāks viršanas punkts nekā n-heksānam, iztvaiko lēnāk. Tomēr heksāna toksiskuma dēļ tiem dodama priekšroka.

▼ **M11**

- 5.2. Etilspirts, 96 % tilp./tilp.

- 5.3. Bezūdens nātrija sulfāts.

- 5.4. Kālija hidroksīda 10 % šķīdums spirtā. Pievieno 50 gramiem kālija hidroksīda 10 ml ūdens, samaisa un pēc tam maisījumu atšķaida ar etilspirtu līdz 500 ml.

3. piezīme:

Kālija hidroksīda šķīdums spirtā stāvot kļūst brūns. Tas katru dienu ir jāpagatavo svaigs un jāglabā labi aizkorķējamās tumša stikla pudelēs.

- 5.5. Silikagēls 60 kolonnas hromatogrāfijai, 70 līdz 230 *mesh* (Merck, Nr. 7734 vai līdzīgs).

4. piezīme:

Silikagēlu parasti var izmantot tieši no trauka bez apstrādes. Tomēr dažas silikagēla partijas var būt mazaktīvas, kas rada sliktu hromatogrāfisko sadalījumu. Šādos apstākļos silikagēls jāapstrādā šādi: Silikagēlu aktivē, sildot vismaz četras stundas 550 °C grādu temperatūrā. Pēc sildīšanas silikagēlu ievieto eksikatorā, līdz gēls atdziest, un pēc tam silikagēlu pārnes noslēdzamā kolbā. Pievieno 2 % ūdens un krata, līdz nav redzami gabaliņi un pulveris plūst brīvi.

Ja silikagēla partijas dod hromatogrammas ar pīķiem, kas pārklājas, silikagēls ir jāapstrādā, kā minēts iepriekš. Alternatīva ir lietot ekstra tīru silikagēlu 60 (Merck, Nr. 7754).

- 5.6. Holestā-3,5-diēna (Sigma, 99 % tīrība) izejas šķīdums (200 ppm) heksānā (10 mg 50 mililitros).

- 5.7. Holestā-3,5-diēna standartšķīdums ar koncentrāciju 20 ppm, ko iegūst atšķaidot izejas šķīdumu.

5. piezīme:

Šķīdumi 5.6 un 5.7 ir stabili vismaz četrus mēnešus, ja tos glabā temperatūrā, kas zemāka par 4 °C.

- 5.8. n-Nonakozāna šķīdums heksānā ar aptuveno koncentrāciju 100 ppm.

- 5.9. Nesējgāze hromatogrāfijai: hēlijs vai ūdeņradis ar 99,9990 % tīrības pakāpi.

- 5.10. Palīgģāzes liesmas jonizācijas detektoram: ūdeņradis ar 99,9990 % tīrības pakāpi un attīrīts gaiss.

▼ **M11****6. DARBA GAITA****6.1. Nepārziepojamās vielas sagatavošana**

6.1.1. Nosver $20 \pm 0,1$ g eļļas 250 ml kolbā (4.1), pievieno 1 ml holesta-3,5-diēna standartšķīduma ($20\text{ g holesta-3,5-diēna}$), pievieno 75 ml 10 % kālija hidroksīda šķīduma spirtā, uzliek atceces dzesinātāju un 30 minūtes silda, lēni vārot. Noņem kolbu ar paraugu no sildītāja un ļauj šķīdumam nedaudz atdzist (neļauj pilnīgi atdzist, lai paraugs nesacietētu). Pievieno 100 ml ūdens un pārnes šķīdumu dalāmajā piltuvē (4.2), izmantojot 100 ml heksāna. Maisījumu enerģiski krata 30 sekundes un ļauj atdalīties.

6. piezīme:

Ja rodas emulsija, kas drīz nepazūd, pievieno nedaudz etilspirta.

6.1.2. Apakšā esošo ūdens fāzi pārnes otrā dalāmajā piltuvē un vēlreiz ekstrahē ar 100 ml heksāna. Vēlreiz izteicina apakšējo fāzi un heksāna ekstraktus (apvienotus citā dalāmajā piltuvē) mazgā trīs reizes ar etilspirta un ūdens maisījumu (1:1), izlietojot katru reizi 100 ml, līdz sasniegts neitrāls pH.

6.1.3. Heksāna šķīdumu laiž cauri bezūdens nātrija sulfātam (50 g), mazgā ar 20 ml heksāna un rotācijas ietvaicētājā 30 °C temperatūrā pie samazināta spiediena iztvaicē sausu.

6.2. Steroīdu ogļūdeņražu frakcijas atdalīšana

6.2.1. Atlikumu, izmantojot divas 1 ml porcijas heksāna, pārnes fracionēšanas kolonnā, laiž paraugu cauri kolonnai, ļaujot šķīduma līmenim nolaisties līdz nātrija sulfāta virmai, un sāk hromatogrāfisko eluēšanu ar heksānu pie aptuvenā plūsmas ātruma 1 ml/min. Izlej pirmos 25 līdz 30 ml eluāta un pēc tam savāc nākošo 40 ml frakciju. Pēc savākšanas pārnes šo frakciju 100 ml apaļkolbā (4.3).

7. piezīme:

Pirmā frakcija satur piesātinātos ogļūdeņražus (1.a zīmējums) un otrā frakcija — steroīdu ogļūdeņražus. Turpmākā eluēšanā iegūst skvalēnu un tam radnieciskus savienojumus. Lai panāktu labu piesātināto un steroīdu ogļūdeņražu atdalīšanu, ir jāoptimizē frakciju tilpumi. Šajā nolūkā pirmās frakcijas tilpums ir jānoregulē tā, lai, analizējot otro frakciju, pīķi, kas atbilst piesātinātajiem ogļūdeņražiem, būtu zemi (sk. 1.c zīmējumu); ja tie neparādās, bet standarta pīķa intensitāte ir zema, tilpums ir jāsamazina. Tomēr pirmās un otrās frakcijas komponentu pilnīga atdalīšana nav vajadzīga, jo GH analizē pīķi nepārklājas, ja GH apstākļi ir noregulēti, kā norādīts 6.3.1. Otrās frakcijas tilpuma optimizācija parasti nav vajadzīga, jo nākamie komponenti ir labi atdalīti. Tomēr liela pīķa klātbūtne ar aptuveni 1,5 minūtes mazāku aiztures laiku nekā standartam ir skvalēna dēļ, un tas norāda uz sliktu atdalīšanu.

6.2.2. Otrā frakciju rotācijas ietvaicētājā 30 °C temperatūrā pie pazemināta spiediena iztvaicē sausu un atlikumu tūlīt šķīdina 0,2 ml heksāna. Šķīdumu līdz analīzei glabā ledusskapī.

8. piezīme:

Atlikumus 6.1.2 un 6.2.2 neglabā sausus un istabas temperatūrā. Tūlīt pēc to iegūšanas jāpievieno šķīdinātājs, un šķīdumi jāglabā ledusskapī.

▼ **M11****6.3. Gāzu hromatogrāfija**

6.3.1. Darba apstākļi iešļircināšanai ar plūsmas dalīšanu:

- inžektora temperatūra: 300 °C,
- detektora temperatūra: 320 °C,
- integrators/reģistrējošā iekārta: integrēšanas parametri ir jāizvēlas tā, lai pareizi novērtētu pīķu laukumus. Ir ieteicama integrēšana starp diviem minimumiem,
- jutība: aptuveni 16 reižu lielāka par mazāko jutības dzišanu,
- iešļircinātā šķīduma daudzums: 1 µl,
- krāsns programmēšanas temperatūras: sākuma temperatūra 235 °C sešas minūtes, pēc tam temperatūru palielina pa 2 °C/minūtē līdz 285 °C,
- inžektors ar plūsmas dalīšanu 1:15,
- nesējgāze: hēlijs vai ūdeņradis pie 120 kPa spiediena.

Šos apstākļus var regulēt saskaņā ar hromatogrāfa un kolonnas īpašībām, lai hromatogrammas atbilstu šādām prasībām: iekšējā standarta pīķim jāparādās aptuveni piecu minūšu intervālā pirms vai pēc 6.3.2 norādītā laika; iekšējā standarta pīķim ir jābūt vismaz 80 % no pilnas skalas.

Gāzu hromatogrāfa sistēma ir jāpārbauda, iešļircinot holestadiēna izejas šķīduma (5.6) un n-nonakozāna šķīduma (5.8) maisījumu. Holesta-3,5-diēna pīķim ir jāparādās pirms n-nonakozāna pīķa (1.c zīmējums); ja tā nenotiek, var rīkoties divējādi: samazināt krāsns temperatūru un/vai lietot mazāk polāru kolonnu.

6.3.2. Pīķu identificēšana Iekšējā standarta pīķis parādās aptuveni pēc 19 minūtēm, un stigmasta-3,5-diēna pīķis — pēc relatīvā iznākšanas laika aptuveni 1,29 (sk. 1.b zīmējumu). Stigmasta-3,5-diēnā gadās mazi izomēra daudzumi, un parasti abi eluējas kopā kā viens hromatogrāfiskais pīķis. Tomēr, ja kolonna ir pārāk polāra vai tai ir augsta izšķirtspēja, izomērs var parādīties kā mazs pīķis pirms stigmasta-3,5-diēna pīķa un tuvu tam (2. zīmējums). Lai nodrošinātu, ka stigmastadiēni eluējas kā viens pīķis, ir ieteicams aizstāt kolonnu ar tādu, kura ir mazāk polāra vai kurai ir lielāks iekšējais diametrs.

9. piezīme:

Stigmastadiēnus standartam var iegūt no rafinētas augu eļļas analīzes, izmantojot mazāku parauga daudzumu (1 līdz 2 g). Stigmastadiēni veido izteiktu un viegli identificējamu pīķi.

6.3.3. Kvantitatīvā analīze

Stigmastadiēnu saturu nosaka saskaņā ar formulu:

$$\text{mg/kg stigmastadiēnu} = \frac{A_s \times M_c}{A_c \times M_o}$$

▼ M11

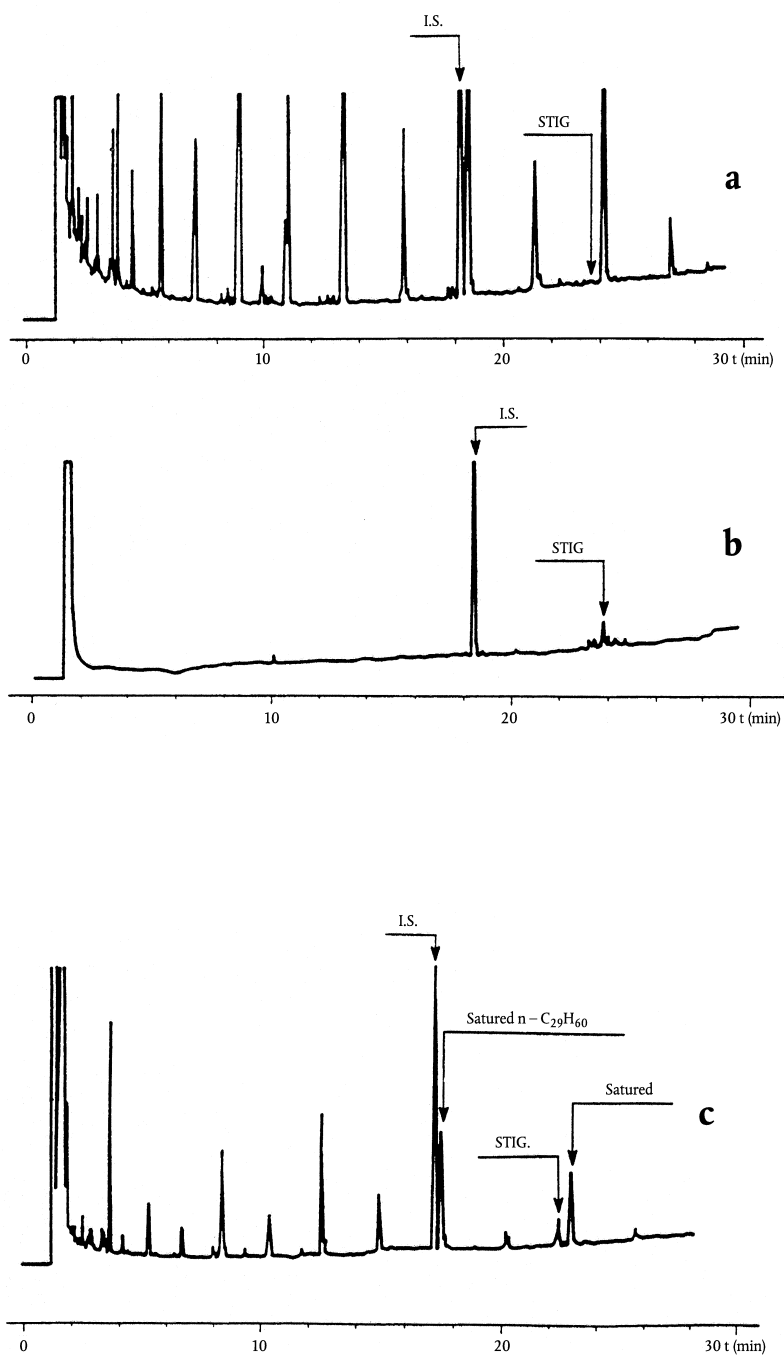
kur: A_s = stigmastadiēnu pīķa laukums (ja pīķis ir izšķirts divos izomēru pīķos, — abu pīķu laukumu summa)
 A_c = iekšējā standarta (holestadiēna) pīķa laukums,
 M_c = pievienotā standarta masa mikrogramos,
 M_o = ņemtā eļļas masa gramos.

Noteikšanas robeža: ap 0,01 mg/kg.

▼ M32

10. piezīme:

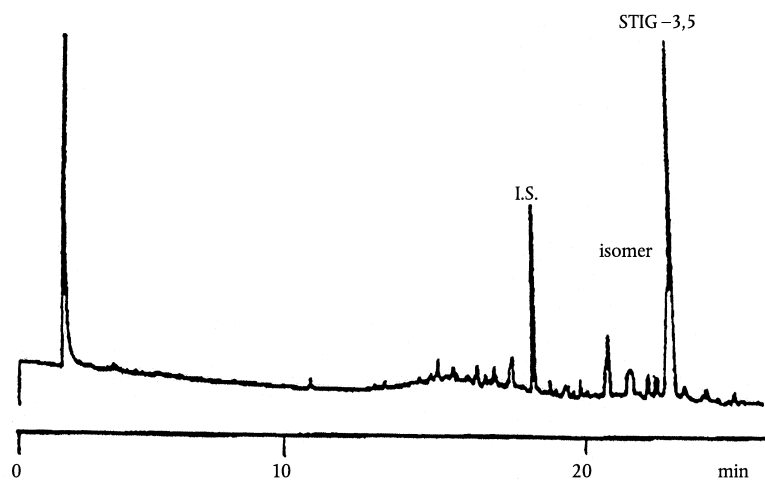
Ja stigmastadiēnu koncentrācija ir lielāka par 4 mg/kg un tā jānosaka kvantitatīvi, ir jāizmanto Starptautiskās Olīvu padomes metode sterēnu noteikšanai rafinētā eļļā.

▼ M11**1. zīmējums**

Gāzu hromatogramma, iegūta olīveļļas paraugiem, kas analizēti ar kvarca kapilāro kolonnu (iekšējais diametrs 0,25 mm, garums 25 m), kura pārklāta ar 5 % fenilmetilsilikonu, plēves biezums 0,25 μm).

▼ M11

- Neapstrādātas eļļas pirmā frakcija (30 ml), eluēta ar standartu.
- Oļīveļļas otrā frakcija (40 ml), kas satur 0,10 mg/kg stigmastadiēnu.
- Otrā frakcija, kas satur nedaudz pirmās frakcijas.

**2. zīmējums**

Gāzu hromatogramma, iegūta rafinētas oļīveļļas paraugam, kas analizēts ar DB-5 kolonnu, redzams stigmasta-3,5-diēna izomērs.

▼ **M25***XVIII PIELIKUMS***FAKTISKĀ UN TEORĒTISKĀ TRIGLICERĪDU AR ECN 42 SATURA STARPĪBAS NOTEIKŠANA****1. PIEMĒROŠANAS JOMA**

Absolūtās starpības noteikšana starp triacilglicerīdu (TAG) ar ekvivalento oglekļa atomu skaitu 42 eksperimentālajām vērtībām (ECN42_{HPLC}), kas iegūtas, nosakot tos eļļā ar augstas efektivitātes šķidrums hromatogrāfiju (*HPLC*), un TAG ar ekvivalento oglekļa atomu skaitu 42 teorētisko vērtību (ECN 42_{theoretical}), kas aprēķināta no taukskābju sastāva.

