

Šis dokuments ir izveidots vienīgi dokumentācijas nolūkos, un iestādes neuzņemas nekādu atbildību par tā saturu

► **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
► M1	Komisijas Regula (EEK) Nr. 3682/91 (1991. gada 17. decembris)	L 349	36	18.12.1991.
► M2	Komisijas Regula (EEK) Nr. 1429/92 (1992. gada 26. maijs)	L 150	17	2.6.1992.
► M3	Commission Regulation (EEC) No 1683/92 of 29 June 1992 (*)	L 176	27	30.6.1992.
► M4	Commission Regulation (EEC) No 1996/92 of 15 July 1992 (*)	L 199	18	18.7.1992.
► M5	Komisijas Regula (EEK) Nr. 3288/92 (1992. gada 12. novembris)	L 327	28	13.11.1992.
► M6	Komisijas Regula (EEK) Nr. 183/93 (1993. gada 29. janvāris)	L 22	58	30.1.1993.
► M7	grozīta ar Komisijas Regulu (EEK) Nr. 826/93 (1993. gada 6. aprīlis)	L 87	6	7.4.1993.
► M8	Commission Regulation (EEC) No 620/93 of 17 March 1993 (*)	L 66	29	18.3.1993.
► M9	Komisijas Regula (EK) Nr. 177/94 (1994. gada 28. janvāris)	L 24	33	29.1.1994.
► M10	Commission Regulation (EC) No 2632/94 of 28 October 1994 (*)	L 280	43	29.10.1994.
► M11	Komisijas Regula (EK) Nr. 656/95 (1995. gada 28. marts)	L 69	1	29.3.1995.
► M12	Commission Regulation (EC) No 2527/95 of 27 October 1995 (*)	L 258	49	28.10.1995.
► M13	Commission Regulation (EC) No 2472/97 of 11 December 1997 (*)	L 341	25	12.12.1997.
► M14	Komisijas Regula (EK) Nr. 282/98 (1998. gada 3. februāris)	L 28	5	4.2.1998.
► M15	Commission Regulation (EC) No 2248/98 of 19 October 1998 (*)	L 282	55	20.10.1998.
► M16	Komisijas Regula (EK) Nr. 379/1999 (1999. gada 19. februāris)	L 46	15	20.2.1999.
► M17	Commission Regulation (EC) No 455/2001 of 6 March 2001 (*)	L 65	9	7.3.2001.
► M18	Commission Regulation (EC) No 2042/2001 of 18 October 2001 (*)	L 276	8	19.10.2001.
► M19	Commission Regulation (EC) No 796/2002 of 6 May 2002 (*)	L 128	8	15.5.2002.
► M20	Komisijas Regula (EK) Nr. 1989/2003 (2003. gada 6. novembris)	L 295	57	13.11.2003.
► M21	Komisijas Regula (EK) Nr. 702/2007 (2007. gada 21. jūnijs)	L 161	11	22.6.2007.
► M22	Komisijas Regula (EK) Nr. 640/2008 (2008. gada 4. jūlijs)	L 178	11	5.7.2008.
► M23	Komisijas Regula (ES) Nr. 61/2011 (2011. gada 24. janvāris)	L 23	1	27.1.2011.
► M24	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.

- **M25** Komisijas Īstenošanas regula (ES) Nr. 299/2013 (2013. gada 26. marts) L 90 52 28.3.2013.
- **M26** Komisijas Īstenošanas regula (ES) Nr. 1348/2013 (2013. gada 16. decembris) L 338 31 17.12.2013.



KOMISIJAS REGULA (EEK) Nr. 2568/91

(1991. gada 11. jūlijs)

par olīveļļas un olīvu izspaidu eļļas īpašībām un attiecīgajām analīzes metodēm

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Ekonomikas kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1966. gada 22. septembra Regulu Nr. 136/66/EEK par eļļas un tauku tirgus kopīgo organizāciju ⁽¹⁾, kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Regulu (EEK) Nr. 3577/90 ⁽²⁾ un jo īpaši tās 35.a pantu,

tā kā Regulas Nr. 136/66/EEK pielikumā ir aprakstīta un definēta olīveļļa un olīvu izspaidu eļļa, ko tirgo katrā dalībvalstī, Kopienas iekšējā tirgū un tirdzniecībā ar trešām valstīm;

tā kā, lai atšķirtu dažādu veidu eļļas, būtu jādefinē katras eļļas fizikālās un ķīmiskās īpašības un neapstrādātas olīveļļas organoleptiskās īpašības, lai garantētu attiecīgo produktu tīrību un kvalitāti, neskarot citus pastāvošos noteikumus;

tā kā dažādu veidu eļļas īpašības būtu jānosaka vienveidīgi visā Kopienā; tā kā šajā nolūkā būtu jāizstrādā Kopienas metodes ķīmiskai analīzei un organoleptiskai novērtēšanai; tā kā būtu jāatļauj pārejas posmā izmantot citas dalībvalstīs piemērojamās analīzes metodes ar nosacījumu, ka, pastāvot rezultātu atšķirībai, kopējā metode ir izšķirošā;

tā kā olīveļļas fizikālo un ķīmisko īpašību un analīzes metožu definīcija ir saistīta ar kombinētās nomenklatūras 15. nodaļas papildu piezīmju grozījumiem;

tā kā neapstrādātas eļļas organoleptisko īpašību novērtēšana ietver atlasītu un apmācītu degustētāju žūriju izveidi;

tā kā tādēļ būtu jānosaka šādu struktūru izveidei vajadzīgais laika posms; tā kā, ņemot vērā grūtības, ar ko dažas dalībvalstis sastapsies, izveidojot degustētāju žūrijas, būtu jāatļauj izmantot citu dalībvalstu žūrijas;

⁽¹⁾ OV 172, 30.9.1966., 3025./66. lpp.

⁽²⁾ OV L 353, 17.12.1990., 23. lpp.

▼B

tā kā, lai nodrošinātu olīvu izspaidu importam piemērojamās maksājumu sistēmas pareizu darbību, būtu jānosaka vienota metode eļļas satura noteikšanai šajos produktos;

tā kā, lai nekaitētu tirdzniecībai, ir jāparedz, ka ierobežotu laika posmu drīkst tirgot eļļu, kas ir iepakota pirms šīs regulas stāšanās spēkā;

tā kā ir jāatceļ Komisijas Regula (EEK) Nr. 1058/77 ⁽¹⁾, kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Regulu (EEK) Nr. 1858/88 ⁽²⁾;

tā kā Eļļas un tauku pārvaldības komiteja nav iesniegusi atzinumu tās priekšsēdētāja noteiktajā termiņā,

IR PIEŅĒMUSI ŠO REGULU.

▼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.

⁽¹⁾ OV L 128, 24.5.1977., 6. lpp.

⁽²⁾ OV L 166, 1.7.1988., 10. lpp.

▼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;
- g) taukskābju sastāvu nosaka ar XA un XB pielikumā izklāstīto metodi;
- h) gaistošos halogenētos šķīdinātājus nosaka ar XI pielikumā izklāstīto metodi;
- 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;
- l) alifātisko spirtu saturu nosaka ar XIX pielikumā izklāstīto metodi;
- m) vasku, taukskābju metilesteru un taukskābju etilesteru saturu nosaka ar XX pielikumā izklāstīto metodi.

Lai noteiktu citu augu eļļu klātbūtni olīveļļā, izmanto XXa pielikumā izklāstīto analīzes metodi.

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.

Ja žūrija deklarēto kategoriju attiecībā uz organoleptiskajām īpašībām neapliecina, pēc ieinteresētās personas pieprasījuma valsts iestādes vai to pārstāvji nekavējoties veic divus kontrolnovērtējumus, ko īsteno citas apstiprinātas žūrijas, un vismaz vienu kontrolnovērtējumu, kuru īsteno attiecīgās ražotājas dalībvalsts apstiprinātā žūrija. Attiecīgās īpašības atzīst par atbilstīgām deklarētajām īpašībām, ja vismaz divi kontrolnovērtējumi apstiprina deklarēto šķiru. Ja tas tā nav, ieinteresētā persona sedz kontrolnovērtējumu izmaksas.

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 ņemt 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, ņemtos 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 ņemšanas, 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, glabāšanas 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
- b) ievērojot kārtību, kas izklāstīta I.b pielikumā par lēmumu pieņemšanas shēmu, līdz pieņem vienu no lēmumiem, kas iekļauts lēmumu pieņemšanas shēmā.

▼ 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 pārbaudžu 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 jākārtos 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 pārbaudes rezultātus saskaņā ar XXI pielikumā ietvertu 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 Kopienų 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.

▼ B*PIELIKUMI***Kopsavilkums**

I pielikums	Olīveļļas īpašības
Ia pielikums	Paraugu ņemšana no olīveļļas vai olīvu izspaidu eļļas, kas piegādāta tiešā iepakojumā
Ib pielikums	Lēmumu pieņemšanas shēma, lai pārbaudītu to, vai olīveļļas paraugs atbilst deklarētajai kategorijai
II pielikums	► M21 Brīvo taukskābju noteikšana pēc aukstās metodes ◀
III pielikums	Peroksīda skaitļa noteikšana
IV pielikums	► M6 Vasku satura noteikšana ar kapilārās kolonnas gāzes - šķīduma hromatogrāfiju ◀
V pielikums	Sterīnu un triterpēndiolu sastāva un satura noteikšana ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju
VII pielikums	► M21 2-glicerilmonopalmitāta satura noteikšana ◀

▼ M20**▼ B**

IX pielikums	Spektrofotometriskā analīze uv spektrā
XA pielikums	Taukskābju metilesteru analīze ar gāzu hromatogrāfiju
Annex X B:	Preparation of the fatty acid methyl esters from olive oil and olive-pomace oil
XI pielikums	Gaistošo halogenēto šķīdinātāju noteikšana olīveļļā
XII pielikums	Starptautiskās olīvu padomes metode, ko piemēro neapstrādātas olīveļļas organoleptiskajai novērtēšanai

▼ M20**▼ M19****▼ B**

XV pielikums	Eļļas saturs olīvu izspaidās
XVI pielikums	Joda skaitļa noteikšana
XVII pielikums:	Stigmastadiēnu noteikšana augu eļļās
XVIII pielikums:	Faktiskā un teorētiskā triglicerīdu ar ECN 42 satura starpības noteikšana
Annex XIX:	Method for determining aliphatic alcohol content

▼ M23

XX pielikums:	Vasku, taukskābju metilesteru un taukskābju etilesteru satura noteikšana ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfijas metodi
---------------	--

▼ M26

XXa pielikums:	Metode citu eļļu noteikšanai olīveļļās
----------------	--

▼ M25

XXI pielikums:	Saskaņā ar 8. panta 2. punktu veikto olīveļļas atbilstības pārbaucēju rezultāti
----------------	---

I PIELIKUMS

OLĪVEĻĻAS ĪPAŠĪBAS

Kategorija	Taukskābju etilesteri (FAEE) mg/kg (*)	Skābums (%) (*)	Peroksīda skaitlis mEq O ₂ /kg (*)	Vaski mg/kg (**)	2-glicerilmonopalmitāts (%)	Stigmasta- diēni mg/kg (¹)	Starpība: ECN42 (HPLC) un ECN42 (²) (teorēti- skais aprēķins)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ vai K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organolepti- skais novēr- tējums Defekta mediāna (Md) (*)	Organolepti- skais novēr- tējums Augļainuma mediāna (Mf) (*)
1. Neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa	FAEE ≤ 40 (2013.–2014. ražas gads) (³) FAEE ≤ 35 (2014.–2015. ražas gads) FAEE ≤ 30 (pēc 2015. ražas gada)	≤ 0,8	≤ 20	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$	≤ 0,9 ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
					≤ 1,0 ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14 %							
2. Neapstrādāta olīveļļa	—	≤ 2,0	≤ 20	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$	≤ 0,9 ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14 %	≤ 0,05	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
					≤ 1,0 ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14 %							
3. Spīdīgā olīveļļa	—	> 2,0	—	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 300$ (⁴)	≤ 0,9 ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (⁵)	—
					≤ 1,1 ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14 %							

▼ M26

Kategorija	Taukskābju etilesteri (FAEE) mg/kg (*)	Skābums (%) (*)	Peroksīda skaitlis mEq O ₂ /kg (*)	Vaski mg/kg (**)	2-glicerilmonopalmitāts (%)	Stigmastadiēni mg/kg (1)	Starpība: ECN42 (HPLC) un ECN42 (2) (teorētiskais aprēķins)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ vai K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptiskais novērtējums Defekta mediāna (Md) (*)	Organoleptiskais novērtējums Augļainuma mediāna (Mf) (*)
4. Rafinēta olīveļļa	—	≤ 0,3	≤ 5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$	≤ 0,9 ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1 ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14 %							
5. Rafinētas un neapstrādātas olīveļļas maisījums	—	≤ 1,0	≤ 15	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$	≤ 0,9 ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
					≤ 1,0 ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14 %							
6. Neattīrīta olīvu izspaidu eļļa	—	—	—	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ (6)	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Rafinēta olīvu izspaidu eļļa	—	≤ 0,3	≤ 5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—

▼ M26

Kategorija	Taukskābju etilesteri (FAEE) mg/kg (*)	Skābums (%) (*)	Peroksīda skaitlis mEq O ₂ /kg (*)	Vaski mg/kg (**)	2-glicerilmonopalmitāts (%)	Stigmastadiēni mg/kg (1)	Starpība: ECN42 (HPLC) un ECN42 (2) (teorētiskais aprēķins)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₆₈ vai K ₂₇₀ (*)	Delta-K (*)	Organoleptiskais novērtējums Defekta mediāna (Md) (*)	Organoleptiskais novērtējums Augļainuma mediāna (Mf) (*)
8. Olīvu izspaidu eļļa	—	≤ 1,0	≤ 15	C ₄₀ + C ₄₂ + C ₄₄ + C ₄₆ > 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

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

(2) Olīveļļai ir jāatbilst XXa pielikumā izklāstītajai metodei.

(3) Šis limits attiecas uz olīveļļām, kas ražotas, sākot no 2014. gada 1. marta.

(4) Eļļas ar vaska saturu no 300 mg/kg līdz 350 mg/kg uzskata par spīdīgo olīveļļu, ja alifātisko spirtu kopējais saturs ir mazāks par vai vienāds ar 350 mg/kg vai ja eritrodiola un uvaola saturs ir mazāks par vai vienāds ar 3,5 %.

(5) Vai ja defekta mediāna ir lielāka par 3,5, vai arī defekta mediāna ir mazāka par vai vienāda ar 3,5 un augļainuma mediāna ir 0.

(6) Eļļas ar vaska saturu no 300 mg/kg līdz 350 mg/kg uzskata par neattīrītu olīvu izspaidu eļļu, ja alifātisko spirtu kopējais saturs ir lielāks par 350 mg/kg un ja eritrodiola un uvaola saturs ir lielāks par 3,5 %.

Kategorija	Taukskābju sastāvs (1)						Kopā trans-oleīnskābes izomēri (%)	Kopā translinolskābes un translinolēnskābes izomēri (%)	Sterīnu sastāvs						Kopā sterīni (mg/kg)	Eritrodiols un uvaols (%) (**)
	Mirisīnskābe (%)	Linolēnskābe (%)	Arahīnskābe (%)	Eikozānskābe (%)	Behēnskābe (%)	Lignoceīnskābe (%)			Holestērīns (%)	Brasikasterīns (%)	Kampessterīns (2) (%)	Stigmastērīns (%)	Nosac. betasitosterīns (%) (3)	Delta-7-stigmastenols (2) (%)		
1. Neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Neapstrādāta olīveļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Spīdīgā olīveļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (4)
4. Rafinēta olīveļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5

▼ M26

Kategorija	Taukskābju sastāvs ⁽¹⁾						Kopā trans-oleīnskābes izomēri (%)	Kopā translinolskābes un translinolēnskābes izomēri (%)	Sterīnu sastāvs						Kopā sterīni (mg/kg)	Eritrodiols un uvaols (%) ^(**)
	Miristīnskābe (%)	Linolēnskābe (%)	Arahīnskābe (%)	Eikozānskābe (%)	Behēnskābe (%)	Lignoce-rīnskābe (%)			Holestērīns (%)	Brasika-sterīns (%)	Kampes-terīns ⁽²⁾ (%)	Stigmaste-rīns (%)	Nosac. betasitos-terīns ⁽³⁾ (%)	Delta-7-stigma-stenol-s ⁽²⁾ (%)		
5. Rafinētas un neapstrādātas olīveļļas maisījums	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Neattīrīta olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 ⁽⁵⁾
7. Rafinēta olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

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

⁽²⁾ Skatīt šā pielikuma papildinājumu.

⁽³⁾ Nosacītais betasitosterīns: Delta-5,23-stigmastadienols+klerosterīns+betasitosterīns+sitostanols+delta-5-avenasterīns+delta-5,24-stigmastadienols.

⁽⁴⁾ Eļļas ar vaska saturu no 300 mg/kg līdz 350 mg/kg uzskata par spīdīgo olīveļļu, ja alifātisko spirtu kopējais saturs ir mazāks par vai vienāds ar 350 mg/kg vai ja eritrodiola un uvaola saturs ir mazāks par vai vienāds ar 3,5 %.

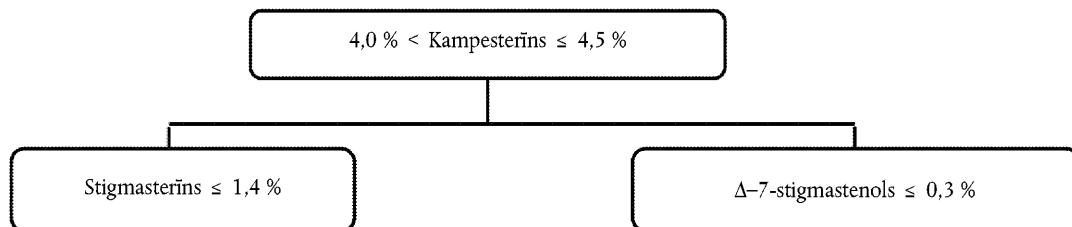
⁽⁵⁾ Eļļas ar vaska saturu no 300 mg/kg līdz 350 mg/kg uzskata par neattīrītu olīvu izspaidu eļļu, ja alifātisko spirtu kopējais saturs ir lielāks par 350 mg/kg un ja eritrodiola un uvaola saturs ir lielāks par 3,5 %.

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 neatbilst tai norādītajai vērtībai, šīs regulas piemērošanas vajadzībām var mainīt eļļas kategoriju vai deklarēt to par neattīrītu.
- Ja īpašība ir atzīmēta ar zvaigznīti (*), tad attiecībā uz eļļas kvalitāti tas nozīmē šo: spīdīgajai olīveļļai ir iespējams, ka abas attiecīgās robežvērtības vienlaikus atšķiras no noteiktajām; neapstrādātajām olīveļļām, ja vismaz viena no šīm robežvērtībām atšķiras no noteiktajām vērtībām, tiks mainīta eļļas kategorija, lai gan tā joprojām jāklasificē vienā no neapstrādātas olīveļļas kategorijām.
- Ja īpašība ir atzīmēta ar divām zvaigznītēm (**), attiecībā uz eļļas kvalitāti tas nozīmē, ka visu veidu olīvu izspaidu eļļām ir iespējams, ka abas attiecīgās robežvērtības vienlaikus atšķiras no noteiktajām.

▼ **M26***Papildinājums***Lēmumu pieņemšanas shēma**

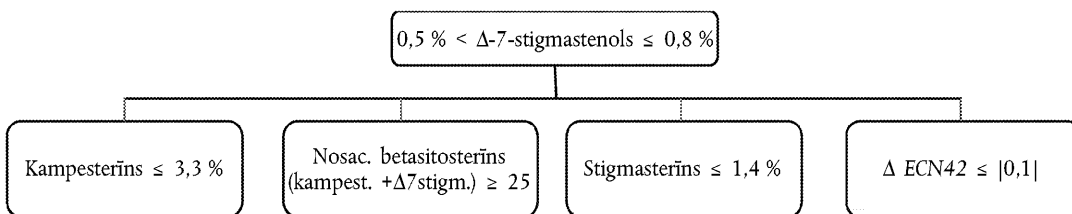
Kampesterīna lēmumu pieņemšanas shēma attiecībā uz neapstrādātu olīveļļu un neapstrādātu augstākā labuma olīveļļu.



Pārējie parametri atbilst šajā regulā noteiktajām robežvērtībām.

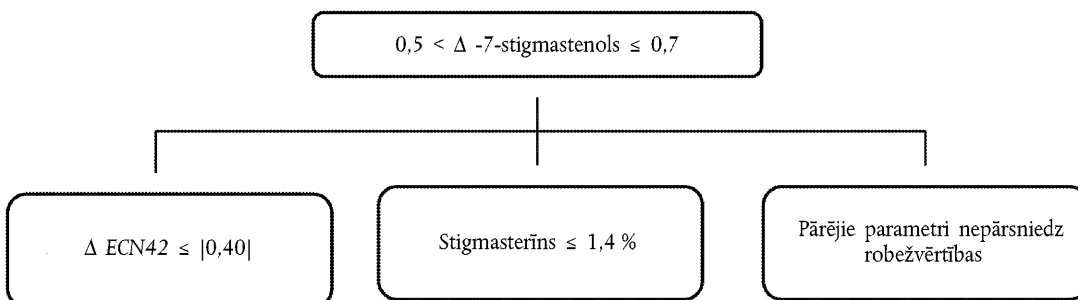
Delta-7-stigmasterenola lēmumu pieņemšanas shēma attiecībā uz:

— neapstrādātu augstākā labuma olīveļļu un neapstrādātu olīveļļu.



Pārējie parametri atbilst šajā regulā noteiktajām robežvērtībām;

— olīvu izspaidu eļļu (neattīrītu un rafinētu)



▼ **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

2.1. Katrs primārais paraugs ir jāsadala laboratorijas paraugos saskaņā ar standarta EN ISO 5555 2.5. punktu un jāanalizē Ib pielikumā izklāstītajā lēmumu pieņemšanas shēmā norādītajā kārtībā vai jebkurā citā izlases veida kārtībā.

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

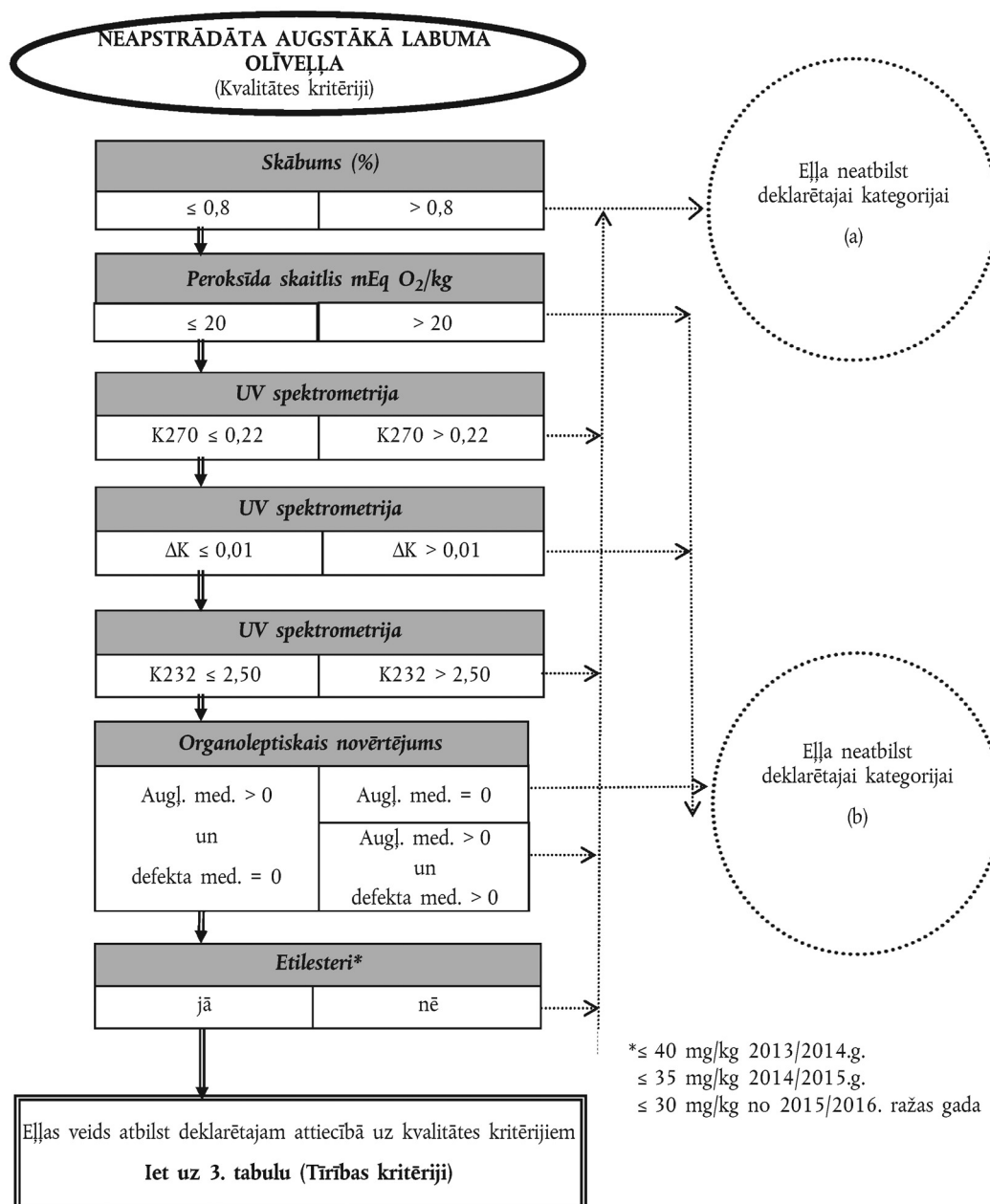
▼M26

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 jāsagatavo saskaņā ar 1.1. un 1.2. punktā minētajām procedūrām.

