

KOMISIJAS REGULA (EK) Nr. 702/2007

(2007. gada 21. jūnijs),

ar ko groza Regulu (EEK) Nr. 2568/91 par olīveļļas un olīvu izspaidu eļļas īpašībām un attiecīgajām analīzes metodēm

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

brīvā apgrozībā pirms iepriekšminētās dienas, var pārdot, līdz tiek izlietoti visi tās krājumi.

ņemot vērā Eiropas Kopienas dibināšanas līgumu,

(4) Šajā regulā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Olīveļļas un galda olīvu pārvaldības komitejas atzinumu,

ņemot vērā Padomes 2004. gada 29. aprīļa Regulu (EK) Nr. 865/2004 par olīveļļas un galda olīvu tirgus kopīgo organizāciju un ar ko groza Regulu (EEK) Nr. 827/68 ⁽¹⁾, un jo īpaši tās 5. panta 3. punktu,

IR PIENĒMUSI ŠO REGULU.

tā kā:

1. pants

Regulu (EEK) Nr. 2568/91 groza šādi.

(1) Komisijas Regulā (EEK) Nr. 2568/91 ⁽²⁾ definētas olīveļļas un olīvu izspaidu eļļas fizikālās un ķīmiskās īpašības, un analīžu metodes šo īpašību noteikšanai. Šīs metodes un pēc tām nosakāmo īpašību robežvērtības jāprecizē saskaņā ar ķīmijas nozares speciālistu atzinumu un ņemot vērā Olīveļļas starptautiskajā padomē veikto darbu.

1) Regulas 2. panta 1. punkta sesto ievilkumu aizstāj ar šādu:

— “2-glicerilmonopalmitāta saturu nosaka pēc VII pielikumā aprakstītās metodes.”

(2) Ķīmijas speciālisti ir konstatējuši, ka 2-glicerilmonopalmitāta satura kvantitatīva noteikšana ir precīzāka esterificēto eļļu detektēšanas metode. Stigmastadiēna pieļaujamā satura samazināšana neapstrādātā olīveļļā dod iespējas labāk atšķirt neapstrādātās olīveļļas no rafinētajām.

2) Pielikumus groza saskaņā ar šīs regulas pielikumu.

2. pants

Šī regula stājas spēkā trešajā dienā pēc tās publicēšanas Eiropas Savienības Oficiālajā Vēstnesī.

(3) Lai paredzētu laika periodu pielāgojumu izdarīšanai jaunajiem standartiem, un dotu laiku to piemērošanas līdzekļu ieviešanai, kā arī lai neradītu tirdzniecības traucējumus, šīs regulas grozījumus nepiemēro līdz 2008. gada 1. janvārim. Šo pašu iemeslu dēļ jānosaka, ka olīveļļu un olīvu izspaidu eļļu, kas legāli ražota un marķēta Kopienā, vai Kopienā legāli importēta un izlaista

To piemēro no 2008. gada 1. janvāra.

Tomēr produktus, kuri ir legāli ražoti un marķēti Kopienā, vai Kopienā likumīgi importēti un laisti brīvā apgrozībā pirms 2008. gada 1. janvāra, var pārdot, līdz tiek izlietoti visi to krājumi.

Šī regula uzliek saistības kopumā un ir tieši piemērojama visās dalībvalstīs.

Briselē, 2007. gada 21. jūnijā

Komisijas vārdā —

Komisijas locekle

Mariann FISCHER BOEL

⁽¹⁾ OV L 161, 30.4.2004., 97. lpp.⁽²⁾ OV L 248, 5.9.1991., 1. lpp. Regulā jaunākie grozījumi izdarīti ar Regulu (EK) Nr. 1989/2003 (OV L 295, 13.11.2003., 57. lpp.).

PIELIKUMS

Regulas (EEK) Nr. 2568/91 pielikumus groza šādi.

1) Kopsavilkumu groza šādi:

a) II pielikuma virsrakstu aizstāj ar šādu:

“Brīvo taukskābju noteikšana pēc aukstās metodes”;

b) VII pielikuma virsrakstu aizstāj ar šādu:

“2-glicerilmonopalmitāta satura noteikšana”.