2. PIEMĒROŠANAS JOMA

Standarts attiecas uz olīveļļām. Metodi izmanto augu sēkļu eļļu (ar augstu linolskābes saturu) piejaukumu nelielu daudzumu noteikšanai visu veidu olīveļļās.

3. PRINCIPS

Triacilglicerīdu ar ECN42 saturs, ko nosaka ar HPLC analīzi, un triacilglicerīdu ar ECN42 teorētiskais saturs (ko aprēķina pēc taukskābju sastāva noteikšanas rezultātiem ar gāzu šķidrums hromatogrāfiju (GLC)), noteiktās robežās atbilst tīrām olīveļļām. Starpība, kas ir lielāka par katram eļļas veidam pieņemto vērtību, liecina, ka eļļai ir sēkļu eļļu piemaisījumi.

4. METODE

Metode, lai aprēķinātu triacilglicerīdu ar ECN 42 teorētisko saturu un tā starpību ar HPCL datiem, būtībā ir ar citām metodēm iegūtu analītisko datu koordinēšana. Tai var izdalīt trīs posmus: taukskābju satura noteikšana ar kapilārās kolonnas gāzes hromatogrāfiju, triacilglicerīdu ar ECN42 teorētiskā sastāva aprēķināšana, ECN42 triacilglicerīdu noteikšana ar HPLC.

4.1. Iekārtas

4.1.1. 250 un 500 ml tilpuma apaļkolbas.

4.1.2. Vārglāzes, 100 ml.

4.1.3. Hromatogrāfijas kolonna no stikla ar 21 mm iekšējo diametru, 450 mm gara, ar krānu un normalizētu konusu (iekšējo) augšā.

4.1.4. Šķirpiltuves, tilpums 250 ml, ar konusu (ārējo) apakšā, kas piemērots pievienošanai kolonas augšā.

4.1.5. Stikla nūjiņa, garums 600 mm.

4.1.6. Stikla piltuve, diametrs 80 mm.

4.1.7. Mērkolbas, tilpums 50 ml.

4.1.8. Mērkolbas, tilpums 20 ml.

4.1.9. Rotācijas ietvaicētājs.

4.1.10. Augstas efektivitātes šķidrums hromatogrāfs ar kolonnas temperatūras regulēšanu.

4.1.11. Inžektorī 10 µl ievadīšanai.

4.1.12. Detektors: diferenciālrefraktometriskais. Pilnas skalas jutībai jābūt vismaz 10^{-4} vienībām no laušanas koeficienta vērtības.

▼ **M25**

4.1.13. Kolonna: 250 mm gara nerūsējošā tērauda caurulīte ar iekšējo diametru 4,5 mm, 5 µm diametra silīcija dioksīda daļiņu pildījums ar 22 līdz 23 % oglekļa oktaedecilsilāna veidā.

4.1.14. Datu apstrādes programmatūra.

4.1.15. Ampulas, aptuveni 2 ml tilpuma, ar blīvēm un skrūvējamiem vāciņiem ar teflona pārklājumu.

4.2. **Reaģenti**

Reaktīviem jābūt analītiskas tīrības pakāpes. Eluēšanai izmantojamajiem šķīdinātājiem jābūt attīrītiem no gāzēm, un tos var vairākkārt reģenerēt, nepasliktinot atdalīšanas spēju.

▼ **M32**

4.2.1. Hromatogrāfijai paredzēts petrolēteris ar viršanas temperatūru 40–60 °C vai heksāns. Heksānu drīkst aizstāt ar izooktānu (2,2,4-trimetilpentāns, hromatogrāfijai), ja vien tiek iegūtas salīdzināmas precizitātes vērtības. Šķīdinātāji, kuriem ir augstāks viršanas punkts nekā n-heksānam, iztvaiko lēnāk. Tomēr heksāna toksiskuma dēļ tiem dodama priekšroka.

▼ **M25**

4.2.2. Etilēteris, peroksīdus nesaturošs, svaigi destilēts.

4.2.3. Eluēšanas šķīdinātājs eļļas attīrīšanai kolonnas hromatogrāfijā: petrolejas ētera/etilētera maisījums 87/13 (v/v).

4.2.4. Silikagels, 70-230 *mesh*, tips Merck 7734, ar ūdens saturu, kas standartizēts pie 5 % (masas).

4.2.5. Stikla vate.

4.2.6. Acetons HPLC vajadzībām.

4.2.7. Acetonitrils vai propionitrils HPLC vajadzībām.

4.2.8. HPLC eluēšanas šķīdinātājs: acetonitrils + acetons (attiecība ir jākorģē atkarībā no vēlamās sadalīšanas; sākt ar 50:50 maisījumu) vai propionitrils.

4.2.9. Solubilizācijas šķīdinātājs: acetons.

4.2.10. Standarttriglicerīdi: var izmantot pārdošanā esošos triglicerīdus (tripalmītīnu, trioleīnu u. c.) un diagrammās atlikt to aizturlaikus saskaņā ar ekvivalento oglekļa atomu skaitu, vai arī standarthromatogrammu iegūt no sojas eļļas maisījuma ar tīru olīveļļu attiecībā 30:70 (sk. 1. un 2. piezīmi un 1.–4. attēlu).

4.2.11. Cietās fāzes ekstrakcijas kolonna ar silīcija fāzi 1 g, 6 ml.

▼ **M32**

4.2.12. Heptāns, hromatogrāfijas kvalitātes. Heptānu drīkst aizstāt ar izooktānu (2,2,4-trimetilpentāns, hromatogrāfijai).

▼ **M25**4.3. **Paraugu sagatavošana**

Tā kā vairāku traucējošu vielu klātbūtnē var iegūt kļūdaini pozitīvus rezultātus, paraugs noteikti jāattīra saskaņā ar IUPAC metodi 2.507, ko izmanto polāro savienojumu noteikšanai cepšanas taukos.

4.3.1. *Hromatogrāfijas kolonnas sagatavošana*

Kolonnā (4.1.3.) iepilda apm. 30 ml eluēšanas šķīdinātāja (4.2.3.), tad kolonnā ievieto neredz stikla vates (4.2.5.), kuru ar stikla nūjiņu (4.1.5.) aizbīda līdz kolonnas apakšai.

100 ml tilpuma vārglāzē suspendē 25 g silikagela (4.2.4.) 80 ml eluēšanas maisījuma (4.2.3.), to pārnes kolonnā, izmantojot stikla piltuvi (4.1.6.).

Lai kolonnā pārnestu visu silikagelu, vārglāzi skalo ar eluēšanas maisījumu un kolonnā pārnes arī skalojumu porcijas.

Atver krānu un eluē šķīdinātāju no kolonnas, līdz tā līmenis ir apmēram 1 cm virs silikagela.

▼ **M25**4.3.2. *Kolonnas hromatogrāfija*

Ar precizitāti 0,001 g ņem, ja vajadzīgs, iepriekš filtrētas, homogenizētas un atūdeņotas eļļas $2,5 \pm 0,1$ g iesvaru 50 ml tilpuma mērkolbā (4.1.7.).

Izšķīdina to aptuveni 20 ml eluēšanas šķīduma (4.2.3.). Vajadzības gadījumā to nedaudz uzsilda, lai atvieglotu izšķīšanu. Atdzesē istabas temperatūrā un ar eluēšanas šķīdinātāju uzpilda līdz vajadzīgajam tilpumam.

Kolonnā, kas sagatavota saskaņā ar 4.3.1., ar mērpipeti pārnes 20 ml šķīduma, atver krānu un eluē šķīdinātāju līdz silikagela slāņa līmenim.

Tad eluē ar 150 ml eluēšanas šķīdinātāja (4.2.3.) ar ātrumu apmēram 2 ml/min (150 ml caur kolonnu iziet apmēram 60 līdz 70 min).

Eluātu savāc 250 ml tilpuma apaļkolbā (4.1.1.), kas ir tarēta krāsnī un precīzi nosvērta. Pie pazemināta spiediena rotācijas ietvaicētājā (4.1.9.) ietvaicē šķīdinātāju un nosver atlikumu, ko izmantos HPLC analīzei lietojamā šķīduma pagatavošanai un metilestera iegūšanai.

Parauga atgūstamībai no kolonnas jābūt vismaz 90 % neapstrādātai augstākā labuma olīveļļai, neapstrādātai olīveļļai, parastajai olīveļļai un rafinētai olīveļļai, un vismaz 80 % spīdīgajai olīveļļai un olīvu izspaidu eļļai.

4.3.3. *Attīrīšana cietās fāzes ekstrakcijai*

Silīcija SPE kolonnu aktivē, tai laižot cauri 6 ml heksāna (4.2.3.) vakuumā, nepieļaujot izžūšanu.

Ar precizitāti līdz 0,001 g 2 ml ampulā (4.1.15.) iesver 0,12 g un izšķīdina ar 0,5 ml heksāna (4.2.3.).

SPE kolonnā iepilda šķīdumu un pēc tam eluē ar 10 ml heksāna/dietilētera (87:13, v/v) (4.2.3.) maisījumu vakuumā.

Savāktu daļu rotora ietvaicētājā (4.1.9.) istabas temperatūrā pie pazemināta spiediena ietvaicē sausu. Atlikumu izšķīdina 2 ml acetona (4.2.6.) triacilglicerīdu (TAG) analīzei.

4.4. **HPLC analīze**4.4.1. *Parauga sagatavošana hromatogrāfiskai analīzei*

Analizējamā parauga 5 % šķīduma pagatavošanai ņem $0,5 \pm 0,001$ g parauga iesvara 10 ml mērkolbā un uzpilda līdz 10 ml ar solubilizācijas šķīdinātāju (4.2.9.).

4.4.2. *Procedūra*

Sagatavo darbam hromatogrāfijas sistēmu. Lai iztīrītu visu sistēmu, sūknē eluēšanas šķīdinātāju (4.2.8.) ar ātrumu 1,5 ml/min. Pagaida, līdz iegūst stabilu bāzes līniju.

Ievada 10 µl parauga, kas sagatavots, kā noteikts 4.3. punktā.

4.4.3. *Rezultātu aprēķināšana un izteikšana*

Izmanto laukumu normalizācijas metodi, t. i., pieņem, ka dažādiem TAG ar ECN no 42 līdz 52 atbilstošo smaiļu laukumu summa ir vienāda ar 100 %.

Katra triglicerīda relatīvos procentus aprēķina, izmantojot formulu:

$$\% \text{ triglicerīda} = \text{smailis laukums} \times 100 / \text{smaiļu laukumu summa.}$$

Rezultātus norāda ar vismaz divām zīmēm aiz komata.

Sk. 1.–4. piezīmi.

▼ **M25**4.5. **Triacilglicerīdu sastāva (mol %) aprēķināšana no taukskābju sastāva datiem (lauk. %)**4.5.1. *Taukskābju sastāva noteikšana*

Taukskābju sastāvu nosaka ar kapilāro kolonnu saskaņā ar ISO 5508. Metilesterus sagatavo saskaņā ar COI/T.20/Doc. No 24.

4.5.2. *Taukskābes aprēķiniem*

Glicerīdus grupē pēc to ekvivalentā oglekļa atomu skaita (ECN), ņemot vērā turpmāk norādīto ECN un taukskābju ekvivalenci. Ņem vērā tikai taukskābes ar 16 un 18 oglekļa atomiem molekulā, jo attiecībā uz olīveļļu tikai tās ir svarīgas. Taukskābes normalizē līdz 100 %.

Taukskābe (FA)	Saīsinājums	Molekulmasa (MW)	ECN
Palmitīnskābe	P	256,4	16
Palmitoleīnskābe	Po	254,4	14
Stearīnskābe	S	284,5	18
Oleīnskābe	O	282,5	16
Linolskābe	L	280,4	14
Linolēnskābe	Ln	278,4	12

4.5.3. *Lauk. % pārvēršana molos visām taukskābēm (1)*

$$\begin{aligned} \text{mol P} &= \frac{\text{lauk. \% P}}{\text{MW P}} & \text{mol S} &= \frac{\text{lauk. \% S}}{\text{MW S}} & \text{mol Po} &= \frac{\text{lauk. \% Po}}{\text{MW Po}} \\ \text{mol O} &= \frac{\text{lauk. \% O}}{\text{MW O}} & \text{mol L} &= \frac{\text{lauk. \% L}}{\text{MW L}} & \text{mol Ln} &= \frac{\text{lauk. \% Ln}}{\text{MW Ln}} \end{aligned}$$

4.5.4. *Taukskābju molu normalizācija pie 100 % (2)*

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

Rezultāts ir katras taukskābes daļa mol % visās (1, 2, 3-) TAG pozīcijās.

Pēc tam aprēķina piesātināto taukskābju P un S (SFA) summu un nepiesātinātās taukskābes Po, O, L un Ln (UFA) (3):

$$\text{mol \% SFA} = \text{mol \% P} + \text{mol \% S}$$

$$\text{mol \% UFA} = 100 - \text{mol \% SFA}$$

▼ **M25**4.5.5. *Taukskābju sastāva aprēķināšana TAG 2- un 1, 3 - pozīcijā*

Taukskābes iedalāmas trijos šādos veidos: vienā 2- pozīcijā un divās identiskās 1- un 3- pozīcijās, ar atšķirīgiem koeficientiem piesātinātajām (P un S) un nepiesātinātajām skābēm (Po, O, L un Ln).

4.5.5.1. Piesātinātās taukskābes 2- pozīcijā [P(2) un S(2)] (4):

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

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

4.5.5.2. Nepiesātinātās taukskābes 2- pozīcijā [Po(2), O(2), L(2) un Ln(2)] (5):

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

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

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

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

4.5.5.3. Taukskābes 1,3- pozīcijā [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) un Ln(1,3)] (6):

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

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

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

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

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

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

4.5.6. *Triacilglicerīdu aprēķināšana*

4.5.6.1. TAG ar vienu taukskābi (AAA, šeit LLL, PoPoPo) (7)

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

4.5.6.2. TAG ar divām taukskābēm (AAB, šeit PoPoL, PoLL) (8)

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

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

▼ **M25**

4.5.6.3. TAG ar trijām dažādām taukskābēm (ABC, šeit OLLn, PLLn, PoOLn, PPoln) (9)

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

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

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

4.5.6.4. Triacilglicerīdi ar ECN42

Aprēķina triacilglicerīdus ar ECN42 pēc vienādojumiem 7, 8 un 9 un norāda sagaidāmās HPLC eluēšanās secībā (parasti tikai trīs smailes).

LLL

PoLL un LPoL vietas izomērs

OLLn un OLnL un LnOL vietas izomēri

PoPoL un PoLPo vietas izomērs

PoOLn un OPoLn un OLnPo vietas izomēri

PLLn un LLnP un LnPL vietas izomēri

PoPoPo

SLnLn un LnSLn vietas izomērs

PPoLn un PLnPo un PoPLn vietas izomēri

Triacilglicerīdi ar ECN42 ir deviņu triacilglicerīdu, ieskaitot to vietas izomērus, summa. Rezultātus norāda ar vismaz divām zīmēm aiz komata.

5. REZULTĀTU VĒRTĒŠANA

Salīdzina aprēķināto teorētisko saturu ar HPLC analīzē noteikto saturu. Ja ar HPLC noteikto un teorētiski aprēķināto rezultātu absolūtā starpība ir lielāka par attiecīgajai eļļas kategorijai standartā norādīto vērtību, paraugs satur sēklu eļļu.

Rezultātu norāda ar divām zīmēm aiz komata.

