

KOMISIJAS ĪSTENOŠANAS REGULA (ES) 2019/1604**(2019. gada 27. septembris),****ar ko groza Regulu (EEK) Nr. 2568/91 par olīveļļas un olīvu izspaidu eļļas īpašībām un attiecīgajām analīzes metodēm**

EIROPAS KOMISIJA,

ņemot vērā Līgumu par Eiropas Savienības darbību,

ņemot vērā Eiropas Parlamenta un Padomes 2013. gada 17. decembra Regulu (ES) Nr. 1308/2013, ar ko izveido lauksaimniecības produktu tirgu kopīgu organizāciju un atceļ Padomes Regulas (EEK) Nr. 922/72, (EEK) Nr. 234/79, (EK) Nr. 1037/2001 un (EK) Nr. 1234/2007 ⁽¹⁾, un jo īpaši tās 91. panta pirmās daļas d) punktu,

tā kā:

- (1) Komisijas Regulā (EEK) Nr. 2568/91 ⁽²⁾ ir definētas olīveļļas un olīvu izspaidu eļļas fizikāli ķīmiskās un organoleptiskās īpašības un noteiktas minēto īpašību novērtēšanas metodes.
- (2) Šīs metodes un eļļu īpašību robežvērtības tiek regulāri atjauninātas, pamatojoties uz ķīmijas ekspertu viedokli un ņemot vērā Starptautiskās Olīvu padomes (IOC) veikto darbu.
- (3) Lai nodrošinātu, ka jaunākie starptautiskie standarti, kurus noteikusi IOC, tiek īstenoti Savienības līmenī, dažas Regulā (EEK) Nr. 2568/91 noteiktās analīzes metodes būtu jāatjaunina.
- (4) Lai panāktu konsekveni ar analīzes metodes precizitātes vērtībām, IOC tirdzniecības standarts ir ticis grozīts attiecībā uz brīvā skābuma robežvērtības izteikšanu, peroksīda skaitļa noteikšanu, organoleptisko novērtējumu (defektu mediāna un augļainuma mediāna) un starpību starp ECN42, kas noteikts ar HPLC, un teorētiski aprēķināto ECN42.
- (5) Saskaņā ar Regulas (EEK) Nr. 2568/91 2.a panta 5. punktu olīveļļas parauga atbilstība deklarētajai kategorijai dalībvalstīm jāverificē, minētās regulas I pielikumā noteiktās īpašības pārbaudot jebkādā secībā vai secībā, kas noteikta minētās regulas Ib pielikumā iekļautajā lēmumu pieņemšanas shēmā.
- (6) Ņemot vērā nesenās pārmaiņas, ir lietderīgi attiecīgi atjaunināt Regulas (EEK) Nr. 2568/91 Ib pielikumā un tā papildinājumā iekļautās tabulas. Turklāt, ņemot vērā minētā Ib pielikuma saturu, termins "plūsmkarte" šķiet piemērotāks par terminu "lēmumu pieņemšanas shēma".
- (7) Regulas (EEK) Nr. 2568/91 XII pielikuma 9.4. punktā defektu mediāna ir definēta kā intensīvākā konstatētā defekta mediāna. Kontrolnovērtējumu kontekstā un ņemot vērā to, ka eļļas atbilstība ir jānovērtē dažādām žūrijām, būtu jākonkretizē, ka lēmums par eļļas atbilstību deklarētās kategorijas īpašībām ir saistīts tikai ar galvenā defekta mediānas vērtību neatkarīgi no galvenā defekta rakstura.
- (8) Tāpēc Regula (EEK) Nr. 2568/91 būtu attiecīgi jāgroza.
- (9) Šajā regulā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Lauksaimniecības tirgu kopīgās organizācijas komitejas atzinumu,

IR PIENĒMUSI ŠO REGULU.

1. pants

Regulu (EEK) Nr. 2568/91 groza šādi:

1) regulas 2. pantu groza šādi:

a) panta 1. punkta l) apakšpunktu aizstāj ar šādu:

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

⁽¹⁾ OV L 347, 20.12.2013., 671. lpp.⁽²⁾ Komisijas 1991. gada 11. jūlija Regula (EEK) Nr. 2568/91 par olīveļļas un olīvu izspaidu eļļas īpašībām un attiecīgajām analīzes metodēm (OV L 248, 5.9.1991., 1. lpp.).

b) panta 2. punkta trešo daļu aizstāj ar šādu:

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

2) regulas 2.a panta 5. punkta b) apakšpunktu aizstāj ar šādu:

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

3) tabulu “PIELIKUMI Kopsavilkums” aizstāj ar šīs regulas I pielikuma tabulu;

4) I pielikumu aizstāj ar šīs regulas II pielikuma tekstu;

5) Ia pielikuma 2.1. punktu aizstāj ar šādu:

“2.1. Katrs primārais paraugs ir jāsadala laboratorijas paraugos saskaņā ar standarta EN ISO 5555 2.5. punktu un jāanalizē Ib pielikumā iekļautajā plūsmkartē noteiktajā secībā vai jebkādā citā nejauši izvēlēta secībā.”;

6) Ib pielikumu aizstāj ar šīs regulas III pielikuma tekstu;

7) V pielikumu svītro;

8) VII pielikuma 4.2. punktu aizstāj ar šādu:

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

9) XII pielikumu groza saskaņā ar šīs regulas IV pielikumu;

10) XVII pielikumu groza saskaņā ar šīs regulas V pielikumu;

11) XVIII pielikumu groza saskaņā ar šīs regulas VI pielikumu;

12) XIX pielikumu aizstāj ar šīs regulas VII pielikuma tekstu;

13) XX pielikuma 4.2. punktu aizstāj ar šādu:

“4.2. n-heksāns, hromatogrāfijai vai ķīmiski tīrs. Heksānu drīkst aizstāt ar izooktānu (2,2,4-trimetilpentāns, hromatogrāfijai), ja vien tiek sasniegtas salīdzināmas precizitātes vērtības. Šķīdinātāji, kuriem viršanas punkts ir augstāks nekā n-heksānam, iztvaiko lēnāk. Tomēr heksāna toksiskuma dēļ tiem dodama priekšroka. Tīrība ir jāpārbauda, piemēram, var pārbaudīt atlikumu pēc 100 ml šķīdinātāja iztvaicēšanas.

UZMANĪBU – Tvaiki var uzliesmot. Turēt pietiekamā attālumā no siltuma un dzirksteļu avotiem un atklātas uguns. Raudzīties, lai pudeles vienmēr būtu cieši noslēgtas. Lietošanas laikā nodrošināt pienācīgu ventilāciju. Nepieļaut tvaiku veidošanos un novērst iespējamo ugunsgrēka risku, ko rada, piemēram, sildītāji vai elektroaparāti, kas nav izgatavoti no nedegamiem materiāliem. Ļoti kaitīgs ieelpojot, jo var radīt nervu šūnu bojājumus. Neieelpot tvaikus. Vajadzības gadījumā lietot piemērotus elpošanas aparātus. Nepieļaut nokļūšanu acīs un uz ādas.

Izooktāns ir uzliesmojošs šķidrums, kas rada ugunsbīstamību. Sprādzienbīstamības robežas gaisā ir no 1,1 % līdz 6,0 % (tilpuma daļa). Tas ir toksisks norijot un ieelpojot. Strādājot ar šo šķīdinātāju, izmantot velkmes skapi labā darba kārtībā.”