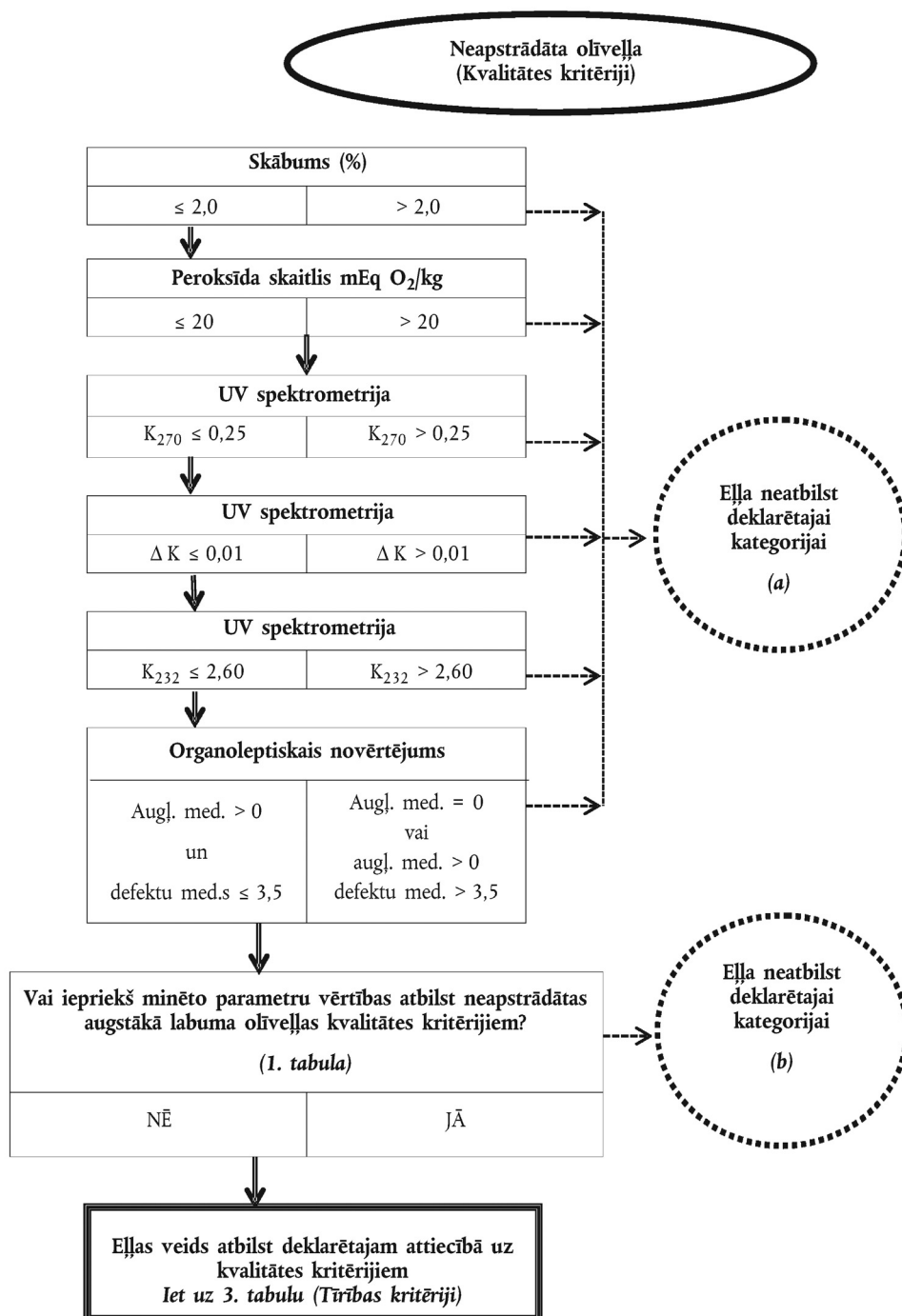
Pēc tam katram primārajam paraugam veic 2. panta 1. punktā minētās analīzes.

- 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.

▼ **M26***1b PIELIKUMS***LĒMUMU PIENĒMŠANAS SHĒMA, LAI PĀRBAUDĪTU TO, VAI OLĪVEĻĻAS
PARAUGS ATBILST DEKLARĒTAJAI KATEGORIJAI***1. tabula*

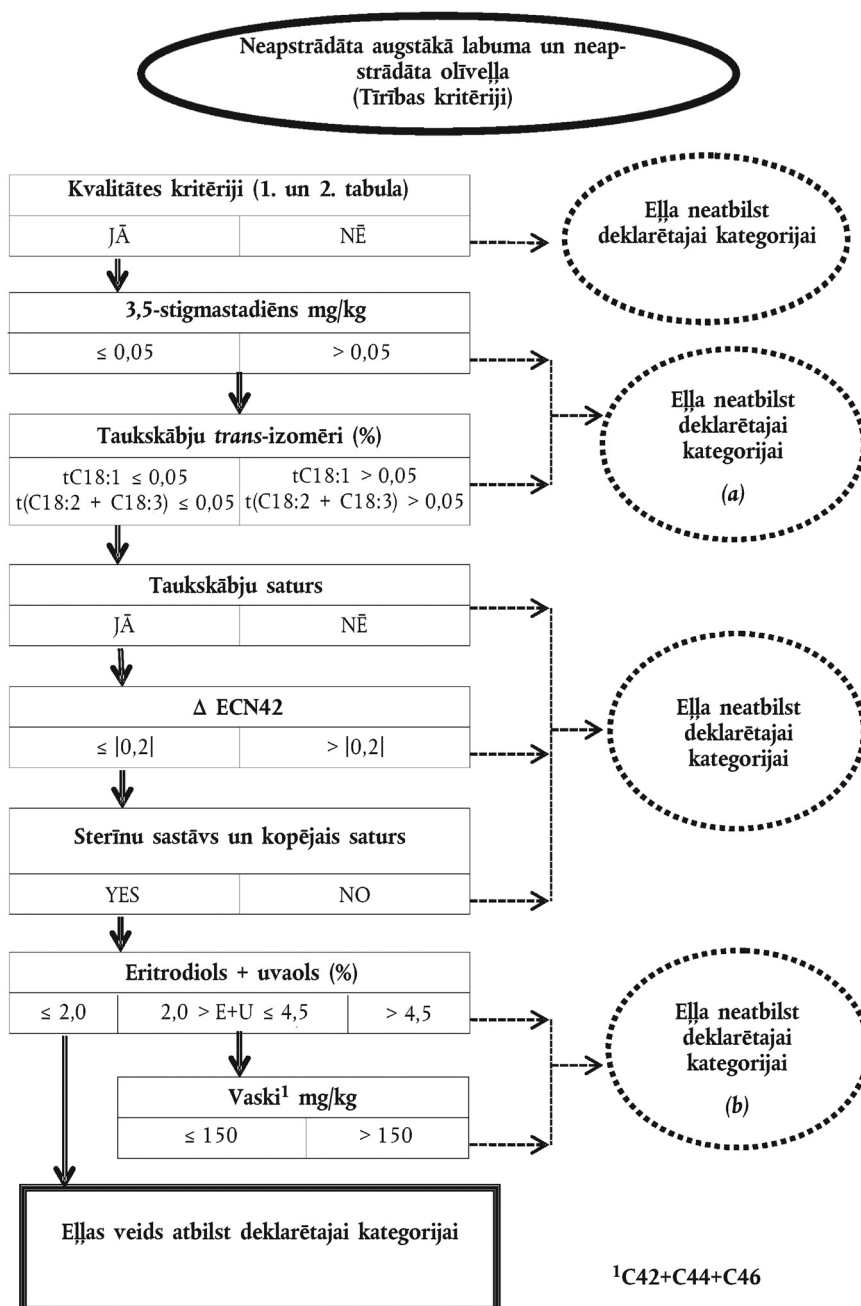
▼ M26

2. tabula



▼ M26

3. tabula



▼ **M26**

1. papildinājums

Šīs regulas pielikumu un lēmumu pieņemšanas shēmā norādīto analīžu atbilstības tabula

— Skābums	II pielikums	Brīvo taukskābju noteikšana pēc aukstās metodes
— Peroksīda skaitlis	III pielikums	Peroksīda skaitļa noteikšana
— UV spektrometrija	IX pielikums	Spektrofotometriskā analīze
— Organoleptiskais novērtējums	XII pielikums	Neapstrādātas olīveļļas organoleptiskā novērtēšana
— Etilesteri	XX pielikums	Vasku, taukskābju metilesteru un taukskābju etilesteru satura noteikšana ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfijas metodi
— 3,5-stigmastadiēni	XVII pielikums	Stigmastadiēnu noteikšanas metode augu eļļās
— <i>Trans</i> -izomēri taukskābēs	XA pielikums un	Taukskābju metilesteru analīze ar gāzu hromatogrāfiju
	XB pielikums	Taukskābju metilesteru pagatavošana
— Taukskābju saturs	XA pielikums un	Taukskābju metilesteru analīze ar gāzu hromatogrāfiju
	XB pielikums	Taukskābju metilesteru pagatavošana
— <i>ΔECN42</i>	XVIII pielikums	Triglicerīdu sastāva noteikšana ar <i>ECN42</i> (starpība starp <i>HPLC</i> datiem un teorētisko saturu)
— Sterīnu sastāvs un kopējais saturs	V pielikums	Sterīnu un triterpēndiolu sastāva un satura noteikšana ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju
— Eritrodiols un uvaols		
— Vaski	IV pielikums	Vasku satura noteikšana ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju
— Alifātiskie spirti	XIX pielikums	Alifātisko spirtu satura noteikšana ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju
— Piesātinātās taukskābes 2. pozīcijā	VII pielikums	2-glicerilmonopalmitāta satura noteikšana

▼B*II PIELIKUMS***▼M21****BRĪVO TAUKSKĀBJU NOTEIKŠANA PĒC AUKSTĀS METODES****▼B****1. SKĀBUMA NOTEIKŠANA**

Brīvu taukskābju noteikšana olīveļļās. Brīvu taukskābju saturu izsaka kā skābumu, ko aprēķina parastā veidā.

1.1. Princips

Paraugu izšķīdina šķīdinātāju maisījumā un klātesošās brīvās skābes titrē ar kālija hidroksīda šķīdumu etanolā.

1.2. Reaktīvi

Visiem reaktīviem ir jābūt atzītas analītiskas kvalitātes un izmantojamam ūdenim jābūt divreiz destilētam vai līdzvērtīgas tīrības.

1.2.1. Dietilētera/etanola (95 tilp. %) maisījums vienādās tilpuma daļās.

Piezīme: dietilēteris ir viegli uzliesmojošs un var veidot sprādzienbīstamus peroksīdus. To lietojot, ir jābūt īpaši piesardzīgiem.

Dietilētera/etanola maisījumu tieši pirms lietošanas neitralizē ar kālija hidroksīda šķīdumu (1.2.2. punkts), pievienojot uz 100 ml maisījuma 0,3 ml fenolftaleīna šķīduma (1.2.3. punkts).

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

1.2.2. Kālija hidroksīds, KOH, titrēts etanola šķīdums, kura koncentrācija aptuveni 0,1 M/l vai vajadzības gadījumā 0,5 M/l.

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

Piezīme: stabilu bezkrāsainu kālija hidroksīda šķīdumu var pagatavot šādi. Uzkaršē līdz vārīšanās temperatūrai 1 000 ml etanola ar 8 g kālija hidroksīda un 0,5 g alumīnija skaidiņu un vienu stundu vāra ar atces dzesinātāju. Tūlīt pārdestilē. Destilātā izšķīdina vajadzīgo kālija hidroksīda daudzumu. Atstāj uz dažām dienām un dzidro supernatantu dekantē no kālija karbonāta nogulsnēm.

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

1.2.3. Fenolftaleīna 10 g/l šķīdums 95 līdz 96 tilp. % etanolā vai sārmainā zilā 20 g/l šķīdums 95 līdz 96 tilp. % etanolā (stipri krāsotu tauku gadījumā).**1.3. Aparatūra**

Parastais laboratoriju aprīkojums, tai skaitā:

▼B

1.3.1. Analītiskie svāri;

1.3.2. 250 ml koniskā kolba;

1.3.3. 10 ml birete, graduēta pa 0,05 ml.

1.4. Procedūra

1.4.1. Parauga sagatavošana analīzei

(Analīzi izdara ar filtrētu paraugu. Ja mitruma un piemaisījumu kopā ir mazāk par 1 %, paraugu lieto bez turpmākas apstrādes; ja to ir vairāk par 1 %, paraugs ir jāfiltrē.)

1.4.2. Parauga ņemšana

Paraugu ņem atkarībā no paredzamā brīvo skābju satura saskaņā ar šādu tabulu:

Paredzamais skābju saturs	Parauga masa (g)	Svēršanas precizitāte (g)
< 1	20	0,05
1 līdz 4	10	0,02
4 līdz 15	2,5	0,01
15 līdz 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

Paraugu nosver koniskajā kolbā (1.3.2. punkts).

1.4.3. Noteikšana

Paraugu (1.4.2. punkts) izšķīdina 50 līdz 150 ml iepriekš neitralizētā dietilētera un etanola maisījumā (1.2.1. punkts).

Maisot titrē ar 0,1 M/l kālija hidroksīda šķīdumu (1.2.2. punkts) (sk. 2. piezīmi), līdz indikatora krāsa mainās (fēnolftaleīna sārtā krāsa saglabājas vismaz 10 sekundes).

1. *piezīme:* titrēto kālija hidroksīda šķīdumu etanolā (1.2.2. punkts) var aizstāt ar kālija vai nātrija hidroksīda ūdens šķīdumu, ar noteikumu, ka ievadītā ūdens daudzums neizraisa fāzu atdalīšanos.

2. *piezīme:* ja vajadzīgais 0,1 M/l kālija hidroksīda daudzums ir lielāks par 10 ml, lieto 0,5 M/l šķīdumu.

3. *piezīme:* ja šķīdums titrēšanas laikā kļūst duļķains, pievieno pietiekami daudz šķīdinātāju (1.2.1. punkts), lai šķīdums kļūtu dzidrs.

1.5. **Skābju saturs: izteikts oleīnskābes procentos**

Skābju saturs svāra procentos ir vienāds ar:

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

▼B

kur:

V = izlietotā titrētā kālija hidroksīda tilpums mililitros;

C = lietotā titrētā kālija hidroksīda precīzā koncentrācija M/l;

M = molmasa gramos skābei, ko izmanto rezultāta izteikšanai (= 282);

m = parauga masa gramos.

Rezultāts ► **M6** divu aprēķinu ◄ aritmētiskais vidējais.



III PIELIKUMS

PEROKSĪDA SKAITĻA NOTEIKŠANA

1. DARBĪBASJOMA

Šis standarts apraksta eļļu un tauku peroksīda skaitļa noteikšanas metodi.

2. IZMANTOŠANASJOMA

Šis standarts ir piemērojams dzīvnieku un augu eļļām un taukiem.

3. DEFINĪCIJA

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

4. PRINCIPS

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

5. APARATŪRA

Visam aprīkojumam jābūt brīvam no reducējošām vai oksidējošām vielām.

Piezīme: slīpētās virsmas nav jāelļo.

5.1. 3 ml stikla svēršanas laiviņa.

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

5.3. 25 vai 50 ml birete, graduēta ik pa 0,1 ml.

6. REAKTĪVI

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

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

6.3. Kālija jodīda piesātināts ūdens šķīdums, nesen pagatavots, kas nesatur jodu un jodātus.

6.4. Nātrija tiosulfāta precīzi standartizēts 0,01 vai 0,002 N ūdens šķīdums, standartizēts tieši pirms lietošanas.

6.5. Cietes šķīdums, 10 g/l ūdens dispersija, nesen pagatavota no dabiskās šķīstošās cietes.

7. PARAUGS

Pievērš vērību, lai paraugu paņemtu un glabātu tumsā, turētu aukstumā un pilnīgi piepildītos stikla traukos, kas ir hermētiski noslēgti ar pieslīpētiem stikla vai korķa aizbāžņiem.

▼B**8. PROCEDŪRA**

Analīzi izdara izkļiedētā dienasgaismā vai mākslīgā apgaismojumā. Analizējamo paraugu ar precizitāti līdz tuvākajam 0,001 g nosver svēršanas laiviņā (5.1. punkts) vai, ja tādas nav, kolbā (5.2. 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 (5.2. punkts) un tajā ieliek stikla svēršanas laiviņu ar analīzes paraugu. Pievieno 10 ml hlороформа (6.1. punkts). Ātri maisot, analīzes paraugu izšķīdina. Pievieno 15 ml etiķskābes (6.2. punkts), pēc tam pievieno 1 ml kālija jodīda šķīduma (6.3. punkts). Nekavējoties aizkorķē, vienu minūti krata un atstāj tieši piecas minūtes tumšā vietā 15 līdz 25 °C temperatūrā.

Pievieno aptuveni 75 ml destilēta ūdens. Enerģiski kratot, izdalījušos jodu titrē ar nātrija tiosulfāta šķīdumu (6.4. punkts) (0,002 N šķīduma, ja sagaidāmie lielumi ir mazāki par 12, un 0,01 N šķīduma, ja sagaidāmie lielumi ir lielāki par 12), izmantojot par indikatoru cietes šķīdumu (6.5. 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 (6.4. punkts), tad nomaina netīros reaktīvus.

9. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

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

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

kur:

V = standartizēta nātrija tiosulfāta šķīduma (6.4. punkts) ml skaits, kas izlietoti analīzē, kas ir koriģēts, lai ņemtu vērā tukšo mēģinājumu;

T = lietotā nātrija tiosulfāta šķīduma (6.4. punkts) precīzā normalitāte;

m = analīzes parauga masa gramos.

Rezultāts ir divu izdarīto noteikšanu aritmētiskais vidējais.

▼ **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 maisījumu 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 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 pārnes kolonnā (3.2.). Nostādina. Sablīvē, izmantojot elektrovibratoru (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 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 iztvaicē 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;

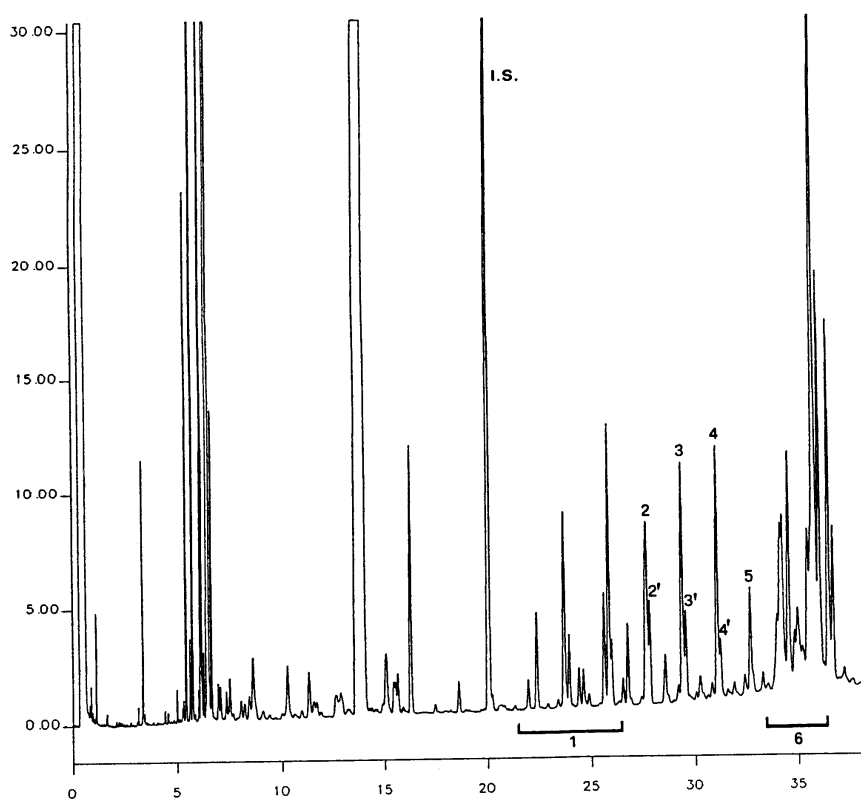
m = analīzei ņemtā parauga masa, gramos.

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. = laurilarahidāts;

1. = diterpēnesteri;

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

6. = sterīna esteri un triterpēns.

⁽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 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.

▼ **M26***V PIELIKUMS***STERĪNU UN TRITERPĒNDIOLU SASTĀVA UN SATURA
NOTEIKŠANA AR KAPILĀRĀS KOLONNAS GĀZU
HROMATOGRĀFIJU****1. DARBĪBAS JOMA**

Šajā metodē aprakstīta atsevišķu sterīnu satura un sterīnu kopējā satura, kā arī triterpēndiolu satura noteikšana olīveļļā un olīvu izspaidu eļļā.

2. PRINCIPS

Eļļu, kam kā iekšējais standarts pievienots α -holestanols, pārziepjo ar kālija hidroksīda šķīdumu etanolā, un nepārziepjoto vielu pēc tam ekstrahē ar etilēteri.

Sterīnu un triterpēndiolu frakciju no nepārziepjojamās vielas atdala ar plānslāņa hromatogrāfiju, izmantojot bāziska silikagēla plati. No silikagēla reģenerētās frakcijas pārveido trimetilsililēteros un analizē ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju.

3. APARATŪRA

Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši turpmāk nosauktais.

- 3.1. 250 ml tilpuma kolba, kas aprīkota ar attecēs dzesinātāju ar pieslēpētu savienojumu.
- 3.2. 500 ml tilpuma dalāmā piltuve.
- 3.3. 250 ml tilpuma kolbas.
- 3.4. Komplekts analīzei ar plānslāņa hromatogrāfiju, izmantojot 20×20 cm stikla plates.
- 3.5. Ultravioletā spuldze ar viļņa garumu 366 vai 254 nm.
- 3.6. 100 μ l un 500 μ l mikrošļircēs.
- 3.7. Cilindriskais poraina stikla filtrtūgelis G3 (poru lielums 15–40 μ m), aptuveni 5 cm augsts un aptuveni ar 2 cm diametru, piemērots filtrēšanai vakuumā, ar ārējo pieslēpējumu.
- 3.8. Koniska 50 ml tilpuma vakuumkolba ar iekšējo pieslēpējumu izmantošanai kopā ar filtrtūgeli (3.7. punkts).
- 3.9. 10 ml tilpuma koniskā mēģene ar stikla aizbāzni.
- 3.10. Ar sadales inžekcijas sistēmu aprīkots kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfs, kura sastāvdaļas ir šādas:
 - 3.10.1. termostatējama kamera kolonnām vēlamās temperatūras uzturēšanai ar precizitāti līdz ± 1 °C;
 - 3.10.2. termostatējama inžekcijas ierīce ar persilinizētu stikla iztvaicētāju un sadales sistēmu;
 - 3.10.3. liesmas jonizācijas detektors (*FID*);
 - 3.10.4. datu ieguves sistēma, kas piemērota izmantošanai ar *FID* (3.10.3. punkts) un ko iespējams manuāli integrēt.
- 3.11. No 20 līdz 30 m gara kvarca kapilārā kolonna ar iekšējo diametru no 0,25 līdz 0,32 mm, pārklāta ar difenilu (5 %) un dimetilpolisiloksānu (95 %) (*SE-52* vai *SE-54* stacionāro fāzi vai līdzvērtīgu fāzi), kuru slāņa biezums ir 0,10–0,30 μ m.

▼ **M26**

- 3.12. Mikrošķirce gāzu hromatogrāfijai ar 10 µl tilpumu un rūdītu adatu, kas piemērota ievadīšanai ar plūsmas dalīšanu.
- 3.13. Kalcija dihlorīda eksikators.
4. REAGENTI
- 4.1. Kālija hidroksīds ar 85 % minimālo titru.
- 4.2. Kālija hidroksīds, aptuveni 2 N etanola šķīduma.

130 g kālija hidroksīda (4.1. punkts) dzesējot izšķīdina 200 ml destilēta ūdens, pēc tam uzpilda ar etanolu līdz vienam litram (4.10. punkts). Šķīdumu glabā cieši noslēgtās tumša stikla pudelēs ne ilgāk kā divas dienas.
- 4.3. Etilēteris, analīzes kvalitātes.
- 4.4. Kālija hidroksīds, aptuveni 0,2 N etanola šķīduma.