6. PIEMĒRS (SKAITĻI NORĀDA ATTIECĪGĀS IEDAĻAS METODEDES APRAKSTĀ)

— 4.5.1. *Taukskābju mol % aprēķināšana no GLC datiem (normalizētais lauk. %)*

Ar GLC iegūti šādi dati par taukskābju sastāvu:

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

▼ **M25**

— 4.5.3 *Lauk. % pārvēršana molos visām taukskābēm (sk. 1. formulu)*

$$\text{mol P} = \frac{10}{256,4} = 0,03900 \text{ mol P}$$

$$\text{mol S} = \frac{3}{284,5} = 0,01054 \text{ mol S}$$

$$\text{mol Po} = \frac{1}{254,4} = 0,00393 \text{ mol Po}$$

$$\text{mol O} = \frac{75}{282,5} = 0,26549 \text{ mol O}$$

$$\text{mol L} = \frac{10}{280,4} = 0,03566 \text{ mol L}$$

$$\text{mol Ln} = \frac{1}{278,4} = 0,00359 \text{ mol Ln}$$

$$\text{Kopā} = 0,35821 \text{ mol TAGs}$$

— 4.5.4 *Taukskābju molu normalizācija pie 100 % (sk. 2. formulu)*

$$\text{mol \% P(1,2,3)} = \frac{0,03900 \text{ mol P} * 100}{0,35821 \text{ mol}} = 10,887 \%$$

$$\text{mol \% S(1,2,3)} = \frac{0,01054 \text{ mol S} * 100}{0,35821 \text{ mol}} = 2,942 \%$$

$$\text{mol \% Po(1,2,3)} = \frac{0,00393 \text{ mol Po} * 100}{0,35821 \text{ mol}} = 1,097 \%$$

$$\text{mol \% O(1,2,3)} = \frac{0,26549 \text{ mol O} * 100}{0,35821 \text{ mol}} = 74,116 \%$$

$$\text{mol \% L(1,2,3)} = \frac{0,03566 \text{ mol L} * 100}{0,35821 \text{ mol}} = 9,955 \%$$

$$\text{mol \% Ln(1,2,3)} = \frac{0,00359 \text{ mol Ln} * 100}{0,35821 \text{ mol}} = 1,002 \%$$

$$\text{Kopā mol \%} = 100 \%$$

Piesātināto un nepiesātināto taukskābju summa TAG 1, 2, 3- pozīcijā (sk. 3. formulu)

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

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

— 4.5.5 *Taukskābju sastāva aprēķināšana TAG 2- un 1,3- stāvoklī*

— 4.5.5.1 *Piesātinātās taukskābes 2- pozīcijā [P(2) un S(2)] (sk. 4. formulu)*

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

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

— 4.5.5.2 *Nepiesātinātās taukskābes 2- pozīcijā [Po(1,3), O(1,3), L(1,3) un Ln(1,3)] (sk. 5. formulu)*

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

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

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

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

▼ **M25**

— 4.5.5.3 Tauskābes 1,3- pozīcijā [P(1,3), S(1,3), Po(1,3), O(1,3), L(1,3) un Ln(1,3)] (sk. 6. formulu)

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

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

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

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

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

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

— 4.5.6. *Triacilglicerīdu aprēķināšana*

No aprēķinātā taukskābju sastāva -2- un -1,3- pozīcijā:

Tauksk.	1,3-poz.	2-poz.
P	16,004 %	0,653 %
S	4,325 %	0,177 %
Po	1,015 %	1,262 %
O	68,526 %	85,296 %
L	9,204 %	11,457 %
Ln	0,927 %	1,153 %
Summa	100,0 %	100,0 %

aprēķina šādus triacilglicerīdus:

LLL

PoPoPo

PoLL ar 1 vietas izomēru

S LnLn ar 1 vietas izomēru

PoPoL ar 1 vietas izomēru

PPoLn ar 2 vietas izomēriem

OLLn ar 2 vietas izomēriem

PLLn ar 2 vietas izomēriem

PoOLn ar 2 vietas izomēriem

— 4.5.6.1. TAG ar vienu taukskābi (LLL, PoPoPo), (sk. 7. formulu)

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

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

▼ M25

— 4.5.6.2 TAG ar divām taukskābēm (PoLL, SLnLn, PoPoL) (sk. 8. formulu)

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

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

0,03210 mol PoLL

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

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

0,00094 mol SLnLn

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

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

0,00354 mol PoPoL

— 4.5.6.3 TAG ar trijām dažādām taukskābēm (PoPLn, OLLn, PLLn, PoOLn), (sk. 9. formulu)

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

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

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

0,00761 mol PPoLn

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

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

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

0,43655 mol OLLn

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

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

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

0,06907 mol PLLn

▼ **M25**

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

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

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

0,04812 mol PoOLn

ECN42 = 0,69512 mol TAGs

1. *piezīme.* Eluēšanas secību var noteikt, aprēķinot ekvivalentos oglekļa atomu skaitus, ko bieži apraksta sakarība $ECN = CN - 2n$, kur CN ir oglekļa atomu skaits un n ir divkāršo saišu skaits; to var aprēķināt daudz precīzāk, ja ņem vērā divkāršās saites izcelsmi. Ja n_o , n_l un n_{ln} ir divkāršo saišu skaits, kas attiecīgi attiecināms uz oleīnskābi, linolskābi un linolēnskābi, ekvivalento oglekļa atomu skaitu var aprēķināt, izmantojot formulu:

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

kur koeficientus d_o , d_l un d_{ln} var aprēķināt, izmantojot standarttriglicerīdus. Šai metodei noteiktajos apstākļos iegūtā sakarība būs ļoti tuva šādai:

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

2. *piezīme.* Ar vairākiem standarttriglicerīdiem ir iespējams arī aprēķināt izšķirtspēju attiecībā uz trioleīnu:

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

izmantojot samazināto aizturlaiku $RT^1 = RT - RT$ šķīd.

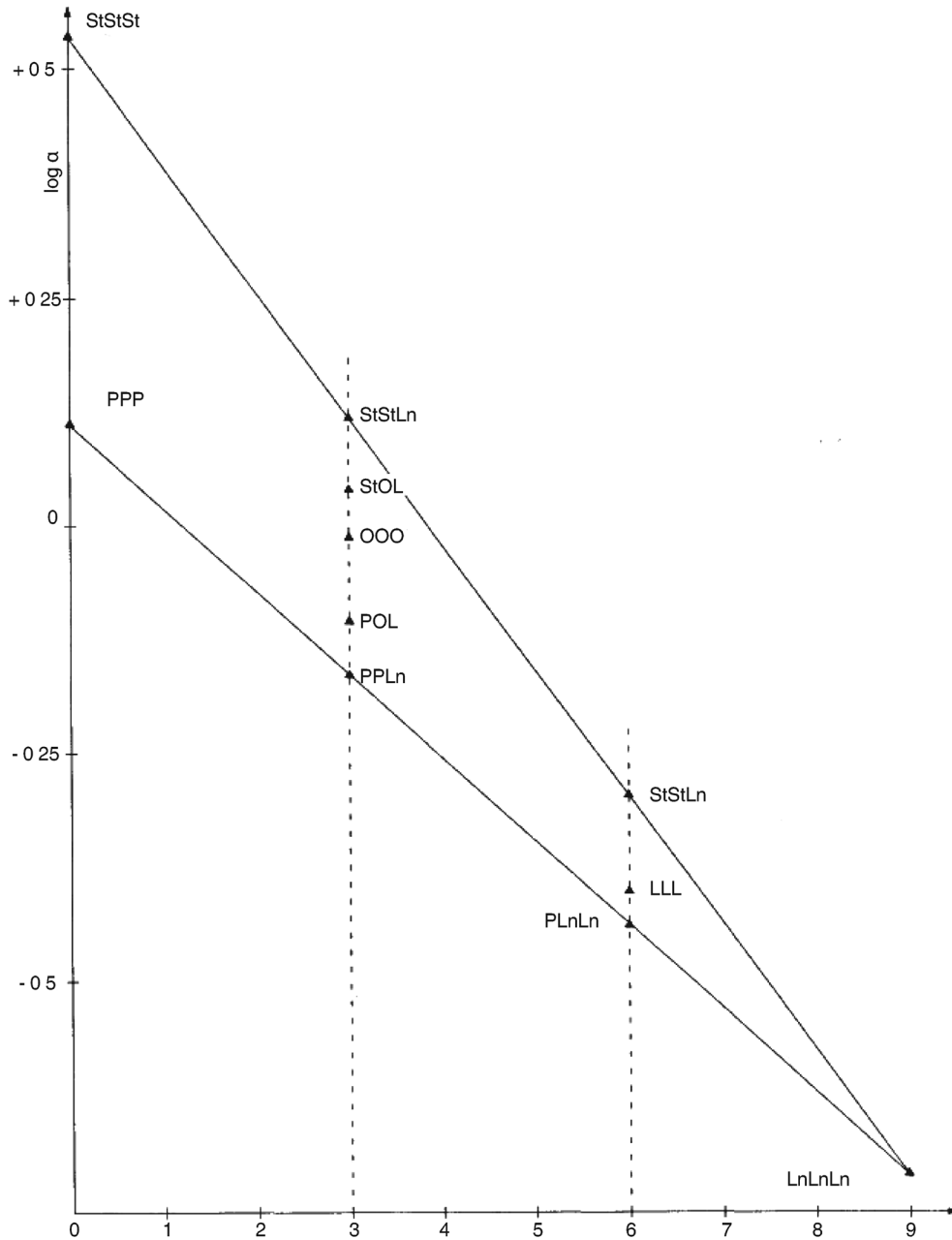
Izmantojot log α diagrammu attiecībā pret f (divkāršo saišu skaitu), var noteikt aizturlaikus visiem to taukskābju triglicerīdiem, kuras satur standarttriglicerīdus – sk. 1. zīmējumu.

3. *piezīme.* Kolonnas efektivitātei jābūt tādai, lai varētu skaidri nošķirt trilinoleīna smailli no to triglicerīdu smailem, kuriem ir tuvi aizturlaiki. Eluēšanu izdara līdz ECN52 smailei.

4. *piezīme.* Visu vajadzīgo smaīļu laukumu noteikšanas pareizība ir nodrošināta, ja otrā smaile, kas atbilst ECN50, ir 50 % no reģistrācijas iekārtas pilnas skalas.

▼ M25

1. attēls

Diagramma log α pret f (divkāršo saišu skaits)

Divkāršo saišu skaits

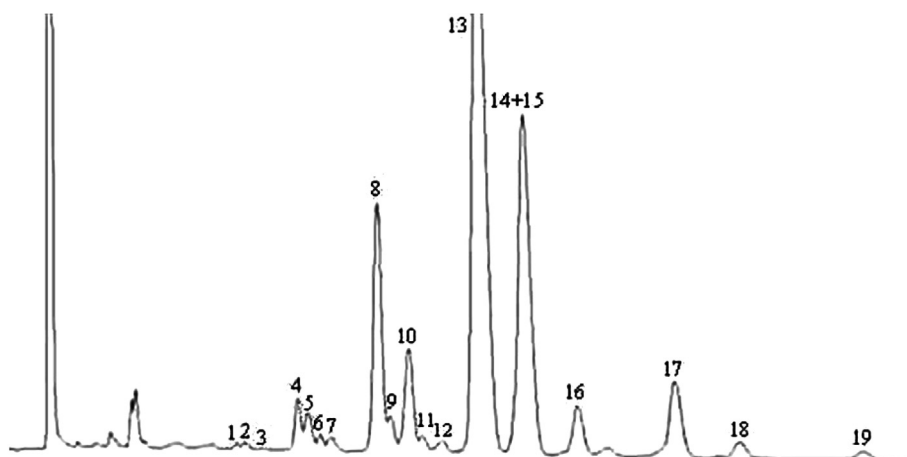
La: laurīnskābe; My: miristīnskābe; P: palmīfīnskābe; S: stearīnskābe; O: oleīnskābe; L: linolskābe;
Ln: linolēnskābe.

▼ **M25**

2. attēls

Olīveļļa ar zemu linolskābes saturu

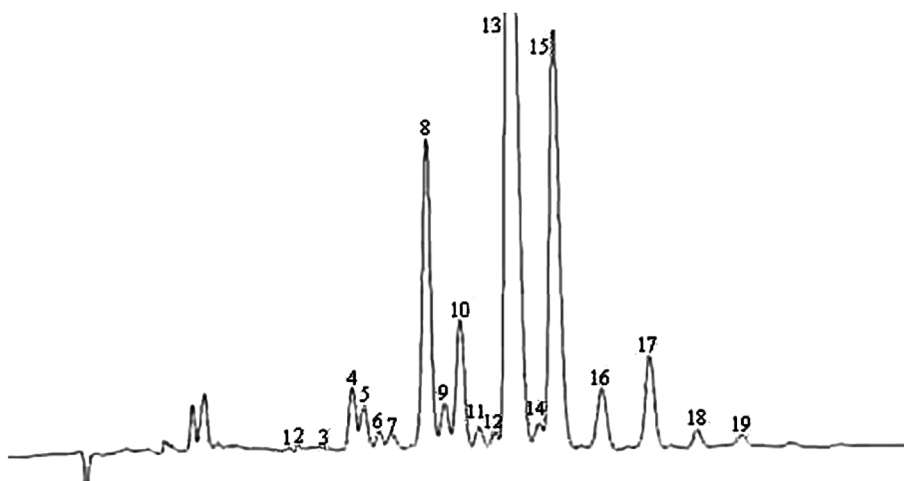
a)



Šķīdinātājs: acetons/acetonnitrils.

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

b)



Šķīdinātājs: propionitrils.

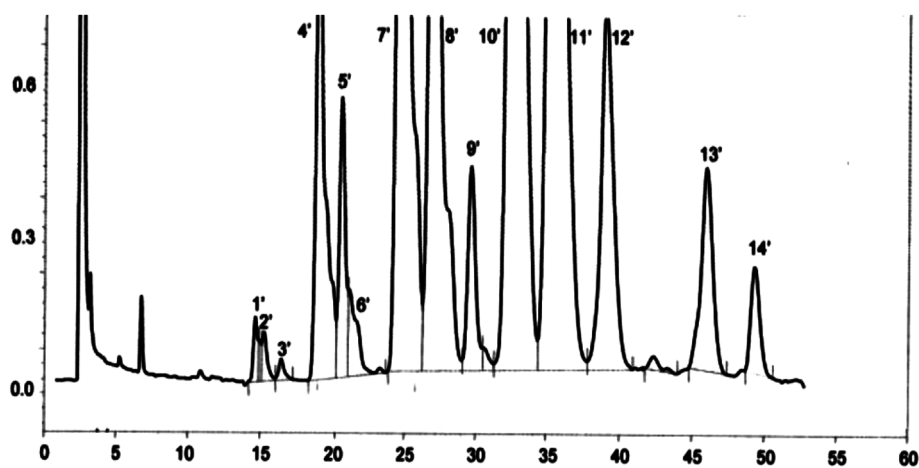
PROFILS b: Hromatogrāfisko smaiļu galvenie komponenti: **ECN42**: (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPoPo + PPoL; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP;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

▼ M25

3. attēls

Olīveļļa ar augstu linolskābes saturu

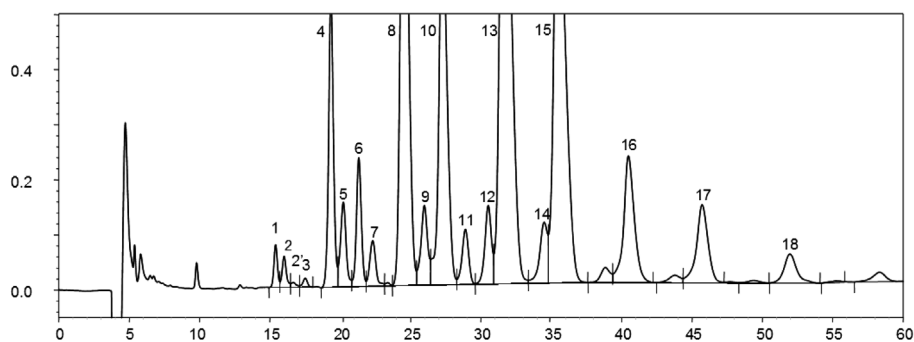
a)



Šķīdinātājs: acetons/acetonnitrils (50:50).

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

b)



Šķīdinātājs: propionitrils.

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

▼ **M32***XIX PIELIKUMS***STERĪNU SASTĀVA UN SATURA NOTEIKŠANA UN SPIRTU SAVIENOJUMU NOTEIKŠANA AR KAPILĀRĀS KOLONNAS GĀZU HROMATOGRĀFIJU****1. DARBĪBAS JOMA**

Šī metode apraksta procedūru, kā nosakāms atsevišķu spirtu savienojumu saturs un kopējais spirtu savienojumu saturs olīveļļās un olīvu izspaidu eļļās, kā arī abu minēto eļļu maisījumos.

Spirtu savienojumi olīveļļās un olīvu izspaidu eļļās ir alifātiskie spirti, sterīni un triterpēndioli.

2. PRINCIPS

Eļļas, kurām kā iekšējais standarts ir pievienots α -holestanols un 1-eikoza-nols, pārziepjo ar kālija hidroksīda šķīdumu etanolā, un nepārziepjoto vielu pēc tam ekstrahē ar etilēteri.