2) I pielikumu aizstāj ar šādu:

"I" PIELIKUMS

OLĪVEĻĀS ĪPAŠĪBAS

Veids	Skābums (%) (*)	Peroksīda skaits mlEq O ₂ /kg (*)	Vaski mg/kg (**)	2 glicerilmonopalmitāts (%)	Stigma- stadiens mg/kg (1)	Starpība ECN42 HPLC – un ECN42 teorētiski aprēķinātā	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*)	Delta- K (*)	Organolepti- skais novērtē- jums Defekta mediana (Md) (*)	Organolepti- skais novērtē- jums Augļu piegāšanas mediana (Mf) (*)
1. Neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 ja kop. palmitīnskābe % ≤ 14 % ≤ 1,0 ja kop. palmitīnskābe % > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Neapstrādāta olīveļļa	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 ja kop. palmitīnskābe % ≤ 14 % ≤ 1,0 ja kop. palmitīnskābe % > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Spīdīgā olīveļļa	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 ja kop. palmitīnskābe % ≤ 14 % ≤ 1,1 ja kop. palmitīnskābe % > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 2,5 (2)	—
4. Rafinēta olīveļļa	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 ja kop. palmitīnskābe % ≤ 14 % ≤ 1,1 ja kop. palmitīnskābe % > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Olīveļļas maisījums, kas sastāv norafinētas un neaptrā- dātas olīveļļas	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 ja kop. palmitīnskābe % ≤ 14 % ≤ 1,0 ja kop. palmitīnskābe % > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Neatīrīta olīvu izspaidu eļļa	—	—	> 350 (4)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Rafinēta olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Olīvu izspaidu eļļa	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(1) Izomēru summa, ko var (vai nevar) atdalīt kapilārajā kolonnā

(2) vai gadījumos, kad defekta mediana ir mazāka vai vienāda ar 2,5 un augļu piegāšanas mediana ir vienāda ar 0.

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

(4) Eļļas ar vasku saturu no 300 mg/kg līdz 350 mg/kg tiek uzskatītas par neatīrītām olīvu izspaidu eļļām, ja alifātisko spirtu kopējais saturs ir lielāks par 350 mg/kg, un ja eritriola un uvaola saturs ir lielāks par 3,5 %.

Veids	Skābju saturs ⁽¹⁾						Kopā trans- olein- skābes izomēri (%)	Sterīna sastāvs						Kopā sterīni (mg/kg)	Eritrodoliols un uvaols (%) ^(**)
	Mirisūn- skābe (%)	Linolēn- skābe (%)	Arahīn- skābe (%)	Eikozān- skābe (%)	Behen- skābe (%)	Lignocerīn- skābe (%)		Holestē- rīns (%)	Brasīka- sterīns (%)	Kampes- terīns (%)	Stigmapes- terīns (%)	Betasitosterīns (%) ⁽²⁾	Delta-7-stig- masteīns (%)		
1. Neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Neapstrādāta olīveļļa	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Spīdīgā olīveļļa	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 ⁽³⁾
4. Rafinēta olīveļļa	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Olīeļļas maisījums	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Neatīrīta olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁴⁾
7. Rafinēta olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

⁽¹⁾ Pārējo taukskābju saturs (%) – palmitīnskābe: 7,5–20,0; palmitolēnskābe: 0,3–3,5; heptadecānoīnskābe: ≤ 0,3; heptadecēnoīnskābe: ≤ 0,3; oleīnskābe: 0,5–5,0; oleīnskābe: 55,0–83,0; linolēnskābe: 3,5–21,0.

⁽²⁾ Kopā: Delta-5,23-stigmastadienols+klosterīns+beta-sitosterīns+sitosanol+sitostanol+delta-5,24-stigmastadienols.

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

⁽⁴⁾ Eļļas ar vasku saturu no 300 mg/kg līdz 350 mg/kg tiek uzskatītas par neatīrītām olīvu izspaidu eļļām, ja alifātisko spirtu kopējais saturs ir lielāks par 350 mg/kg, un eritrodoliola un uvaola saturs ir lielāks par 3,5 %.