13 g kālija hidroksīda (4.1. punkts) izšķīdina 20 ml destilēta ūdens un uzpilda ar etanolu līdz vienam litram (4.10. punkts).
- 4.5. Bezūdens nātrija sulfāts, analīzes kvalitātes.
- 4.6. Stikla plates (20 × 20 cm) ar silikagēla pārklājumu, bez fluorescences indikatora, 0,25 mm biezas (nopērkamas lietošanai gatavas).
- 4.7. Toluols, hromatogrāfijas kvalitātes.
- 4.8. Acetons, hromatogrāfijas kvalitātes.
- 4.9. n-heksāns, hromatogrāfijas kvalitātes.
- 4.10. Etilēteris, hromatogrāfijas kvalitātes.
- 4.11. Etanols, analītiskas kvalitātes.
- 4.12. Etilacetāts, analītiskas kvalitātes.
- 4.13. Standartšķīdums plānslāņa hromatogrāfijai: holesterīns vai fitosterīni un eritrodiola 5 % šķīdums etilacetātā (4.11. punkts).
- 4.14. 2,7-dihlorfluoresceīna 0,2 % šķīdums etanolā. To padara neredzamu bāzisku, pievienojot dažus pilienus 2 N kālija hidroksīda šķīduma spirtā (4.2. punkts).
- 4.15. Bezūdens piridīns, hromatogrāfijas kvalitātes (skatīt 5. piezīmi).
- 4.16. Heksametildisilazāns, analītiskas kvalitātes.
- 4.17. Trimetilhlorsilāns, analītiskas kvalitātes.
- 4.18. Sterīnu trimetilsililēteru parauga šķīdumi.

Tos pagatavo pirms lietošanas no sterīniem un eritrodiola, kas iegūti no sterīnus un eritrodiolu saturošām eļļām.
- 4.19. α-cholestanols, vairāk nekā 99 % tīrība (tīrība jāpārbauda ar gāzu hromatogrāfijas analīzi).
- 4.20. α-cholestanola iekšējais standartšķīdums, 0,2 % šķīdums (masa/tilp.) etilacetātā (4.11. punkts).
- 4.21. Fenoltaleīna šķīdums etanolā, 10 g/l (4.10. punkts).
- 4.22. Nesējgāzes: ūdeņradis vai hēlijs, gāzu hromatogrāfijas tīrības.
- 4.23. Palīgģāzes: ūdeņradis, hēlijs, slāpekļis un gaiss, gāzu hromatogrāfijas tīrības.

▼ **M26**

4.24. n-heksāna (4.9. punkts)/etilētera (4.10. punkts) maisījums 65:35 (tilpums/tilpums).

4.25. Sililēšanas reaktīvs, kas ir piridīna/heksametildisilazāna/trimetilhlorsilāna maisījums 9:3:1 (tilpums/tilpums/tilpums).

5. PROCEDŪRA

5.1. Nepārziepjamās vielas pagatavošana.

5.1.1. Ar 500 µl mikrošķīrci (3.6. punkts) 250 ml tilpuma kolbā (3.1. punkts) pārnes tādu daudzumu α-cholestanola iekšējā standartšķīduma (4.20. punkts), kas satur tādu cholestanola daudzumu, kurš atbilst aptuveni 10 % sterīnu satura paraugā. Piemēram, 5 g olīveļļas parauga pievieno 500 µl α-cholestanola šķīduma (4.20. punkts), bet 5 g olīvu izspaidu eļļas pievieno 1 500 µl α-cholestanola šķīduma. Silta ūdens vannā, mērenā slāpekļa plūsmā ietvaicē sausu un pēc kolbas atdzesēšanas tajā pašā kolbā iesver $5 \pm 0,01$ g sausā nofiltrētā parauga.

1. piezīme. Dzīvnieku izcelsmes vai augu eļļas un tauki, kas satur lielākus holesterīna daudzumus, var uzrādīt smailes ar aiztures laikiem, kas ir līdzīgi cholestanola aiztures laikam. Tādā gadījumā sterīnu frakcija ir jāanalizē divreiz – ar iekšējo standartu un bez tā.

5.1.2. Pievieno 50 ml 2 N kālija hidroksīda šķīduma etanolā (4.2. punkts) un nedaudz pumeka, uzliek atteces dzesinātāju un silda līdz lēnai viršanai, līdz ir notikusi pārziepjošana (šķīdums kļūst dzidrs). Turpina sildīt vēl 20 minūtes, pēc tam caur dzesinātāja augšgalu pievieno 50 ml destilēta ūdens, atvieno dzesinātāju un atdzesē kolbu aptuveni līdz 30 °C.

5.1.3. Kolbas saturu kvantitatīvi pārnes 500 ml dalāmajā piltuvē (3.2. punkts), vairākas reizes skalojot ar destilētu ūdeni, (50 ml). Pievieno aptuveni 80 ml etilētera (4.10. punkts), enerģiski krata aptuveni 60 sekundes, periodiski atbrīvo spiedienu, apgriežot dalāmo piltuvi un atverot krānu. Ļauj nostāvēties, līdz abas fāzes ir pilnīgi nodalījušās (2. piezīme).

Pēc tam pēc iespējas pilnīgāk atdala ziepju šķīdumu, savācot to citā dalāmajā piltuvē. Tieši tāpat ūdens-spirta fāzi ekstrahē vēl divas reizes, katrai ekstrakcijai izlietojot no 60 līdz 70 ml etilētera (4.10. punkts).

2. piezīme. Radušos emulsiju var likvidēt, pievienojot nedaudz etanola (4.11. punkts).

5.1.4. Trīs ētera ekstraktus apvieno vienā dalāmajā piltuvē, kurā ir 50 ml ūdens. Turpina mazgāt ar ūdeni (50 ml), līdz mazgājamais ūdens pēc fenolftaleīna šķīduma (4.21. punkts) piliena pievienošanas vairs neiekrāsojas sārts.

Kad mazgājamais ūdens ir aizvadīts, filtrē uz bezūdens nātrija sulfāta (4.5. punkts) iepriekš nosvērtā 250 ml tilpuma kolbā, mazgājot piltuvi un filtru ar maziem daudzumiem etilētera (4.10. punkts).

5.1.5. Šķīdinātāju ietvaicē, destilējot rotācijas ietvaicētājā 30 °C vakuumā. Pievieno 5 ml acetona un ar mērenu gaisa plūsmu pilnībā likvidē gaistošo šķīdinātāju. Atlikumu 15 minūtes žāvē žāvēšanas skapī 103 ± 2 °C temperatūrā. Atdzesē eksikatoros un nosver ar 0,1 mg precizitāti.

▼ **M26****5.2. Sterīnu un triterpēndiolu frakcijas atdalīšana (eritrodiols + uvaols)**

- 5.2.1. Bāzisko plānslāņa hromatogrāfijas plašu sagatavošana. Silikagēla plates (4.6. punkts), aptuveni 4 cm, uz 10 sekundēm pilnīgi iegremdē 0,2 N kālija hidroksīda šķīdumā etanolā (4.5. punkts), pēc tam divas stundas žāvē velkmē un vienu stundu žāvēšanas skapī 100 °C temperatūrā.

Izņem no žāvēšanas skapja un glabā eksikatorā virs kalcija hlorīda (3.13. punkts) līdz lietošanai (šādi apstrādātas plates jāizlieto 15 dienu laikā).

3. *piezīme.* Ja sterīnu frakcijas atdalīšanai izmanto bāziska silikagēla plates, nepārziepjamā frakcija nav jāapstrādā ar alumīnija oksīdu. Tādā veidā visi savienojumi ar skābju īpašībām (taukskābes un pārējie) paliek uz starta, un sterīnu josla labi atdalās no alifātisko spirtu un triterpēnspirtu joslās.

- 5.2.2. Attīstīšanas kamerā pārnes heksāna/etilētera maisījumu (4.24. punkts) (4. *piezīme*), izveidojot aptuveni 1 cm biezu slāni. Kameru noslēdz ar piemērotu vāku un vismaz 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 un pareizāk.

4. *piezīme.* Lai attīstīšanas apstākļi būtu atkārtojami, attīstīšanas šķīdums katrai analīzei ir jānomaina. Var lietot arī 50:50 (tilpums/tilpums) n-heksāna/etilētera maisījumu.

- 5.2.3. Sagatavo aptuveni 5 % nepārziepjamās vielas (5.1.5. punkts) šķīdumu etilacetātā (4.12. punkts) un ar 100 µl mikrošļirci 0,3 ml šā šķīduma tievā un vienādā svītā uznes uz hromatogrāfijas plates (5.2.1. punkts) apakšējās malas (2 cm attālumā). Vienādā attālumā ar šo svītru uznes no 2 līdz 3 µl materiāla standartšķīduma (4.13. punkts), lai pēc attīstīšanas varētu identificēt sterīnu un triterpēndiolu joslu.

- 5.2.4. Plati ievieto attīstīšanas kamerā, kas ir sagatavota, kā noteikts 5.2.2. punktā. Apkārtējās vides temperatūrai jābūt no 15 līdz 20 °C (5. *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 iztvaicē šķīdinātāju, izmantojot karsta gaisa plūsmu vai plati uz neilgu laiku novietojot velkmē.

5. *piezīme.* Augstāka temperatūra varētu pasliktināt nodalīšanos.

- 5.2.5. Uz plates vienmērīgi uzsmidzina neredzamu 2,7-dihlorfluoresceīna šķīdumu (4.14. punkts) un tad atstāj nožūt. Novērojot plati ultravioleto staru gaismā, sterīnu un triterpēndiolu joslas var identificēt pēc tā, ka tās ir vienādā attālumā ar standartšķīdumam atbilstošajiem plankumiem (4.13. punkts). Joslu robežas apkārt fluorescējošajam plankumam apzīmē ar melnu zīmuli (skatīt plānslāņa hromatogrāfijas plati 3. attēlā).

- 5.2.6. Ar metāla lāpstiņu no apzīmētā laukuma noņem silikagelu. Sīki sasmalcinātu no plates noņemto materiālu pārvieto uz filtrrūgeli (3.7. punkts). Pievieno 10 ml karsta etilacetāta (4.12. punkts), rūpīgi samaisa ar metāla lāpstiņu un vakuumā filtrē, filtrātu uztver filtrrūgelim pievienotajā koniskajā kolbā (3.8. punkts).

▼ **M26**

Nogulsnes kolbā trīs reizes mazgā ar etilēteri (4.3. punkts) (katru reizi aptuveni 10 ml), filtrātu savācot tajā pašā filtram pievienotajā kolbā. Filtrātu ietvaicē no 4 līdz 5 ml tilpumam, atlikušo šķīdumu pārnes iepriekš nosvērtā 10 ml mēģenē (3.9. punkts), uzmanīgi sildot, lēnā slāpekļa plūsmā ietvaicē sausu, izšķīdina, vēlreiz pievienojot dažus pilienus acetona (4.8. punkts), atkal ietvaicē sausu.

Mēģenē iegūtajam atlikumam jā sastāv no sterīnu un triterpēndiolu frakcijām.

5.3. Trimetilsililēteru iegūšana.

5.3.1. Mēģenē, kurā ir sterīnu un triterpēnu frakcija, pievieno sililēšanas reaģentu (4.25. punkts) (6. piezīme) proporcijā 50 µl uz katru miligramu sterīnu un triterpēndiolu, 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 pīridīna.

Pīridīnu var aizvietot ar tādu pašu daudzumu acetonitrila.

5.3.2. Mēģeni noslēdz ar aizbāzni, uzmanīgi krata (bez apgrīšanas), līdz savienojumi ir pilnībā izšķīduši. Atstāj vismaz 15 minūtes istabas temperatūrā, pēc tam dažas minūtes centrifugē. Dzidrais šķīdums ir gatavs gāzu hromatogrāfiskai analīzei.

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).

5.4. Gāzu hromatogrāfiskā analīze.

5.4.1. Sagatavošanas operācijas, kapilārās kolonnas kondicionēšana.

5.4.1.1. Kolonnu (3.11. punkts) iemontē gāzu hromatogrāfā, ieeju pievienojot plūsmas sadales inžektoram un kolonnas izeju detektoram.

Izdara gāzu hromatogrāfijas iekārtas vispārējo pārbaudi (noplūdes no gāzu līnijām, detektora, plūsmas sadales un reģistrējošās sistēmas efektivitāti utt.).

5.4.1.2. Ja kolonnu lieto pirmoreiz, ir ieteicams to 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 datu apstrādes 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 temperatūru. Nulles līnijai ir jābūt lineārai, bez smailēm, un tā nedrīkst nobīdīties.

▼ **M26**

Negatīva taisna līnija norāda uz noplūdēm kolonnas savienojumu vietās; pozitīva nobīde norāda uz neatbilstīgu kolonnas kondicionēšanu.

8. *piezīme.* Kondicionēšanas temperatūrai vienmēr jābūt vismaz par 20 °C zemākai nekā lietojamajai stacionārajai fāzei paredzētajai maksimālajai temperatūrai.

5.4.2. Darba apstākļu izvēle.

5.4.2.1. Darba apstākļi ir šādi:

- kolonnas temperatūra: 260 ± 5 °C,
- inžektora temperatūra: 280–300 °C,
- detektora temperatūra: 280–300 °C,
- nesējgāzes lineārais ātrums: hēlijam no 20 līdz 35 cm/s, ūdeņradim no 30 līdz 50 cm/s,
- dalījuma attiecība: no 1:50 līdz 1:100,
- aparāta jutība: 4–16 reižu lielāka par minimālo atenuāciju,
- reģistrēšanas jutība: no 1 līdz 2 mV no visas skalas,
- ievadāmās vielas daudzums: no 0,5 līdz 1 µl *TMSE* šķīduma.

Atbilstīgi kolonnas un gāzes hromatogrāfa īpašībām norādītos apstākļus var mainīt, lai iegūtu hromatogrammas, kas atbilst šādiem nosacījumiem:

- betasitosterīna smailes aiztures laikam jābūt 20 ± 5 minūtēm,
- kampesterīna smailei jābūt: olīveļļai (vidējais saturs 3 %) 20 ± 5 % no pilnas skalas; sojas eļļai (vidējais saturs 20 %) 80 ± 10 % no pilnas skalas,
- visiem klātesošajiem sterīniem jābūt atdalītiem. Turklāt smailēm jābūt arī pilnībā nošķirtām, t. i., smailes līnijai ir jāatgriežas uz nulles līnijas, pirms sāk veidoties jauna smaile. Tomēr nepilnīga nošķiršana ir pieņemama ar nosacījumu, ka smailes ar relatīvo aiztures laiku *RRT* 1,02 02 (sitostanols) var kvantitatīvi noteikt, izmantojot perpendikulu.

5.4.3. Analītiskā procedūra.

5.4.3.1. 10 µl tilpuma mikrošļircē vispirms ieviek 1 µl heksāna, tad 0,5 µl gaisa un pēc tam 0,5 –1 µl parauga šķīduma. Paceļ šļirces virzuli, lai iztukšotu adatu. Izdūr adatu cauri inžektora membrānai un pēc vienas vai divām sekundēm strauji ievada, tad aptuveni pēc piecām sekundēm lēni izvelk adatu.

Var izmantot arī automātisku inžektoru.

5.4.3.2. Turpina reģistrēt, līdz klātesošo triterpēdiolu *TMSE* ir pilnīgi eluēti. Nulles līnijai visu laiku ir jāatbilst prasībām (5.4.1.2. punkts).

5.4.4. Smailu identificēšana.

Atsevišķās smailes identificē pēc aiztures laikiem, salīdzinot ar sterīnu un triterpēdiolu *TMSE* maisījumiem, kas analizēti tādos pašus apstākļos (skatīt papildinājumu).

▼ **M26**

Sterīni un triterpēndioli eluējas šādā secībā: holesterīns, brasikasterīns, ergosterīns, 24-metilēnholesterīns, kampesterīns, kampestanols, stigmasterīns, Δ^7 -kampesterīns, $\Delta^5,23$ -stigmastadienols, klerosterīns, betasitosterīns, sitostanols, Δ^5 -avenasterīns, $\Delta^5,24$ -stigmastadienols, Δ^7 -stigmastenols, Δ^7 -avenasterīns, eritrodiols un uvaols.

Betasitosterīna aiztures laiki *SE-52* un *SE-54* kolonnā ir parādīti 1. tabulā.

Turpmāk 1. un 2. attēlā parādītas dažu eļļu raksturīgās hromatogrammas.

5.4.5. Kvantitatīvā novērtēšana.

5.4.5.1.

Izmantojot datu apstrādes sistēmu, aprēķina α -holestanola, sterīnu un triterpēndiolu smaiļu laukumus. To savienojumu smaiļes, kas nav ietverti 1. tabulā, neņem vērā (ergosterīns nav jāaprēķina). Uzskata, ka α -holestanola atbildes signāla koeficients ir vienāds ar 1.

5.4.5.2. Katra atsevišķā sterīna koncentrāciju, kas izteikta mg/kg taukvielas, aprēķina šādi:

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

kur:

A_x = sterīna x smaiļes laukums skaitļošanas sistēmas uzskaites vienībās,

A_s = α -holestanola smaiļes laukums skaitļošanas sistēmas uzskaites vienībās,

m_s = pievienotā α -holestanola masa miligramos,

m = noteikšanai ņemtā parauga masa gramos.

6. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

6.1. Atsevišķo sterīnu koncentrāciju izsaka mg/kg taukvielas, un to summu norāda kā "kopējos sterīnus".

Katra atsevišķā sterīna, eritrodiola un uvaola sastāvu izsaka ar skaitli līdz vienai zīmei aiz komata.

Kopējais sterīnu sastāvs ir jāizsaka veselā skaitlī.

6.2. Katra atsevišķā sterīna procentus aprēķina pēc attiecīgās smaiļes laukuma attiecības pret sterīnu, eritrodiola un uvaola smaiļu kopējo laukumu.

$$\text{sterīns } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \times 100$$

kur:

A_x = x smaiļes laukums,

ΣA = sterīnu smaiļu kopējais laukums.

6.3. Nosacītais betasitosterīns: $\Delta^5,23$ -stigmastadienols + klerosterīns + betasitosterīns + sitostanols + Δ^5 -avenasterīns + $\Delta^5,24$ -stigmastadienols.

▼ M26

6.4. Aprēķina eritrodiola un uvaola procentus:

$$\text{Eritrodiols} + \text{uvaols} = \frac{\text{Er} + \text{Uv}}{\text{Er} + \text{Uv} + \Sigma A} \times 100$$

kur:

ΣA = sterīna laukumu summa skaitļošanas sistēmas uzskaites vienībās,

Er = eritrodiola laukums skaitļošanas sistēmas uzskaites vienībās,

Uv = uvaola laukums skaitļošanas sistēmas uzskaites vienībās.

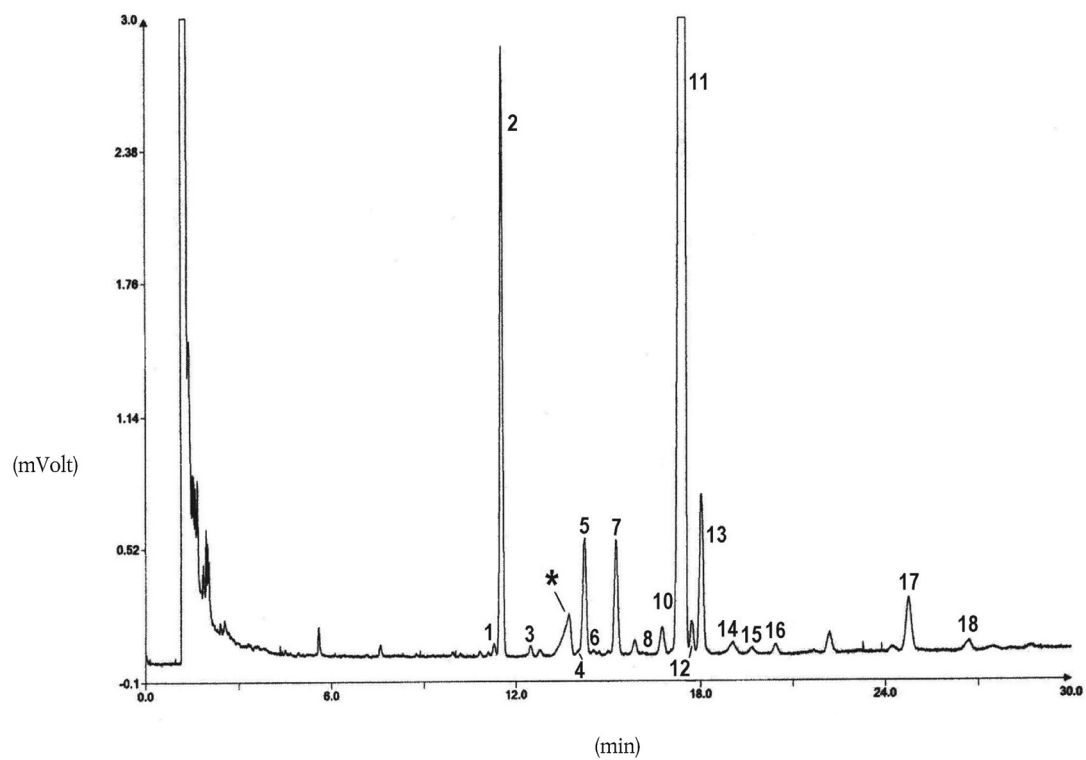
▼ **M26***Papildinājums***Gāzes lineārā ātruma noteikšana**

Gāzu hromatogrāfā, kas noregulēta atbilstīgi parastajiem darba apstākļiem, ievada no 1 līdz 3 μ l metāna (vai propāna) un izmēra laiku, kādā gāze iziet caur kolonnu no ievadīšanas brīža līdz smailes parādīšanās brīdim (tM).

Lineāro ātrumu aprēķina kā L/tM, kur L ir kolonnas garums centimetros un tM ir laiks sekundēs, kas izmērīts ar hronometru.

*1. tabula***Sterīnu relatīvie aiztures laiki**

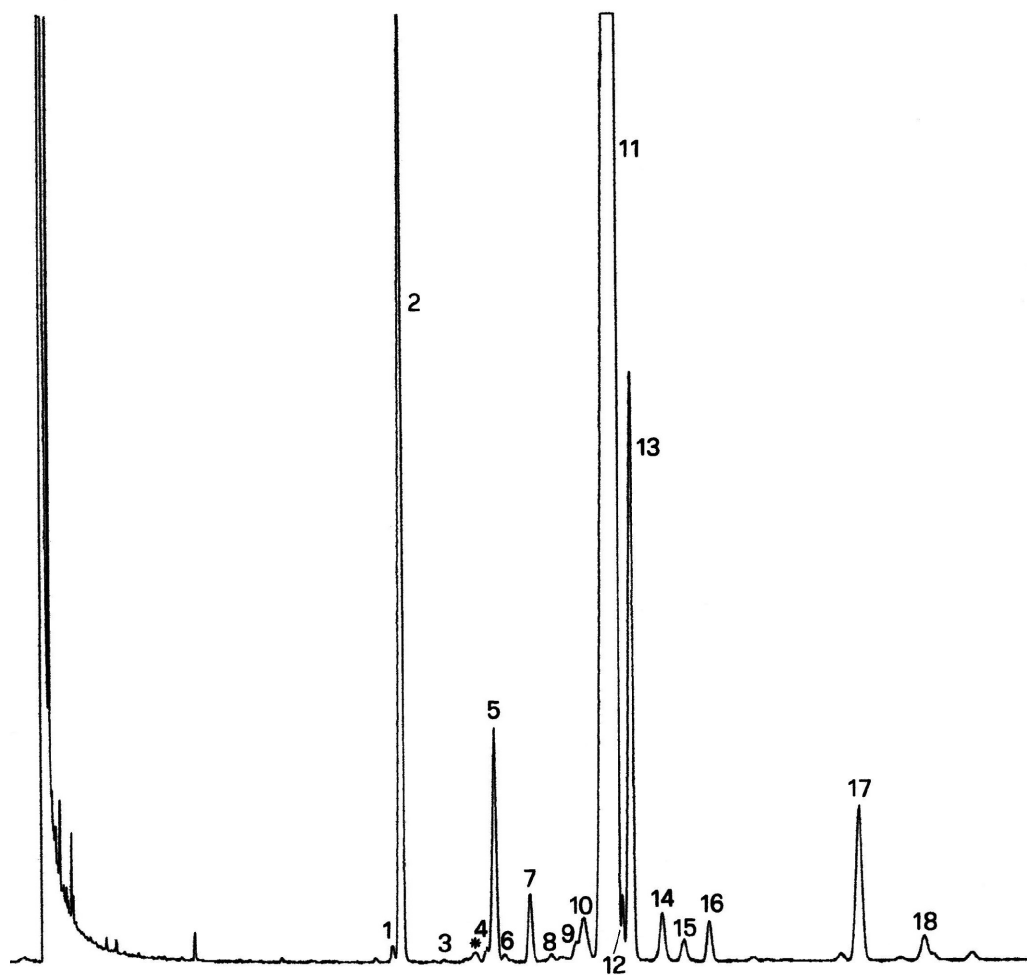
Smaile	Identifikācija		Relatīvie aiztures laiki	
			SE 54 kolonna	SE 52 kolonna
1.	Holesterīns	Δ -5-holesten-3 β -ols	0,67	0,63
2.	Holestanols	5 α -holestan-3 β -ols	0,68	0,64
3.	Brasikasterīns	[24S]-24-metil- Δ -5,22-holestadien-3 β -ols	0,73	0,71
*	Ergosterīns	[24S] 24 meti Δ 5-7-22 holestatrien 3 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,S)-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
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-12en-3 β 28 diols	1,41	1,41
18.	Uvaols	Δ 12-ursen-3 β 28 diols	1,52	1,52

▼ **M26***1. attēls***Spīdīgās olīveļļas (ar iekšējo standartu) sterīnu un triterpēdiolu frakcijas gāzu hromatogramma**

▼ M26

2. attēls

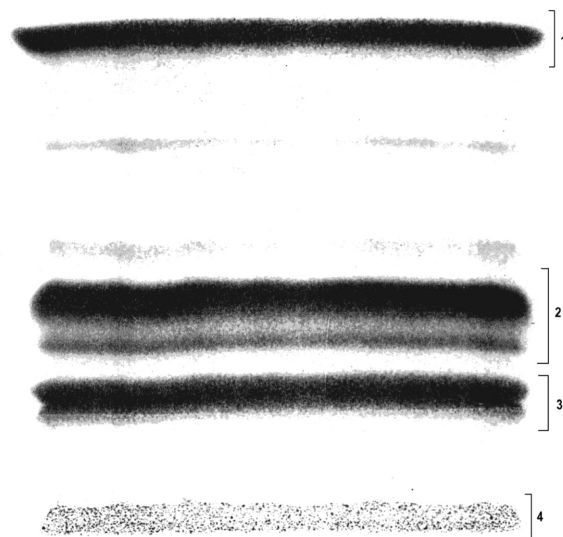
Rafinētas olīveļļas (ar iekšējo standartu) sterīnu un triterpēndiolu frakcijas gāzu hromatogramma



▼ **M26**

3. attēls

Olīvu izspaidu eļļas plānslāņa hromatogrāfijas plate, kura ir jānoskrāpē, lai noteiktu sterīnus un triterpēndiolus



- 1 – skvalēns
- 2 – triterpēnspirti un alifātiskie spirti
- 3 – sterīni un triterpēndioli
- 4 – sākums un brīvās taukskābes.