Dažādās spirtu savienojumu frakcijas no nepārziepjojamās vielas atdala ar plānslāņa hromatogrāfiju uz bāziskas silikagela plates (standartmetode) vai ar *HPLC*, kurā izmanto silikagela kolonnu. Atdalīšanā ar silikagelu reģenerēto frakciju pārveido trimetilsililēteros un analizē ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju.

1. DAĻA**NEPĀRZIEPJOJAMĀS VIELAS SAGATAVOŠANA****1. DARBĪBAS JOMA**

Šajā daļā aprakstīta nepārziepjojamās vielas sagatavošana un ekstrakcija. Tā aptver nepārziepjojamās vielas sagatavošanu un ekstrakciju no olīveļļām un olīvu izspaidu eļļām.

2. PRINCIPS

Testējamo daudzumu pārziepjo, vārot ar atteces dzesinātāju kālija hidroksīda šķīdumā etanolā. Nepārziepjojamo vielu ekstrahē ar dietilēteri.

3. APARATŪRA

Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši turpmāk nosauktais.

- 3.1. Apaļkolba, kas ar pieslīpēta stikla savienojumu savienota ar atteces dzesinātāju, 250 ml.
 - 3.2. Dalāmā piltuve, 500 ml.
 - 3.3. Kolbas, 250 ml.
 - 3.4. Mikrošļirces, 100 μ l un 500 μ l.
 - 3.5. Cilindriskais poraina stikla filtrtūģelis G3 (poru lielums 15–40 μ m), diametrs aptuveni 2 cm, augstums aptuveni 5 cm, piemērots filtrēšanai vakuumā, ar stikla savienojumu ar ārējo pieslīpējumu.
 - 3.6. Koniskā kolba (Erlenmeiera kolba), 50 ml, ar stikla savienojumu ar iekšējo pieslīpējumu, izmantojama kopā ar filtrtūģeli (3.5. punkts).
 - 3.7. Mēģene ar sašaurinātu konusveida galu un blīvi noslēdzošu stikla aizbāzni, 10 ml.
 - 3.8. Kalcija dihlorīda eksikators.
- 4. REAĢENTI**
- 4.1. Kālija hidroksīds ar 85 % minimālo titru.

▼ **M32**

- 4.2. Kālija hidroksīds, aptuveni 2 M šķīdums etanolā.

130 g kālija hidroksīda (4.1. punkts) dzesējot izšķīdina 200 ml destilēta ūdens, pēc tam uzpilda ar etanolu (4.7. punkts) līdz vienam litram. Šķīdumu glabā cieši noslēgtās tumša stikla pudelēs ne ilgāk kā divas dienas.

- 4.3. Etilēteris, analīzes kvalitātes.
- 4.4. Bezūdens nātrija sulfāts, analīzes kvalitātes.
- 4.5. Acetons, hromatogrāfijas kvalitātes.
- 4.6. Etilēteris, hromatogrāfijas kvalitātes.
- 4.7. Etanols, analītiskas kvalitātes.
- 4.8. Etilacetāts, analītiskas kvalitātes.
- 4.9. Iekšējais standarts, α -holestanols, vairāk nekā 99 % tīrība (tīrība jāpārbauda ar gāzu hromatogrāfijas analīzi).
- 4.10. α -holestanola iekšējais standartšķīdums, 0,2 % šķīdums (masa/tilp.) etilacetātā (4.8. punkts).
- 4.11. Fenolftaleīna šķīdums etanolā, 10 g/l (4.7. punkts).
- 4.12. 0,1 % (masa/tilp.) 1-eikozanola šķīdums etilacetātā (iekšējais standarts).

5. PROCEDŪRA

Ar 500 μ l mikrošļirci (3.4. punkts) 250 ml tilpuma kolbā (3.1. punkts) ievada tādu daudzumu α -holestanola iekšējā standartšķīduma (4.10. punkts) un tādu daudzumu 1-eikozanola (4.12. punkts), kas satur, attiecīgi, tādu holestanola un eikozanola daudzumu, kurš atbilst aptuveni 10 % no sterīnu un spirtu satura paraugā. Piemēram, 5 g olīveļļas parauga pievieno 500 μ l α -holestanola šķīduma (4.10. punkts) un 250 μ l 1-eikozanola šķīduma (4.12. punkts). Olīvu izspaidu eļļām pievieno 1 500 μ l α -holestanola šķīduma (4.10. punkts) un identisku daudzumu 1-eikozanola (4.12. punkts). Silta ūdens vannā, mērenā slāpekļa plūsmā ietvaicē sausu. Pēc kolbas atdzesēšanas tajā pašā kolbā iesver 5,00 \pm 0,01 g sausā nofiltrētā parauga.

1. piezīme. Dzīvnieku vai augu eļļas un tauki, kas satur lielākus daudzumus holesterīna, var uzrādīt smaili ar aiztures laiku, kas ir identisks holestanola aiztures laikam. Tādā gadījumā sterīnu frakcija jāanalizē divreiz – ar iekšējo standartu un bez tā.

Pievieno 50 ml 2 M kālija hidroksīda šķīduma etanolā (4.2. punkts) un nedaudz pumeka, pievieno atceces dzesinātāju un uzsilda līdz lēnai viršanai, līdz notiek pārziepjošanās (šķīdums kļūst dzidrs). Turpina sildīt vēl 20 minūtes, tad caur dzesinātāja augšgalu pievieno 50 ml destilēta ūdens, atvieno dzesinātāju un atdzesē kolbu aptuveni līdz 30 °C.

Kolbas saturu kvantitatīvi pārnes 500 ml dalāmajā piltuvē (3.2. punkts), vairākas reizes skalojot ar destilētu ūdeni (50 ml). Pievieno aptuveni 80 ml etilētera (4.6. punkts), enerģiski krata aptuveni 60 sekundes, periodiski atbrīvo spiedienu, dalāmo piltuvi apvēršot otrādi un atverot krānu. Ļauj nostāties, līdz abas fāzes ir pilnībā atdalījušās (2. piezīme). Tad pēc iespējas pilnīgāk atdala ziepju šķīdumu, savācot to citā dalāmajā piltuvē. Ūdens-spirta fāzi tieši tādā pašā veidā ekstrahē vēl divas reizes, katrai ekstrakcijai izlietojot 60–70 ml etilētera (4.6. punkts).

2. piezīme. Radašos emulsiju var likvidēt, pievienojot nedaudz etanola (4.7. punkts).

▼ **M32**

Trīs ētera ekstraktus apvieno vienā dalāmajā piltuvē, kurā ir 50 ml ūdens. Turpina mazgāt ar ūdeni (50 ml), līdz mazgājamais ūdens pēc fenolfaleīna šķīduma (4.11. punkts) piliena pievienošanas vairs neiekrāsojas sārts. Kad mazgājamais ūdens ir aizvadīts, filtrē uz bezūdens nātrija sulfāta (4.4. punkts) iepriekš nosvērtā 250 ml tilpuma kolbā, mazgājot piltuvi un filtru ar maziem daudzumiem etilētera (4.6. punkts).

Šķīdinātāju ietvaicē, destilējot vakuumā rotācijas ietvaicētājā 30 °C temperatūrā. Pievieno 5 ml acetona (4.5. punkts) un ar mērenu slāpekļa plūsmu likvidē pilnīgi visu gaistošo šķīdinātāju. Atlikumu 15 minūtes žāvē žāvēšanas skapī 103 ± 2 °C temperatūrā. Atzdesē eksikatoros un nosver ar 0,1 mg precizitāti.

2. DAĻA**SPIRTU SAVIENOJUMU FRAKCIJU ATDALĪŠANA****1. DARBĪBAS JOMA**

Nepārziņojamo vielu, kas sagatavota saskaņā ar 1. daļu, sadala frakcijās, iegūstot dažādus spirtu savienojumus, alifātiskos spirtus, sterīnus un triterpēndiolus (eritrodioļu un uvaolu).

2. PRINCIPS

Izmantojot parasto plānslāņa hromatogrāfiju (atsauces metode), nepārziņojamo vielu var sadalīt frakcijās, atsegt, un pēc tam noskrāpēt un ekstrahēt atbilstošās joslas. Alternatīva atdalīšanas metode ir *HPLC*, kurā izmanto silikagela kolonnu ar UV starojuma detektoru un savāc dažādās frakcijas. Alifātiskos spirtus un triterpēns spirtus, kā arī sterīnus un triterpēndiolus atdala kopā.

3. APARATŪRA

Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši turpmāk nosauktais.

- 3.1. Komplekts analīzei ar plānslāņa hromatogrāfiju, kurā izmanto 20 × 20 cm stikla plates.
- 3.2. Ultravioletā spuldze ar viļņu garumu 366 vai 254 nm.
- 3.3. Mikrošļircis, 100 µl un 500 µl.
- 3.4. Cilindriskais poraina stikla filtrtūģelis G3 (poru lielums 15–40 µm), diametrs aptuveni 2 cm, augstums aptuveni 5 cm, piemērots filtrēšanai vakuumā, ar stikla savienojumu ar ārējo pieslēpējumu.
- 3.5. Koniskā kolba (Erlenmeiera kolba), 50 ml, ar stikla savienojumu ar iekšējo pieslēpējumu, izmantojama kopā ar filtrtūģeli (3.4. punkts).
- 3.6. Mēģene ar sašaurinātu konusveida galu un blīvi noslēdzošu stikla aizbāzni, 10 ml.
- 3.7. Kalcija dihlorīda eksikators.
- 3.8. *HPLC* sistēma, kurā ir:
 - 3.8.1. binārais sūknis;
 - 3.8.2. manuāls vai automātisks inžektors, kuram ir 200 µl inžektora cilpa;
 - 3.8.3. integrēts atgāzētājs;
 - 3.8.4. *UV-VIS* vai *IR* detektors.
- 3.9. *HPLC* kolonna (25 cm x 4 mm iekš. diam.) ar silikagelu 60 (daļiņu lielums 5 µm).
- 3.10. Šļircis filtrs, 0,45 µm.
- 3.11. Koniskā kolba (Erlenmeiera kolba), 25 ml.

▼ **M32**

4. REAĢENTI

4.1. Kālija hidroksīds ar 85 % minimālo titru.

4.2. Kālija hidroksīds, aptuveni 2 M šķīdums etanolā.

130 g kālija hidroksīda (4.1. punkts) dzesējot izšķīdina 200 ml destilēta ūdens, pēc tam uzpilda ar etanolu (4.9. punkts) līdz vienam litram. Šķīdumu glabā cieši noslēgtās tumša stikla pudelēs ne ilgāk kā 2 dienas.

4.3. Etilēteris, analīzes kvalitātes.

4.4. Kālija hidroksīds, aptuveni 0,2 M šķīdums etanolā.

13 g kālija hidroksīda (4.1. punkts) izšķīdina 20 ml destilēta ūdens un uzpilda ar etanolu (4.9. punkts) līdz vienam litram.

4.5. 20 × 20 cm stikla plates ar silikagela pārklājumu, bez fluorescences indikatora, 0,25 mm biezas (nopērkamas lietošanai gatavas).

4.6. Acetons, hromatogrāfijas kvalitātes.

4.7. n-heksāns, hromatogrāfijas kvalitātes.

4.8. Etilēteris, hromatogrāfijas kvalitātes.

4.9. Etanols, analītiskas kvalitātes.

4.10. Etilacetāts, analītiskas kvalitātes.

4.11. Standartšķīdums plānslāņa hromatogrāfijai: holesterīns, fitosterīni, spirti un eritrodiola šķīdums (5 %) etilacetātā (4.10. punkts).

4.12. 2,7-dihlorfluoresceīna šķīdums (0,2 %) etanolā. To padara viegli bāzisku, pievienojot dažus pilienus 2 M kālija hidroksīda šķīduma spirtā (4.2. punkts).

4.13. n-heksāna (4.7. punkts)/etilētera (4.8. punkts) maisījums 65:35 (tilp./tilp.).

4.14. *HPLC* kustīgā fāze, n-heksāna (4.7. punkts)/etilētera (4.8. punkts) maisījums 1:1 (tilp./tilp.).

5. ATSAUCES METODE: SPIRTU SAVIENOJUMU ATDALĪŠANA AR BĀZISKO PLĀNSLĀŅA HROMATOGRĀFIJAS (TLC) PLATI

Bāzisko plānslāņa hromatogrāfijas plašu sagatavošana. Silikagela plates (4.5. punkts) uz 10 sekundēm iegremdē vai iemērc 0,2 M kālija hidroksīda šķīdumā etanolā (4.4. punkts) aptuveni 4 cm dziļumā, tad divas stundas žāvē velkmes skapī un pēc tam uz vienu stundu ievieto žāvēšanas skapī 100 °C temperatūrā.

Izņem no žāvēšanas skapja un līdz lietošanai glabā eksikatorā (3.7. punkts) virs kalcija hlorīda (šādi apstrādātas plates jāizlieto 15 dienu laikā).

Attīstīšanas kamerā pārnes heksāna/etilētera maisījumu (4.13. punkts) (3. piezīme), izveidojot aptuveni 1 cm biezu slāni. Kameru noslēdz ar piemērotu vāku un vismaz uz pusstundu atstāj vēsā vietā, lai iestātos šķidruma un tvaika līdzsvars. Kameras iekšējām virsmām var piestiprināt filtrpapīra sloksnes, kas iegremdētas eluentā. Tas aptuveni par trešdaļu samazina attīstīšanas laiku, un komponentu eluēšanās notiek vienmērīgāk.

3. *piezīme.* Lai eluēšanas apstākļi būtu pilnībā atkārtojami, attīstīšanas maisījums pirms katras analīzes jānomaina. Par šķīdinātāju var lietot arī n-heksāna/etilētera maisījumu 50:50 (tilp./tilp.).

Sagatavo saskaņā ar 1. daļu sagatavotās nepārziepjāmās vielas aptuveni 5 % šķīdumu etilacetātā (4.10. punkts) un ar 100 μl mikrošļirci (3.3. punkts) 0,3 ml šā šķīduma tievā un vienādā svītrā uznes uz hromatogrāfijas plates (4.5. punkts) apakšējās malas (2 cm attālumā). Vienādā attālumā ar šo svītru uznes 2–3 μl materiāla standartšķīduma (4.11. punkts), lai pēc attīstīšanas varētu identificēt sterīnu, triterpēndiolu un spirtu joslas.

▼ **M32**

Plati ievieto attīstīšanas kamerā (3.1. punkts). Apkārtējās vides temperatūrai jābūt no 15 līdz 20 °C (4. piezīme). Kameru tūlīt noslēdz ar vāku un atstāj eluēties, līdz šķīdinātāja fronte sasniedz aptuveni 1 cm no plates augšējās malas. Plati izņem no attīstīšanas kameras un šķīdinātāju iztvaicē, izmantojot karsta gaisa plūsmu vai plati uz neilgu laiku atstājot velkmē.

4. *piezīme.* Augstāka temperatūra varētu pasliktināt atdalīšanos.

Uz plates vienmērīgi uzsmidzina nelielu daudzumu 2,7-dihlorfluoresceīna šķīduma (4.12. punkts) un tad atstāj nožūt. Novērojot plati zem ultravioletās spuldzes (3.2. punkts), sterīnu, triterpēndiolu un spirtu joslas var identificēt pēc tā, ka tās ir vienādā attālumā ar standartšķīdumam (4.11. punkts) atbilstošajiem plankumiem. Joslu robežas apkārt fluorescējošajam plankumam apvelk ar melnu zīmuli (sk. *TLC* plati 1. attēlā).

No apvilkta laukuma ar metāla lāpstiņu noskrāpē silikagelu. Sīki sasmalcinātu no plates noņemto materiālu pārvieto uz filtrtūģeli (3.4. punkts). Pievieno 10 ml karsta etilacetāta (4.10. punkts), rūpīgi samaisa ar metāla lāpstiņu un filtrē (vajadzības gadījumā vakuumā), filtrātu uztver filtrtūģelim pievienotajā koniskajā kolbā (3.5. punkts).

Nogulsnes kolbā trīs reizes mazgā ar etilēteri (4.3. punkts) (katru reizi aptuveni 10 ml), filtrātu savācot tajā pašā filtrtūģelim pievienotajā kolbā; filtrātu ietvaicē, līdz iegūst no 4–5 ml tilpuma, atlikušo šķīdumu pārnēs iepriekš nosvērtā 10 ml mēģenē (3.6. punkts), uzmanīgi sildot, lēnā slāpekļa straumē ietvaicē sausu, vēlreiz uzpilda dažus pilienus acetona (4.6. punkts), atkal ietvaicē sausu. Mēģenē iegūtais atlikums sastāv no sterīnu un triterpēndiolu vai spirtu un triterpēnspirtu frakcijām.