Piezīmes:

a) Analīžu rezultāti jāuzrāda ar tādu pašu decimālciparu skaitu aiz komata kā attiecīgajai raksturlieluma skaitliskajai vērtībai.

b) Pēdējais cipars jānoapaļo uz augšu, ja aiz tā nākamais cipars, kas jāņem vērā, ir lielāks par 4.

c) Ja kaut viens raksturlielums neatbilst tam norādītajai vērtībai, šīs regulas vajadzībām var mainīt eļļas veidu vai to deklarēt par neatīrītu.

d) Ja raksturlielums ir atzīmēts ar zvaigznīti (*), attiecībā uz eļļas kvalitāti tas nozīmē, ka:

— spīdīgajai olīveļļai ir iespējams, ka abas attiecīgās robežvērtības vienlaicīgi atšķiras no noteiktajām;

— neapstrādātajām olīveļļām ir iespējams, ka abas attiecīgās robežvērtības vienlaicīgi atšķiras no noteiktajām vērtībām, oīls, jāmaina eļļas veids, lai gan tā joprojām jāklasificē kā viens no neapstrādātās olīveļļas veidiem.

d) Ja raksturlielums atzīmēts ar divām zvaigznītēm (**), attiecībā uz eļļas kvalitāti tas nozīmē, ka visu veidu olīvu izspaidu eļļām ir iespējams, ka vienlaikus abas robežvērtības var atšķirties no noteiktajām.

3) Pielikuma 1. papildinājumu groza šādi:

a) pirmo ievilkumu aizstāj ar šādu:

“— Skābums II pielikums Brīvo taukskābju noteikšana pēc aukstās metodes”;

b) trīspadsmto ievilkumu aizstāj ar šādu:

“— Piesātinātās taukskābes 2. VII pielikums 2-glicerilmonopalmitāta satura noteikšana”.
pozīcijā

4) II pielikuma virsrakstu aizstāj ar šādu:

“BRĪVO TAUKSKĀBJU NOTEIKŠANA PĒC AUKSTĀS METODES”.

5) IV pielikumu aizstāj ar šādu:

“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 ievadišanas 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 maisījumu homogenizētu, to rūpīgi sakrata. Pirms lietošanas vismaz 12 h glabā tumšā vietā

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 miristilstearātu.)

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 pārnēs kolonnā (3.2.). Nostādina. Sablīvē, izmantojot elektrovibratori (3.5.), lai hromatogrāfijas slānis būtu homogenāks. Perkolē 30 ml n-heksāna attīrīšanai no piemaisījumiem. Ar svariem (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 pārnēs 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 iztvaicē ar vāju slāpekļa plūsmu; pievieno 2–4 ml n-heptāna.

5.2. Gāzes hromatogrāfijas analīze

5.2.1. Sagatavošana

Kolonnu 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.).

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	
sākumā 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 injektorā un pēc 1–2 sekundēm ātri ievada; pēc apmēram piecām sekundēm adatu lēnām izvelk.

Veic reģistrāciju, līdz visi vaski ir pilnībā eluēti.

Nulles līnijai noteikti jāatbilst nepieciešamajiem nosacījumiem.

5.4. Signālu identifikācija

Signālus identificē pēc aiztures laikiem, tos salīdzinot ar tādus 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 C_{40} līdz C_{46} signālu laukumu.