2. pants

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

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

Briselē, 2019. gada 27. septembrī

*Komisijas vārdā –
priekšsēdētājs*
Jean-Claude JUNKER

I PIELIKUMS

"PIELIKUMI

KOPSAVILKUMS

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

II PIELIKUMS

“I PIELIKUMS

OLĪVEĻĻAS ĪPAŠĪBAS

Kvalitāte

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

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

Tīrība

Kategorija	Taukskābju sastāvs ⁽¹⁾						Kopā trans-oleīnskābes izomēri (%)	Kopā trans-linolskābes un translinolēnskābes izomēri (%)	Stigmastadiēni (mg/kg) ⁽²⁾	Starpība: ECN42 (HPLC) un ECN42 (teorētiskais aprēķins)	2-glicerilmonopalmitāts (%)
	Miristīnskābe (%)	Linolēnskābe (%)	Arahīnskābe (%)	Eikozēnskābe (%)	Behēnskābe (%)	skābe (%)					
1. Neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9, ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14,00 %
											≤ 1,0, ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14,00 %
2. Neapstrādāta olīveļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,20	≤ 0,9, ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14,00 %
											≤ 1,0, ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14,00 %
3. Spīdīgā olīveļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,9, ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14,00 %
											≤ 1,1, ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14,00 %
4. Rafinēta olīveļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9, ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14,00 %
											≤ 1,1, ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14,00 %
5. Olīveļļa, kas sastāv no rafinētas olīveļļas un neapstrādātām olīveļļām	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ 0,30	≤ 0,9, ja palmitīnskābes kop. saturs % ≤ 14,00 %
											≤ 1,0, ja palmitīnskābes kop. saturs % > 14,00 %
6. Neattīrīta olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ 0,60	≤ 1,4
7. Rafinēta olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,4
8. Olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ 0,50	≤ 1,2

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

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

30.9.2019.

LV

Eiropas Savienības Oficiālais Vēstnesis

L 250/19

Kategorija	Sterīnu sastāvs						Kopā sterīni (mg/kg)	Eritrodiols un uvaols (%) (**)	Vaski (mg/kg) (**)
	Holesterīns (%)	Brasikasterīns (%)	Kampesterīns (⁽¹⁾) (%)	Stigmasterīns (%)	Nosac. β-sitos- terīns (⁽²⁾) (%)	Delta-7-stigma- stenols (⁽¹⁾) (%)			
1. Neapstrādāta augstākā la- buma olīveļļa	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Neapstrādāta olīveļļa	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Spīdīgā olīveļļa	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (⁽³⁾)	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 300$ (⁽³⁾)
4. Rafinēta olīveļļa	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
5. Olīveļļa, kas sastāv no rafi- nētas olīveļļas un neapstrā- dātām olīveļļām	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 350$
6. Neattīrīta olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (⁽⁴⁾)	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$ (⁽⁴⁾)
7. Rafinēta olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$
8. Olīvu izspaidu eļļa	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5	$C_{40} + C_{42} + C_{44} + C_{46} > 350$

⁽¹⁾ Skatīt šā pielikuma papildinājumu.
⁽²⁾ Nosacītais β-sitosterīns: delta-5,23-stigmastadienols+klerosterīns+beta-sitosterīns+sitostanols+delta-5-avenasterīns+delta-5,24-stigmastadienols.
⁽³⁾ Eļļas ar vasku saturu no 300 mg/kg līdz 350 mg/kg uzskata par spīdīgajām olīveļļām, ja alifātisko spirtu kopējais saturs ir zemāks par vai vienāds ar 350 mg/kg vai ja eritrodiola un uvaola saturs ir zemāks par vai vienāds ar 3,5 %.
⁽⁴⁾ Eļļas ar vasku saturu no 300 mg/kg līdz 350 mg/kg uzskata par neattīrītām olīvu izspaidu eļļām, ja alifātisko spirtu kopējais saturs ir augstāks par 350 mg/kg un ja eritrodiola un uvaola saturs ir augstāks par 3,5 %.

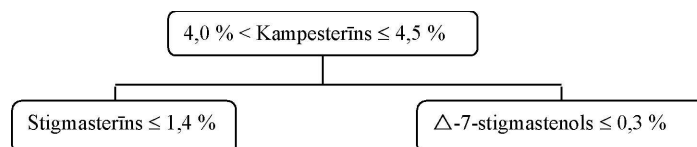
Piezīmes

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

Papildinājums

Lēmumu pieņemšanas shēmas

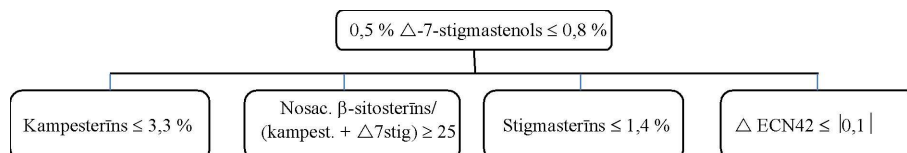
Kampesterīna lēmumu pieņemšanas shēma attiecībā uz neapstrādātu olīveļļu un neapstrādātu augstākā labuma olīveļļu



Pārējie parametri atbilst šajā regulā noteiktajām robežvērtībām.

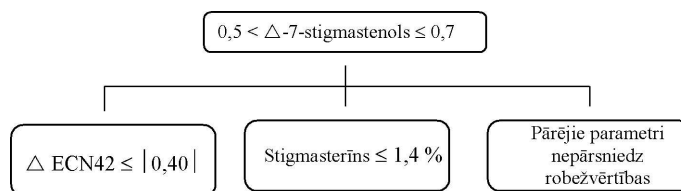
Delta-7-stigmasterenola lēmumu pieņemšanas shēma attiecībā uz:

— neapstrādātu augstākā labuma olīveļļu un neapstrādātu olīveļļu



Pārējie parametri atbilst šajā regulā noteiktajām robežvērtībām.

— olīvu izspaidu eļļu (neattīrītu un rafinētu)



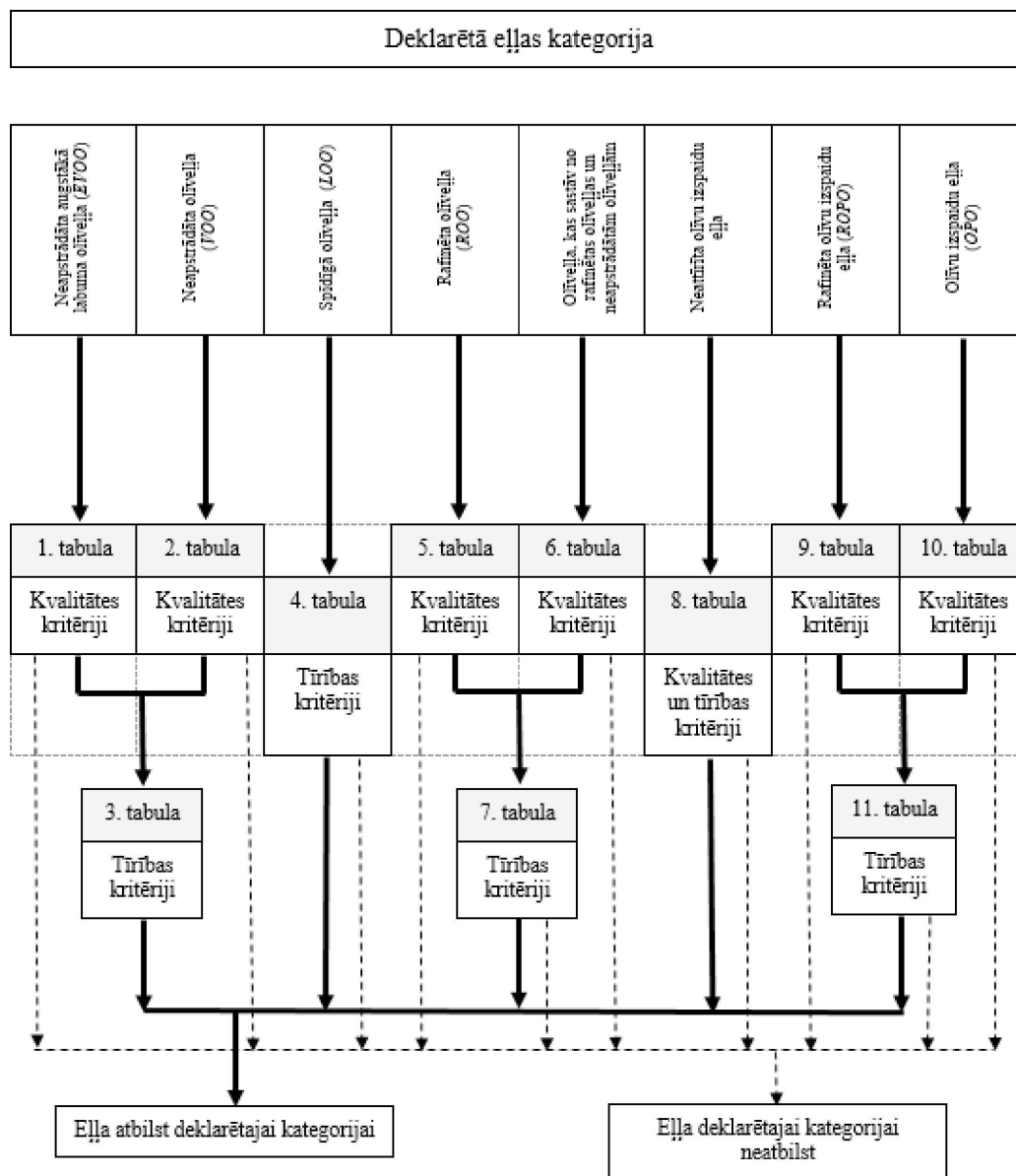
Pārējie parametri atbilst šajā regulā noteiktajām robežvērtībām.”