▼ **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 šķel ar aizkuņģa dziedzera 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 krāsnī, 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 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 tīģelī 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 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 analizējamo 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 šķidrums 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.

▼ **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 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.)

▼ **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

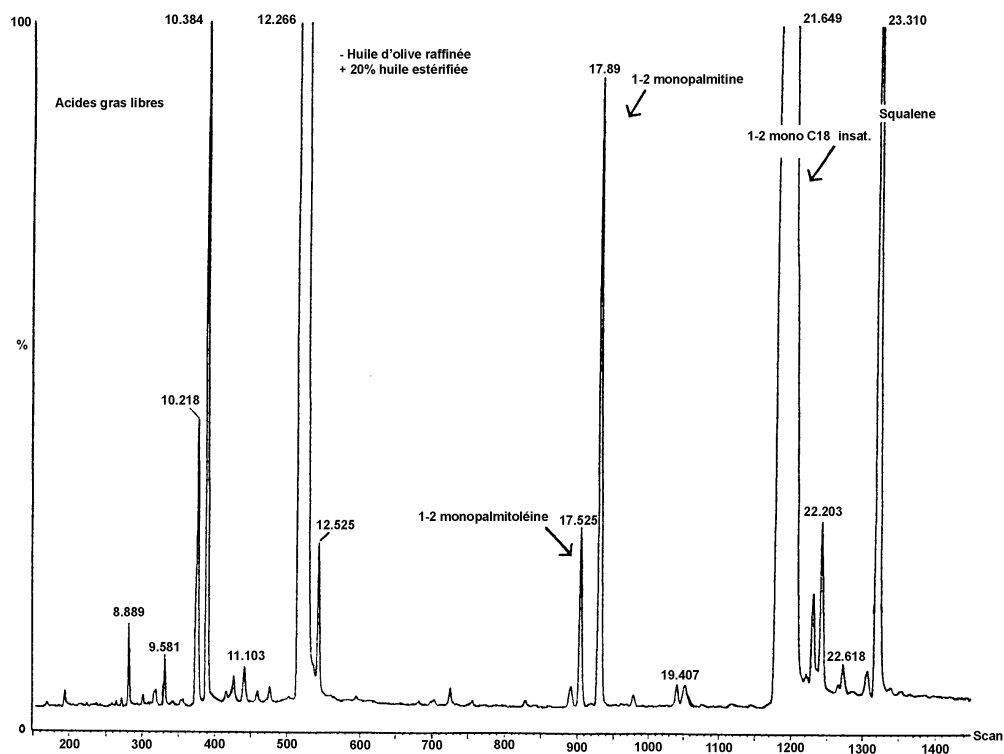
Pārskatā par analīzes rezultātiem jānorāda:

- 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.

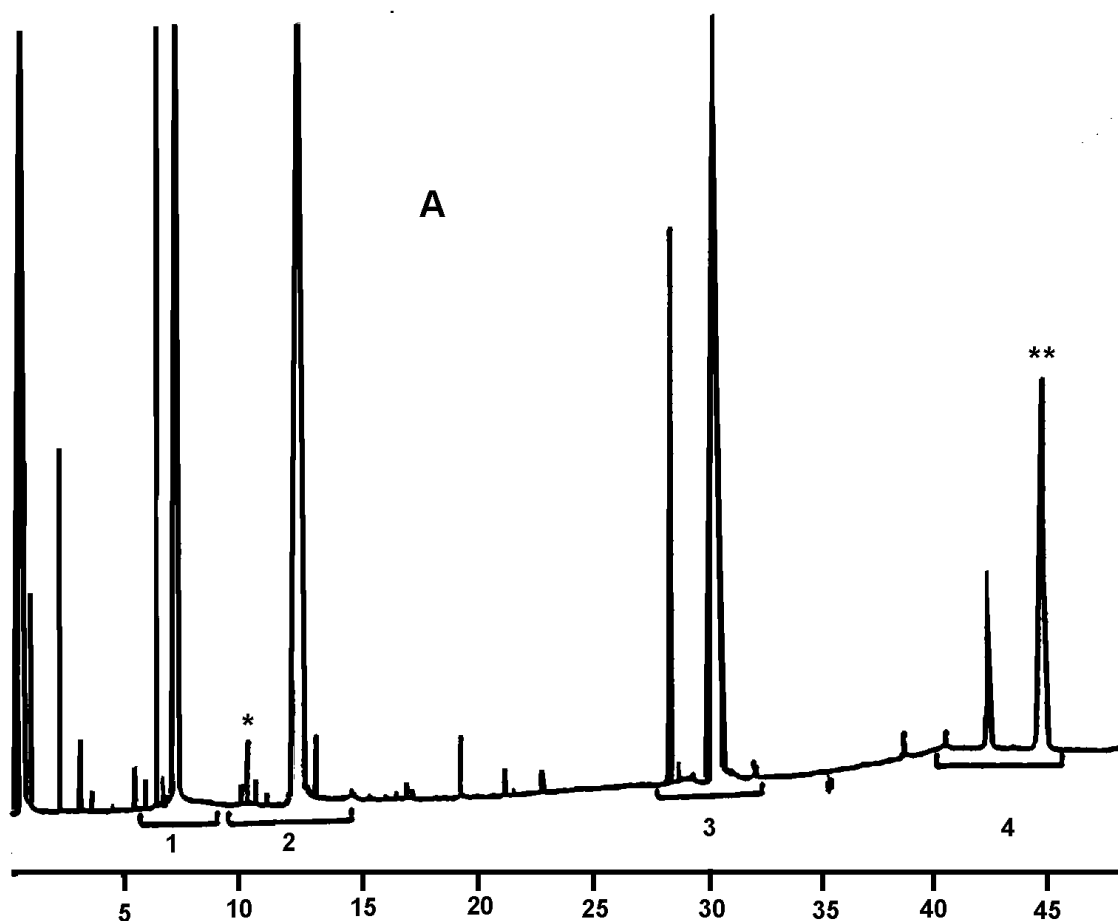
▼ **M21**

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 %.

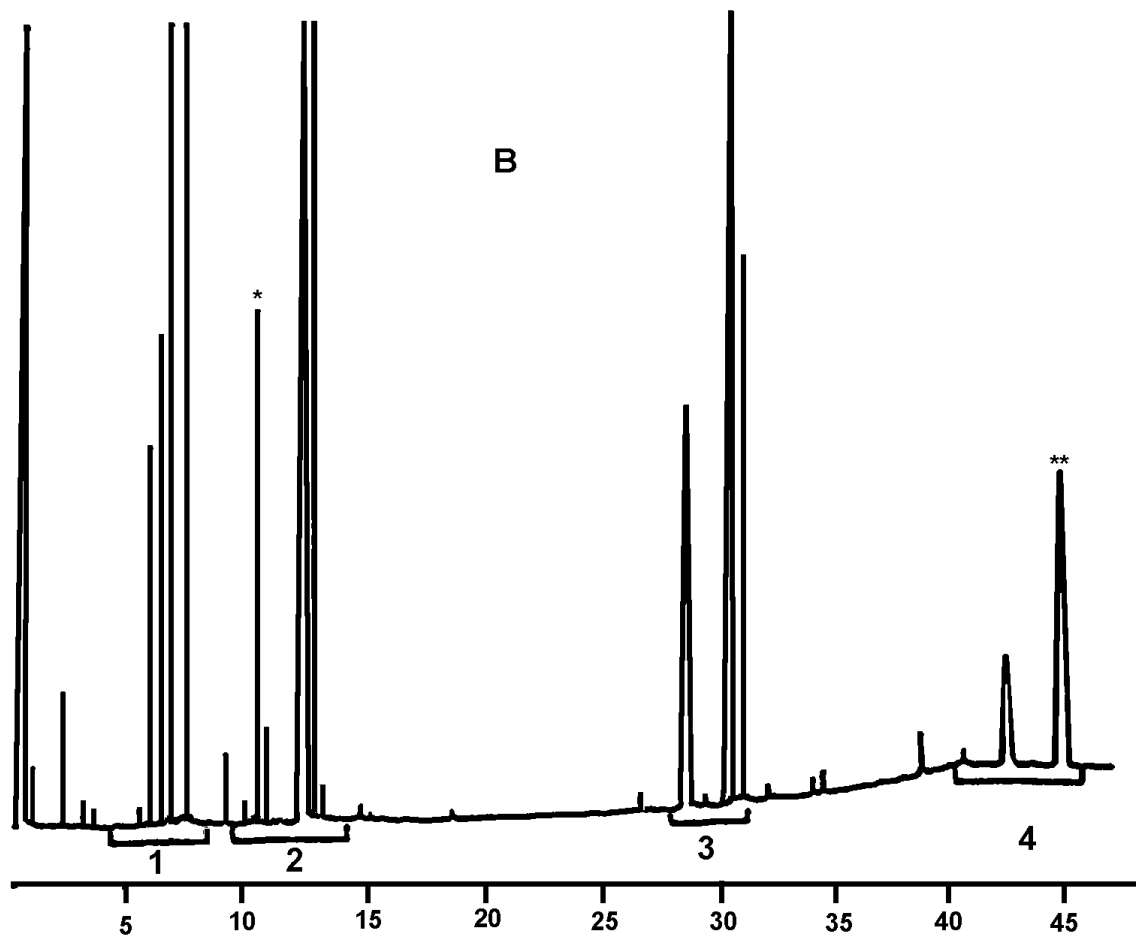
*Paskaidrojumi:*

- 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 šķidras 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.

Pārmes 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**

▼ M25

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.

Absorbcija pie metodē noteiktajiem viļņa garumiem notiek konjugētu diēnu un triēnu sistēmu klātbūtnes dēļ. Šo absorbciju izsaka kā īpatnējo ekstinkciju $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (1 % tauku šķīduma ekstinkcija attiecīgā šķīdinātājā pie slāņa biezuma 1 cm), ko parasti apzīmē ar K (sauc arī par "ekstinkcijas koeficientu").

1. PIEMĒROŠANAS JOMA

Metode apraksta procedūru olīveļļas spektrofotometriskai analīzei (aprakstīta papildinājumā) ultravioletajā spektrā.

2. METODES PRINCIPS

Attiecīgos taukus šķīdina vajadzīgajā šķīdinātājā un pie noteiktiem viļņa garumiem nosaka ekstinkciju šķīdumam attiecībā pret tīru šķīdinātāju. Īpatnējās ekstinkcijas aprēķina pēc spektrofotometra nolasījumiem. Vietas koncentrācijai 1 g uz 100 ml 10 mm kivetē aprēķina īpatnējo absorbciju pie 232 nm un 268 nm izooktānā vai 232 nm un 270 nm cikloheksānā.

3. IEKĀRTA

- 3.1. Spektrofotometrs ekstinkcijas mērījumiem ultravioletajā spektra daļā starp 220 un 360 nm ar iespēju nolasīt atsevišķas nanometru vienības. Pirms izmantošanas ieteicams pārbaudīt spektrometra viļņa garuma un absorbcijas skalas.

- 3.1.1. *Viļņa garuma skala.* To var pārbaudīt, izmantojot references materiālu – optiskā stikla filtru, kas satur holmija oksīdu, kam ir izteiktas absorbcijas joslas. References materiāls ir paredzēts, lai verificētu un kalibrētu viļņa garuma skalas spektrofotometriem, kas darbojas redzamajā un ultravioletajā starojuma apgabalā un kā nominālais spektrālās joslas platums ir ne vairāk par 5 nm. Holmija stikla filtru absorbcijas režīmā salīdzina ar gaisa tukšo paraugu 640–240 nm viļņa garuma diapazonā. Katram spektrālās joslas platumam ((0,10 – 0,25 – 0,50 – 1,00 – 1,50 – 2,00 un 3,00) izdara bāzes līnijas korekciju ar tukšu kivešu turētāju. Spektrālās joslas platuma viļņa garumi ir uzskaitīti ISO 3656 references materiāla sertifikātā.

- 3.1.2. *Absorbcijas skala.* To var pārbaudīt, izmantojot references materiālu: 4 kālija dihromāta šķīdumi perhlorskābē, kas hermētiski ievietoti četrās UV paredzētās kvarca kivetēs, lai noteiktu linearitātes un fotometriskās pareizības referenci UV. Ar kālija dihromātu piepildītās kivetes ((40 mg/ml, 60 mg/ml, 80 mg/ml un 100 mg/ml) salīdzina ar perhlorskābes tukšo paraugu. Neto absorbcijas vērtības ir uzskaitītas ISO 3656 references materiāla sertifikātā.

- 3.2. Taisnstūra kvarca kivetes ar vāciņiem, optiskais ceļa garums 1 cm. Ja kivetes piepildītas ar ūdeni vai citu piemērotu šķīdinātāju, tās savā starpā nedrīkst atšķirties par vairāk nekā 0,01 ekstinkcijas vienību.

▼ **M25**

- 3.3. 25 ml mērkolbas.
 3.4. Analītiskie svāri ar nolāsiņuma precizitāti līdz 0,0001 g.

4. REAĢENTI

Jāizmanto tikai atzītas analītiskas tīrības pakāpes reaģenti, ja vien nav norādīts citādi.

Šķīdinātājs: izooktāns (2,2,4-trimetilpentāns) mērijumiem pie 232 nm un 268 nm vai cikloheksāns mērijumiem pie 232 nm un 270 nm, ar absorbciju mazāk par 0,12 pie 232 nm un mazāk par 0,05 pie 250 nm salīdzinājumā ar destilētu ūdeni, mērot 10 mm kivetē.

5. PROCEDŪRA

- 5.1. Attiecīgajam paraugam jābūt pilnīgi homogēnam un bez suspendētiem piemaisījumiem. Eļļas, kas istabas temperatūrā ir šķidrās, ir jāfiltrē caur filtrpapīru aptuveni 30 °C temperatūrā, cieti tauki ir jāhomogenizē un jāfiltrē temperatūrā, kas nav augstāka par 10 °C virs kušanas punkta.

- 5.2. Precīzi nosver 0,25 g (ar precizitāti līdz 1 mg) tā 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.

- 5.3. Ar iegūto šķīdumu piepilda kvarca kivetu un izmēra ekstinkciju pie attiecīga viļņa garuma starp 232 un 276 nm, šķīdinātāju izmantojot kā standartšķīdumu.

Izmērijtajām ekstinkcijas vērtībām jābūt starp 0,1 un 0,8. Ja tā nav, mērijumi ir jāatkārto, lietojot pēc vajadzības koncentrētākus vai atšķaidītākus šķīdumus.

PIEZĪME. Var nebūt vajadzības mērijt absorbciju pie visa viļņa garumu diapazona.

6. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

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

$$K_{\lambda} = \left(\frac{E_{\lambda}}{c \cdot s} \right)$$

kur:

K_{λ} = īpatnējā ekstinkcija pie viļņa garuma λ ;

E_{λ} = ekstinkcija, kas izmērīta pie viļņa garuma λ ;

c = šķīduma koncentrācija g/100 ml;

s = kvarca kivešu biezums cm.

Rezultātus izsaka ar divām zīmēm aiz komata.

6.2. **Īpatnējās ekstinkcijas variācija (ΔK)**

Olīveļļas spektrofotometriskajā analīzē, ko veic saskaņā ar Savienības tiesību aktos paredzēto oficiālo metodi, nosaka arī īpatnējās ekstinkcijas absolūtās vērtības variāciju (ΔK) pēc šādas formulas

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

kur K_m ir īpatnējā ekstinkcija pie viļņa garuma m , maksimālās absorbcijas viļņa garums ir atkarīgs no izmantotā šķīdinātāja – 270 cikloheksānam un 268 izooktānam.

Papildinājums

OLĪVEĻĻAS ĪPAŠĪBAS

Kategorija	Taukskābju metilesteri (FAME) un taukskābju etilesteri (FAEE)	Skābums (%) (*)	Peroksīda skaitlis mEq 02/kg (*)	Vaski mg/kg (**)	2-glicerilmonopalmitāts (%)	Stigmastadiēns mg/kg (1)	Starpība: ECN42 (HPLC) un ECN42 (teorētiskais aprēķins)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*) "K 270 vai K 268 (5)"	Delta-K (*) (5)	Organoleptiskais novērtējums Defekta mediāna (Md) (*)	Organoleptiskais novērtējums Augļai- numā mediāna (Mf) (*)
1. Neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa	Σ FAME + FAEE ≤ 75 mg/kg vai 75 mg/kg < Σ FAME + FAEE ≤ 150 mg/kg un (FAEE/FAME) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
					≤ 1,0 ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14 %							
2. Neapstrādāta olīveļļa	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0
					≤ 1,0 ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14 %							
3. Spīdīgā olīveļļa	—	> 2,0	—	≤ 300 (3)	≤ 0,9 ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 3,5 (2)	—
					≤ 1,1 ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14 %							
4. Rafinēta olīveļļa	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
					≤ 1,1 ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14 %							

▼ **M25**

Kategorija		Taukskābju metilesteri (FAME) un taukskābju etilesteri (FAEE)	Skābums (%) (*)	Peroksīda skaitlis mEq 02/kg (*)	Vaski mg/kg (**)	2-glicerilmonopalmitāts (%)	Stig- masta- diēns mg/kg ⁽¹⁾	Starpība: ECN42 (HPLC) un ECN42 (teorēti- skaiss aprēķins)	K ₂₃₂ (*)	K ₂₇₀ (*) “K 270 vai K 268 ⁽⁵⁾ ”	Delta-K (*) ⁽⁵⁾	Organolepti- skaiss novērtējums Defekta mediāna (Md) (*)	Organo- leptiskais novērtē- jums Augļai- numā mediāna (Mf) (*)
5.	Rafinētas un neapstrādātas olīveļļas maisījums	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
						≤ 1,0 ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14 %							
6.	Neattīrīta 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⁾ Kapilārajā kolonnā atdalāmo (vai neatdalāmo) izomēru summa
⁽²⁾ Vai ja defektu mediāna ir mazāka par vai vienāda ar 3,5 un augļainuma mediāna ir vienāda ar 0.
⁽³⁾ Eļļas ar vaska saturu no 300mg/kg līdz 350 mg/kg uzskata par spīdīgo olīveļļu, ja kopējais alifātisko spirtu saturs ir mazāks par vai vienāds ar 350 mg/kg vai ja eritrodiola un uvaola saturs ir mazāks par vai vienāds ar 3,5 %.
⁽⁴⁾ Eļļas ar vaska saturu no 300mg/kg līdz 350 mg/kg uzskata par neapstrādātu olīvu izspaidu eļļu, ja kopējais alifātisko spirtu saturs ir lielāks par 350 mg/kg un ja eritrodiola un uvaola saturs ir lielāks par 3,5 %.
⁽⁵⁾ K 270 ja šķīdinātājs ir cikloheksāns, K 268 ja šķīdinātājs ir izooktāns.

▼B*X A PIELIKUMS***TAUKSKĀBJU METILESTERU ANALĪZE AR GĀZU HROMATOGRĀFIJU****1. DARBĪBAS JOMA**

Šī metode dod vispārīgus norādījumus par gāzu hromatogrāfijas pielietošanu, izmantojot pakotās vai kapilārās kolonnas, lai noteiktu taukskābju metilesteru, kas iegūti saskaņā ar X B pielikumā norādīto metodi, maisījuma kvalitatīvo un kvantitatīvo sastāvu.

Šī metode nav lietojama polimerizētām taukskābēm.

2. REAKTĪVI**2.1. Nesējgāze**

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

1. piezīme: ūdeņradis, ko izmanto par nesējgāzi tikai ar kapilārām kolonnām, var divreiz palielināt analīzes ātrumu, bet tas ir bīstams. Ir pieejamas drošības ierīces.

2.2. Palīgģāzes

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

2.2.2. Gaiss vai skābeklis, bez organiskiem piemaisījumiem.

2.3. Salīdzināšanas standarts

Tīru taukskābju metilesteru maisījums vai zināma sastāva tauku metilesteri, vēlams, līdzīgi analizējamās taukainās vielas sastāvam.

Ir jā rūpējas par polinepiesātināto taukskābju oksidācijas novēršanu.

3. APARATŪRA

Dotie norādījumi attiecas uz parasto gāzu hromatogrāfijas aprīkojumu, kurā izmanto pakotās un/vai kapilārās kolonnas un liesmas jonizācijas detektoru. Jebkura aparatūra, kuras efektivitāte un izšķirtspēja atbilst 4.1.2. punktā noteiktajai, ir piemērota.

3.1. Gāzu hromatogrāfs

Gāzu hromatogrāfā ir šādas sastāvdaļas.

3.1.1. Iešļircināšanas sistēma

Izmanto iešļircināšanas sistēmu vai nu ar:

a) pakotām kolonnām ar vismazāko iespējamo nelietderīgo tilpumu (šajā gadījumā iešļircināšanas sistēmai jābūt sildāmai līdz temperatūrai, kas ir par 20 līdz 50 °C augstāka nekā kolonnas temperatūra), vai ar

b) kapilārām kolonnām, šajā gadījumā iešļircināšanas sistēma ir īpaši izveidota izmantošanai ar šādām kolonnām. Iešļircināšanas sistēma var būt ar plūsmas dalīšanu, vai tā var būt “on column” veida, bez plūsmas dalīšanas.

▼B

2. *piezīme:* ja taukskābju, kurās ir mazāk par 16 oglekļa atomiem, nav klāt, var izmantot kustīgās adatas inžektoru.

3.1.2. Krāsns

Krāsni jāspēj sildīt kolonnu vismaz līdz 260 °C un uzturēt vēlamo temperatūru 1 °C robežās ar pakoto kolonnu un 0,1 °C robežās ar kapilāro kolonnu. 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. Pakotā kolonna

3.1.3.1. Kolonna, kas izgatavota no materiāla, kurš ir inerts pret analizējamām vielām (t.i., stikls vai nerūsējošais tērauds), kolonnai ir šādi izmēri:

a) garums: 1 līdz 3 m. Relatīvi īsa kolonna būtu jālieto, analizējot garas virknes taukskābes (vairāk par C₂₀). Analizējot skābes ar 4 vai 6 oglekļa atomiem, ir ieteicams izmantot 2 m garu kolonnu;

b) iekšējais diametrs: 2 līdz 4 mm.

3. *piezīme:* ja ir klāt polinepiesātināti komponenti ar vairāk par trim dubultsaitēm, tie nerūsējošā tērauda kolonnā var sadalīties.

4. *piezīme:* var izmantot sistēmu ar pakotām dubultkolonnām.