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

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

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

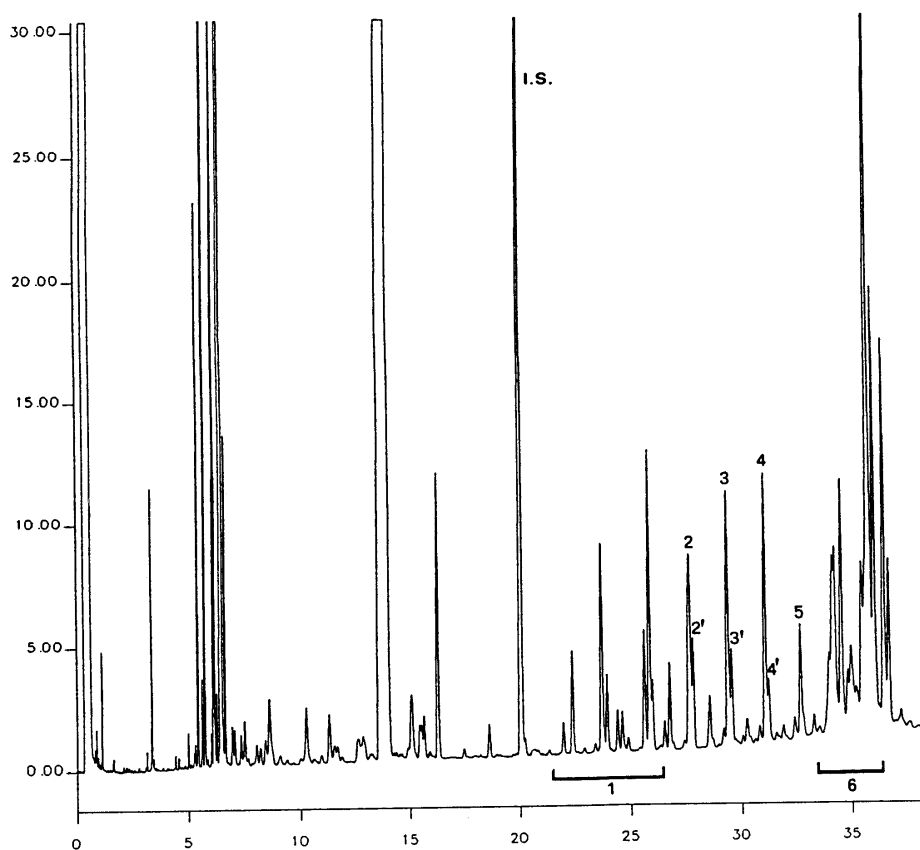
Norāda dažādu C_{40} līdz C_{46} vasku kopīgo saturu mg/kg eļļas (ppm).

NB! Kvantitatīvi nosakāmie komponenti saistāmi ar C_{40} līdz un C_{46} esteru signāliem, izmantojot par paraugu olīveļļas vasku hromatogrammu turpmāk redzamajā attēlā. Ja esteris C_{46} parādās divas reizes, tad, lai to identificētu, ieteicams analizēt olīvu izspaidu eļļas vasku frakciju, kur C_{46} signāls ir viegli identificējams tāpēc, ka tas ir izteiktā pārkumā.

Rezultātus uzdod ar precizitāti līdz vienam ciparam aiz komata.

Attēls.

Oļīveļļas vasku hromatogramma (*)



Paskaidrojumi:

I.S. = laurilrahidāts;

1. = diterpēnesteri;

2 + 2' = C₄₀ esteri3 + 3' = C₄₂ esteri4 + 4' = C₄₄ esteri;5. = C₄₆ esteri

6. = sterīna esteri un triterpēnspirts.

(*) Pēc sterīna esteru eluēšanas hromatogrammā nedrīkst būt nekādu būtisku signālu (triglicerīdi).

Papildinājums

Gāzes lineārā ātruma noteikšana

Pēc noregulēšanas darba normāliem darba apstākļiem gāzes hromatogrāfā ievada 1–3 μl metāna (vai propāna). Uzņem laiku, kādā gāze iziet cauri kolonnai no ievadišanas 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.”

6) VII pielikumu aizstāj ar šādu:

“VII PIELIKUMS

2-GLICERILMONOPALMITĀTA SATURA NOTEIKŠANA

1. IZMANTOŠANAS JOMA

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

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

2. PRINCIPS

Pēc sagatavošanas eļļas paraugu šķel 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

3.19. 10 µl tilpuma mikrošļirce 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 žāvē 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
- 4.2. n-heksāns (hromatogrāfijai)
- 4.3. Izopropanols
- 4.4. Izopropanols, 1/1 (v/v) ūdens šķīdums
- 4.5. Aizkuņģa dziedzerā lipāze. Tās aktivitātei jābūt no 2,0 līdz 10 lipāzes vienībām uz miligramu. (Aizkuņģa dziedzerā 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. Palīgģāzes: 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-trimetilsililtrifluoracetamīds + 1 % trimetilhlorsilāns, kas atšķaidīts ar tādu pašu tilpumu bezūdens piridīna.)
- 4.16. Standartparaugi: tīri monoglicerīdi vai monoglicerīdu maisījumi ar zināmu sastāvu, kas ir līdzīgs analizējamajam 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.
- 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 nešķīstošas 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 fenoltaleīnu.