III PIELIKUMS

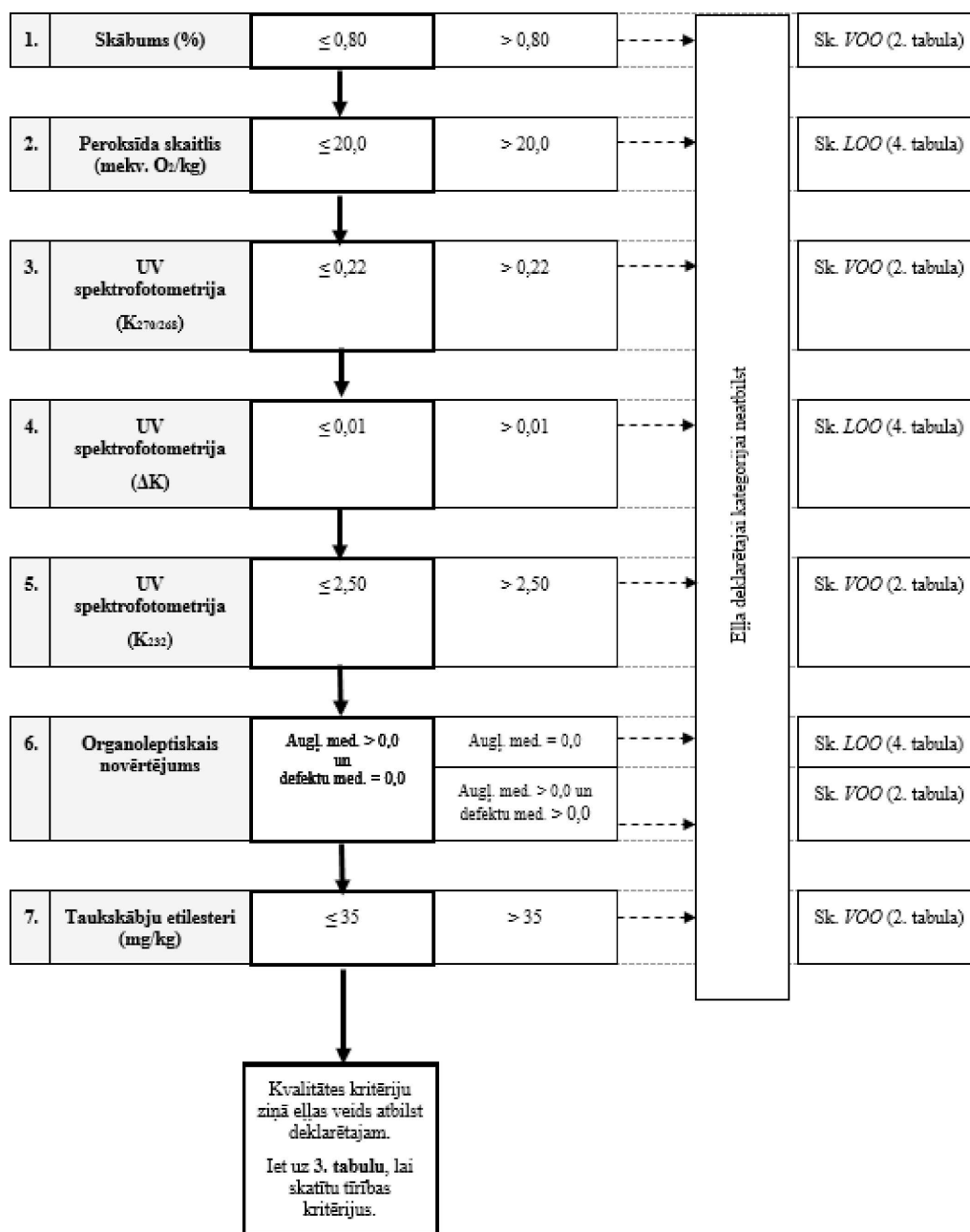
"Ib PIELIKUMS

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

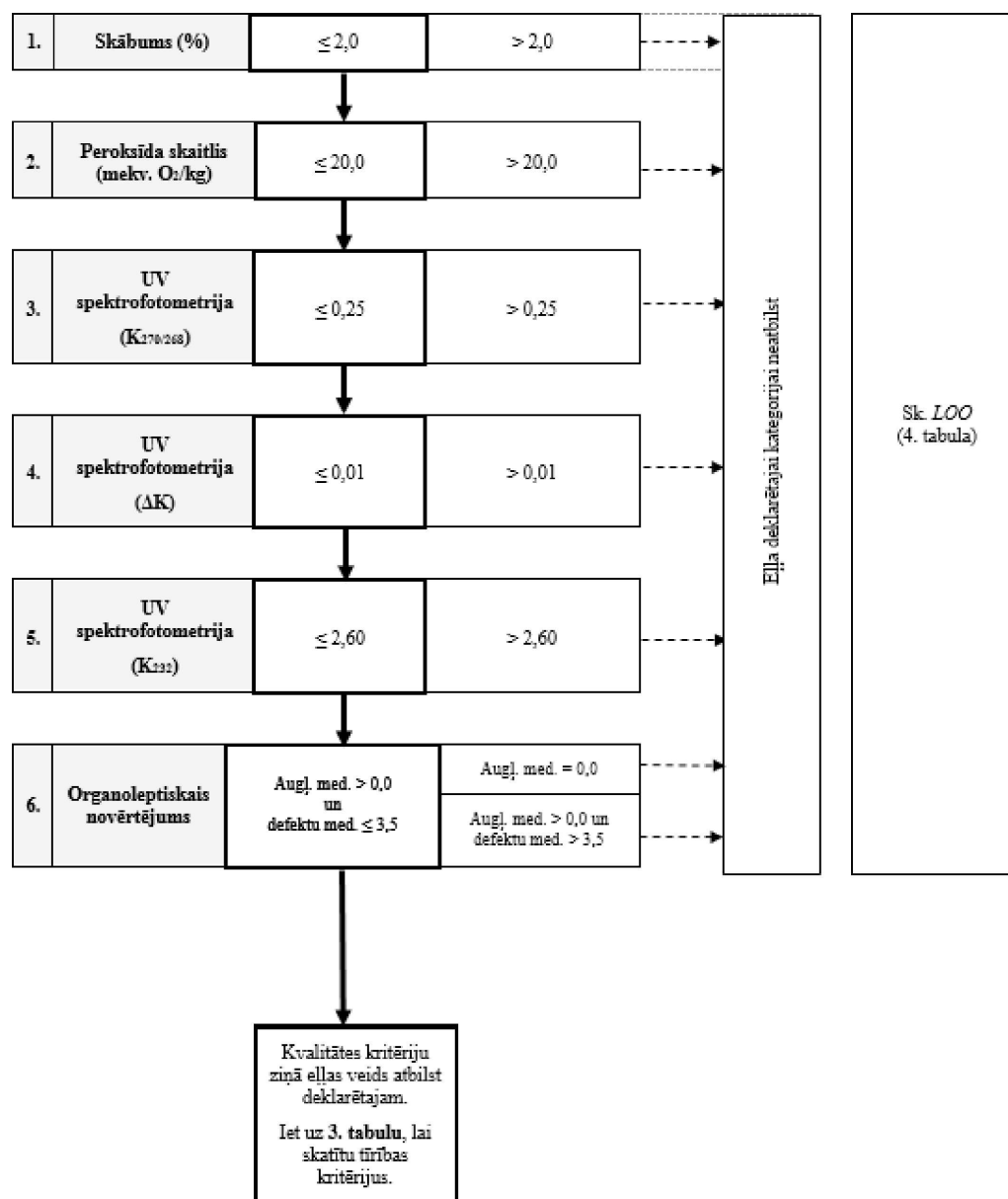
Vispārīgā tabula



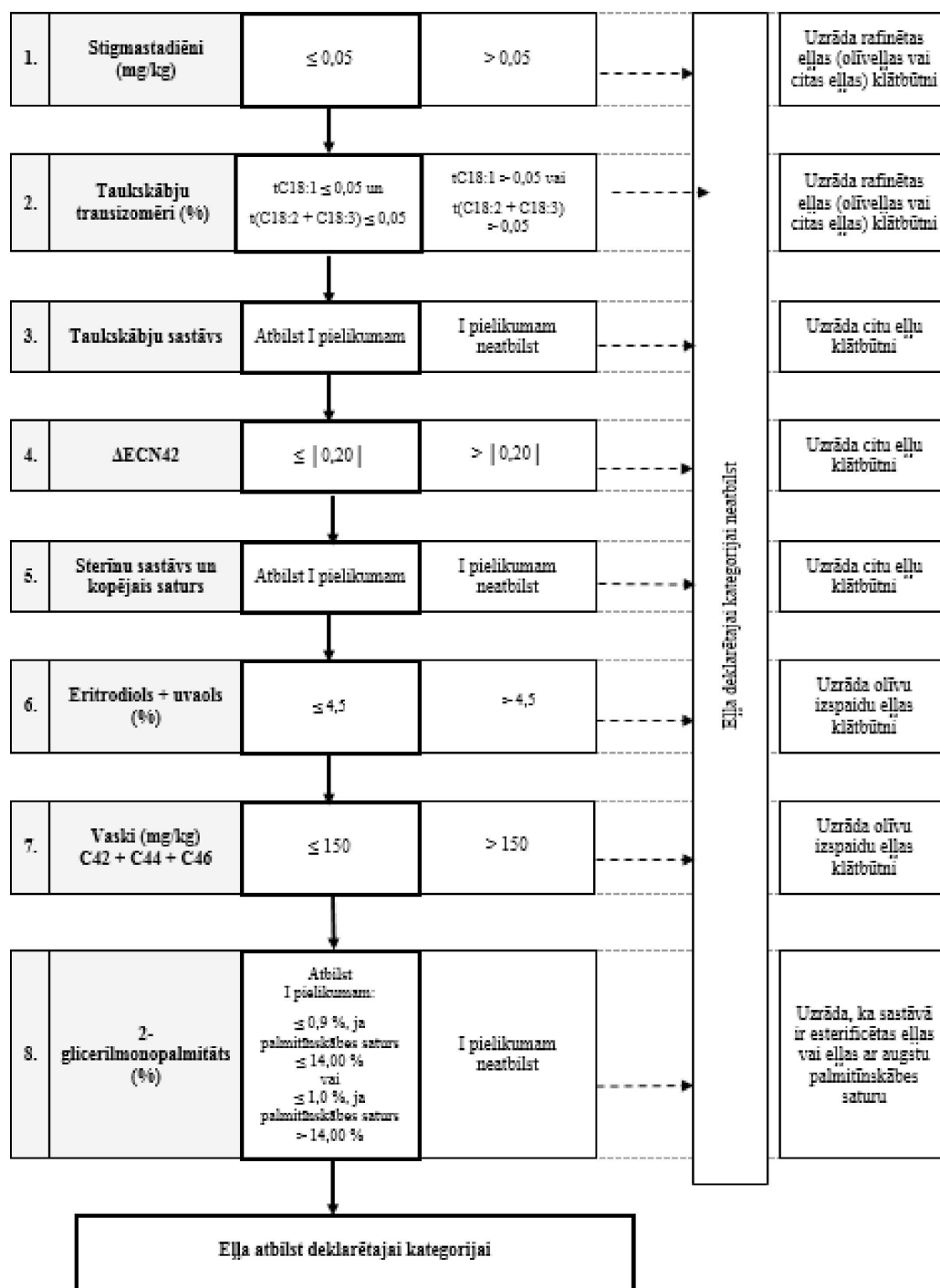