6. SPIRTU FRAKCIJAS ATDALĪŠANA AR *HPLC*

Saskaņā ar 1. daļu sagatavoto nepārziņojamo vielu izšķīdina 3 ml kustīgās fāzes (4.14. punkts), šķīdumu filtrē ar šļirces filtru (3.10. punkts) un uzglabā.

200 µl filtrētā nepārziņojamā šķīduma ievada *HPLC* (3.8. punkts).

Sāk *HPLC* atdalīšanas procesu ar ātrumu 0,8 ml/min, pirmajās 5 minūtēs iegūto rezultātu izmet un 25 ml koniskajās kolbās (3.11. punkts) laikā no 5. līdz 10. minūtei savāc alifātiskos spirtus un triterpēnspirtus, bet laikā no 11. līdz 25. minūtei sterīnus, eritrodioļu un uvaolu (5. piezīme).

Atdalīšanu var novērot ar UV detektoru 210 nm viļņu garumā vai ar refrakcijas koeficienta detektoru (sk. 6. attēlu).

Frakcijas ietvaicē sausas un sagatavo hromatogrāfiskajai analīzei.

5. *piezīme.* *HPLC* sūkņa spiediens ir rūpīgi jākontrolē, etilēteris var paaugstināt spiedienu; lai kontrolētu spiedienu, ir jākorģē plūsma.

3. DAĻA

SPIRTU SAVIENOJUMU FRAKCIJU GĀZU HROMATOGRĀFISKĀ ANALĪZE

1. DARBĪBAS JOMA

Šajā daļā doti vispārīgi norādījumi par to, kā kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfija izmantojama, lai noteiktu tādu spirtu savienojumu kvalitatīvo un kvantitatīvo sastāvu, kas atdalīti saskaņā ar šīs metodes 2. daļā izklāstīto metodi.

▼ M32**2. PRINCIPS**

Frakcijas, kas iegūtas no nepārziepjamās vielas, izmantojot *TLC* vai *HPLC*, derivatizē trimetilsililēteros un analizē ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju, kurā izmanto inžektoru ar plūsmas sadalītāju un liesmas jonizācijas detektoru.

3. APARATŪRA

Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši turpmāk nosauktais.

3.1. Mēģene ar sašaurinātu konusveida galu un blīvi noslēdzošu stikla aizbāzni, 10 ml.

3.2. Gāzu hromatogrāfs, kurā var izmantot kapilāro kolonnu plūsmas dalīšanas režīmā un kura sastāvdaļas ir šādas:

3.2.1. termostatējama kamera kolonnām vēlamās temperatūras uzturēšanai ar precizitāti līdz ± 1 °C;

3.2.2. termoregulējams inžektors ar persilanizētu stikla iztvaicētāju un plūsmas sadalītāju;

3.2.3. liesmas jonizācijas detektors (*FID*);

3.2.4. datu ieguves sistēma, kas piemērota izmantošanai ar *FID* (3.10.3. punkts) un ko iespējams manuāli integrēt.

3.3. 20–30 m gara kvarca kapilārā kolonna ar iekšējo diametru no 0,25 līdz 0,32 mm, vienmērīgi pārklāta ar difenilu (5 %) un dimetilpolisiloksānu (95 %) (SE-52 vai SE-54 stacionārā fāze vai līdzvērtīga fāze), kuru slāņa biezums ir 0,10–0,30 μm.

3.4. Gāzu hromatogrāfijai paredzēta mikrošļirce ar 10 μl tilpumu un rūdītu adatu, kas piemērota ievadīšanai plūsmas dalīšanas režīmā.

4. REAĢENTI

4.1. Bezūdens piridīns, hromatogrāfijas kvalitātes.

4.2. Heksametildisilazāns, analītiskas kvalitātes.

4.3. Trimetilhlorsilāns, analītiskas kvalitātes.

4.4. Sterīnu trimetilsililēteru parauga šķīdumi. Pagatavo lietošanas gaitā no sterīniem un eritrodiola, kas iegūti no sterīnus un eritrodiolu saturošām eļļām.

4.5. C20 līdz C28 alifātisko spirtu trimetilsililēteru standartšķīdumi. Vajadzības gadījumā tos var pagatavot no tīru spirtu maisījumiem.

4.6. Nesējgāze: ūdeņradis vai hēlijs, gāzu hromatogrāfijas tīrības.

4.7. Palīgģāzes: ūdeņradis, hēlijs, slāpeklis un gaiss, gāzu hromatogrāfijas tīrības.

4.8. Sililēšanas reaģents, kas ir piridīna/heksametildisilazāna/trimetilhlorsilāna maisījums 9:3:1 (tilp./tilp./tilp.).

4.9. n-heksāns, hromatogrāfijas kvalitātes.

▼ **M32**

5. TRIMETILSILILĒTERU IEGŪŠANA

Mēģenē (3.1. punkts), kurā ir spirtu savienojuma frakcija, pievieno sililēšanas reaģentu (4.8. punkts) (6. piezīme) proporcijā 50 µl uz katru miligramu spirtu savienojuma, novēršot mitruma absorbciju (7. piezīme).

6. *piezīme.* Tirdzniecībā ir pieejami lietošanai gatavi šķīdumi. Ir pieejami arī citi sililēšanas reaģenti, piemēram, bis-trimetilsililtrifluoracetamīds ar 1 % trimetilhlorsilānu, kas ir jāatšķaida ar vienādu tilpumu bezūdens piridīna. Piridīnu var aizstāt ar tādu pašu daudzumu acetoniitrila.

7. *piezīme.* Var veidoties viegla opalescence, kas nerada traucējumus. Baltu pārslu veidošanās vai sāra krāsojuma parādīšanās norāda uz mitruma klātbūtni vai reaģenta bojāšanos. Ja tā notiek, analīze ir jāatkārto (tikai tad, ja izmanto heksametildisilazānu/trimetilhlorsilānu).

Mēģeni (3.1. punkts) noslēdz ar aizbāzni, uzmanīgi krata (neapvēršot otrādi), līdz savienojumi ir pilnībā izšķīduši. Ļauj nostāties vismaz 15 minūtes istabas temperatūrā, pēc tam dažas minūtes centrifugē. Dzidrais šķīdums ir gatavs gāzu hromatogrāfiskajai analīzei.

6. GĀZU HROMATOGRĀFISKĀ ANALĪZE

6.1. Sagatavošanas operācijas, kapilārās kolonnas kondicionēšana

Kolonnai (3.3. punkts) iemontē gāzu hromatogrāfā, tās ieeju pievienojot inžektoram ar plūsmas sadalītāju, bet izeju – detektoram.

Izdara gāzu hromatogrāfijas iekārtas vispārējo pārbaudi (noplūdes no gāzu kontūriem, detektora, plūsmas sadalīšanas un reģistrējošās sistēmas efektivitāte utt.).

Ja kolonnai lieto pirmoreiz, to ieteicams kondicionēt. Lēnu gāzes plūsmu laiž cauri kolonnai, pēc tam ieslēdz gāzu hromatogrāfu un pakāpeniski uzsilda līdz temperatūrai, kas ir vismaz 20 °C virs darba temperatūras (8. piezīme). Šo temperatūru uztur vismaz divas stundas, pēc tam iekārtu noregulē darba režīmā (noregulē gāzu plūsmas un sadali, liesmas aizdedzi, savienojumu ar datošanas sistēmu, kā arī noregulē kolonnas, detektora un inžektora temperatūru utt.), pēc tam reģistrē signālu, izvēloties jutību, kas ir vismaz divas reizes augstāka par analīzei paredzēto jutību. Nulles līnijai ir jābūt lineārai, bez smailēm, un tā nedrīkst nobīdīties. Negatīva taisnvirziena nobīde norāda uz noplūdēm kolonnas savienojumu vietās; pozitīva nobīde norāda uz nepareizu kolonnas kondicionēšanu.

8. *piezīme.* Kondicionēšanas temperatūrai vienmēr jābūt vismaz par 20 °C zemākai nekā maksimālā temperatūra, kas norādīta lietojamajai stacionārajai fāzei.

6.2. Darba apstākļi

Optimizē temperatūras programmu un nesējgāzes plūsmu, lai iegūtu hromatogrammas, kas ir līdzīgas 3.–6. attēlā redzamajām.

Turpinājumā norādītie parametri ir testēti un atzīti par lietderīgiem.

▼ **M32**

6.2.1. Alifātiskie spirti

Žāvēšanas skapja programma	180 °C (8 min) → 260 °C (ar kāpumu 5 °C/min) → 260 °C (15 min)
Inžektora temperatūra	280 °C
Detektora temperatūra	290 °C
Nesējgāzes lineārais ātrums	Hēlijs (20–30 cm/s); ūdeņradis (30–50 cm/s)
Dalījuma attiecība	1:50 līdz 1:100
Ievadītais tilpums	0,5 līdz 1 μl <i>TMSE</i> šķīduma

6.2.2. Sterīni un triterpēndioli

Žāvēšanas skapja programma	260 ± 5 °C, izotermiska
Inžektora temperatūra	280–300 °C
Detektora temperatūra	280–300 °C
Nesējgāzes lineārais ātrums	Hēlijs (20–30 cm/s); ūdeņradis (30–50 cm/s)
Dalījuma attiecība	1:50 līdz 1:100
Ievadītais tilpums	0,5 līdz 1 μl <i>TMSE</i> šķīduma

Atbilstīgi kolonnas un gāzu hromatogrāfa īpašībām norādītos apstākļus var mainīt, lai iegūtu hromatogrammas, kas atbilst šādiem nosacījumiem:

- spirta C26 aiztures laiks ir 18 ± 5 min,
- spirta C22 smaile ir 80 ± 20 % no skalas pilnas vērtības olīveļļai un 40 ± 20 % no skalas pilnas vērtības olīvu izspaidu eļļai,
- β-sitosterīna smailes aiztures laikam jābūt 20 ± 5 minūtēm,
- kampesterīna smailei jābūt: olīveļļai (vidējais saturs 3 %) 20 ± 5 % no pilnas skalas,
- visiem klātesošajiem sterīniem jābūt atdalītiem. Turklāt atdalītajām smailēm ir jābūt arī pilnībā nošķirtām, t. i., smailes līnijai ir jāatgriežas uz nulles līnijas, pirms sāk veidoties jauna smaile. Tomēr nepilnīga nošķiršana ir pieņemama, ja smailes ar relatīvo aiztures laiku RRT 1,02 (sitostanols) var kvantitatīvi noteikt, izmantojot perpendikulu.

6.3. Analītiskā procedūra.

10 μl mikrošļircē (3.4. punkts) vispirms ieviek 1 μl heksāna, tad 0,5 μl gaisa un pēc tam 0,5–1 μl parauga šķīduma. Pavelk šļirci virzuli, lai iztukšotu adatu. Adatu izdur cauri inžektora membrānai un pēc vienas vai divām sekundēm strauji ievada šļirci saturu, tad aptuveni pēc piecām sekundēm lēnām izvelk adatu. Var izmantot arī automātisku inžektoru.

▼ **M32**

Turpina reģistrēt, līdz atbilstošo klātesošo spirtu savienojumu *TMSE* ir pilnībā eluēti. Nulles līnijai visu laiku ir jāatbilst attiecīgo darba apstākļu prasībām (6.2.1. vai 6.2.2. punkts).

6.4. Smaiļu identificēšana

Atsevišķās smailes identificē pēc aiztures laikiem, salīdzinot ar alifātisko spirtu un triterpēnspirtu vai sterīnu un triterpēndiolu *TMSE* maisījumiem, kas analizēti tādos pašos apstākļos. Alifātisko spirtu un triterpēnspirtu frakcijas hromatogramma ir redzama 3. attēlā, un attiecīgās sterīnu un triterpēndiolu hromatogrammas ir redzamas 2. attēlā.

Alifātiskie spirti eluējas šādā secībā: C20-ols (I.S.), C22-ols, C23-ols, C24-ols, C25-ols, C26-ols, C27-ols un C28-ols.

Sterīni un triterpēndioli eluējas šādā secībā: holesterīns, brasikasterīns, ergosterīns, 24-metilēnholesterīns, kampesterīns, kampestanols, stigmasterīns, Δ 7-kampesterīns, Δ 5,23-stigmastadienols, klerosterīns, β -sitosterīns, sitostanols, Δ 5-avenasterīns, Δ 5,24-stigmastadienols, Δ 7-stigmastenols, Δ 7-avenasterīns, eritrodīols un uvaols.

6.5. Kvantitatīvā novērtēšana

Alifātisko spirtu C22, C24, C26 un C28 un 1-eikozanola smaiļu laukumus aprēķina datu ieguves sistēmā. Uzskata, ka 1-eikozanola atbildes koeficients ir vienāds ar 1.

Izmantojot datošanas sistēmu, aprēķina α -holestanola, sterīnu un triterpēndiolu smaiļu laukumus. To savienojumu smailes, kas nav ietverti 1. tabulā, neņem vērā (ergosterīns nav jāaprēķina). Uzskata, ka α -holestanola atbildes koeficients ir vienāds ar 1.

Katra atsevišķā spirtu savienojuma koncentrāciju, kas izteikta mg/kg taukvielas, aprēķina šādi:

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

kur:

A_x = spirtu savienojuma x smailes laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās;

A_s = 1-eikozanola/ α -holestanola smailes laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās;

m_s = pievienotā 1-eikozanola/ α -holestanola masa miligramos;

m = noteikšanai ņemtā parauga masa gramos.

7. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

Atsevišķo alifātisko spirtu un triterpēnspirtu koncentrāciju izsaka mg/kg taukvielas, un to summu norāda kā "kopējo alifātisko spirtu saturu". Kopējais saturs ir C22, C24, C26 un C28 summa.

Katra atsevišķā spirtu savienojuma sastāvu izsaka ar skaitli līdz vienai zīmei aiz komata.

Kopējā sterīnu koncentrācija ir jāizsaka veselā skaitlī.

▼ **M32**

Katra atsevišķā sterīna procentus aprēķina pēc attiecīgā smailes laukuma attiecības pret sterīnu smaīļu kopējo laukumu:

$$\text{Sterīns } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

kur:

A_x = sterīna x smailes laukums;

ΣA = sterīnu smaīļu kopējais laukums.

Nosacītais β -sitosterīns: $\Delta 5,23$ -stigmastadienols + klerosterīns + β -sitosterīns + sitostanols + $\Delta 5$ -avenasterīns + $\Delta 5,24$ -stigmastadienols.

Aprēķina eritrodiola un uvaola procentus:

$$\text{Eritrodiols} + \text{uvaols} = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

kur:

A_{Er} = eritrodiola laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās;

A_{Uv} = uvaola laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās;

ΣA_T = sterīna + eritrodiola + uvaola kopējais laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās.

Līdztekus atsevišķu sterīnu un triterpēndiolu relatīvajiem procentiem un sterīnu kopējai koncentrācijai ir jāaprēķina eritrodiola un uvaola koncentrācija un to summa mg/kg taukvielas, izmantojot šādas formulas:

$$\text{Eritrodiols} = \frac{A_{Er} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

$$\text{Uvaols} = \frac{A_{Uv} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

kur:

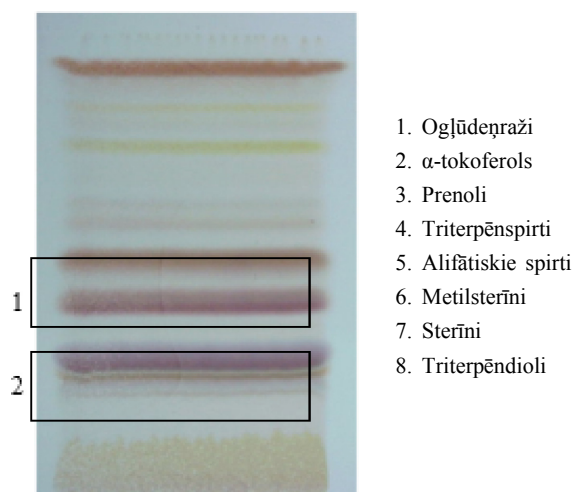
A_{Er} = eritrodiola smailes laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās;

A_{Uv} = uvaola laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās;

A_s = α -holestanola smailes laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās;

m_s = pievienotā α -holestanola masa miligramos;

m = noteikšanai ņemtā parauga masa gramos.