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).

Eluātu 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.

(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 dziedzeru lipāzi (5.2.). Jāpārbauda taukskābju sastāvs pirms SPE kartridža un pēc tā.)

- 5.2. **Hidrolīze ar aizkuņģa dziedzeru 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 pieslēpēta 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 (atkarībā 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.)
- 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:

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

kur:

A_x = glicerilmonopalmitāta signāla laukums;

ΣA = visu monoglicerīdu signālu laukumu summa.

Rezultātus uzdod ar precizitāti līdz vienam decimālciparam aiz komata.

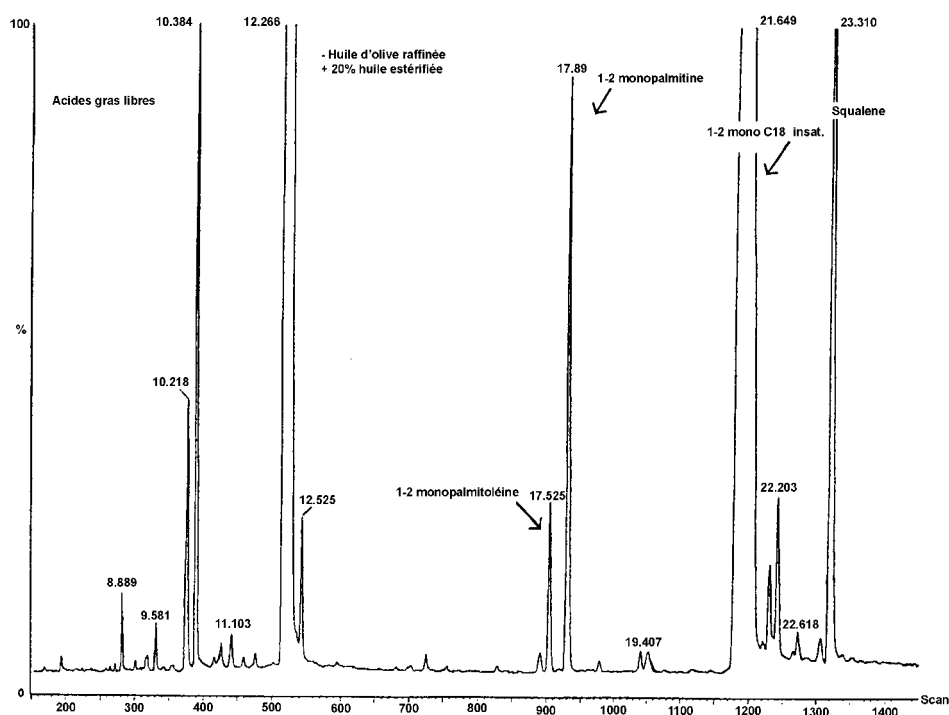
7. ANALĪZES REZULTĀTU PĀRSKATS

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.