1. tabula. Neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa: kvalitātes kritēriji



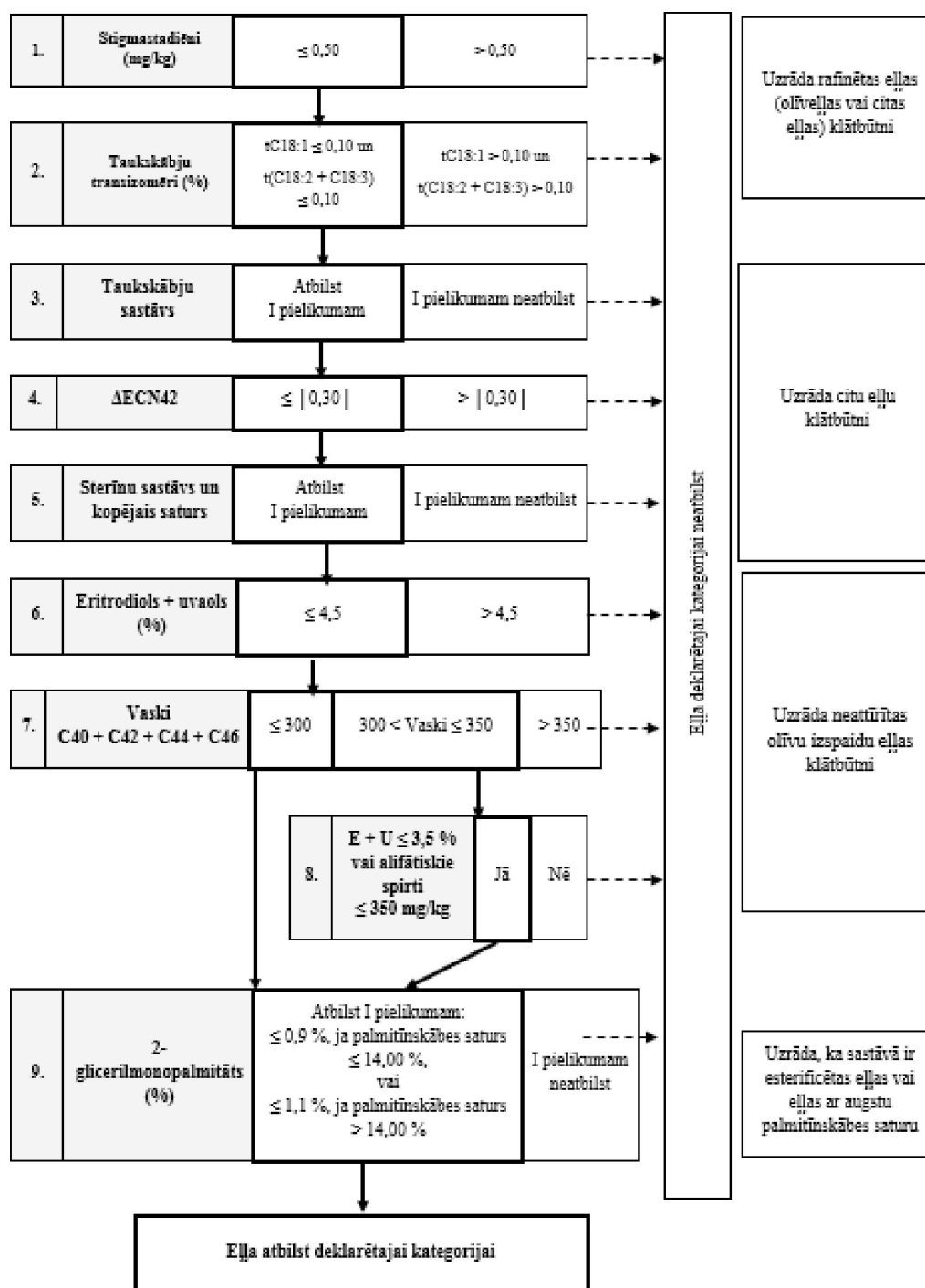
2. tabula. Neapstrādāta olīveļļa: kvalitātes kritēriji