3.1.3.2. Pakojums ietver šādas sastāvdaļas:

a) *nesēju:* skābē mazgātu un silanizētu diatomītu vai citu piemērotu inerti nesēju ar šauru graudiņu lieluma diapazonu (25 µm diapazons robežās starp 125 un 200 µm) graudiņu vidējais lielums ir saistīts ar kolonnas iekšējo diametru un garumu;

b) *stacionārā fāze:* poliesteru tipa polārs šķidrums (piem., dietilēnglikola polisukcināts, butāndiols polisukcināts, etilēnglikola poliadepāts u. c.), ciānsilikonī vai cits šķidrums, kas ļauj izdarīt vajadzīgo hromatogrāfisko sadalīšanu (sk. 4. punktu). Stacionārās fāzes daudzums ir 5 līdz 20 % (masa/masa) no pakojuma. Dažu veidu sadalīšanām var izmantot nepolāru stacionāro fāzi.

3.1.3.3. Kolonnas kondicionēšana

Kolonnu, ja iespējams, atvieno no detektora, pakāpeniski uzsilda krāsni līdz 185 °C un caur tikko sagatavotu kolonnu laiž inerti gāzi ar ātrumu 20 līdz 60 ml/min. vismaz 16 stundas šajā temperatūrā un vēl divas stundas 195 °C temperatūrā.

3.1.4. Kapilārā kolonna

3.1.4.1. Caurule, izgatavota no materiāla, kas ir inerts pret analizējamām vielām (parastais stikls vai kvarcs). Iekšējais diametrs ir starp 0,2 un 0,8 mm. Iekšējo virsmu pirms pārklāšanas ar stacionāro fāzi attiecīgi apstrādā (piem., sagatavo virsmu, inaktivē). Vairumā gadījumu 25 m ir pietiekami.

▼B

- 3.1.4.2. Stacionārā fāze, parasti poliglikolu tipa (polietilenglikols 20 000), poliesteris (butāndiola polisukcināts) vai polārais polisiloksāns (ciānsilikonī). Ir piemērotas kolonnas ar ķīmiski piesaistītu stacionāro fāzi.

5. *piezīme:* pastāv iespējamība, ka polārie polisiloksāni varētu radīt grūtības linolēnskābes un skābju ar C₂₀ identificēšanā un atdalīšanā.

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

- 3.1.4.3. Kolonnas montēšana un kondicionēšana

Kapilāro kolonnu montēšanā, t. i., kolonnas ievietošanā krāsnī (atbalsts), pievienojumu montēšanā (hermētiskums), kolonnas galu ievietošanā injektorā un detektorā (nelietderīgo tilpumu samazināšana) jāievēro parastā piesardzība. Kolonnu pievieno nesējgāzes plūsmai (piem., 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.

6. *piezīme:* piemērotas, iepriekš kondicionētas, kolonnas ir pieejamas pārdošanā.

- 3.1.5. Detektors, vēlams tāds, ko var karsēt līdz temperatūrai, kas ir lielāka par kolonnas temperatūru.

3.2. Šļirce

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

3.3. Reģistrējošā iekārta

Ja reģistrējošās iekārtas līkne ir jāizmanto, lai aprēķinātu analizējamā maisījuma sastāvu, ir vajadzīga augstas precizitātes elektroniskā reģistrēšanas iekārta, kas ir saderīga ar izmantojamo aparāturu. Reģistrējošajai iekārtai ir šādas īpašības:

a) atbildes ātrums mazāks par 1,5 sek., vēlams 1 sek. (atbildes ātrums ir laiks, kas vajadzīgs pašrakstītāja spalvai, lai pārvietotos no 0 līdz 90 % pēc pēkšņas 100 % signāla izraisīšanas);

b) papīra platums vismaz 20 cm;

c) papīra ātrums regulējams starp 0,4 un 2,5 cm/min.

3.4. Integrators

Ātrus un precīzus aprēķinus var izdarīt ar elektronisko integratoru. Tam ir jādod lineāra atbilde ar pietiekamu jutību, un nulles līnijas noviržu korekcijai ir jābūt apmierinošai.

▼B**4. PROCEDŪRA**

Darbības, kas aprakstītas no 4.1. LĪDZ 4.3. punktam, attiecas uz liesmas jonizācijas detektora lietošanu.

Alternatīvi var izmantot gāzu hromatogrāfu ar katarometra detektoru (darbojas, pamatojoties uz vadītspējas izmaiņām atkarībā no temperatūras). Darba apstākļus tad maina, kā norādīts 6. punktā.

4.1. Analīzes apstākļi**4.1.1. Darba apstākļu izvēle****4.1.1.1. Pakotā kolonna**

Izvēloties analīzes apstākļus, jāņem vērā šādi mainīgie lielumi:

- a) kolonnas garums un diametrs;
- b) stacionārās fāzes īpašības un daudzums;
- c) kolonnas temperatūra;
- d) nesējgāzes plūsma;
- e) vajadzīgā izšķirtspēja;
- f) analīzes parauga lielums, ko izvēlas tā, lai detektora un elektrometra iekārta dotu lineāru atbildes reakciju;
- g) analīzes ilgums.

Parasti 1. un 2. tabulā norādītie lielumi dod vēlamos rezultātus, t. i., vismaz 2 000 teorētisko šķīvju uz kolonnas garuma metru metilstea-rātam un tā eluēšana apmēram 15 minūtēs.

Ja aparatūra ļauj, inžektora temperatūrai jābūt apmēram 200 °C un detektora temperatūrai — vienānai vai augstākai par kolonnas temperatūru.

Parasti liesmas jonizācijas detektorā padodamā ūdeņraža plūsmas ātrums pret nesējgāzes ātrumu attiecas kā 1:2 līdz 1:1 atkarībā no kolonnas diametra. Skābekļa plūsma ir aptuveni 5 līdz 10 reizi lielāka par ūdeņraža plūsmu.

1. tabula

Kolonnas iekšējais diametrs mm	Nesējgāzes plūsmas ātrums ml/min.
2	15 līdz 25
3	20 līdz 40
4	40 līdz 60

2. tabula

Stacionārās fāzes koncentrācija % (masa/masa)	Kolonnas temperatūra °C
5	175
10	180
15	185
20	185

▼ B

4.1.1.2. Kapilārā kolonna

Kapilārās kolonnas efektivitāte un caurlaidība nozīmē, ka sastāvdaļu atdalīšana un analīzes ilgums lielā mērā ir atkarīgs no nesējgāzes plūsmas ātruma kolonnā. Tādēļ ir jāoptimizē darba apstākļi, iedarbojoties uz šo parametru (vai, vienkāršāk sakot, uz kolonnas spiediena kritumu) atbilstoši tam, vai vēlas uzlabot sadalīšanu, vai ātri izdarīt analīzi.

4.1.2. Teorētisko šķīvju skaita (efektivitātes) un izšķirtspējas noteikšana (sk. 1. zīmējumu).

Izdarā analīzi metilstearāta un metiloleāta maisījumam aptuveni vienādās daļās (piemēram, kakao sviesta metilesteriem).

Kolonnas temperatūru un nesējgāzes plūsmas ātrumu izvēlas tā, lai metilstearāta pīķa maksimumu reģistrētu aptuveni 15 minūtes pēc šķīdinātāja pīķa. Izlieto pietiekamu metilesteru maisījuma daudzumu, lai metilstearāta pīķis aizņemtu apmēram trīs ceturtdaļas no visas skalas.

Teorētisko šķīvju skaitu n (efektivitāti) aprēķina pēc formulas:

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

un izšķirtspēju R aprēķina pēc formulas:

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

kur:

dr_1 ir aiztures attālums milimetros no hromatogrammas sākuma līdz metilstearāta pīķa maksimumam;

ω_1 un ω_2 ir attiecīgi metilstearāta un metiloleāta pīķu platums milimetros, kas mērīts starp līknes pārliekuma punktos novilkto tangenšu krustojšanās punktiem ar nulles līniju;

Δ ir attālums milimetros starp metilstearāta un metiloleāta pīķu maksimumiem;

▼ M2

un izšķirtspējas indekss I_r , aprēķinot pēc formulas:

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

kur:

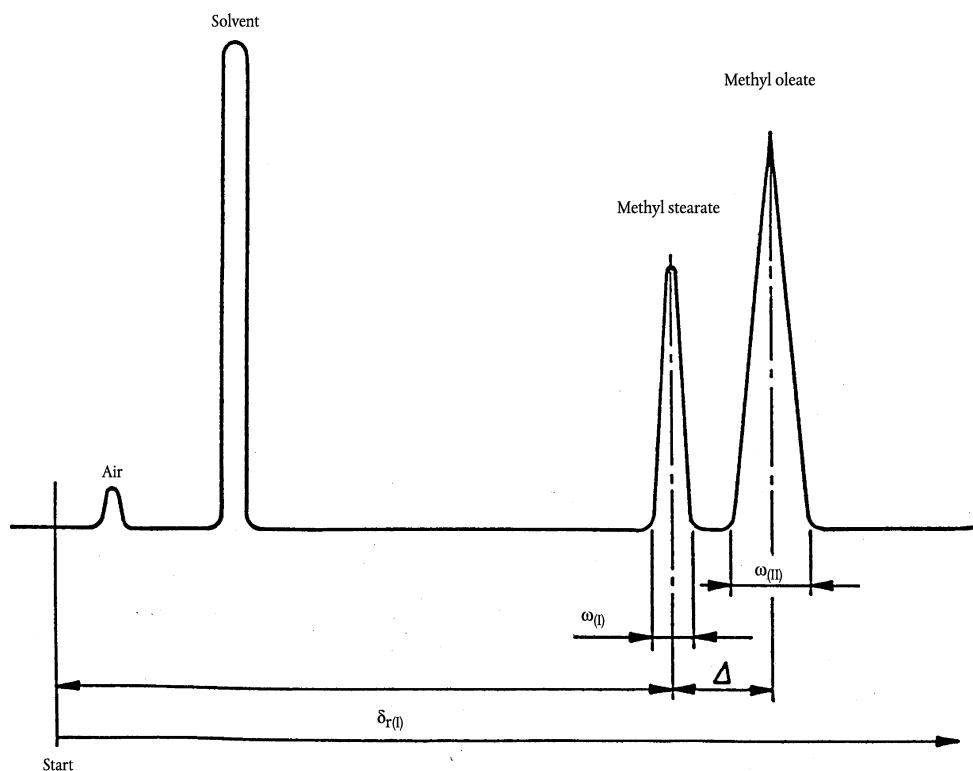
a = mazākā pīķa augstums, mērot no nulles līnijas;

b = zemākā punkta augstums minimumā starp diviem blakusesošiem pīķiem, mērot no nulles līnijas.

▼ B

1. zīmējums

Hromatogramma teorētisko šķīvju skaita (efektivitātes) un izšķirtspējas noteikšanai



Ir jāizvēlas tādi darba apstākļi, kas metilstearātam dod vismaz 2 000 teorētiskos šķīvjus uz kolonnas garuma metru un izšķirtspēju vismaz 1,25.

4.2. Analīzes paraugs

Ar šļirci (3.2. punkts) ņem 0,1 līdz 2 μ l metilesteru šķīduma, kas sagatavots saskaņā ar X B pielikumu un iešļircina to kolonnā.

Ja esteri nav šķīdumā, sagatavo 100 mg/ml šķīduma heptānā, kas ir hromatogrāfijas kvalitātes, un iešļircina 0,1 līdz 1 μ l šā šķīduma.

Ja analizē sastāvdaļas, kas ir klāt tikai zīmju daudzumos, analīzes paraugu var palielināt (līdz 10 reizēm).

4.3. Analīze

Parasti darba apstākļi ir tādi, kā definēts 4.1.1. punktā.

Tomēr ir iespējams strādāt zemākā kolonnas temperatūrā, ja ir jānosaka taukskābes ar mazāk nekā 12 oglekļa atomiem, vai augstākā temperatūrā, ja nosaka taukskābes ar vairāk nekā 20 oglekļa atomiem. Abos šajos gadījumos ir iespējams izmantot temperatūras programmēšanu. Piemēram, ja paraugs satur taukskābju metilesterus ar mazāk nekā 12 oglekļa atomiem, paraugu iešļircina 100 °C temperatūrā (vai 50 līdz 60 °C temperatūrā, ja klāt ir sviestskābe) un nekavējoties paaugstina temperatūru ar ātrumu 4 līdz 8 °C/min. līdz optimālajai. Dažos gadījumos var apvienot abas procedūras.

▼ B

Pēc programmētās sildīšanas turpina eluēšanu nemainīgā temperatūrā, līdz ir eluēti visi komponenti. Ja aparātam nav programmētas sildīšanas, to izmanto divās nemainīgās temperatūrās starp 100 un 195 °C.

Ir ieteicams vajadzības gadījumā izdarīt analīzi uz divām nekustīgajām fāzēm ar dažādu polaritāti, lai pārbaudītu, vai nav klāt maskēti pīķi, piemēram, ja vienā paraugā ir klāt konjugēti C_{18:3} un C_{20:0}, vai C_{18:3} un C_{18:2}.

4.4. **Standarthromatogrammas un standartdiagrammu pagatavošana**

Analīzē salīdzināšanas standartmaisījumu (2.3. punkts) tajos pašos darba apstākļos kā tie, kas izmantoti paraugam, un izmēra sastāvdaļu taukskābju aiztures laikus vai aiztures attālumus. Uz puslogaritmiskā diagrammu papīra katrai nepiesātinātības pakāpei izveido diagrammu, kas rāda aiztures laika vai attāluma logaritmu kā oglekļa atomu skaita funkciju. Izotermiskos apstākļos diagrammām par taisnas virknes skābēm ar vienu un to pašu nepiesātinātības pakāpi jābūt ar taisnām līnijām. Šīm līnijām jābūt aptuveni paralēlām.

Ir noteikti jāizvairās no analīzes apstākļiem, kuros pastāv “maskētie pīķi”, t.i., kuros izšķirtspēja nav pietiekama, lai sadalītu divas sastāvdaļas.

5. **REZULTĀTU IZTEIKŠANA**

5.1. **Kvalitatīvā analīze**

Metilesteru pīķus paraugā identificē no 4.4. punktā pagatavotās diagrammas, vajadzības gadījumā interpolējot.

5.2. **Kvantitatīvā analīze**

5.2.1. **Sastāva noteikšana**

Izņemot īpašus gadījumus, izmanto iekšējās normalizācijas metodi, t. i., pieņem, ka visu parauga komponentu kopums ir pārstāvēts hromatogrammā tā, ka zem pīķiem esošo laukumu kopsumma ir 100 % no sastāvdaļām (pilnīga eluēšana).

Ja iekārtai ir integrators, izmanto skaitļus, kas iegūti no tā. Ja integratora nav, nosaka zem katra pīķa esošo laukumu, reizinot pīķa augstumu ar tā platumu, kāds ir pusē no augstuma, un vajadzības gadījumā ņem vērā dažādas jutības pārslēgšanas reģistrēšanas laikā.

5.2.2. **Aprēķinu metode**

5.2.2.1. **Vispārējs gadījums**

Aprēķina dotā komponenta *i* saturu, izteiktu metilesteru masas procentos, nosakot attiecīgā pīķa laukumu procentos attiecībā pret visu pīķu laukumu summu, izmantojot šādu formulu:

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

kur:

A_i ir pīķa laukums, kas atbilst komponentam *i*;

$\sum A$ = visu pīķu laukumu summa.

▼B

Rezultātu nosaka līdz vienai zīmei aiz komata.

7. *piezīme:* šajā vispārējā gadījumā uzskata, ka uz relatīvajiem laukumiem pamatoto aprēķinu rezultāts pārstāv masas procentus. 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, ja izmanto siltumvadītspējas detektorus vai ja ir īpaši prasīta augstākā precizitātes pakāpe, ir jālieto korekcijas koeficienti, lai pīķu laukumu procentus pārvērstu komponentu masas procentos.

Korekcijas koeficientus nosaka, izmantojot hromatogrammu, kas iegūta, analizējot zināma sastāva metilesteru standartmaisījumu darba apstākļos, identiskos ar parauga analīzes apstākļiem.

Šim standartmaisījumam komponenta i masas procentus apraksta formula:

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

kur:

m_i ir komponenta i masa standartmaisījumā;

$\sum m$ ir dažādo komponentu masu summa standartmaisījumā.

No standartmaisījuma (4.4. punkts) hromatogrammas šādi aprēķina komponenta i procentus (laukums/laukums):

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

kur:

A_i ir komponentam i atbilstošā pīķa laukums,

$\sum A$ ir visu pīķu laukumu summa.

Korekcijas koeficientu aprēķina šādi:

$$K'_i = \frac{m_i \times \sum A}{A_i \times \sum m}$$

Parasti korekcijas koeficientus izsaka attiecībā pret K_{C16} , tātad relatīvie koeficienti kļūst

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

Paraugā katra komponenta i saturs, izteikts metilesteru masas procentos, ir:

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

Rezultātu nosaka līdz vienai zīmei aiz komata.

▼ B

5.2.2.3. Iekšējā standarta lietošana

Dažās analizēs (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 pieciem, 15 vai 17 oglekļa atomiem. Būtu jānosaka korekcijas koeficients (ja tāds ir) iekšējam standartam.

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

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

kur:

A_i ir komponentam *i* atbilstīgā pīķa laukums;

A_s ir iekšējam standartam atbilstīgā pīķa laukums;

K'_i ir komponenta *i* korekcijas koeficients (attiecībā pret K_{C1});

K'_s ir iekšējā standarta korekcijas koeficients (attiecībā pret K_{C16});

m ir noteikšanai ņemtā parauga masa miligramos;

m_s ir iekšējā standarta masa miligramos.

Rezultātu nosaka līdz vienai zīmei aiz komata.

▼ M26. ĪPAŠS GADĪJUMS — TAUKSKĀBJU *TRANS* — IZOMĒRU NOTEIKŠANA.

Ir iespējams noteikt *trans* — izomēru saturu taukskābēs ar oglekļa atomu skaitu no 10 līdz 24, atdalot metilesterus, izmantojot gāzu hromatogrāfijas kapilārās kolonnas ar īpatnējo polaritāti.

- 6.1. Kvarca kapilārā kolonna ar iekšējo diametru no 0,25 mm līdz 0,32 mm un garumu 50 m, pārklāta ar ciānpropisilikonu, pārklājuma kārtas biezums no 0,1 līdz 0,3 μm (veids SP 2380, *C. P. sil* 88, *silor* 10 un līdzīga veida).

▼ M21

- 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.

▼ M2

- 6.3. Kopumā gāzu hromatogrāfiju veic šādos apstākļos:

— kolonnas temperatūra noregulēta no 150 °C līdz 230 °C (piemēram, 165 °C uz 15 minūtēm, tad, pieaugot par 5 °C minūtē, sasniedz 200 °C),

— inžektora temperatūra: 250 °C, ja lieto sadales sistēmu, vai sākotnējā temperatūra, ja lieto “virs kolonnas” sistēmu,

▼ **M2**

— detektora temperatūra: 260 °C,

— nesējgāzes (hēlijs un ūdeņradis) plūsmas ātrums: 1,2 ml minūtē.

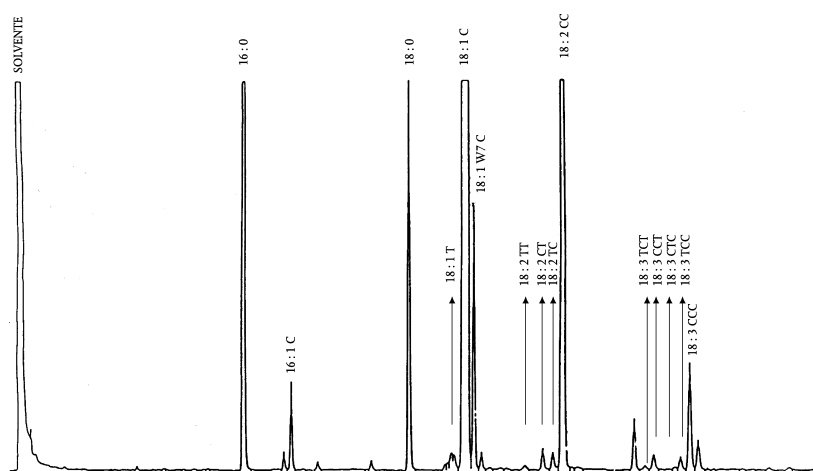
Ievadītajam daudzumam jābūt tādām, lai izmantotajos jutīguma apstākļos tā pīķa augstums, kas atbilst arahīnskābes metilesteram, būtu vienāds ar 20 % no skalas apakšas vai lielāks.

- 6.4. Dažādo metilesteru identifikāciju veic, salīdzinot izdalīšanās laikus ar standarta maisījumu izdalīšanās laikiem (kā norādīts 2.3. punktā).

Trans taukskābju esterus eluē pirms atbilstošajiem *cis* — izomēriem. Hromatogrammas piemērs ir sniegts 2. attēlā.

2. attēls

Taukskābes trans – izomēru gāzu hromatogramma, izmantojot kapilāro kolonnu



- 6.5. Kolonnas efektivitātei, kas noteikta saskaņā ar 4.1.2. punktu, jābūt tādai, lai varētu atdalīt noteiktus kritiskos pārus, piemēram, pāri, ko veido *trans* — oleīnskābju masīvs un oleīnskābes pīķis, *trans* C18:1/*cis* C18:1, ar izšķirtspējas indeksu lielāku par 2.

- 6.6. Dažādo *trans* taukskābju procentuālo samēru aprēķina, ņemot vērā attiecību starp konkrētā pīķa virsmu un visu esošo pīķu virsmu summu.

Ņem vērā:

— *trans* oktadeci- skābju (T 18: 1), kas norādītas šīs regulas I pielikumā, kā transoleīnskābes izomēru summu,

— *cis–trans* un *trans–cis* oktadekadiēn-skābju ((CT/TC) 18: 2), kas norādītas šīs regulas I pielikumā, kā translinolskābes izomēru summu,

— *trans–cis–trans*, *cis–cis–trans*, *cis–trans–cis*, *trans–cis–cis* oktadekatriēn-skābju ((TCT + CCT + CTC + TCC) 18: 3), kas norādītas šīs regulas I pielikumā, kā translinolēnskābes izomēru summu

procentuālo daudzumu.

▼ **M2**

8. *piezīme:* Ņemot vērā šīs metodes raksturīgās īpatnības, vēlams izteikt rezultātus ar 2 decimālzīmēm aiz komata.

▼ **B**

7. ĪPAŠS GADĪJUMS — KATAROMETRA DETEKTORA IZMANTOŠANA (DETEKTORS DARBOJAS PĒC SILTUMA VADĪTSPĒJAS IZMAIŅU PRINCIPA)

Taukskābju metilesteru maisījuma kvalitatīvā un kvantitatīvā sastāva noteikšanai var izmantot arī gāzu hromatogrāfu ar detektoru, kura darbības pamatā ir siltuma vadītspējas izmaiņas (katarometrs). Ja to izmanto, 3. un 4. punktā norādītos nosacījumus ir jāmaina, kā parādīts 3. tabulā.

Kvantitatīvajā analīzē izmanto korekcijas koeficientus, kas norādīti 5.2.2.2. punktā.

3. tabula

Mainīgais	Lielumu nosacījumi
Kolonna	Garums: 2 līdz 4 m Iekšējais diametrs: 4 mm
Nesējs	Graudiņu lielums starp 160 un 200 μm
stacionārās fāzes koncentrācija	15 līdz 25 % (masa/masa)
Nesējgāze	hēlijs vai, ja tā nav, ūdeņradis ar iespējami mazu skābekļa saturu
Palīgģāze	nav vajadzīga
inžektora temperatūra	no 40 līdz 60 °C virs kolonnas temperatūras
kolonnas temperatūra	180 līdz 200 °C
nesējgāzes plūsma	parasti starp 60 un 80 ml/min.
iešļircinātā analīzes parauga lielums	parasti starp 0,5 un 2 μl

8. ANALĪZES PROTOKOLS

Analīzes protokolā norāda metilesteru pagatavošanai un hromatogrāfijai lietotās metodes un iegūtos rezultātus. Tur norāda arī visus datus par darbu, kas nav norādīti šajā starptautiskajā standartā vai tiek uzskatīti par neobligātiem, kā arī datus par nejaušībām, kas varētu būt ietekmējušas rezultātus.

Analīzes protokols ietver visu informāciju, kas vajadzīga parauga pilnīgai identificēšanai.