1. attēls

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



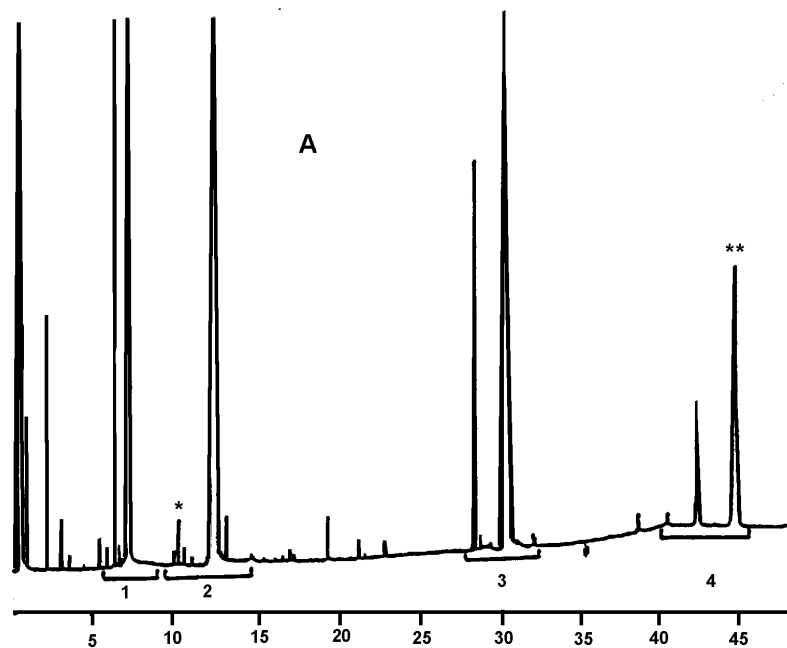
Paskaidrojumi: *Acides gras libres* = brīvās tauksābes; *Huile d'olive raffinée* = rafinēta olīveļļa; 20 % *Huile estérifiée* = 20 % esterificēta eļļa; *1-2 monopalmitoléine* = 1-2 monopalmitoleīns; *1-2 monopalmitine* = 1-2 monopalmitīns; *1-2 mono C₁₈ insat.* = 1-2 mono- C₁₈ nepiesāt.; *Squalene* =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

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

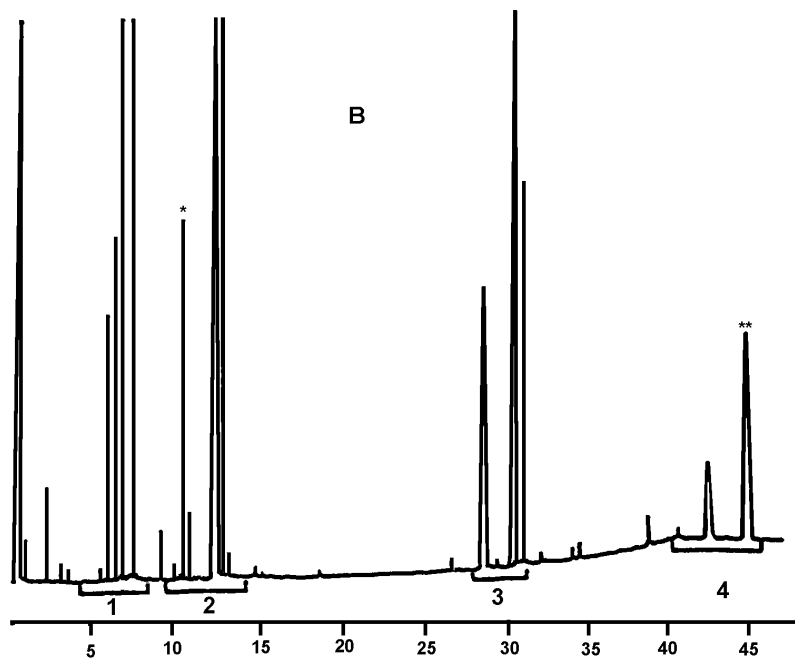
* = 2-monopalmitīns

** = C₅₄ triglicerīds

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

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.

Pārnes 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.

Vārlāzi novieto termostatā 37 °C temperatūrā; ievieto pH-metra elektrodus un spirāles maisītāju.

Ar bīreti 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 sārna daudzumu.

Iegūtos datus attēlo x/y grafikā, kurā uz abscisu ass atliek laiku, bet uz ordinātu ass – 0,1 N sārna 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.”

7) XA pielikumā 6.2. punktu aizstāj ar šādu:

“6.2. Metilesterus sagatavo saskaņā ar XB pielikumā noteikto B procedūru. Taukvielas, kuru brīvais skābums ir lielāks par 3 %, vispirms jāneitralizē saskaņā ar VII pielikuma 5.1.1. punktu.”