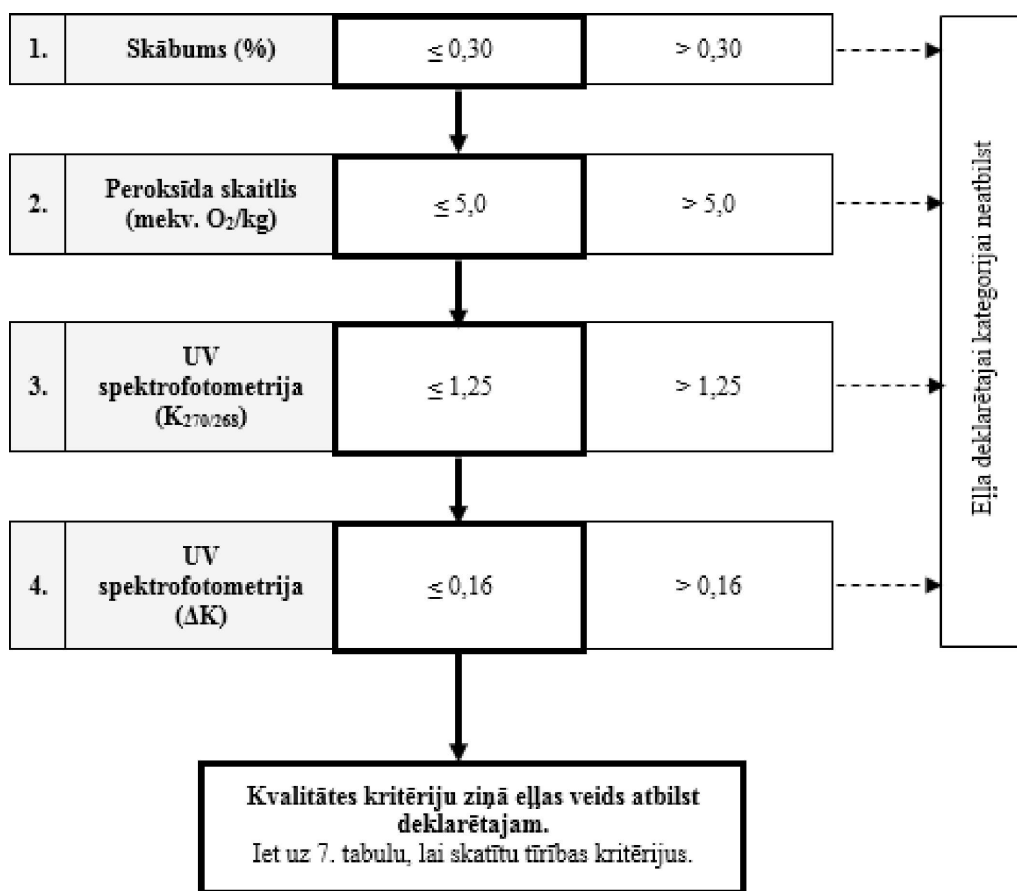
3. tabula. Neapstrādāta augstākā labuma olīveļļa un neapstrādāta olīveļļa: tīrības kritēriji



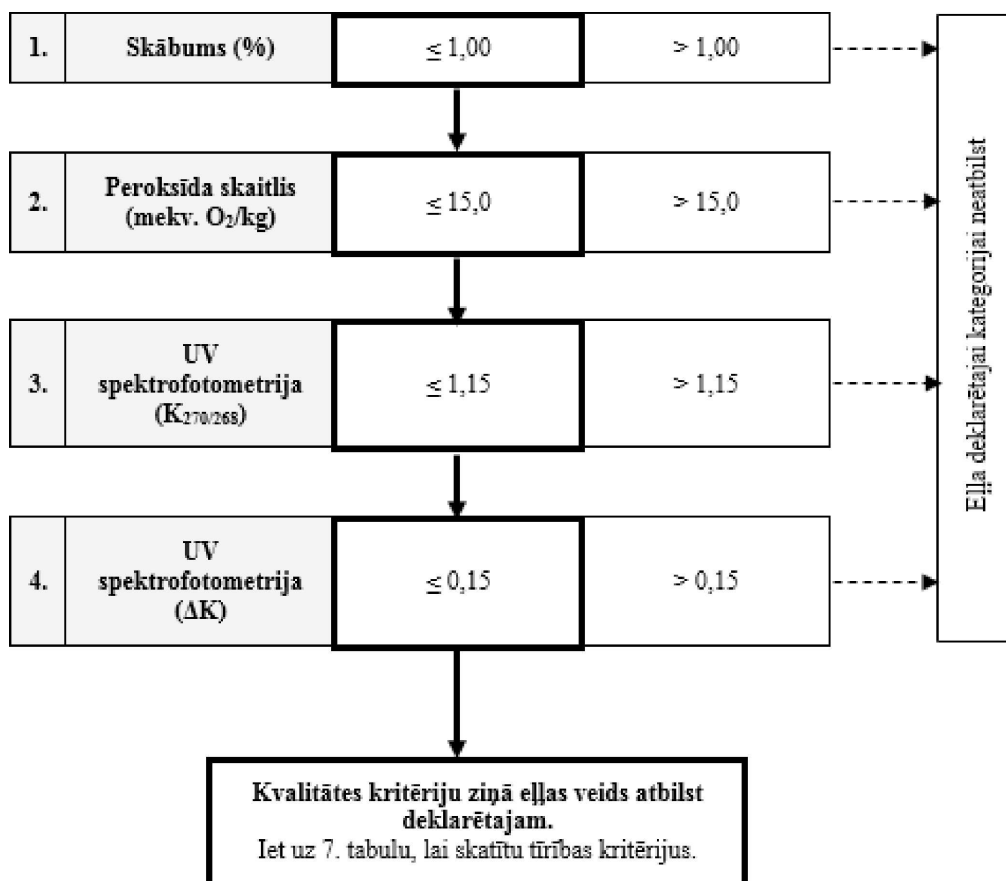
4. tabula. Spīdīgā olīvēļļa: tīrības kritēriji