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

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

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

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

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

(a) determination of difference between actual and theoretical content of triglycerides with ECN42 (Δ ECN42):

— method A will be applied to samples of all the oil categories after purification of the oil by passing it through a silica gel column;

(b) determination of the fatty acid composition:

— method A will be applied directly to samples of the following oil categories:

- virgin olive oils with an acidity of less than 3,3 %,
- refined olive oil,
- olive oil (blend of virgin olive oils and refined olive oil),
- refined olive-pomace oil,
- olive-pomace oil (blend of virgin olive oils and refined olive-pomace oil);

— method B will be applied directly to samples of the following oil categories:

- virgin olive oil with an acidity of more than 3,3 %,
- crude olive-pomace oil;

(c) determination of trans-isomers of fatty acids:

— method A will be applied directly to samples of the following oil categories:

- virgin olive oils with an acidity of less than 3,3 %,
- refined olive oil,
- olive oil (blend of virgin olive oils and refined olive oil),
- refined olive-pomace oil,
- olive-pomace oil (blend of virgin olive oils and refined olive-pomace oil);

— method A will be applied to the following categories of oils after purification of the oil by passing it through a silica gel column:

- virgin olive oil with an acidity of more than 3,3 %,
- crude olive-pomace oil.

▼ **M19****PURIFICATION OF OIL SAMPLES**

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

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

METHODS FOR PREPARING THE FATTY ACID METHYL ESTERS1. ***Method A: Trans-esterification with cold methanolic solution of potassium hydroxide***1.1. **Purpose**

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

1.2. **Principle**

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

1.3. **Reagents**

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

Heptane, chromatographic quality.

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

1.4. **Apparatus**

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

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

1.5. **Procedure**

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

▼ M19**2. *Method B: Methylation by heating with sodium methylate in methanol followed by esterification in acid medium*****2.1. Purpose**

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

2.2. Principle

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

2.3. Reagents

- heptane, chromatographic quality,
- methanol containing not more than 0,05 % (m/m) water,
- sodium methylate, 0,2 N methanolic solution: dissolve 5 g of sodium in 1 000 ml of methanol (this may be prepared from commercial solutions),
- phenolphthalein, 0,2 % methanolic solution,
- sulphuric acid, 1 N in methanolic solution: add 3 ml of 96 % sulphuric acid to 100 ml of methanol,
- saturated solution of sodium chloride in water.

2.4. Apparatus

- 50 ml flat-bottomed volumetric flask with long, narrow, ground neck,
- reflux condenser: air condenser (1 m long) with ground joint appropriate to the neck of the flask,
- boiling chips,
- glass funnel.

2.5. Procedure

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

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

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

▼ M19**2.6. Alternatives to methylation Method B****2.6.1. Method C****2.6.1.1. Principle**

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

2.6.1.2. Apparatus

— Strong glass vial of a capacity of about 5 ml (height 40 to 45 mm, diameter 14 to 16 mm).

— 1 and 2 ml graduated pipettes.

2.6.1.3. Reagents

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

Hexane, chromatographic quality.

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

2.6.1.4. Procedure

— Place in the glass vial 0,2 g of the fatty matter, which has previously been dried out on sodium sulphate and filtered, and 2 ml of hydrochloric acid-methanol solution. Heat seal the vial.

— Immerse the vial at 100 °C for 40 minutes.

— Cool the vial under running water, open, add 2 ml of distilled water and 1 ml of hexane.

— Centrifuge and remove the hexane phase, which is ready for use.

2.6.2. Method D**2.6.2.1. Principle**

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

2.6.2.2. Apparatus

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

▼ M19

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

2.6.2.3. Reagents

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

2.6.2.4. Procedure

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

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

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

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

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

3. Precision parameters

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

RECOMMENDATIONS FOR GAS CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF THE FATTY ACID ESTERS FROM OLIVE OIL AND OLIVE-POMACE OIL**1. Procedure**

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

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

2. Calculations**2.1. For the calculation of the fatty acid composition and ΔECN_{42} , all the following fatty acids will be taken into account:**

Myristic (C14:0).

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

▼ M19

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

Margaric (C17:0).

Margaroleic (C17:1).

Stearic (C18:0).

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

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

Arachidic (C20:0).

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

Eicosenoic (C20:1).

Behenic (C22:0).

Lignoceric (C24:0).

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

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

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

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

▼ M19

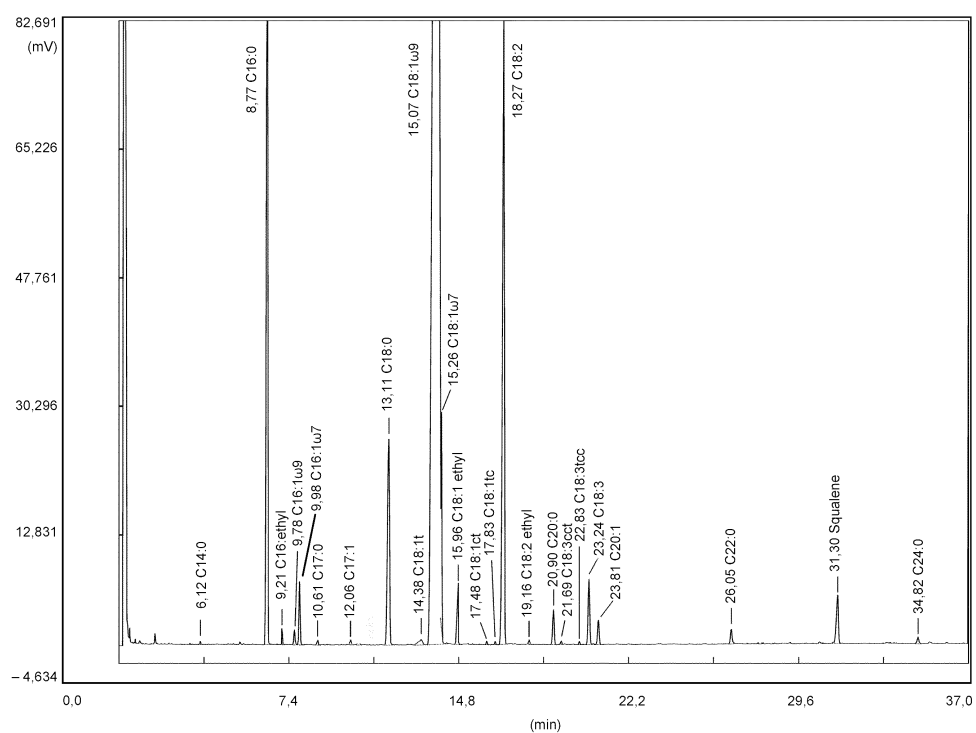


Figure 1: Gas chromatographic profile obtained by the cold methylation method from olive-pomace oil. The chromatographic peaks correspond to the methyl and ethyl esters except where otherwise indicated.



XI 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 termostātā, 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****1. MĒRĶIS UN PIEMĒROŠANAS JOMA**

Šīs starptautiskās metodes mērķis ir noteikt kārtību, kādā novērtē organoleptiskās īpašības neapstrādātai olīveļļai Regulas (EK) Nr. 1234/2007 XVI pielikuma 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 neapstrādātu olīveļļu un šādas eļļas klasificēšanu vai marķēšanu atkarībā no konstatēto defektu un augļainuma intensitātes, ko nosaka atlasītu, kvalificētu un uzraudzītu degustētāju grupa jeb žūrija.

Turklāt šajā metodē ir paredzēti norādījumi attiecībā uz fakultatīvo marķējumu.

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

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/dulķes: 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.

3.2. Citas negatīvās pazīmes

Pārkarsēšana vai raksturīga eļļas buķete, ko rada pārlietu stipra un/vai ilgstoša sildīšana

Piedegums: ieguves laikā, jo īpaši olīvu pastas termomaisīšanas gadījumā, ja to veic nepiemērotos temperatūras apstākļos.

Siens/koksne: buķete, kas raksturīga dažām eļļām, kuras iegūtas no sažu-
vušām olīvām.

▼ **M26**

Raupjums: biežuma un mīklveidīguma sajūta, kas rodas, pagaršojot dažas vecas eļļas.

Smēreļļas: buķete, kas atgādina dīzeļdegvielu, ziezeļļas vai minerāleļļu.

Izspaidu ūdens: buķete, kas raksturo eļļu, kura pārāk ilgi bijusi saskarē ar izspaidu ūdeni, kurā notikusi rūgšana.

Sālījums: buķete, kas raksturo no sāls šķīdumā iekonservētām olīvām iegūtu eļļu.

Metāls: metālu atgādinoša buķete. Pārsvarā raksturīga eļļām, kas drupināšanas, maisīšanas, spiešanas vai glabāšanas laikā ilgstoši bijušas saskarē ar metāla virsmām.

Esparto: 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.

Kāpuri: tādu eļļu buķete, kas iegūtas no olīvām, kuras stipri bojājuši olīvu mušu (*Bactrocera oleae*) kāpuri.

Gurķi: raksturīga buķete, kas rodas, eļļu pārāk ilgi glabājot hermētiski noslēgtos traukos, jo īpaši skārda tvertnēs, kā dēļ veidojas 2,6-nonadienāls.

3.3. Pozitīvās pazīmes

Augļainums: 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.

Rūgtums: pamatgarša, kas raksturīga eļļām, kuras iegūtas no zaļām vai pusgatavām olīvām. Rūgto garšu nosaka ar valnīšveida garšas kārpīņām, kuras atrodas uz robežas starp mēles sakni un ķermeni.

Pikantums: kņudinoša sajūta, ko parasti rada eļļas, kuras iegūtas sezonas sākumā un – visbiežāk – no olīvām, kas vēl ir zaļas. Pikantumu var sajūt visā mutes dobumā, jo īpaši rīklē.

3.4. Fakultatīvs terminu lietojums marķējumā

Žūrijas priekšsēdētājs pēc pieprasījuma var apliecināt to, ka novērtētā eļļa atbilst definīcijām un intervāliem, kurus raksturo ar turpmāk norādītajiem īpašības vārdiem, ņemot vērā attiecīgo pazīmju intensitāti un noteikšanu.

Pozitīvās pazīmes (augļainums, rūgtums un pikantums). Atbilstīgi garšas intensitātei:

— *intensīva*, ja attiecīgās pazīmes mediāna pārsniedz 6;

— *vidēja*, ja attiecīgās pazīmes mediāna ir no 3 līdz 6;

— *viegla*, ja attiecīgās pazīmes mediāna ir mazāka par 3.

Augļainums: no olīvu šķirnes atkarīgs aromātu kopums, kas raksturīgs eļļām, kuras iegūtas no nebojātiem, svaigiem augļiem, kur nav ne zaļo, ne gatavo augļu pārsvars. Tas ir uztverams tieši un/vai retronazāli.

Zaļu augļu garša: 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.

▼ **M26**

Gatavu augļu garša: 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.

Sabalansēta garša: eļļa, kuras garša nav nesabalansēta, proti, pagaršojot eļļu, nerodas tāda ožas, garšas un taustes sajūta, kurā rūgtuma un/vai pikantuma pazīmes mediāna ir par diviem punktiem lielāka par augļainuma mediānu.

Maiga eļļa: eļļa, kuras rūgtuma un pikantuma pazīmes mediāna ir 2 vai mazāka.

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 $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
- 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 sausiniem;
- glāzei ūdens apkārtējās vides temperatūrā;
- lapai ar vispārīgajiem noteikumiem, kas uzskaitīti 8.4. un 9.1.1. iedaļā;
- sļaujamtraukiem.

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 atlases, 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).

▼ **M26**

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 analīzē nepastrādātu olīveļļu, lai noskaidrotu, vai žūrija pienācīgi darbojas.

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.

7.2. **Degustētāji**

Cilvēkiem, kas kā degustētāji piedalās olīveļļu organoleptiskajos testos, tas jā dara brīvprātīgi, rēķinoties ar visām šādas brīvprātīgas rīcības sekām saistībā ar pienākumiem un finansiālas atbildības neesību. 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 jādarbojas kā faktiskiem sensoriskajiem novērotājiem, neņemot vērā savas 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 aizvietotu 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 pulksteņstiklu.

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 $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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".

Degustācijas telpas temperatūrai jābūt $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (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;

▼ **M26**

— 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

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 ievelkot elpu, lai novērtētu eļļu. Smaržošana nedrīkst pārsniegt 30 sekundes. Ja šajā laikā nav izdarīti nekādi secinājumi, pirms nākamā mēģinājuma viņi neilgu laiku atpūšas.

Kad ožas tests ir paveikts, degustētāji novērtē mutes izjūtas (vispārējās retronazālās, garšas un taustes izjūtas). Šim nolūkam viņi iemalko aptuveni 3 ml eļļas. Ir ļoti svarīgi izplatīt eļļu visā mutes dobumā no mutes priekšējās daļas, mēles, mutes malām un aizmugurējās daļas līdz aukslējām un rīklei, jo, kā ir zināms, garšu un taustes izjūtu intensitāte atšķiras atkarībā no mēles, aukslēju un rīkles zonas.

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

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

Jāņem vērā pikantuma iedarbība uz taustes sajūtām. Šim nolūkam ir ieteicams eļļu norīt.

9.1.2. Veicot neapstrādātas olīveļļas organoleptisko novērtējumu, ir ieteicams katrā testēšanas sesijā novērtēt ne vairāk kā ČETRUS PARAUGUS 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 splaujamtraukā. Pēc tam muti izskalo ar nelielu daudzumu istabas temperatūras ūdens. Starp vienas sesijas beigām un nākamās sākumam jāpaiet vismaz 15 minūtēm.

▼ **M26****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.

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

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. iedaļu 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 izseina atbilstīgo klasifikāciju.

Klasifikācijas 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 atkārtotāmības indeksu un novirzes indeksu, lai pārbaudītu žūrijas darbības rezultātus (IOC/T.20/Doc. Nr. 14, 6. nodaļa).

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 intervāliem. Intervālu robežas ir noteiktas, ņemot vērā metodes kļūdu, un tāpēc tiek uzskatītas par absolūtām. Attiecīgs programmatūras nodrošinājums ļauj iedalījumu šķirās attēlot statistikas datu tabulas vai grafika veidā.

(a) Neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa: defektu mediāna ir 0, augļainuma mediāna ir lielāka par 0.

⁽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**

(b) Neapstrādāta olīveļļa: defektu mediāna ir lielāka par 0, bet nav lielāka par 3,5, augļainuma mediāna ir lielāka par 0.

(c) Spīdīgā olīveļļa: defektu mediāna ir lielāka par 3,5, vai arī defektu mediāna ir mazāka par vai vienāda ar 3,5 un augļainuma mediāna ir 0.

1. *piezīme.*

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

1. *attēls***PROFILA LAPA NEAPSTRĀDĀTAI OLĪVEĻĻAI**

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 ☐ Sālījums ☐ Pārkarsēšana vai piedegums ☐ Izspaidu ūdens ☐ Esparto ☐ Gurķi ☐ Smēreļļas ☐	

(*) *Lieko svītrot*

Konstatēto pozitīvo pazīmju intensitāte		
Augļainums		
	Zaļi augļi ☐	Gatavi augļi ☐
Rūgtums		
Pikantums		
Degustētāja vārds, uzvārds:		Degustētāja kods:
Parauga kods:	Paraksts:	

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

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

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 (procentiļu 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 jāpārliciecinās 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 reižu. 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 termostātējams 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 aparātam un visu kopā novieto uz vannas, ko silda ar elektrisko strāvu. Sildīšanas ātrumu noregulē tā, lai attēces 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 straumē, 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,
 m₀ = analīzes parauga masa gramos,
 m₁ = 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, šē 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 skaitlis	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 tumsā. Veisa reaktīvam neizmanto mutes pipeti.

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

Kolbas ar paraugiem, kuru joda skaitlis ir zem 150, vienu stundu atstāj tumsā; kolbas ar paraugiem, kuru joda skaitlis ir virs 150, un polimerizētiem produktiem vai ievērojamā mērā oksidētiem produktiem atstāj tumsā 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

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

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 olīvēļļā 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 (olīvēļļas, olīvu atlikumu eļļas, saulespuķu eļļas, palmu eļļas utt.) klātbūtni neapstrādātā olīvēļļā, 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 mikrošķirce gāzu hromatogrāfijai ar nemaināmu adatu.
- 4.10. Elektriskais sildīšanas apvalks vai elektriskā plītiņa.

▼M11**5. REAGENTI**

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

- 5.1. Heksāns vai alkānu maisījums ar virš. p. starp 65 un 70 °C, destilējot ar rektifikācijas kolonnu.

2. piezīme:

Šķīdinātājam jābūt destilētam, lai atbrīvotos no piemaisījumiem.

- 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 stāvēt 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 pīkiem, kas pārklājas, silikagēls ir jāapstrādā, kā minēts iepriekš. Alternatīva ir lietot ekstra tīru silikagēlu 60 (Merck, Nr. 7754).

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

- 5.7. Holesta-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 iztecina 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 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 jāneregulē 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 analīzē pīķi nepārklājas, ja GH apstākļi ir neregulēti, 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 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 dzišānu,
- 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

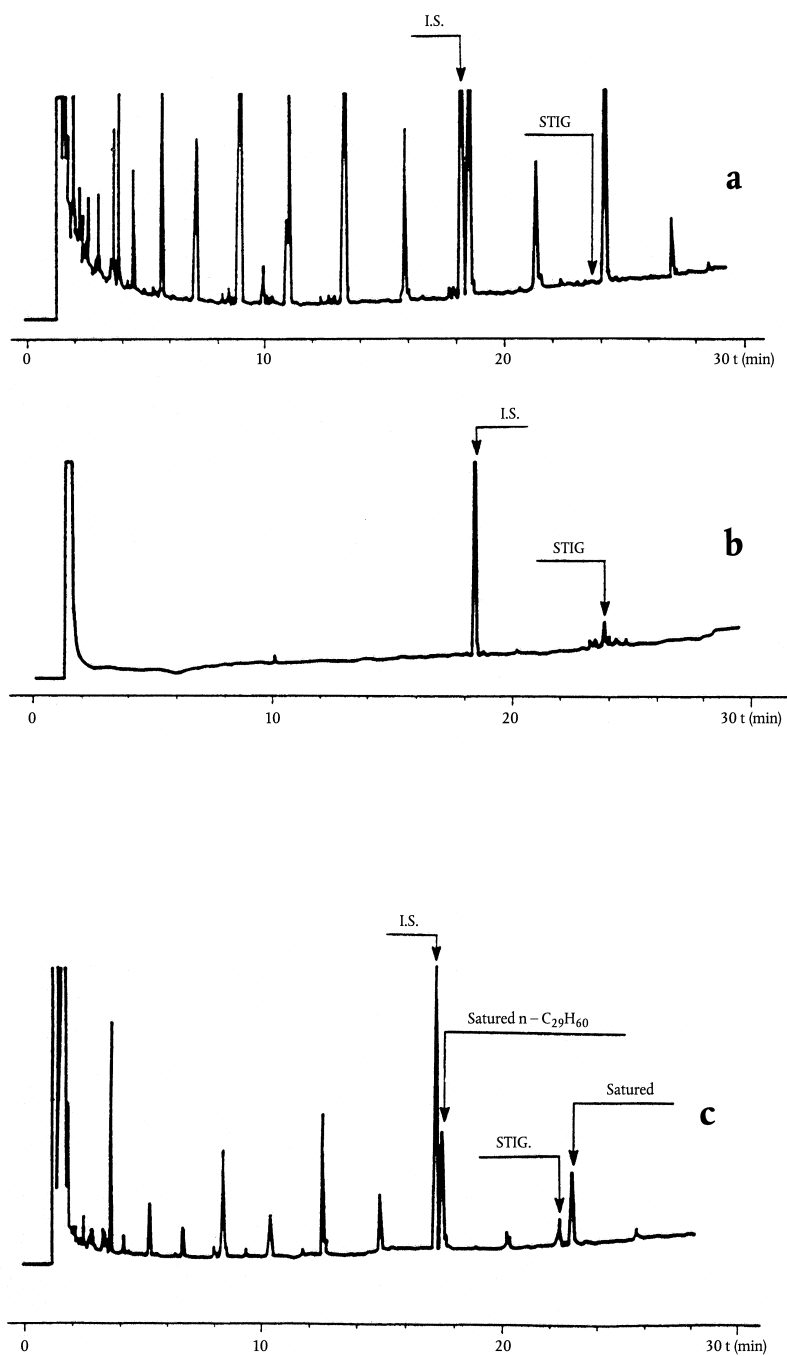
Stigmastadiēnu saturu nosaka saskaņā ar formulu:

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

▼ 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.

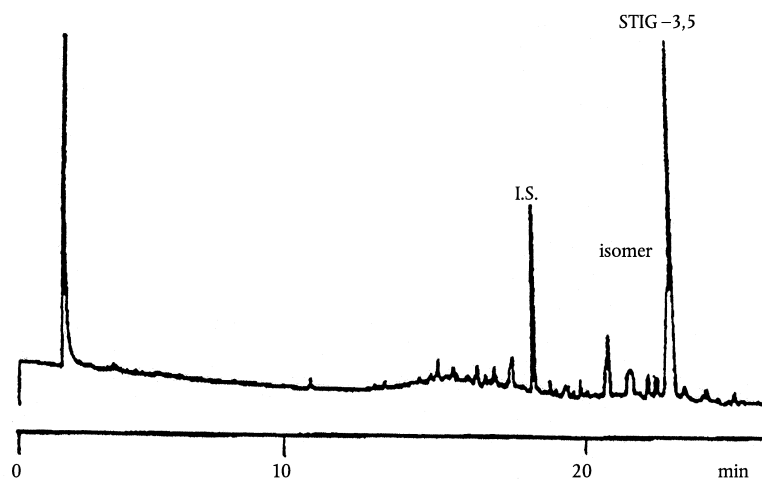
Noteikšanas robeža: ap 0,01 mg/kg.

▼ **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

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

**2. zīmējums**

Gāzu hromatogramma, iegūta rafinētas olīveļļas 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 (ECN_{42_HPLC}), kas iegūtas, nosakot tos eļļā ar augstas efektivitātes šķidruma 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 sēklu 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 šķidruma hromatogrāfiju (GLC)), noteiktās robežās atbilst tīrām olīveļļām. Starpība, kas ir lielāka par katram eļļas veidam pieņemto vērtību, liecina, ka eļļai ir sēklu 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 šķidruma hromatogrāfs ar kolonnas temperatūras regulēšanu.

4.1.11. Inžektori 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.

4.2.1. Hromatogrāfijai paredzēts petrolejas ēteris ar viršanas temperatūru 40 līdz 60 °C vai heksāns.

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 jākorrigē 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 (tripalmīnu, 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.

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 nelielu 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.

Savākto 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 smaīļu laukumu summa ir vienāda ar 100 %.

Katra triglicerīda relatīvos procentus aprēķina, izmantojot formulu:

$\% \text{ triglicerīda} = \text{smaīles laukums} \times 100 / \text{smaīļu laukumu summa}$.

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 METODES 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 Taukskābes 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

SLnLn 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)

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

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

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

0,00761 mol PPLn

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

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

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

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 $RT^1 = RT - RT \text{ šķīd.}$

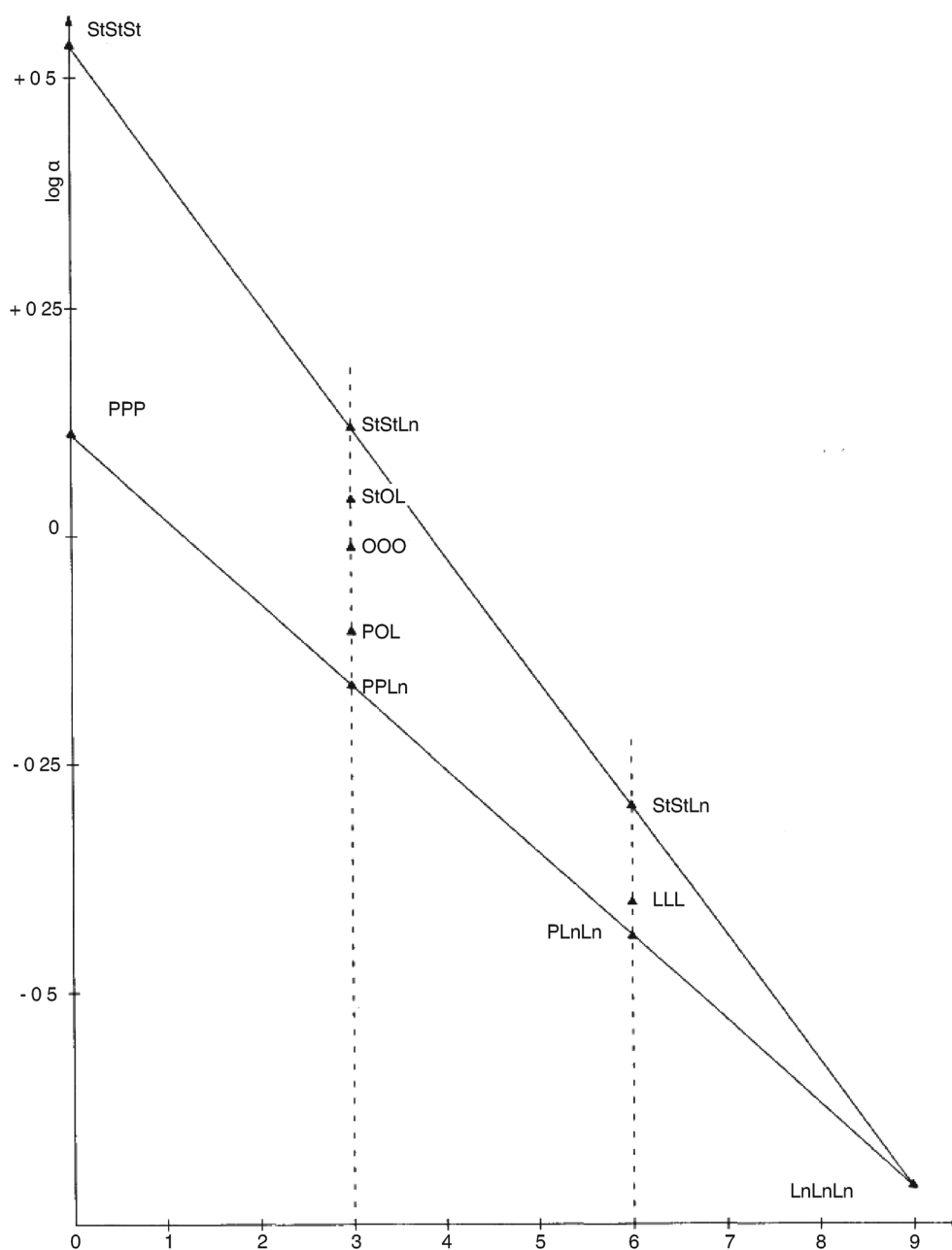
Izmantojot log α diagrammu attiecībā pret f (divkāršo saišu skaitu), var noteikt aizturlaikus visiem to taukskābju triglicerīdiem, kuras satur standarttriglicerīdus – sk. 1. zīmējumu.