▼ **M32***Papildinājums*

1. Ogļūdeņraži
2. α -tokoferols
3. Prenoli
4. Triterpēnspirti
5. Alifātiskie spirti
6. Metilsterīni
7. Sterīni
8. Triterpēndioli

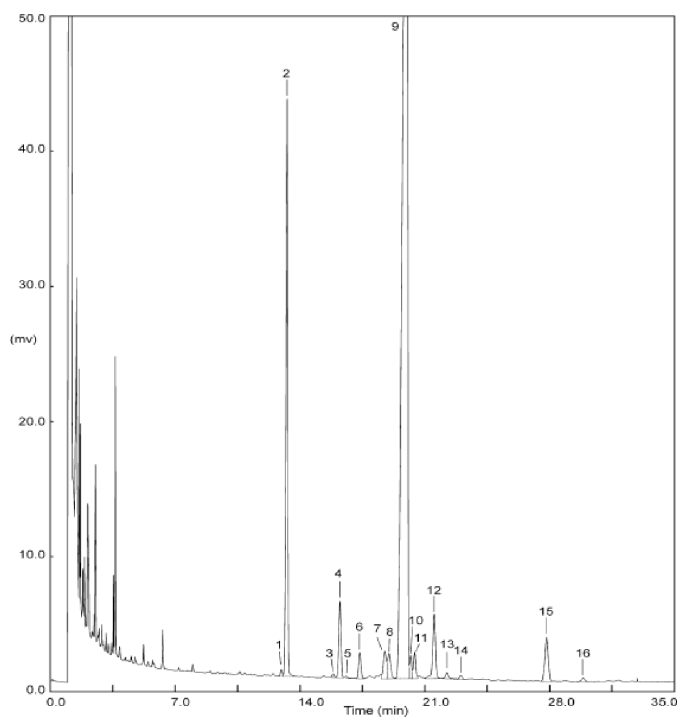
1. attēls. *TLC*, kas iegūta no olīvu izspaidu eļļas nepārziepjāmās frakcijas, kura divreiz elutēta ar heksānu:dietilēteri (65:35), attīstīta ar SO_4H_2 (50 %) un karsēta. Noskrāpējamās joslas atrodas taisnstūrī, 1. taisnstūrī ir alifātisko spirtu joslas, bet 2. taisnstūrī sterīnu un triterpēndiolu joslas.

I tabula. Sterīnu relatīvie aiztures laiki

Smaile	Identifikācija		Relatīvie aiztures laiki	
			SE 54 kolonna	SE 52 kolonna
1.	Holesterīns	Δ -5-holesten-3 β -ols	0,67	0,63
2.	Holestanols	5 α -holestan-3 β -ols	0,68	0,64
3.	Brasikasterīns	[24S]-24-metil- Δ -5,22-holestadien-3 β -ols	0,73	0,71
*	Ergosterīns	[24S]-24-metil- Δ -5,7,22 holestatrien-3 β -ols	0,78	0,76
4.	24-metilēnholesterīns	24-metilēn- Δ -5,24-holestadien-3 β -ols	0,82	0,80
5.	Kampesterīns	(24R)-24-metil- Δ -5-holesten-3 β -ols	0,83	0,81
6.	Kampestanols	(24R)-24-metil-holestan-3 β -ols	0,85	0,82
7.	Stigmasterīns	[24S]-24-etil- Δ -5,22-holestadien-3 β -ols	0,88	0,87
8.	Δ -7-kampesterīns	(24R)-24-metil- Δ -7-holesten-3 β -ols	0,93	0,92
9.	Δ -5,23-stigmastadienols	(24R)-24-etil- Δ -5,23-holestadien-3 β -ols	0,95	0,95
10.	Klerosterīns	[24S]-24-etil- Δ -5,25-holestadien-3 β -ols	0,96	0,96

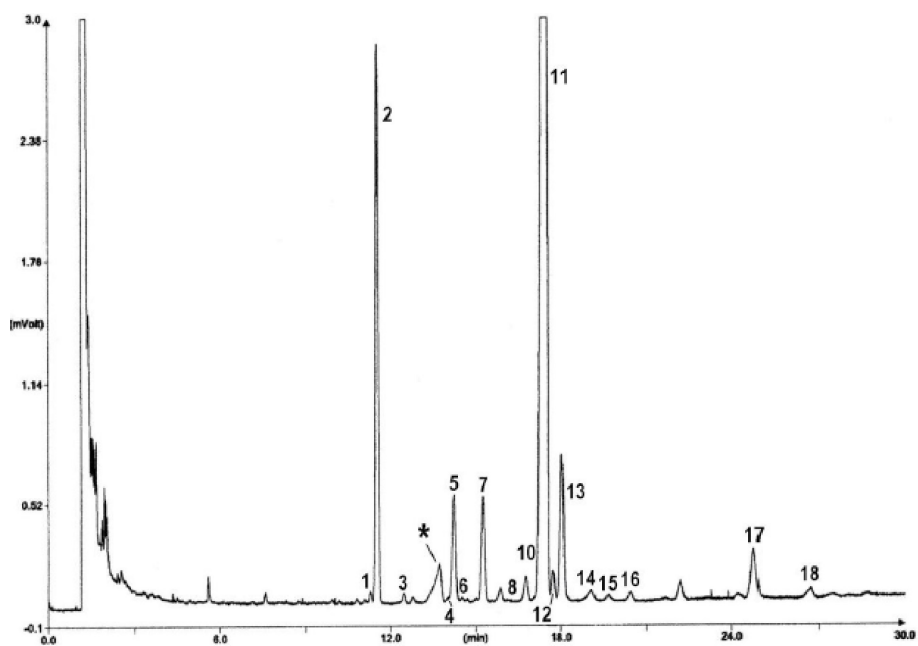
▼ M32

Smaile	Identifikācija		Relatīvie aiztures laiki	
			SE 54 kolonna	SE 52 kolonna
11.	Betasitosterīns	(24R)-24-etil- Δ -5-holesten-3 β -ols	1,00	1,00
12.	Sitostanols	24-etil-holestan-3 β -ols	1,02	1,02
13.	Δ -5-avenasterīns	(24Z)-24-etiliden- Δ -holesten-3 β -ols	1,03	1,03
14.	Δ -5,24-stigmastadienols	(24R,S)-24-etil- Δ -5,24-holestadien-3 β -ols	1,08	1,08
15.	Δ -7-stigmastenols	(24R,S)-24-etil- Δ -7-holesten-3 β -ols	1,12	1,12
16.	Δ -7-avenasterīns	(24Z)-24-etiliden- Δ -7-holesten-3 β -ols	1,16	1,16
17.	Eritrodiols	5 α -olean-12-en-3 β ,28-diols	1,41	1,41
18.	Uvaols	Δ 12-ursen-3 β ,28-diols	1,52	1,52

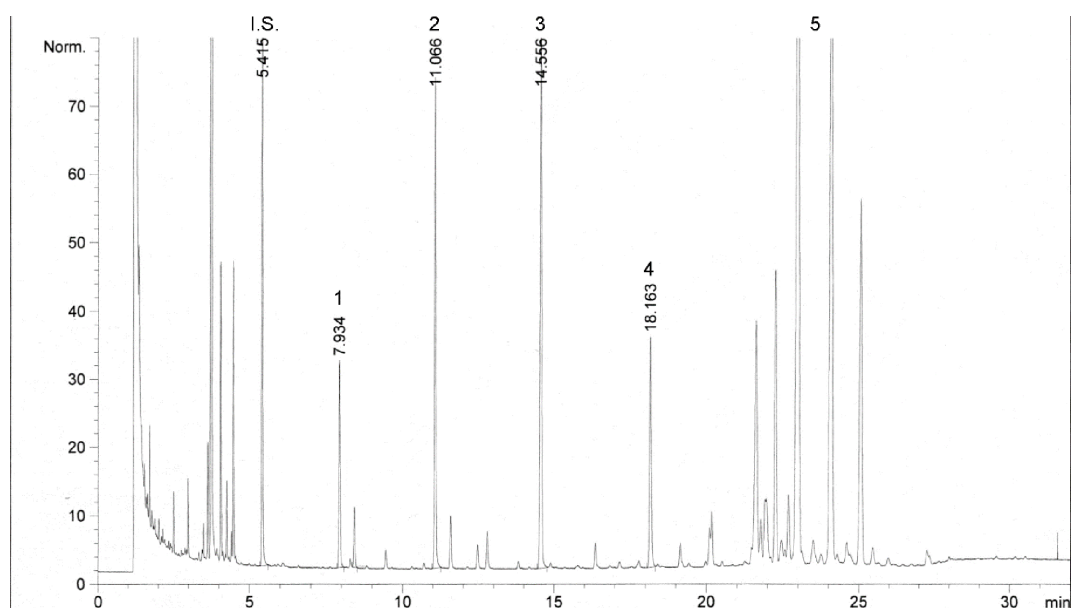


2. attēls. Rafinētas olīveļļas sterīnu un triterpēdiolu GC-FID hromatogrāfiskais profils. (1) Holes-
terīns, (2) α -holestanols (I.S.), (3) 24-metilēnholesterīns, (4) kampesterīns, (5) kampestanols, (6)
stigmasterīns, (7) Δ 5,23-stigmastadienols, (8) klerosterīns, (9) betasitosterīns, (10) sitostanols, (11)
 Δ 5-avenasterīns, (12) Δ 5,24-stigmastadienols, (13) Δ 7-stigmastenols, (14) Δ 7-avenasterīns, (15)
eritrodiols, (16) uvaols.

▼ M32

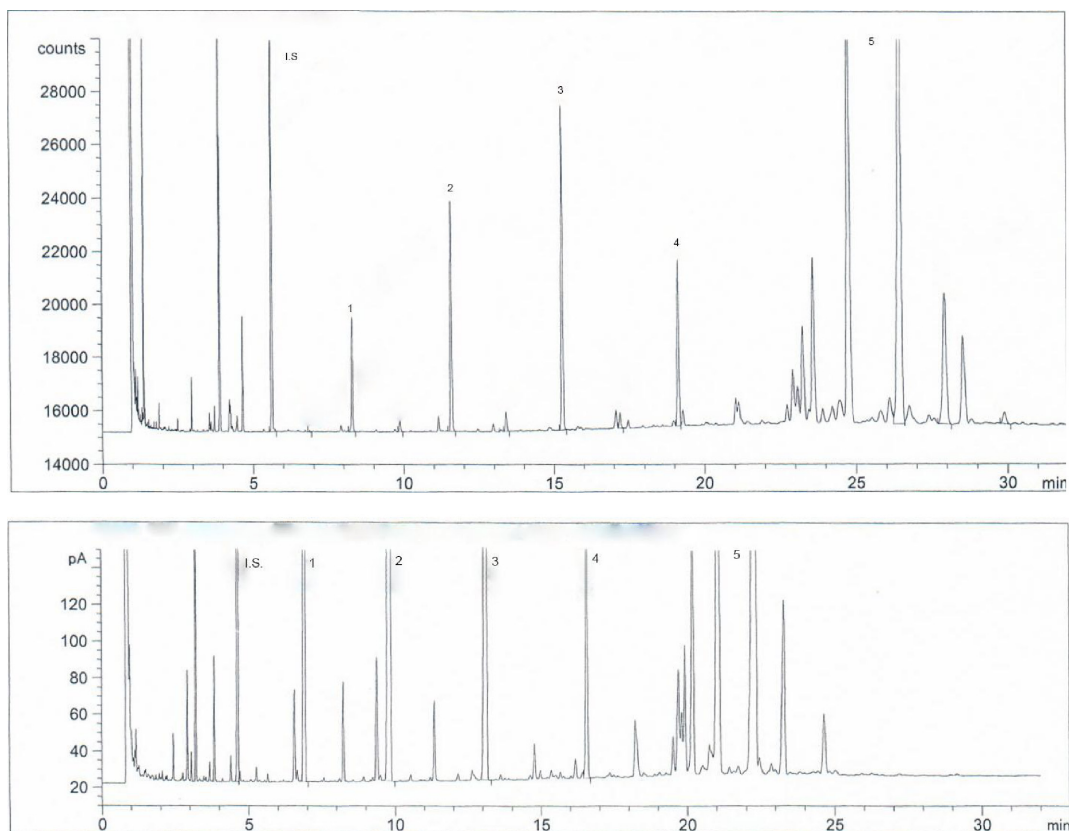


3. attēls. Spīdīgās olīveļļas sterīnu un triterpēdiolu *GC-FID* hromatogrāfiskais profils. (1) Holes-
terīns, (2) α -holestanols, (3) brasikasterīns, (4) 24-metilēnholesterīns, (5) kampesterīns, (6) kampe-
stanols, (7) stigmasterīns, (8) Δ^7 -kampesterīns, (9) $\Delta^{5,23}$ -stigmastadienols, (10) klerosterīns, (11)
betasitosterīns, (12) sitostanols, (13) Δ^5 -avenasterīns, (14) $\Delta^{5,24}$ -stigmastadienols, (15) Δ^7 -stigma-
stenols, (16) Δ^7 -avenasterīns, (17) eritrodiols, (18) uvaols.

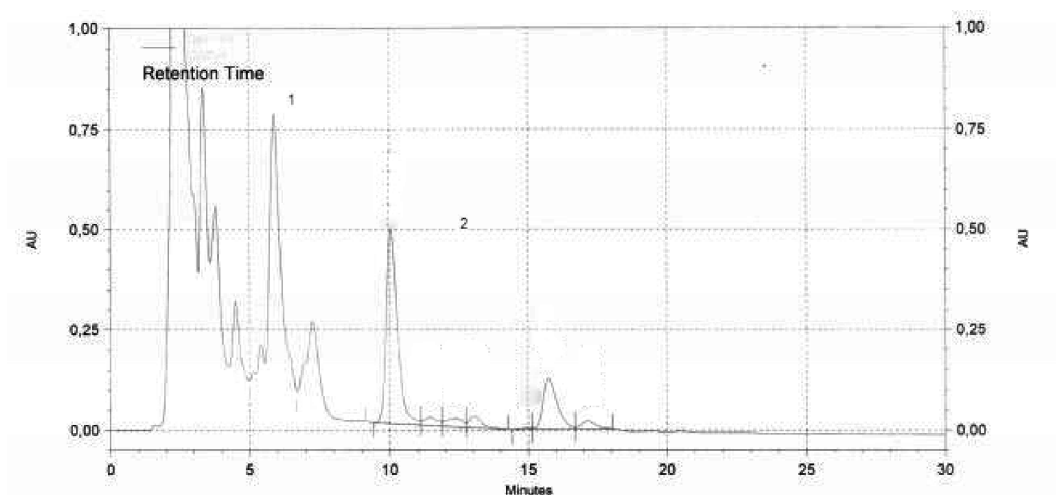


4. attēls. Olīveļļas alifātisko spirtu un triterpēnsirtu *GC-FID* hromatogrāfiskais profils. (I.S.)
C20-ols, (1) C22-ols, (2) C24-ols, (3) C26-ols, (4) C28-ols, (5) triterpēnspirti.

▼ M32



5. attēls. Rafinētas olīveļļas un otrās centrifugēšanas olīveļļas alifātisko spirtu un triterpēnspirtu *GC-FID* hromatogrāfiskais profils. (I.S.) C20-ols, (1) C22-ols, (2) C24-ols, (3) C26-ols, (4) C28-ols, (5) triterpēnspirti.



6. attēls. *HPLC* hromatogramma, kas iegūta no olīveļļas nepārziņojamās vielas, kura atdalīta ar *HPLC*, izmantojot UV detektoru. (1) Alifātiskie spirti un triterpēnspirti; (2) sterīni un triterpēndioli.

▼ **M23***XX PIELIKUMS***Vasku, taukskābju metilesteru un taukskābju etilesteru saturs noteikšana ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfijas metodi**1. **MĒRĶIS**

Pēc šīs metodes nosaka vasku, taukskābju metilesteru un taukskābju etilesteru saturu olīveļļās. Vaskus un alkilesterus sadala pēc oglekļa atomu skaita to molekulās. Metodi ieteicams izmantot olīveļļas atšķiršanai no olīvu izspaidu eļļas, kā arī par neapstrādātas augstākā labuma olīveļļas kvalitātes parametru, kas dod iespējas konstatēt neapstrādātas augstākā labuma olīveļļas viltojumus, kuros tā ir maisījums ar zemākas kvalitātes neapstrādātu olīveļļu, spīdīgās olīveļļas vai dearomatizētām eļļām.