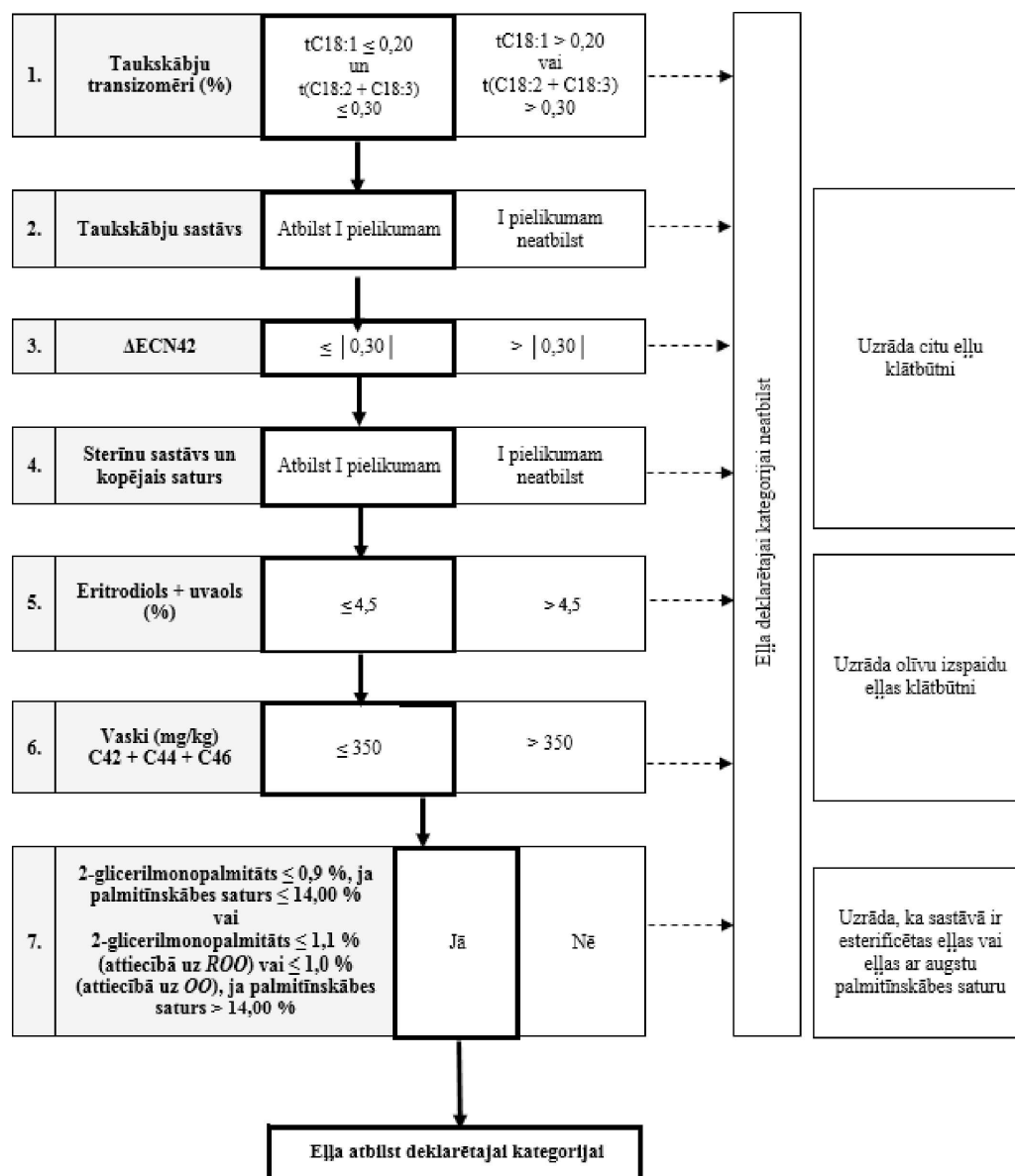
5. tabula. Rafinēta olīveļļa: kvalitātes kritēriji



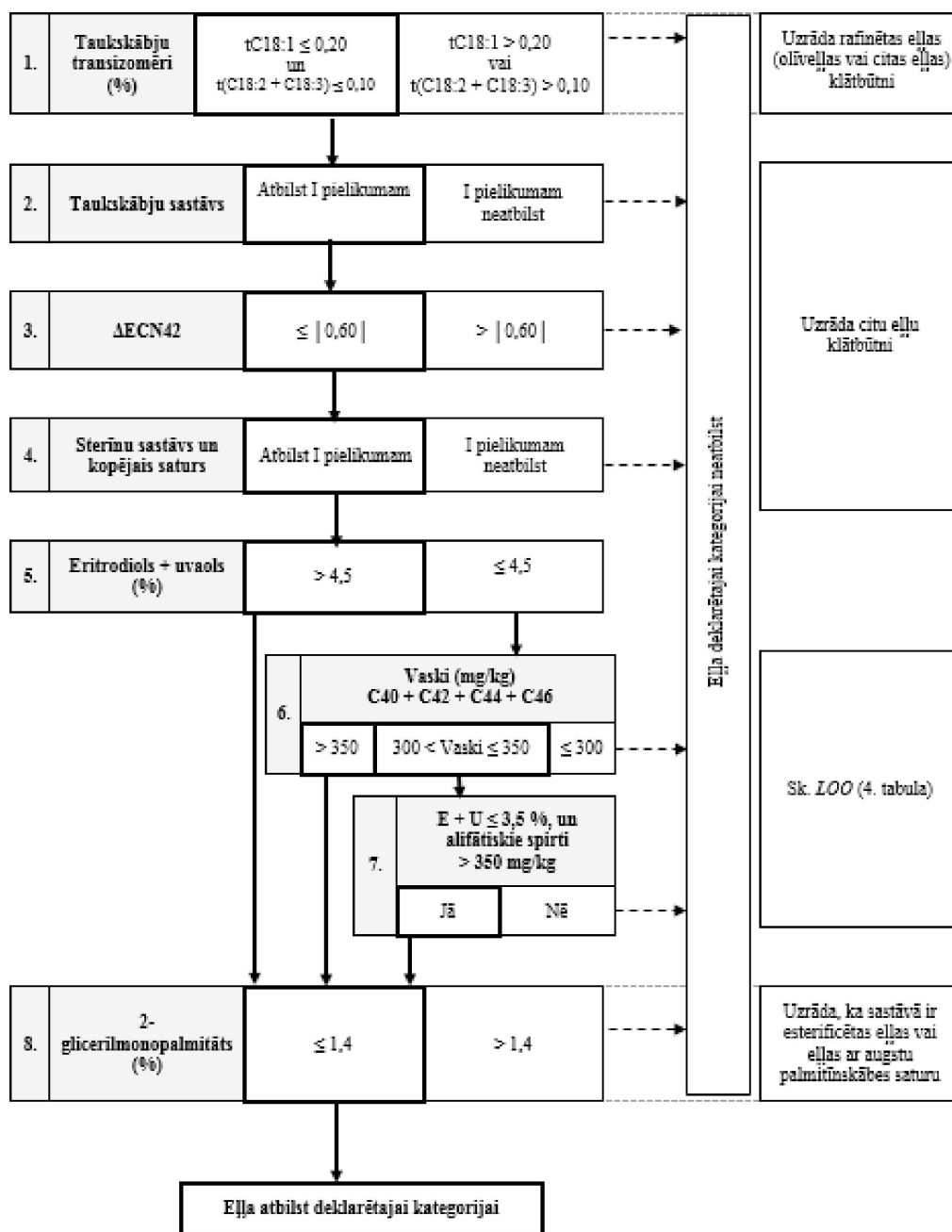
6. tabula. Olīveļļa, kas sastāv no rafinētas olīveļļas un neapstrādātām olīveļļām: kvalitātes kritēriji