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 $\log \alpha$ pret f (divkāršo saišu skaits)

Divkāršo saišu skaits

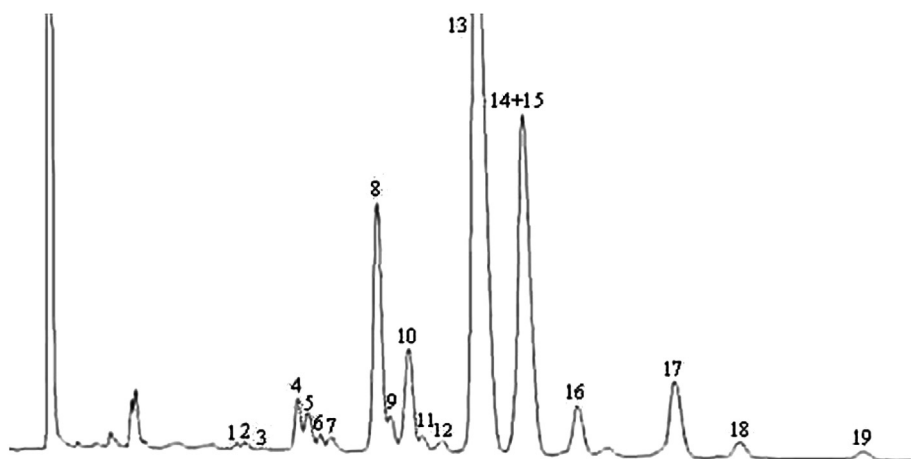
La: laurīnskābe; My: miristīnskābe; P: palmīfīnskābe; S: stearīnskābe; O: oleīnskābe; L: linolskābe;
Ln: linolēnskābe.

▼ M25

2. attēls

Olīveļļa ar zemu linolskābes saturu

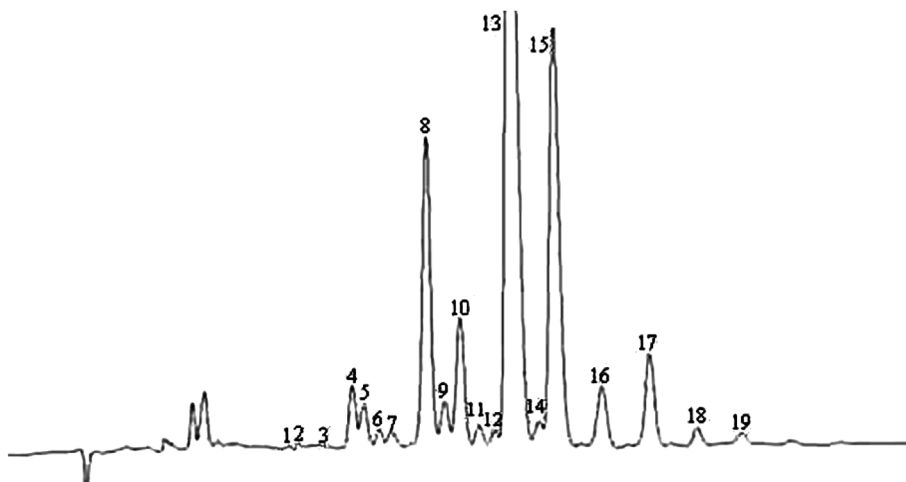
a)



Šķīdinātājs: acetons/acetonitrils.

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.

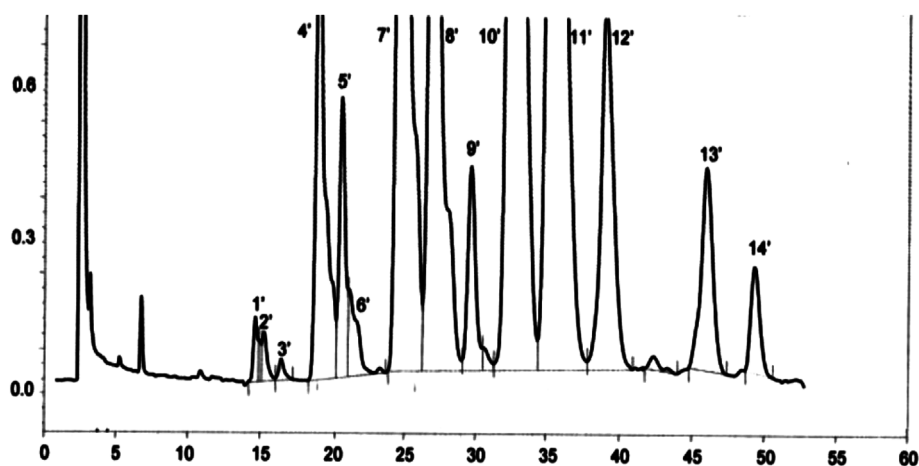
PROFILS b: Hromatogrāfisko smaiļu galvenie komponenti: **ECN42**: (1) LLL; (2) OLLn + PoLL; (3) PLLn; **ECN44**: (4) OLL; (5) OOLn + PoOL; (6) PLL + PoPoO; (7) POLn + PPoPo + PPol; **ECN46**: (8) OOL + LnPP; (9) PoOO; (10) SLL + PLO; (11) PoOP + SPoL + SOLn + SPoPo; (12) PLP; **ECN48**: (13) OOO + PoPP;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

▼ M25

3. attēls

Olīveļļa ar augstu linolskābes saturu

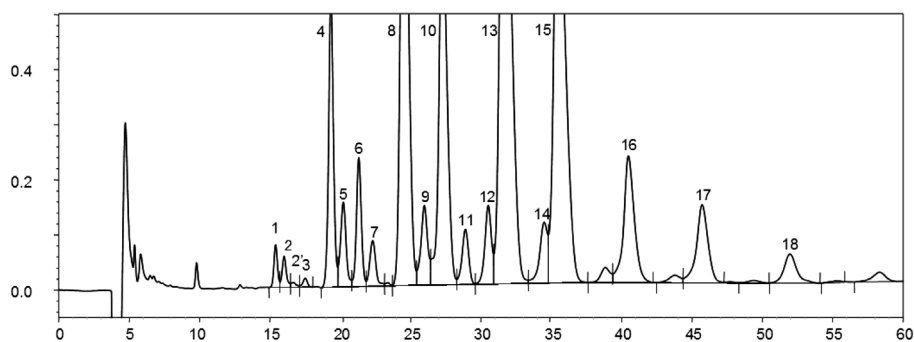
a)



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.

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

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

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

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

3. EQUIPMENT

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

▼ M19**4. REAGENTS**

- 4.1. Potassium hydroxide, approximately 2 N ethanolic solution: 130 g potassium hydroxide (minimum concentration 85 %) is dissolved, with cooling, in 200 ml distilled water and then made up to one litre with ethanol. The solution should be stored in a well-stoppered opaque glass bottle.
- 4.2. Ethyl ether, pure for analysis.
- 4.3. Anhydrous sodium sulphate, analytical purity.
- 4.4. Glass plates coated with silica gel, without fluorescence indicator, thickness 0,25 mm (commercially available ready for use).
- 4.5. Potassium hydroxide, approximately 0,2 N ethanolic solution; 13 g of potassium hydroxide are dissolved in 20 ml of distilled water and made up to one litre with ethanol.
- 4.6. Benzene, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.7. Acetone, for chromatography (See 5.2.2).
- 4.8. Hexane, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.9. Ethyl ether, for chromatography (see 5.2.2).
- 4.10. Chloroform, for chromatography.
- 4.11. Reference solution for thin-layer chromatography: cholesterol or phytosterols, 5 % solution in chloroform.
- 4.12. 0,2 % solution of 2', 7'-dichlorofluorescein in ethanol. Make slightly basic by adding a few drops of 2 N alcoholic potassium hydroxide solution.
- 4.13. Anhydrous pyridine, for chromatography.
- 4.14. Hexamethyl disilazane.
- 4.15. Trimethylchlorosilane.
- 4.16. Standard solutions of trimethylsilyl ethers of aliphatic alcohols from C₂₀ to C₂₈. They may be prepared from mixtures of pure alcohols at the time they are required for use.
- 4.17. A 0,1 % (m/v) solution of 1-eicosanol in chloroform (internal standard).
- 4.18. Carrier gas: hydrogen or helium, gas-chromatographic purity.
- 4.19. Auxiliary gas: nitrogen, gas-chromatographic purity.

5. PROCEDURE**5.1. Preparation of the unsaponifiables**

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

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

▼ M19

5.1.2. Add 50 ml of 2 N potassium hydroxide ethanolic solution, fit the reflux condenser and heat the apparatus to slight boiling on a steam bath, stirring continuously throughout the heating process until saponification has taken place (the solution becomes clear). Continue heating for a further 20 minutes and then add 50 ml of distilled water through the condenser. The condenser is then disconnected and the flask cooled to approximately 30 °C.

5.1.3. The contents of the flask are quantitatively transferred to a separating funnel of 500 ml capacity by adding distilled water several times, using a total of around 50 ml distilled water. Add approximately 80 ml of ethyl ether, shake vigorously for approximately 30 seconds and allow to settle (Note 1).

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

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

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

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

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

5.2. Separation of alcoholic fractions

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

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

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

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

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

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

▼ M19

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

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

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

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

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

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

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

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

5.3. Preparation of the trimethylsilyl ethers

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

▼M19

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

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

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

5.4. **Gas chromatography analysis**

5.4.1. Preliminary operations, column packing

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

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

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

5.4.2. Choice of operating conditions

- 5.4.2.1. The guideline operating conditions are as follows:

- column temperature: the initial isotherm is set at 180 °C for eight minutes and then programmed at 5 °C/minute to 260 °C and a further 15 minutes at 260 °C,
- temperature of evaporator: 280 °C,
- temperature of detector: 290 °C,
- linear velocity of carrier gas: helium 20 to 35 cm/s, hydrogen 30 to 50 cm/s,
- splitting ratio: 1:50 to 1:100,
- sensitivity of instrument: 4 to 16 times the minimum attenuation,

▼M19

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

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

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

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

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

5.4.3. Analytical procedure

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

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

5.4.4. Peak identification

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

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

5.4.5. Quantitative evaluation

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

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

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

where:

A_x = area of the alcohol peak x

A_s = area of 1-eicosanol

m_s = mass of 1-eicosanol in milligrams

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

6. EXPRESSION OF THE RESULTS

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

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

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

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

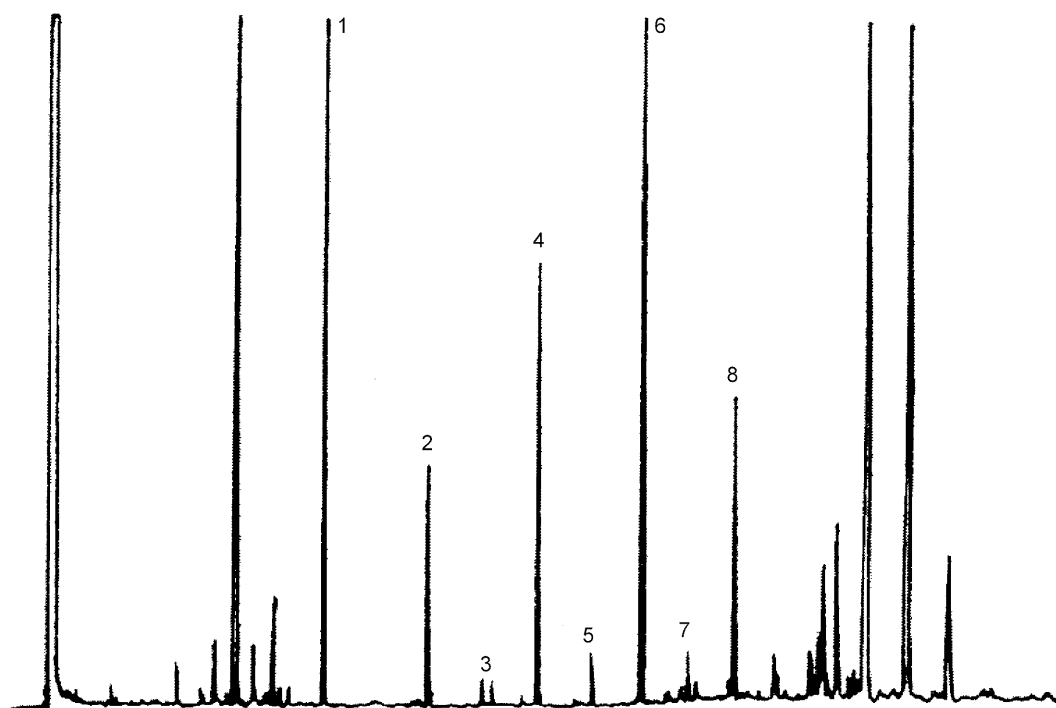


Figure 1 — Chromatogram of the alcoholic fraction of virgin oil

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

▼ **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 olīvēļļās. Vaskus un alkilesterus sadala pēc oglekļa atomu skaita to molekulās. Metodi ieteicams izmantot olīvēļļas atšķiršanai no olīvu izspaidu eļļas, kā arī par neapstrādātas augstākā labuma olīvēļļas kvalitātes parametru, kas dod iespējas konstatēt neapstrādātas augstākā labuma olīvēļļas viltojumus, kuros tā ir maisījumos ar zemākas kvalitātes neapstrādātu olīvēļļu, spīdīgās olīvēļļas 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** šķidruma 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-integrators** (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. Analītiskie 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.

- 4.2. **n-heksāns**, hromatogrāfijai vai ķīmiski tīrs (tīrība jāpārbauda).

UZMANĪBU – 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. Ieelpojot ļoti kaitīgs, var radīt nervu šūnu bojājumus. Neieelpot tvaikus. Ja vajadzīgs, lietot piemērotus elpošanas aparātus. Nepieļaut nokļūšanu acīs vai saskari ar bojātu ādu

- 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) (iekšējais standarts vasku noteikšanai).

3. *piezīme*. Var lietot arī palmitilpalmitātu, miristilsteāratu vai arahidillau-reātu.

- 4.6. **Metilheptadekanoāta standartšķīdums** heptānā, 0,02 % (m/V) (iekšējais 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 nemarķētus 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 nemarķētus 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 pašai aizdegšanās 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 nemarķētus 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 svariem (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 aparāturu darba režīmā (regulē gāzes plūsmu, iedezgāz, pievieno elektronisko pašrakstītāju (3.3.4.), noregulē kolonnas krāšņs 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 dreifis.

Negatīvs taisnlīnijas dreifis liecina, ka kolonnas savienojumi nav pareizi, savukārt pozitīvs dreifis 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);7

▼ **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 inžekcijas 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 C_{40} līdz C_{46} alifātiskajiem esteriem.

Vasku kopējo saturu mg/kg eļļas nosaka, saskaitot visu atsevišķo vasku saturu:

$$\text{Vaski, mg/kg} = \frac{(\Sigma A_x) \cdot m_s \cdot 1\,000}{A_s \cdot m}$$

▼ M23

kur

A_x = attiecīgajam esterim atbilstošā signāla laukums, skaitītāja vienībās,

A_s = iekšējam standartam laurilarahidātam 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.

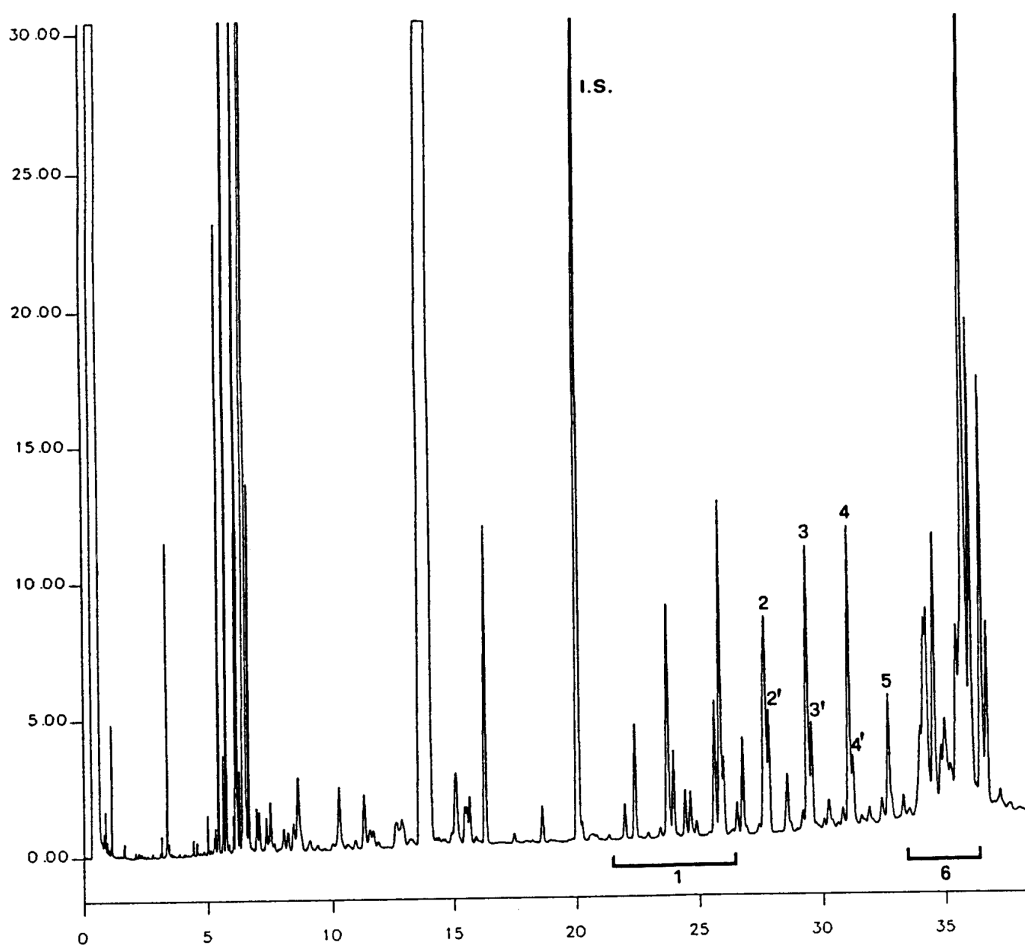
Rezultātus izsaka, noapaļojot līdz vienam mg/kg.

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

I. attēls

Olivēļas 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

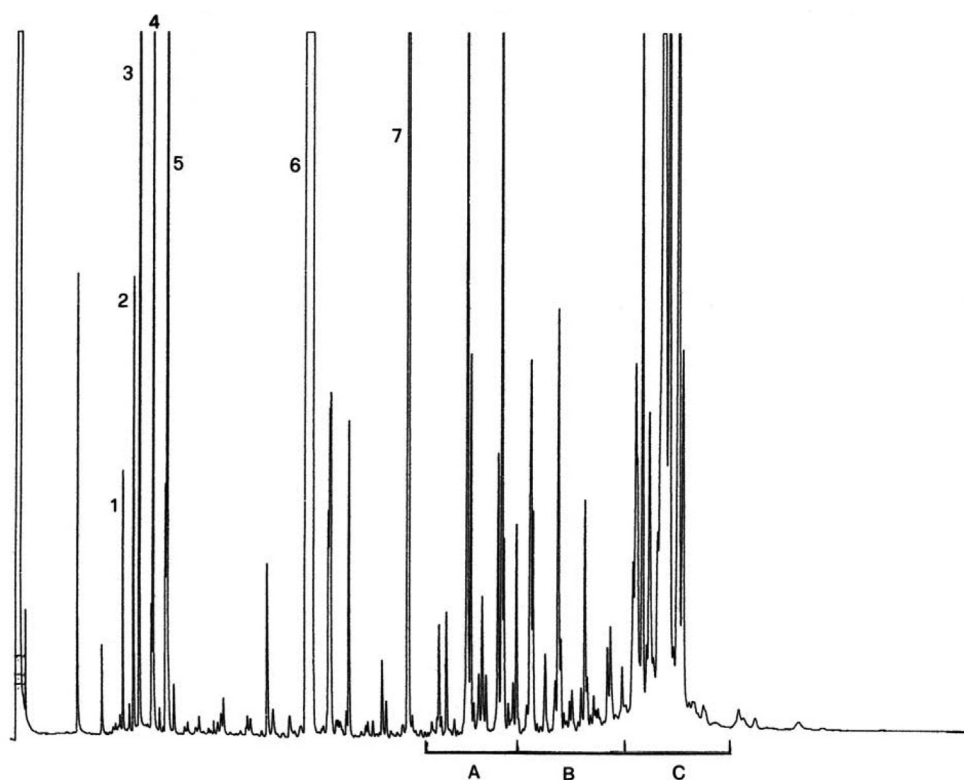
6 = Sterīna esteri un triterpēnspirīti

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

▼ **M23**

2. attēls

Neapstrādātas olīveļļas metilesteri, etilesteri un vaski



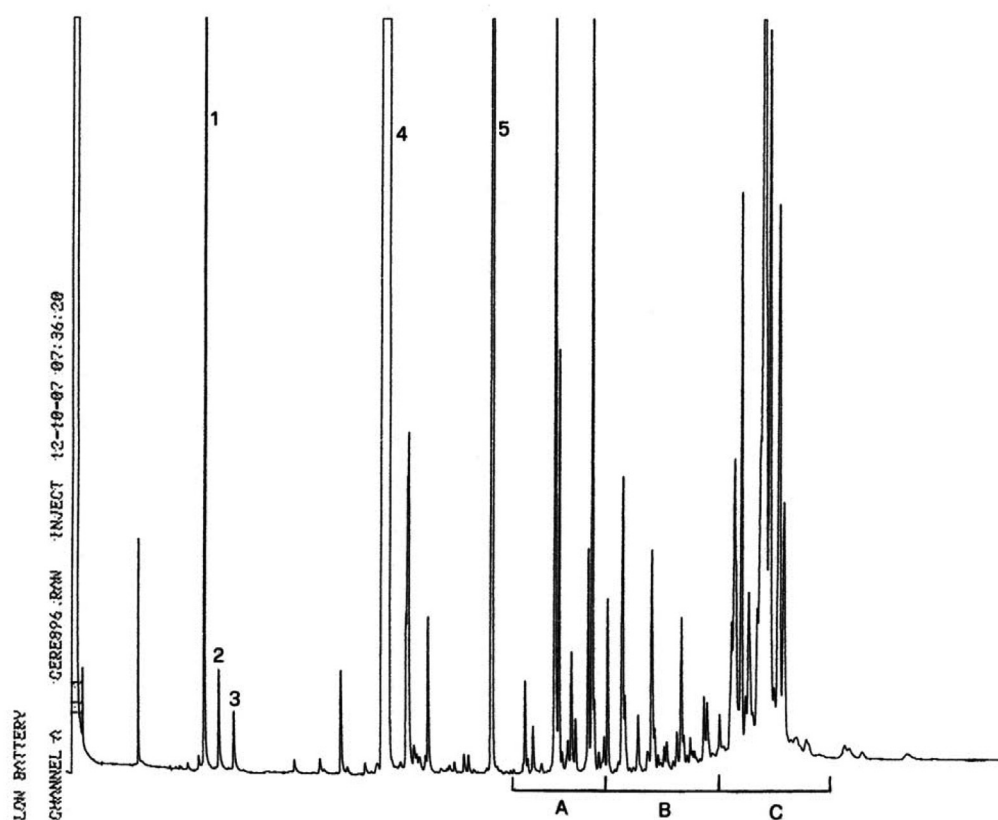
Paskaidrojumi:

- 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, etilesteri un vaski



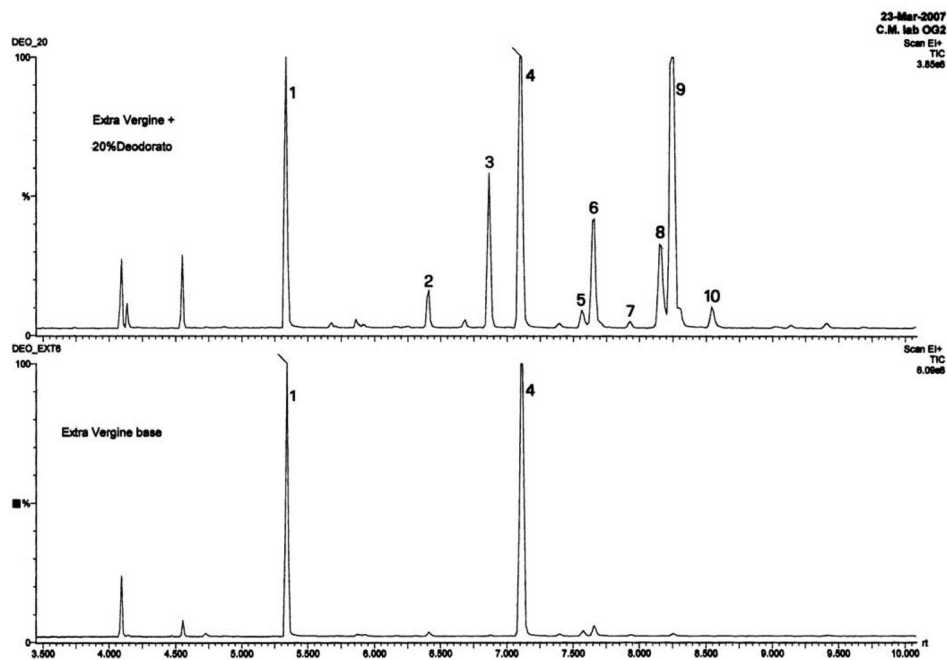
Paskaidrojumi:

- 1 – Metilheptadekanoāts, *I.S.*
- 2 – Metil- C₁₈
- 3 – Etil- C₁₈
- 4 – Skvalēns
- 5 – Laurilarahidāts, *I.S.*
- A – Diterpēnesteri
- B – Vaski
- C – Sterīna esteri un triterpēnesteri

▼ M23

4. attēls

Neapstrādātas olīveļļas hromatogrammas daļa un hromatogrammas daļa tai pašai eļļai ar dearomatizētas eļļas piedevu



Paskaidrojumi:

- 1 – Metilmiristāts, *I.S.*
- 2 – Metilpalmitāts
- 3 – Etilpalmitāts
- 4 – Metilheptadekanoāts, *I.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 μ l metāna (vai propāna). Mēra laiku, kas paiet kamēr gāze iziet caur kolonnu, no tās ievadišanas 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.