2. **PRINCIPS**

Eļļai pievieno atbilstošu iekšējo standartu, pēc tam hidrēta silikagela kolonnā hromatogrāfiski sadala frakcijās. Iegūst frakciju, kas testēšanas apstākļos eluējas vispirms (kura ir mazāk polāra par triglicerīdiem), un to tieši analizē, izmantojot kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju.

3. **APRĪKOJUMS**3.1. **Erlenmeijera kolba, 25 ml.**3.2. **Stikla kolonna** šķidrums hromatogrāfijai, iekšējais diametrs 15 mm, augstums 30 līdz 40 cm, ar krānu.3.3. **Gāzu hromatogrāfs**, kas piemērots darbam ar kapilāro kolonnu, ir aprīkots ar sistēmu parauga tiešai ievadīšanai kolonnā, un kuram ir šādas sastāvdaļas.3.3.1. **Termostatējama krāsns ar temperatūras programmēšanu.**3.3.2. **Aukstais inžektors** parauga tiešai ievadīšanai kolonnā.3.3.3. **Liesmas jonizācijas detektors un pārveidotājs-pastiprinātājs.**3.3.4. **Reģistrējošā iekārta-integratori** (1. piezīme) darbam ar pārveidotāju/pastiprinātāju (3.3.3.) ar atbildes reaģēšanas laiku ne lielāku par 1 s.

1. piezīme. Ja gāzu hromatogrāfijas datus ievada ar *PC*, var izmantot arī datorizētas sistēmas.

3.3.5. **Kapilārā kolonna, kausēta kvarca (vasku, metilesteru un etilesteru analīzei)**, garums 8-12 m, iekšējais diametrs 0,25-0,32 mm, ar 0,10-0,30 μm šķidrās fāzes (2. piezīme) slāņa pārklājumu iekšpusē.

2. piezīme. Šim nolūkam piemērotākās gatavas nopērkamās šķidrās fāzes ir SE52, SE54, u.c.

3.4. **Mikrošļirce**, 10 μl, ar rūdītu adatu, parauga tiešai ievadīšanai kolonnā.3.5. **Elektriskais kratītājs.**3.6. **Rotācijas iztvaicētājs.**3.7. **Mufelkrāsns.**3.8. **Anālītiskie svāri** ar svēršanas precizitāti ± 0,1 mg.

▼ **M23**

3.9. Laboratorijas stikla trauki.

4. REAKTĪVI

4.1. **Silikagels**, daļiņu izmērs 60-200 μm. Silikagelu uz vismaz 4 h karsē mufelkrāsnī pie 500°C. Atdzesē un pievieno 2 % ūdens no silikagela daudzuma. Homogenizācijai labi sakrata un vismaz 12 h pirms lietošanas ievieto eksikatorā.

▼ **M32**

4.2. n-heksāns, hromatogrāfijai vai ķīmiski tīrs. Heksānu drīkst aizstāt ar izooktānu (2,2,4-trimetilpentāns, hromatogrāfijai), ja vien tiek sasniegtas salīdzināmas precizitātes vērtības. Šķīdinātāji, kuriem viršanas punkts ir augstāks nekā n-heksānam, iztvaiko lēnāk. Tomēr heksāna toksiskuma dēļ tiem dodama priekšroka. Tīrība ir jāpārbauda, piemēram, var pārbaudīt atlikumu pēc 100 ml šķīdinātāja iztvaicēšanas.

UZMANĪBU – Tvaiki var uzliesmot. Turēt pietiekamā attālumā no siltuma un dzirksteļu avotiem un atklātas uguns. Raudzīties, lai pudeles vienmēr būtu cieši noslēgtas. Lietošanas laikā nodrošināt pienācīgu ventilāciju. Nepieļaut tvaiku veidošanos un novērst iespējamo ugunsgrēka risku, ko rada, piemēram, sildītāji vai elektroaparāti, kas nav izgatavoti no nedegamiem materiāliem. Ļoti kaitīgs ieelpojot, jo var radīt nervu šūnu bojājumus. Neieelpot tvaikus. Vajadzības gadījumā lietot piemērotus elpošanas aparātus. Nepieļaut nokļūšanu acīs un uz ādas.

Izooktāns ir uzliesmojošs šķidrums, kas rada ugunsbīstamību. Sprādzienbīstamības robežas gaisā ir no 1,1 % līdz 6,0 % (tilpuma daļa). Tas ir toksisks norijot un ieelpojot. Strādājot ar šo šķīdinātāju, izmantot velkmes skapi labā darba kārtībā.

▼ **M23**

4.3. **Etilēteris, hromatogrāfijai.**

UZMANĪBU – Ļoti viegli uzliesmojošs un vidēji toksisks. Kairina ādu. Ieelpojot ļoti kaitīgs. Var radīt acu bojājumus. Iedarbība var būt aizkavēta. Var veidot sprādzienbīstamus peroksīdus. Tvaiki var uzliesmot. Turēt pietiekamā attālumā no siltuma un dzirksteļu avotiem un atklātas uguns. Jāraugās, lai tā pudeles vienmēr būtu cieši noslēgtas. Lietošanas laikā jānodrošina pienācīga ventilācija. Jānovērš tvaiku veidošanās un jānovērš iespējamie ugunsgrēka riski, ko rada, piemēram, sildītāji vai elektroaparāti, kas nav ražoti no nedegamiem materiāliem. Neiztvaicēt sausu vai gandrīz sausu. Pievienojot ūdeni vai piemērotu reducētāju, var samazināt peroksīdu veidošanos. Nedzert. Neieelpot tvaikus. Novērst ilgstošu vai atkārtotu saskari ar ādu.

4.4. **n-heptāns, hromatogrāfijai, vai izooktāns.**

UZMANĪBU – Uzliesmojošs. Ieelpojot ļoti kaitīgs. Turēt pietiekamā attālumā no siltuma un dzirksteļu avotiem un atklātas uguns. Jāraugās, lai tā pudeles vienmēr būtu cieši noslēgtas. Lietošanas laikā jānodrošina pienācīga ventilācija. Neieelpot tvaikus. Novērst ilgstošu vai atkārtotu saskari ar ādu.

4.5. **Laurilarahidāta standartšķīdums** (3. iezīme) heptānā, 0,05 % (m/V) (ieکشējais standarts vasku noteikšanai).

3. *piezīme.* Var lietot arī palmitilpalmitātu, miristilsteāratu vai arahidillaurēatu.

4.6. **Metilheptadekanoāta standartšķīdums** heptānā, 0,02 % (m/V) (ieکشējais standarts metilesteru un etilesteru noteikšanai).

4.7. **Sudānas 1 krāsviela (1-fenil-azo-2-naftols).**

▼ **M23**4.8. **Nesējgāze: ūdeņradis vai hēlijs, tīrs, gāzu hromatogrāfijai.****BRĪDINĀJUMS**

Ūdeņradis. Ļoti viegli uzliesmojošs, zem spiediena. Turēt pietiekamā attālumā no siltuma un dzirksteļu avotiem un atklātas uguns, sildītājiem vai elektroaparātiem, kas nav ražoti no nedegamiem materiāliem. Nelietojot balona vārsts jānoslēdz. Obligāti jālieto reduktors spiediena samazināšanai. Pirms balona vārsta atvēršanas jāatbrīvo reduktora atspere. Atverot vārstu, nestāvēt pret izeju no balona. Lietošanas laikā jānodrošina pienācīga ventilācija. Nepārvietot ūdeņradi no viena balona uz citu. Nemaisīt gāzi balonā. Raudzīties, lai baloni nevarētu apgāzties. Neturēt saules staros un pie siltuma avotiem. Glabāt nekorozīvā vidē. Nelietot bojātus vai nemarkētus balonus.

Hēlijs. Saspiesta gāze zem augsta spiediena. Samazina elpošanai pieejamā skābekļa daudzumu. Turēt balonu noslēgtu. Lietošanas laikā jānodrošina pienācīga ventilācija. Neieiet glabāšanas zonās, ja tajās nav pietiekamas ventilācijas. Obligāti jālieto reduktors spiediena samazināšanai. Pirms balona vārsta atvēršanas jāatbrīvo reduktora atspere. Nepārvietot gāzi no viena balona uz citu. Raudzīties, lai baloni nevarētu apgāzties. Atverot vārstu, nestāvēt pret izeju no balona. Neturēt saules staros un pie siltuma avotiem. Glabāt nekorozīvā vidē. Nelietot bojātus vai nemarkētus balonus. Neieelpot. Lietot tikai tehniskām vajadzībām.

4.9. **Palīggāzes:**

— ūdeņradis, tīrs, gāzu hromatogrāfijai.

— gaiss, tīrs, gāzu hromatogrāfijai.

BRĪDINĀJUMS

Gaiss. Saspiesta gāze zem augsta spiediena. Degamu vielu klātbūtnē lietot uzmanīgi, organisko savienojumu lielākas daļas pašizdegšanās temperatūra gaisā ievērojami pazeminās pie augsta spiediena. Nelietojot balona vārsts jānoslēdz. Obligāti jālieto reduktors spiediena samazināšanai. Pirms balona vārsta atvēršanas jāatbrīvo reduktora atspere. Atverot vārstu, nestāvēt pret izeju no balona. Nepārvietot gāzi no viena balona uz citu. Nemaisīt gāzi balonā. Raudzīties, lai baloni nevarētu apgāzties. Neturēt saules staros un pie siltuma avotiem. Glabāt nekorozīvā vidē. Nelietot bojātus vai nemarkētus balonus. Gaiss ir paredzēts tehniskām vajadzībām, to nedrīkst lietot ieelpošanai vai elpošanas aparātos.

5. **PROCEDŪRA**5.1. **Hromatogrāfijas kolonnas sagatavošana**

Suspendē 15 g silikagela (4.1.) n-heksānā (4.2.) un pārnes kolonnā (3.2.). Nostādina. Lai hromatogrāfijas slānis būtu iespējami viendabīgāks, nostādīšanas beigās izmanto elektrisko kratītāju. Eluē 30 ml n-heksāna attīrīšanai no piemaisījumiem. Uz analītiskajiem svāriem (3.8.) 25 ml tilpuma kolbā (3.1.) ņem apmēram 500 mg analizējamā parauga iesvaru un atkarībā no sagaidāmā vasku satura pievieno vajadzīgo daudzumu iekšējā standarta, t.i., analizējot olīveļļu vai olīvu izspaidu eļļu, pievieno attiecīgi 0,1 mg vai 0,25-0,50 mg laurilarahidāta (4.5.), bet, analizējot olīveļļas, 0,05 mg metilheptadekanoāta (4.6.).

▼ **M23**

Sagatavoto paraugu ar divām 2 ml n-heksāna (4.2.) porcijām pārnes hromatogrāfijas kolonnā.

Uztur 1 mm šķīdinātāja līmeni virs absorbenta slāņa. Ar plūsmas ātrumu apmēram 15 pilieni 10 sekundēs eluē n-heksāna/etilētera (99:1) maisījumu un savāc 220 ml. (Šī **frakcija satur metilesterus, etilesterus un vaskus**). (4. *piezīme*) (5. *piezīme*).

4. *piezīme.* n-heksāna/etilētera maisījums (99:1) jāgatavo tajā pašā dienā.

5. *piezīme.* Vasku eluēšanas kontrolei parauga šķīdumam var pievienot 100 µl Sudānas I krāsvielas 1 % šķīdumu eluēšanas maisījumā.

Krāsvielas aiztures laiks ir starp vasku un triglicerīdu aiztures laiku. Tāpēc eluēšanu var pārtraukt pēc tam, kad krāsviela sasniedz hromatogrāfijas kolonnas apakšu, jo tad visi vaski ir eluēti.

No iegūtajām frakcijām rotācijas ietvaicētājā iztvaicē gandrīz visu šķīdinātāja daudzumu. Pēdējos 2 ml iztvaicē ar vāju slāpekļa plūsmu. Savāc metilesterus un etilesterus saturošo frakciju, ko izšķīdina 2-4 ml n-heptāna vai izooktāna.

5.2. Gāzu hromatogrāfijas analīze

5.2.1. Sagatavošanas procedūra

Kolonnas uzstāda gāzu hromatogrāfam (3.3.), pievienojot ieeju kolonnā virskolonnas sistēmai, bet kolonnas izeju detektoram. Pārbauda gāzu hromatogrāfa darbību (gāzes cilpas, detektoru, pašrakstītāju u.c.).

Kolonnas lietojot pirmo reizi, to ieteicams kondicionēt. Kolonnai laiž cauri nelielu gāzes plūsmu, un tad ieslēdz gāzu hromatogrāfu. Apmēram 4 h laikā pakāpeniski paaugstina temperatūru līdz 350°C.

Šādu temperatūru uztur vismaz 2 h, tad noregulē aparatūru darba režīmā (regulē gāzes plūsmu, iedez liesmu, pievieno elektronisko pašrakstītāju (3.3.4.), noregulē kolonnas krāsns temperatūru, noregulē detektoru u.c.). Reģistrē signālu ar jutību, kas ir vismaz divas reizes lielāka par analīzei nepieciešamo. Bāzes līnijai jābūt taisnai, bez jebkādiem signāliem, un tai nedrīkst būt dreifā.

Negatīvs taisnlīnijas dreifs liecina, ka kolonnas savienojumi nav pareizi, savukārt pozitīvs dreifs norāda uz to, ka kolonna nav pienācīgi kondicionēta.

5.2.2. Darba režīma izraudzīšanās vasku, metilesteru un etilesteru noteikšanai (6. *piezīme*)

Parasti izmanto šādu darba režīmu:

— kolonnas temperatūra:

20°C/min 5°C/min

80 °C sākumā (1') ————— 140 °C ————— 335 °C (20);

— detektora temperatūra 350°C;

— ievadītais daudzums 1 µl n-heptāna šķīduma (2–4 ml);

▼ **M23**

— nesējgāze hēlijs vai ūdeņradis ar attiecīgajai gāzei optimālo lineāro ātrumu (sk. A papildinājumā);

— instrumenta jutība: piemērota iepriekš minētajiem apstākļiem.

6. *piezīme.* Augstas beigu temperatūras dēļ pieļaujams pozitīvs dreifs, taču tas nedrīkst būt lielāks par 10 % no skalas pilnas vērtības.

Lai sadalītu visus vaskus, taukskābju metilesterus un etilesterus, panāktu attiecīgo signālu pietiekamu atdalīšanu (sk. 2., 3. un 4. att.) un iekšējā standarta laurilarahidāta aiztures laiku 18 ± 3 min, atbilstoši kolonnas un gāzu hromatogrāfa raksturlielumiem šos apstākļus var mainīt. Pašam reprezentatīvākajam vasku signālam jābūt lielākam par 60 % no skalas pilnas vērtības, bet metilesteru un etilesteru noteikšanai par iekšējo standartu izmantojamā metilheptadekanoāta signālam jāsasniedz skalas pilna vērtība.

Hromatogrāfiskā signāla integrēšanas parametrus nosaka tā, lai iegūtu attiecīgo signālu laukuma pareizu novērtējumu.

5.3. Analīzes veikšana

Ar 10 μl tilpuma mikrošļirci ņem 10 μl šķīduma, velkot tās virzuli atpakaļ, līdz šļirces adata ir tukša. Adatu ievada injekcijas sistēmā un pēc 1–2 s šļirci ātri iztukšo. Pēc apmēram 5 s adatu uzmanīgi izvelk.

Reģistrāciju atkarībā no analizējamās frakcijas veic tik ilgi, līdz pilnībā eluējas vaski vai stigmastadiēni.

Bāzes līnijai noteikti jāatbilst nepieciešamajiem nosacījumiem.

5.4. Signālu identificēšana

Signālus identificē pēc izdalīšanas laika, tos salīdzinot ar tādos pašos apstākļos analizētu vasku maisījumu izdalīšanas laikiem, kas ir zināmi. Olīveļļu galveno taukskābju (palmitīnskābes un oleīnskābes) alkilesterus identificē no metilesteru un etilesteru maisījumiem.

1. att. parādīta neapstrādātas augstākā labuma olīveļļas vasku hromatogramma. 2. un 3. att. parādītas hromatogrammas divām neapstrādātām augstākā labuma olīveļļām no mazumtirdzniecības, no tām viena satur metilesterus un etilesterus, bet otra ir bez tiem. 4. att. parādītas hromatogrammas neapstrādātai augstākā labuma olīveļļai un tai pašai eļļai ar 20 % dearomatizētas eļļas piedevu.