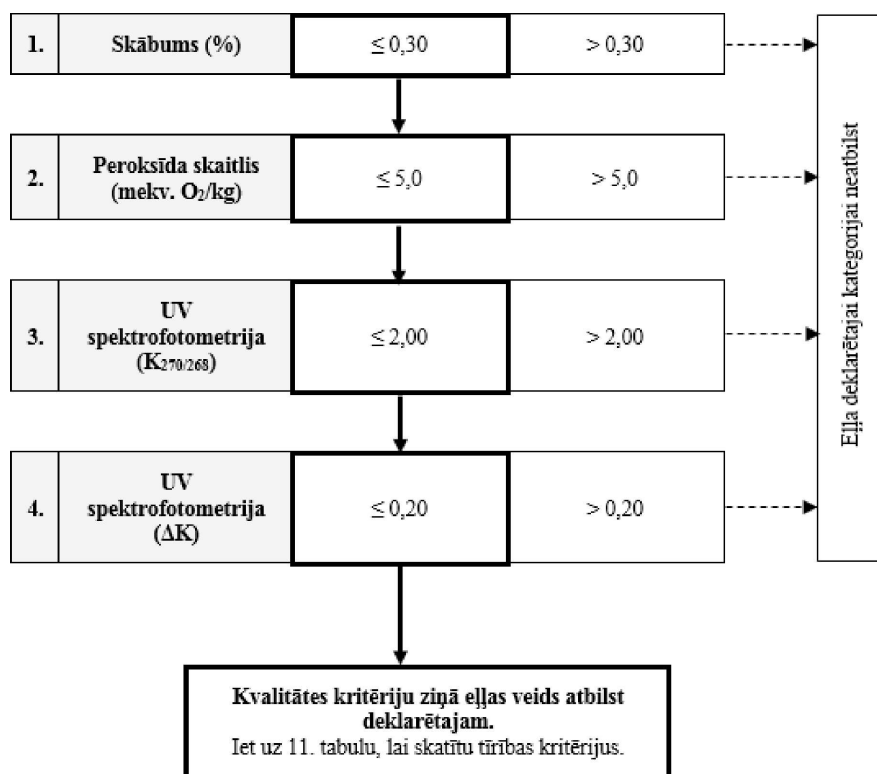
7. tabula. Rafinēta olīveļļa un olīveļļa, kas sastāv no rafinētas olīveļļas un neapstrādātām olīveļļām: tīrības kritēriji



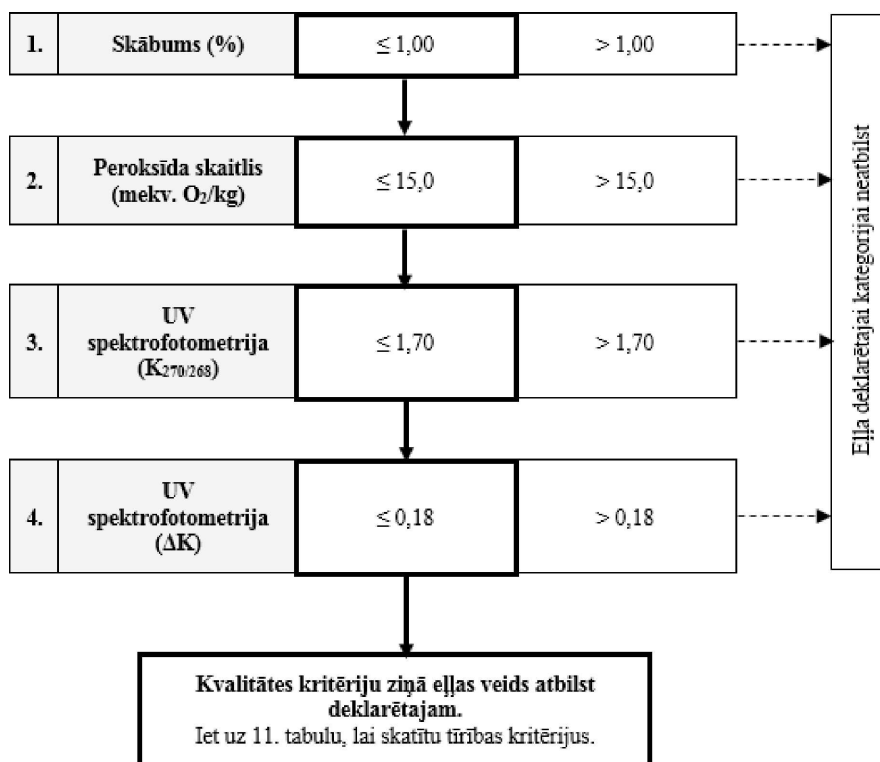
8. tabula. Neattīrīta olīvu izspaidu eļļa: tīrības kritēriji



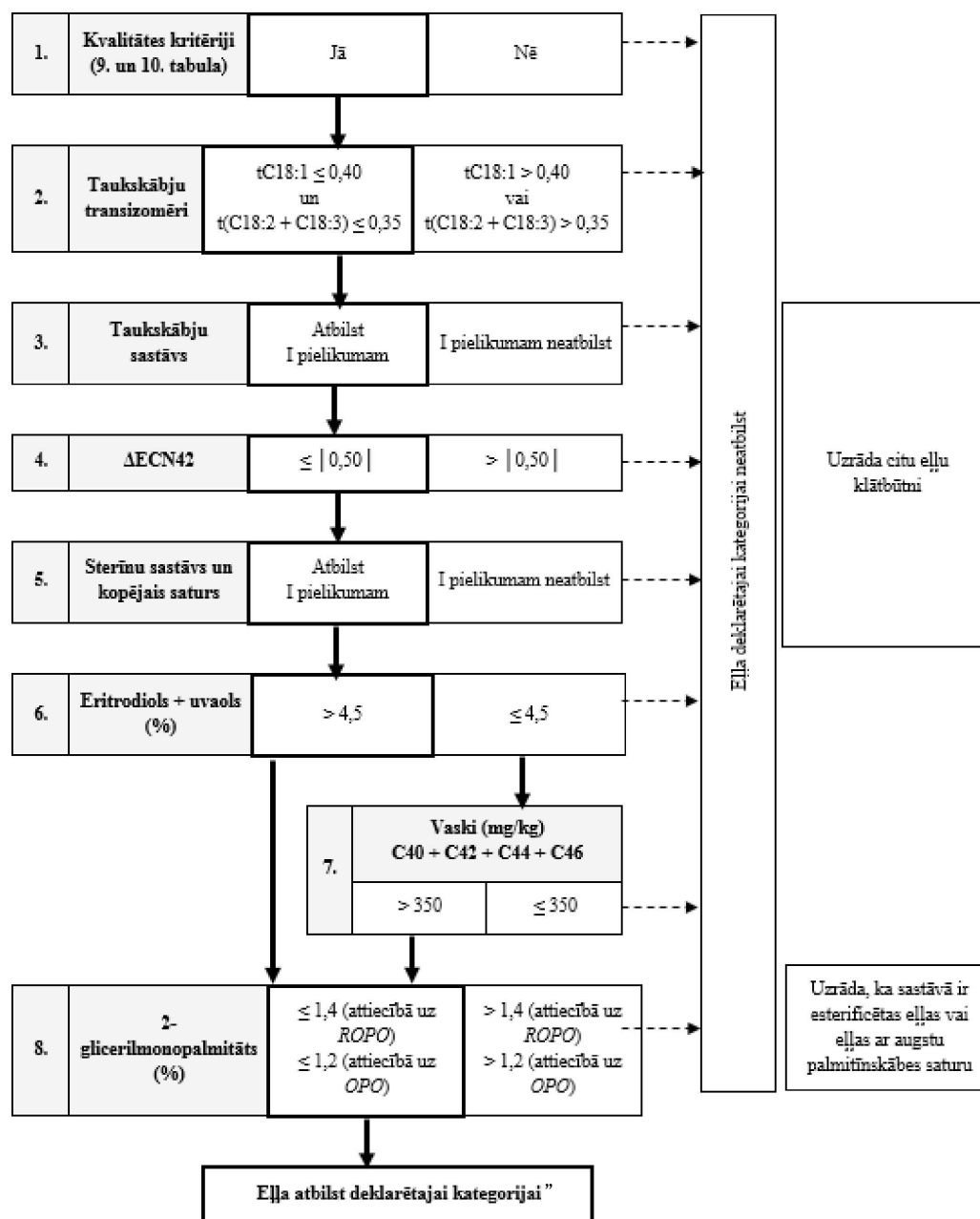
9. tabula. Rafinēta olīvu izspaidu eļļa: kvalitātes kritēriji



10. tabula. Olīvu izspaidu eļļa: kvalitātes kritēriji



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



IV PIELIKUMS

Regulas XII pielikumu groza šādi:

1) pielikuma 3.3. punktu aizstāj ar šādu:

“3.3. Fakultatīvs terminu lietojums marķējumā

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

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

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

Augļainums: no olīvu šķirnes atkarīgs aromātu kopums, kas raksturīgs eļļām, kuras iegūtas no nebojātām, svaigām olīvām, kur nav ne zaļo, ne gatavo augļu pārsvara. Tas ir uztverams tieši un/vai retronazāli.