▼ **M26***XXa PIELIKUMS***METODE CITU EĻĻU NOTEIKŠANAI OLĪVEĻĻĀS****1. DARBĪBAS JOMA**

Šo metodi izmanto, lai noteiktu citu augu eļļu klātbūtni olīveļļās. Olīveļļās var noteikt augu eļļas ar augstu linolskābes saturu (sojas, rapšu, saulespuķu eļļa utt.) un dažas augu eļļas ar augstu oleīnskābes saturu, piemēram, lazdu riekstu eļļu, saulespuķu un olīvu izspaidu eļļu ar augstu oleīnskābes saturu. Noteiktais līmenis ir atkarīgs no šīs citas eļļas veida un olīvu šķirnes. Attiecībā uz lazdu riekstu eļļu noteikšanas līmenis parasti ir 5–15 %. Ar šo metodi nav iespējams identificēt noteiktās citas eļļas veidu, un tā norāda vienīgi to, vai olīveļļa ir vai nav tīra.

2. PRINCIPS

Eļļu attīra ar cietās fāzes ekstrakciju (*SPE*) uz silikagēlu kasetnēm. Triacilglicerīnu (*TAG*) sastāvu nosaka ar apgrieztās fāzes augstas izšķīrtspējas šķīdumu hromatogrāfiju, izmantojot refrakcijas koeficienta mēriekārtu un par kustīgo fāzi izmantojot propionitrilu. Taukskābju metilesterus (*FAME*) pagatavo no attīrītas eļļas, izmantojot metilēšanu ar aukstu *KOH* šķīdumu metanolā (*XB* pielikums), un pēc tam esterus analizē ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfiju, izmantojot augstas polārās kolonnas (*XA* pielikums). Teorētisko triacilglicerīna sastāvu aprēķina no taukskābju sastāva, izmantojot datorprogrammu un pieņemot 1,3-nejaušu, 2-nejaušu taukskābju izplatību triacilglicerīnā ar piesātināto taukskābju ierobežojumiem 2. pozīcijā. Aprēķināšanas metode ir XVIII pielikumā aprakstītās metodes variants. Vairākus matemātiskos algoritmus aprēķina no teorētiskā un eksperimentālā (*HPLC*) triacilglicerīna sastāva un iegūtās vērtības salīdzina ar datubāzē esošajām vērtībām, kas iegūtas no tīrām olīveļļām.

3. MATERIĀLI UN REAĢENTI**3.1. Eļļas attīrīšana**

3.1.1. Koniskas 25 ml tilpuma kolbas.

3.1.2. 5 ml tilpuma stikla mēģenes ar aizskrūvējamu aizbāzni no politetrafluoretilēna.

3.1.3. Silikagēla kasetnes, 1 g (6 ml), cietās fāzes ekstrakcijai (piemēram, *Waters*, Masačūsetsa, ASV).

3.1.4. N-heksāns, analītiskas tīrības.

3.1.5. Heksāna/dietilētera šķīdumu maisījums (87:13, tilpums/tilpums).

3.1.6. N-heptāns, analītiskas tīrības.

3.1.7. Acetons, analītiskas tīrības.

3.2. Triacilglicerīnu *HPLC* analīze

3.2.1. Mikrošļirces (50 µL) un adatas ievadīšanai *HPLC*.

3.2.2. Propionitrils, izcilas tīrības vai *HPLC* tīrības (piemēram, *ROMIL*, Kembridža, Apvienotā Karaliste), ko izmanto kā kustīgo fāzi.

▼ **M26**

3.2.3. *HPLC* kolonna (25 cm x 4 mm iekšējais diametrs), kurā iepildīta RP-18 fāze (daļiņu lielums 4 µm).

3.3. **Taukskābju metilesteru sagatavošana**

(skatīt XB pielikumu)

3.3.1. Metanols, kas satur ne vairāk par 0,5 % ūdens.

3.3.2. Heptāns, analītiskas tīrības.

3.3.3. 2N kālija hidroksīda šķīdumā metanolā. Izšķīdina 1,1 g kālija hidroksīda 10 ml metanola.

3.3.4. 5 ml tilpuma stikla mēģenes ar aizskrūvējamu aizbāzni no politetrafluoretilēna.

3.4. **FAME gāzu hromatogrāfijas analīze**

(Skatīt XA pielikumā izklāstīto *trans*-nepiesātināto taukskābju noteikšanu ar kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfijas metodi).

3.4.1. Mikrošļircis (5 µL) un adatas ievadīšanai gāzu hromatogrāfā.

3.4.2. Ūdeņradis vai hēlijs kā nesējgāze.

3.4.3. Ūdeņradis un skābeklis liesmas jonizācijas detektoram.

3.4.4. Slāpeklis vai hēlijs kā papildu nesējgāze.

3.4.5. Kvarca kapilārā kolonna (50–60 m x 0,25–0,30 mm iekšējo diametru), pārklāta ar sianopropilpolisiloksāna vai sianopropilfenilsiloksāna fāzēm (*SP*-2380 vai līdzīgām), kuru slāņa biezums ir 0,20–0,25 µm.

4. **APARATŪRA**

4.1. Vakuuma iekārta cietās fāzes ekstrakcijai.

4.2. Rotācijas ietvaicētājs.

4.3. *HPLC* aprīkojums, kas sastāv no:

4.3.1. atgāzētāja kustīgajai fāzei;

4.3.2. reodīna inžektora vārsta ar 10 µl cilpu;

4.3.3. augstspiediena sūkņa;

4.3.4. termostata žāvēšanas skapja *HPLC* kolonnai, kurš spēj uzturēt temperatūru, kas zemāka par apkārtējās vides temperatūru (15–20 °C) (piemēram, *Peltier* tipa);

4.3.5. refrakcijas koeficienta detektora;

4.3.6. datorizētu datu ieguves sistēmas ar integrēšanas programmu.

4.4. XA pielikumā aprakstītais kapilārās kolonnas gāzu hromatogrāfijas aprīkojums ar:

4.4.1. plūsmas dalījuma inžektoru;

4.4.2. liesmas jonizācijas detektoru;

4.4.3. žāvēšanas skapi ar programmējamu temperatūru;

4.4.4. datorizētu datu ieguves sistēmu ar integrēšanas programmu.

4.5. Dators ar *Microsoft EXCEL* programmu.

▼ **M26****5. ANALĪTISKĀ PROCEDŪRA****5.1. Eļļas attīrīšana**

SPE silikagēla kasetni ievieto vakuuma eluēšanas iekārtā un mazgā vakuumā ar 6 ml heksāna. Vakuumu atbrīvo, lai neļautu kolonnai izžūt, un zem kasetnes novieto konisko kolbu. Eļļas (aptuveni 0,12 g) šķīdumu 0,5 ml heksāna ievada kolonnā, šķīdumu izvelk cauri un pēc tam eluē ar 10 ml heksāna/dietilētera šķīdumu maisījuma (3.1.5. punkts) (87:13, tilpums/tilpums) vakuuma apstākļos. Eluēto šķīdinātāju homogenizē un aptuveni pusi tilpuma ielej citā koniskajā kolbā. Abus šķīdumus atsevišķi iztvaicē sausos rotācijas ietvaicētājā pazemināta spiediena apstākļos istabas temperatūrā. Triacilglicerīna analizēšanai vienu no atlikumiem izšķīdina 1 ml acetona (skatīt 5.2. punkta pirmo daļu) un ielej aizskrūvējamā 5 ml stikla mēģenē. Otru atlikumu izšķīdina 1 ml *n*-heptāna un ielej citā 5 ml aizskrūvējamā stikla mēģenē, lai sagatavotu taukskābju metilesterus.

Piezīme. Eļļu var attīrīt, izmantojot silikagēla kolonnu, kā aprakstīts *IUPAC* metodē 2.507.

5.2. Triacilglicerīnu HPLC analīze

Uzstāda *HPLC* sistēmu, uzturot kolonnas temperatūru pie 20 °C un izmantojot propionitrilu kā kustīgo fāzi ar plūsmas ātrumu 0,6 ml/min. Kad nulles līnija ir stabila, ievada šķīdinātāju. Ja nulles līnija šķiet traucēta 12–25 min reģionā, izmanto cita veida acetonu vai propionitrila/acetona maisījumu (25:75), lai izšķīdinātu paraugu.

Piezīme. Daži acetona veidi iztraucē nulles līniju iepriekš minētajā reģionā.

Ievada 10 µl alikvotu attīrītas eļļas šķīduma acetonā (5 %). Cikls ilgst aptuveni 60 min. Žāvēšanas skapja temperatūra un/vai plūsmas ātrums ir jāpielāgo, lai panāktu 1. attēlā redzamajai hromatogrammai līdzīgu hromatogrammu, kur trilinoleīns (1. smaile) eluējas 15,5. minūtē un starp *LLL/OLLn* (1. un 2. smaile) un *OLL/OOLn* (4. un 5. smaile) ir laba izšķirtspēja.

2. smailes augstumam (*OLLn+PoLL*) ir jāsasniedz vismaz 3 % no pilnas skalas.

5.3. Taukskābju metilesteru sagatavošana

0,1 ml 2N kālija hidroksīda šķīduma metanolā pievieno attīrītas eļļas šķīdumam 1 mL *n*-heptāna. Mēģeni aiztaisa un cieši aizskrūvē. Mēģeni spēcīgi kratā 15 sekundes un atstāj noslāņoties, līdz augšējās slānis kļūst dzidrs (5 minūtes). *N*-heptāna šķīdums ir gatavs ievadīšanai gāzu hromatogrāfā. Šķīdumu var atstāt istabas temperatūrā ne ilgāk kā uz 12 stundām.

5.4. Taukskābju metilesteru gāzu hromatogrāfijas analīze

Jāizmanto procedūras, kas aprakstītas *trans*-nepiesātināto taukskābju noteikšanas metodē (skatīt XA pielikumu).

Gāzu hromatogrāfijas sistēmas žāvēšanas skapī iestata 165 °C temperatūru. Žāvēšanas skapja ieteicamā temperatūra ir izotermiska pie 165 °C 10 minūtes, pēc tam to paaugstina līdz 200 °C par 1,5 °C/min. Inžektora ieteicamā temperatūra no 220 °C līdz 250 °C, lai pēc iespējas mazinātu *trans*-taukskābju veidošanos (skatīt XA pielikumu). Detektora temperatūra ir 250 °C. Kā nesējgāze ir jāizmanto ūdeņradis vai hēlijs pie kolonnas priekšgala spiediena aptuveni 130 kPa. Ievadītais tilpums ir 1 µl, ja veic ievadīšanu plūsmas dalīšanas režīmā.

▼ **M26**

Jāiegūst 2. attēlā redzamajam līdzīgs gāzu hromatogrāfijas profils. Īpaša uzmanība ir jāpievērš izšķirtspējai starp C18:3 un C20:1 (C18:3 smailei ir jāparādās pirms C20:1). Lai panāktu šādus apstākļus, jāoptimizē sākotnējā temperatūra un/vai kolonnas priekšgala spiediens. Inžektora apstākļus (temperatūru, dalīšanas attiecību un tilpuma ievadīšanu) noregulē, lai pēc iespējas samazinātu palmitīnskābes un palmitoleīnskābes nošķiršanu.

C20:0 smailes augstumam jābūt aptuveni 20 % no pilnas skalas, lai kvantificētu *trans*-izomērus. Ja šķiet, ka C18:0 smaile ir izkropļota, samazina parauga lielumu.

6. HROMATOGRĀFISKO SMAIĻU INTEGRĒŠANA

6.1. *HPLC* hromatogramma

1. attēlā ir parādīta attīrītas olīveļļas triacilglicerīnu tipiska *HPLC* hromatogramma. Lai integrētu smailes, ir jāizseko trīs nulles līnijas: pirmā starp 1. smailes sākumu un 3. smailes beigām; otrā starp 4. smailes sākumu un ieleju pirms 8. smailes; trešā starp ieleju pirms 8. smailes un 18. smailes beigām.

Kopējais laukums ir visu smaiļu (noteikto un nenoteikto) (no 1. smailes līdz 18. smailei) laukumu summa. Katras smailes procentuālo daļu nosaka šādi:

$$\text{TAG}_x(\%) = 100 (A_x + A_T)$$

Procenti jānorāda ar divām zīmēm aiz komata.

6.2. Gāzu hromatogramma

Turpmāk 2. attēlā ir parādīta no attīrītas olīveļļas iegūtu taukskābju alkil-esteru gāzu hromatogramma. Ir jāaprēķina turpmāk uzskaitīto taukskābju īpatsvari.

Palmitīnskābe	P (C16:0)	=	metilesteris + etilesteris
Stearīnskābe	S (C18:0)	=	metilesteris
Palmitoleīnskābe	Po (C16:1)	=	divu <i>cis</i> -izomēru metilesteru summa
Oleīnskābe	O (C18:1)	=	divu <i>cis</i> -izomēru metilesteru + etilesteru + <i>trans</i> -izomēru summa
Linolskābe	L (C18:2)	=	metilesteris + etilesteris + <i>trans</i> -izomēri
Linolēnskābe	Ln (C18:3)	=	metilesteris + <i>trans</i> -izomēri
Arahīnskābe	A (C20:0)	=	metilesteris
Eikozānskābe (gondoīnskābe)	G (C20:1)	=	metilesteris

Etilesteru un *trans*-izomēru esteru hromatogrammā var nebūt.

Kopējais lauks ir visu hromatogrammā redzamo smaiļu summa no C14:0 līdz C24:0, izņemot to, kas atbilst skvalēnam. Katras smailes īpatsvaru aprēķina šādi:

$$\text{FA}_x(\%) = 100(A_x + A_T)$$

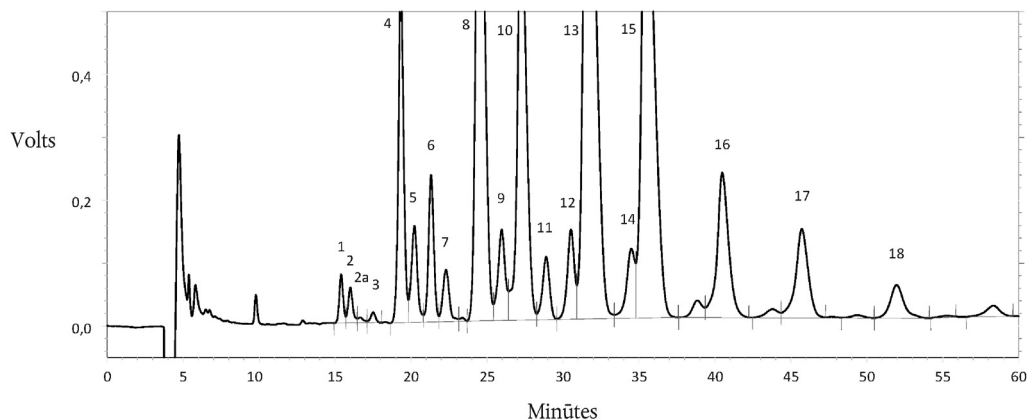
Rezultāti jānorāda ar divām zīmēm aiz komata.

Datorprogrammu aprēķiniem nav jānormalizē līdz 100, jo tas notiek automātiski.

▼ M26

1. attēls

“Chamlali” neapstrādātas olīveļļas TAG HPLC hromatogramma.
Hromatogrāfisko smaiļu galvenie komponenti



- (1) LLL; (2) OLLn+PoLL; (3) PLLn; (4) OLL; (5) OOLn+PoOL;
(6) PLL+PoPoO; (7) POLn+PPoPo+PPoL; (8) OOL+LnPP; (9) PoOO;
(10) SLL+PLO; (11) PoOP+SPoL+SOLn+SPoPo; (12) PLP;
(13) OOO+PoPP; (14) SOL; (15) POO; (16) POP; (17) SOO;
(18) POS+SLS.

1. tabula

Neapstrādātas olīveļļas TAG noteikšanas atkārtojamība, ja izmanto HPLC, kurā kolonnas temperatūra ir 20 °C
un par kustīgo fāzi izmanto propionitrilu

ECN	HPLC smailis	TAG	1. paraugs		2. paraugs		3. paraugs		4. paraugs		5. paraugs	
			Vidējais (%)	RSD _r (%)	Vidējais (%)	RSD _r (%)	Vidējais (%)	RSD _r (%)	Vidējais (%)	RSD _r (%)	Vidējais (%)	RSD _r (%)
42	1.	LLL	0,020	7,23	0,066	5,18	0,095	4,10	0,113	0,95	0,34	1,05
	2.	OLLn+ PoLL	0,085	7,44	0,24	1,78	0,26	2,25	0,35	2,02	0,50	2,83
	3.	PLLn	0,023	15,74	0,039	5,51	0,057	5,62	0,082	4,35	0,12	6,15
44	4.	OLL	0,47	1,52	1,53	0,42	2,62	0,98	3,35	1,05	4,37	1,13
	5.	OOLn+ PoOL	1,07	2,01	1,54	0,46	1,61	0,71	1,72	1,07	1,77	2,40
	6.	PLL+ PoPoO	0,11	12,86	0,24	4,37	0,65	1,32	1,35	0,73	2,28	1,24
	7.	POLn+ PpoPo+ PpoL	0,42	5,11	0,49	2,89	0,55	2,01	0,85	1,83	1,09	1,96
46	8.	OOL+ LnPP	6,72	0,63	8,79	0,31	11,21	0,42	13,25	0,33	15,24	0,23
	9.	PoOO	1,24	2,86	1,49	0,95	1,63	0,85	2,12	0,45	2,52	0,56
	10.	SLL+ PLO	2,70	0,65	4,05	0,70	6,02	0,65	9,86	0,53	11,53	0,31
	11.	PoOP+ SpoL+ SOLn+ SpoPo	0,64	4,42	0,69	3,02	0,79	1,23	1,53	0,89	1,70	1,66

▼ M26

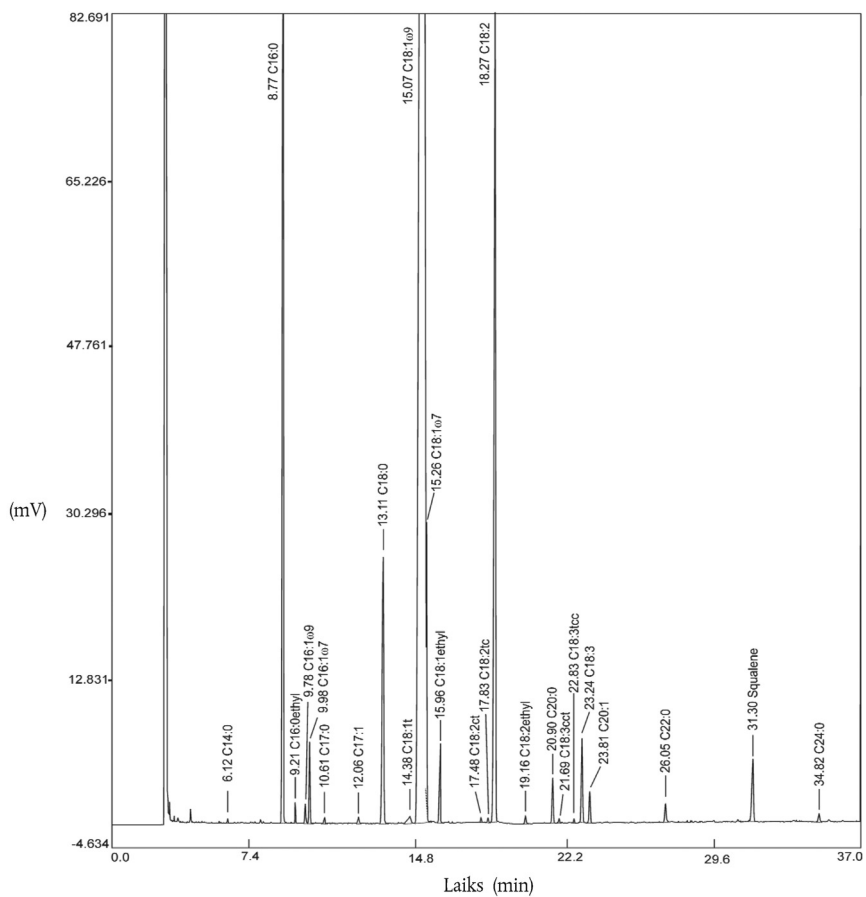
ECN	HPLC smailes	TAG	1. paraugs		2. paraugs		3. paraugs		4. paraugs		5. paraugs	
			Vidējais (%)	RSD _r (%)	Vidējais (%)	RSD _r (%)	Vidējais (%)	RSD _r (%)	Vidējais (%)	RSD _r (%)	Vidējais (%)	RSD _r (%)
48	12.+1-3.	OOO+ PLP+ PoPP	49,60	0,07	48,15	0,06	42,93	0,06	33,25	0,10	24,16	0,06
	14.	SOL	0,82	1,72	0,92	1,56	1,05	1,32	1,25	1,05	1,60	1,77
	15.	POO	22,75	0,25	21,80	0,20	21,05	0,30	20,36	0,35	20,17	0,14
50	16.	POP	3,05	0,46	4,56	0,42	4,98	0,52	5,26	0,41	5,57	0,38
	17.	SOO	6,87	0,21	5,56	0,33	4,86	0,43	4,12	0,72	3,09	0,69
	18.	POS+ SLS	1,73	1,23	1,65	1,10	1,54	0,99	1,49	1,10	1,41	1,00

n = 3 atkārtējumi

RSD_r = atkārtējamības relatīvā standartnovirze

2. attēls

No olīvu izspaidu eļļas iegūtu taukskābju alkilesteru gāzu hromatogramma, izmantojot esterificēšanu ar aukstu KOH šķīdumu metanolā



▼M26**7. CITU EĻĻU NOTEIKŠANA OLĪVEĻĻĀS**

Standarta IOC/T.20/Doc. Nr. 25 I pielikumā ir izklāstīta aprēķināšanas metode, ko izmanto, lai olīveļļās noteiktu citas eļļas, salīdzinot matemātiskus algoritmus ar datubāzi, kurā pieejami dati par tīrām olīveļļām.

XXI PIELIKUMS

Saskaņā ar 8. panta 2. punktu veikto olīveļļas atbilstības pārbaūžu rezultāti

				Marķējums						Ķīmiskie parametri			Organoleptiskās īpašības ⁽⁴⁾			Galīgais secinājums	
Paraugs	Kategorija	Izcelsmes valsts	Pārbaudes vieta ⁽¹⁾	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.