5.5. Vasku kvantitatīvā analīze

Ar integratoru nosaka to signālu laukumu, kas atbilst iekšējam standartam laurilarahidātam un C₄₀ līdz C₄₆ alifātiskajiem esteriem.

Vasku kopējo saturu mg/kg eļļas nosaka, saskaitot visu atsevišķo vasku saturu:

$$\text{Vaski, mg/kg} = \frac{(\sum A_x) \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

▼ **M23**

kur

A_x = attiecīgajam esterim atbilstošā signāla laukums, skaitītāja vienībās,

A_s = iekšējam standartam laurilarahidātām atbilstošā signāla laukums, skaitītāja vienībās,

m_s = pievienotā iekšējā standarta laurilarahidāta masa miligramos,

m = noteikšanai ņemtā parauga masa gramos.

5.5.1. *Metilesteru un etilesteru kvantitatīvā analīze*

Ar integratoru nosaka to signālu laukumu, kas atbilst iekšējam standartam metilheptadekanoātam, C_{16} un C_{18} taukskābju metilesteriem C_{16} un C_{18} taukskābju etilesteriem.

Katra alkilestera saturu mg/kg eļļas nosaka šādi:

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

kur

A_x = attiecīgajam C_{16} un C_{18} esterim atbilstošā signāla laukums, skaitītāja vienībās,

A_s = iekšējam standartam metilheptadekanoātam atbilstošā signāla laukums, skaitītāja vienībās,

m_s = pievienotā iekšējā standarta metilheptadekanoāta masa miligramos,

m = noteikšanai ņemtā parauga masa gramos.

6. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

Norāda dažādu C_{40} līdz C_{46} vasku (7. *piezīme*) satura summu mg/kg eļļas.

Norāda atsevišķi C_{16} līdz C_{18} metilesteru un etilesteru satura summu un to kopējo summu.

Rezultātus izsaka, noapaļojot līdz vienam mg/kg.

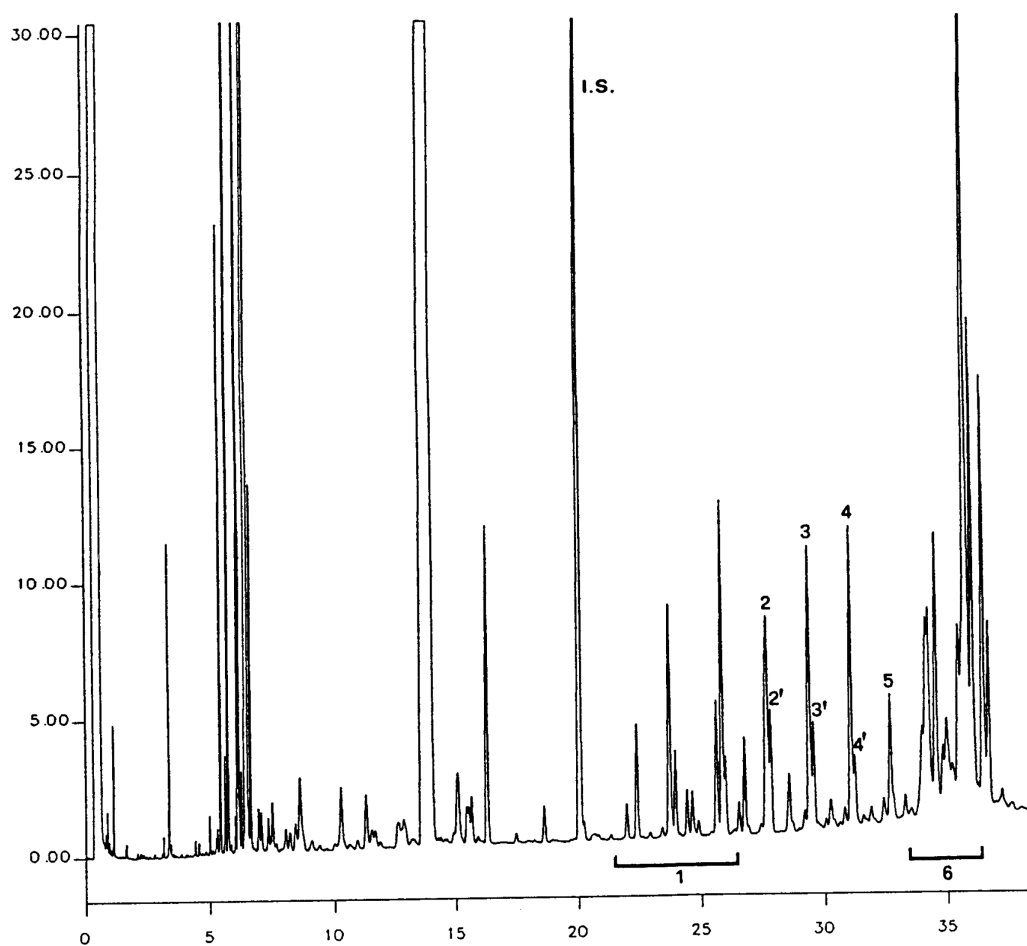
7. *piezīme.* Kvantitatīvai noteikšanai izmanto signālus, kas attiecas uz C_{40} – C_{46} esteriem ar oglekļa atomu pāra skaitli molekulā pēc olīveļļā esošo vasku hromatogrammas piemēra pievienotajā attēlā. Identifikācijas nolūkiem, ja C_{46} esteris ir sašķelts, ieteicams analizēt olīvu izspaidu eļļas vasku frakciju, kur C_{46} signāls ir atšķirams, jo ir lielākais.

Norāda metilesteru un etilesteru satura attiecību.

▼ M23

1. attēls

Oļīveļļas vasku frakcijas gāzu hromatogrammas piemērs (1)



Taukskābju metilesteru un etilesteru signāli ar aiztures laiku no 5 līdz 8 min

Paskaidrojumi:

I.S. = Laurilarahidāts

1 = Diterpēnesteri

2+2' = C₄₀ esteri

3+3' = C₄₂ esteri

4+4' = C₄₄ esteri

5 = C₄₆ esteri

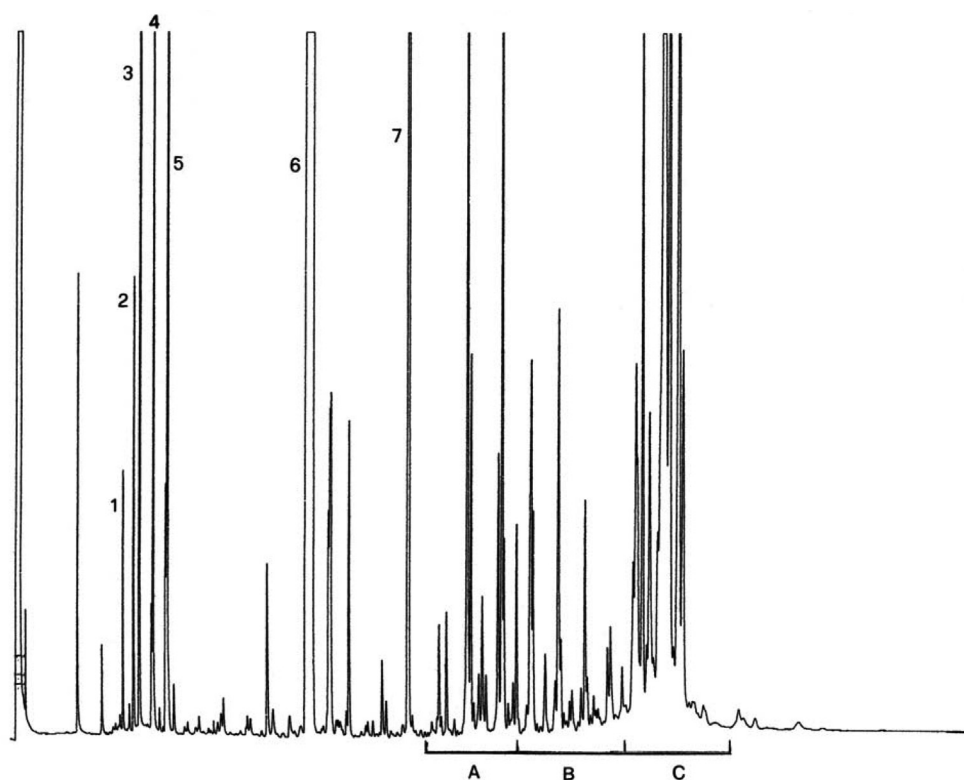
6 = Sterīna esteri un triterpēnsipiti

(1) Pēc sterīna esteri eluēšanas hromatogrammā nedrīkst būt nekādu būtisku signālu (triglicerīdi).

▼ M23

2. attēls

Neapstrādātas olīveļļas metilesteri, etilesteri un vaski



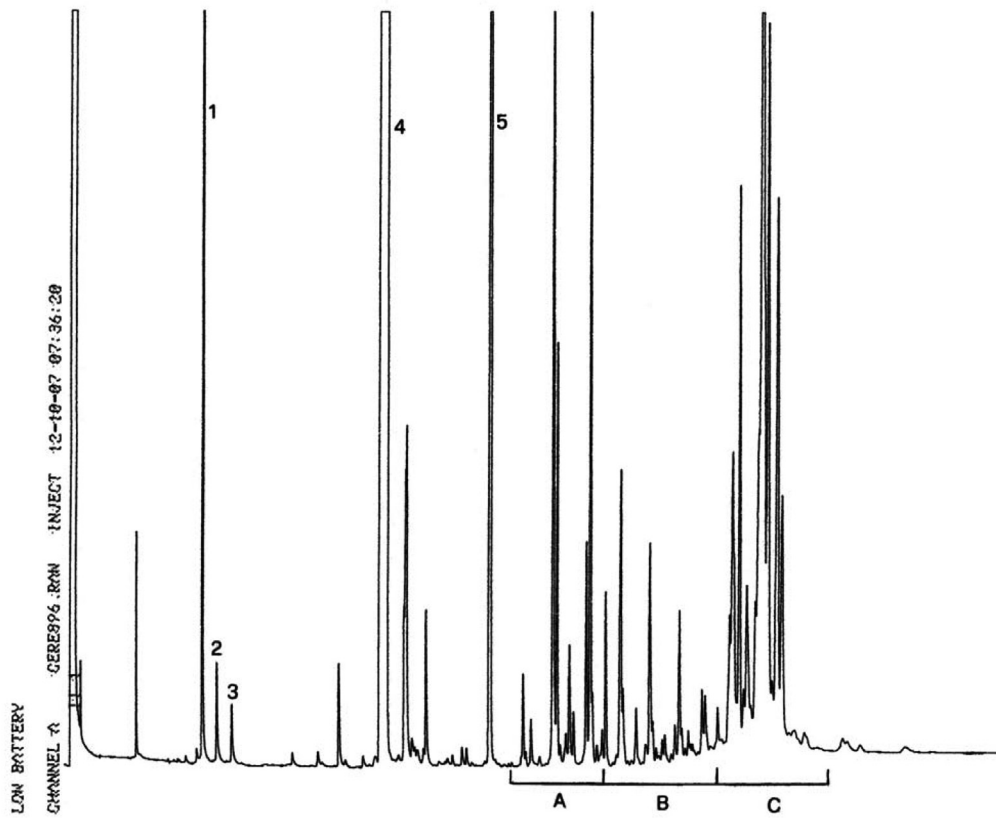
Paskaidrojumi:

- 1 – Metil- C₁₆
- 2 – Etil- C₁₆
- 3 – Metilheptadekanoāts,
- 4 – Metil- C₁₈
- 5 – Etil- C₁₈
- 6 – Skvalēns
- 7 – Laurilarahidāts, *I.S.*
- A – Diterpēnesteri
- B – Vaski
- C – Sterīna esteri un triterpēnesteri

▼ M23

3. attēls

Neapstrādātas augstākā labuma olīveļļas metilesteri, eļļestēri un vaski



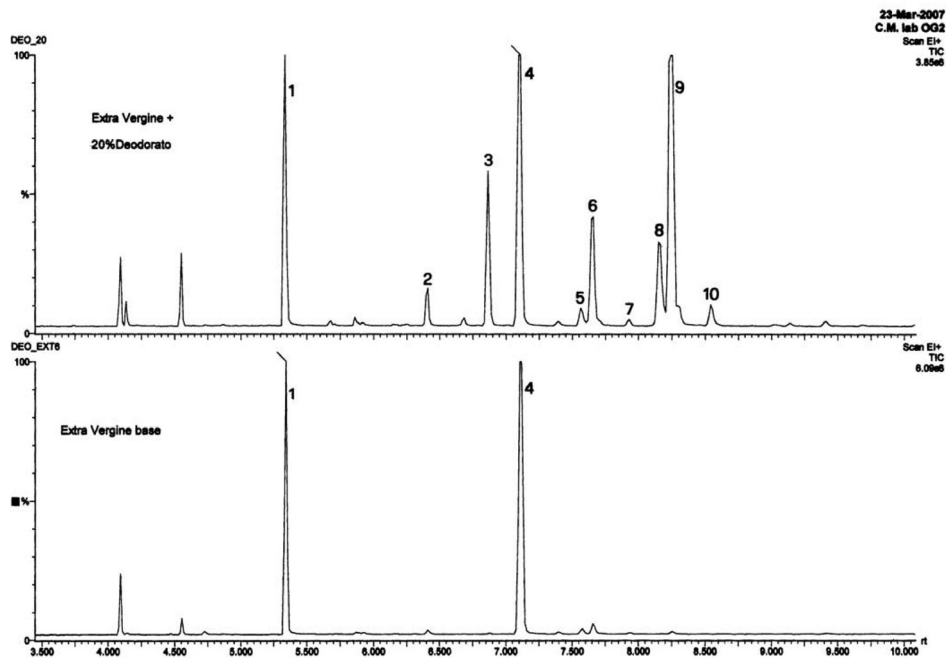
Paskaidrojumi:

- 1 – Metilheptadekanoāts, *I.S.*
- 2 – Metil- C₁₈
- 3 – Etil- C₁₈
- 4 – Skvalēns
- 5 – Laurilārahidāts, *I.S.*
- A – Diterpēnēsteri
- B – Vaski
- C – Sterīna esteri un triterpēnēsteri

▼ M23

4. attēls

Neapstrādātas olīveļļas hromatogrammas daļa un hromatogrammas daļa tai pašai eļļai ar dearomatizētas eļļas piedevu



Paskaidrojumi:

- 1 – Metilmiristāts, *L.S.*
- 2 – Metilpalmitāts
- 3 – Etilpalmitāts
- 4 – Metilheptadekanoāts, *L.S.*
- 5 – Metilinoleāts
- 6 – Metiloleāts
- 7 – Metilstearāts
- 8 – Etilinoleāts
- 9 – Etiloleāts
- 10 – Etilstearāts

▼ M23*A papildinājums***Gāzes lineārā ātruma noteikšana**

Pēc darba režīma iestatīšanas gāzu hromatogrāfā ievada 1 līdz 3 μl metāna (vai propāna). Mēra laiku, kas paiet kamēr gāze iziet caur kolonnu, no tās ievadīšanas līdz signāla parādīšanās brīdim (t_M).

Lineāro ātrumu cm/s aprēķina pēc formulas L/t_M , kur L ir kolonnas garums centimetros, un t_M - laiks sekundēs.

▼ M28

XXI PIELIKUMS

Saskaņā ar 8. panta 2. punktu veikto olīveļļas atbilstības pārbažu rezultāti

Pārbaugs	Kategorija	Izcelsmes valsts	Pārbaudes vieta ⁽¹⁾	Marķējums						Ķīmiskie parametri			Organoleptiskās īpašības ⁽⁴⁾			Galīgais secinājums		
				Juridiskais nosaukums	Izcelsmes vietas apzīmējums	Glabāšanas apstākļi	Kļūdaina informācija	Salasāmība	Atb./ Neatb. ⁽³⁾	Parametri ārpus robežām J/N	Ja jā, norāda, kāds(-i) ⁽²⁾	Atb./ Neatb. ⁽³⁾	Defektu mediāna	Augļai- numa mediāna	Atb./ Neatb. ⁽³⁾	Vajadzīgā rīcība	Sankcija	

⁽¹⁾ Iekšējais tirgus (spiestuve, iepildīšana, mazumtirdzniecība), eksports, imports.

⁽²⁾ Katru I pielikumā norādīto olīveļļas īpašību apzīmē ar kodu.

⁽³⁾ Atbilst/neatbilst.

⁽⁴⁾ Nav jānorāda olīveļļai un olīvu izspaidu eļļai.