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.

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 kņudi-noša sajūta, kurā rūgtuma un/vai pikantuma pazīmes mediāna ir par 2,0 punktiem lielāka par augļainuma mediānu.

Maiga eļļa: eļļa, kuras rūgtuma un pikantuma pazīmes mediāna ir 2,0 vai mazāka.

Garšas intensitātei atbilstīgo terminu saraksts:

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

Termini, uz kuriem attiecas eļļas organoleptiskā testa sertifikāts	Attiecīgās pazīmes mediāna
Vāji izteikts rūgtums	$\leq 3,0$
Vidēji izteikts rūgtums	$3,0 < Me \leq 6,0$
Stipri izteikts rūgtums	$> 6,0$
Vāji izteikts pikantums	$\leq 3,0$
Vidēji izteikts pikantums	$3,0 < Me \leq 6,0$
Stipri izteikts pikantums	$> 6,0$
Līdzsvarotas garšas eļļa	Rūgtuma pazīmes mediāna un pikantuma pazīmes mediāna pārsniedz augļainuma mediānu ne vairāk par 2,0 punktiem.
Maiga eļļa	Rūgtuma un pikantuma pazīmes mediāna ir 2,0 vai mazāka.”;

2) pielikuma 9.4. punktu aizstāj ar šādu:

“9.4. Eļļas klasificēšana

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

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

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

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

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

V PIELIKUMS

Regulas XVII pielikumu groza šādi:

1) pielikuma 5.1. punktu aizstāj ar šādu:

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

2) pielikuma 6.3.3. punktam pievieno šādu tekstu:

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

VI PIELIKUMS

Regulas XVIII pielikumu groza šādi:

1) pielikuma 4.2.1. punktu aizstāj ar šādu:

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

2) pievieno šādu 4.2.12. punktu:

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

VII PIELIKUMS

"XIX PIELIKUMS

STERĪNU SASTĀVA UN SATURA NOTEIKŠANA UN SPIRTU SAVIENOJUMU NOTEIKŠANA AR KAPILĀRĀS KOLONNAS GĀZU HROMATOGRĀFIJU

1. DARBĪBAS JOMA

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

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

2. PRINCIPS

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

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

1. DAĻA**NEPĀRZIEPJOJAMĀS VIELAS SAGATAVOŠANA**

1. DARBĪBAS JOMA

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

2. PRINCIPS

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

3. APARATŪRA

Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši turpmāk nosauktais.

3.1. Apaļkolba, kas ar pieslēpēta stikla savienojumu savienota ar atteces dzesinātāju, 250 ml.

3.2. Dalāmā piltuve, 500 ml.

3.3. Kolbas, 250 ml.

3.4. Mikrošļirces, 100 μ l un 500 μ l.

3.5. Cilindriskais poraina stikla filtrtūģelis G3 (poru lielums 15–40 μ m), diametrs aptuveni 2 cm, augstums aptuveni 5 cm, piemērots filtrēšanai vakuumā, ar stikla savienojumu ar ārējo pieslēpējumu.

3.6. Koniskā kolba (Erlenmeiera kolba), 50 ml, ar stikla savienojumu ar iekšējo pieslēpējumu, izmantojama kopā ar filtrtūģeli (3.5. punkts).

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

3.8. Kalcija dihlorīda eksikators.

4. REAGENTI

4.1. Kālija hidroksīds ar 85 % minimālo titru.

4.2. Kālija hidroksīds, aptuveni 2 M šķīdums etanolā.

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

4.3. Etilēteris, analīzes kvalitātes.

4.4. Bezūdens nātrija sulfāts, analīzes kvalitātes.

4.5. Acetons, hromatogrāfijas kvalitātes.

4.6. Etilēteris, hromatogrāfijas kvalitātes.

4.7. Etanols, analītiskas kvalitātes.

4.8. Etilacetāts, analītiskas kvalitātes.

4.9. Iekšējais standarts, α -holestanols, vairāk nekā 99 % tīrība (tīrība jāpārbauda ar gāzu hromatogrāfijas analīzi).

4.10. α -holestanola iekšējais standartšķīdums, 0,2 % šķīdums (masa/tilp.) etilacetātā (4.8. punkts).

4.11. Fenoltaleīna šķīdums etanolā, 10 g/l (4.7. punkts).

4.12. 0,1 % (masa/tilp.) 1-eikozanola šķīdums etilacetātā (iekšējais standarts).

5. PROCEDŪRA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. PRINCIPS

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

3. APARATŪRA

Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši turpmāk nosauktais.

3.1. Komplekts analīzei ar plānslāņa hromatogrāfiju, kurā izmanto 20 × 20 cm stikla plates.

3.2. Ultravioletā spuldze ar viļņu garumu 366 vai 254 nm.

3.3. Mikrošļirces, 100 µl un 500 µl.

3.4. Cilindriskais poraina stikla filtrtīģelis G3 (poru lielums 15–40 µm), diametrs aptuveni 2 cm, augstums aptuveni 5 cm, piemērots filtrēšanai vakuumā, ar stikla savienojumu ar ārējo pieslēpējumu.

3.5. Koniskā kolba (Erlenmeiera kolba), 50 ml, ar stikla savienojumu ar iekšējo pieslēpējumu, izmantojama kopā ar filtrtīģeli (3.4. punkts).

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

3.7. Kalcija dihlorīda eksikators.

3.8. *HPLC* sistēma, kurā ir:

3.8.1. binārais sūknis;

3.8.2. manuāls vai automātisks inžektors, kuram ir 200 µl inžektora cilpa;

3.8.3. integrēts atgāzētājs;

3.8.4. *UV-VIS* vai *IR* detektors.

3.9. *HPLC* kolonna (25 cm x 4 mm iekš. diam.) ar silikagelu 60 (daļiņu lielums 5 µm).

3.10. Šļirces filtrs, 0,45 µm.

3.11. Koniskā kolba (Erlenmeiera kolba), 25 ml.

4. REAĢENTI

4.1. Kālija hidroksīds ar 85 % minimālo titru.

4.2. Kālija hidroksīds, aptuveni 2 M šķīdums etanolā.

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

4.3. Etilēteris, analīzes kvalitātes.

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

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

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

4.6. Acetons, hromatogrāfijas kvalitātes.

- 4.7. n-heksāns, hromatogrāfijas kvalitātes.
 - 4.8. Etilēteris, hromatogrāfijas kvalitātes.
 - 4.9. Etanols, analītiskas kvalitātes.
 - 4.10. Etilacetāts, analītiskas kvalitātes.
 - 4.11. Standartšķīdums plānslāņa hromatogrāfijai: holesterīns, fitosterīni, spirti un eritrodiola šķīdums (5 %) etilacetātā (4.10. punkts).
 - 4.12. 2,7-dihlorfluoresceīna šķīdums (0,2 %) etanolā. To padara viegli bāzisku, pievienojot dažus pilienus 2 M kālija hidroksīda šķīduma spirtā (4.2. punkts).
 - 4.13. n-heksāna (4.7. punkts)/etilētera (4.8. punkts) maisījums 65:35 (tilp./tilp.).
 - 4.14. HPLC kustīgā fāze, n-heksāna (4.7. punkts)/etilētera (4.8. punkts) maisījums 1:1 (tilp./tilp.).
5. ATSAUCES METODE: SPIRTU SAVIENĀJUMU ATDALĪŠANA AR BĀZISKO PLĀNSLĀŅA HROMATOGRĀFIJAS (TLC) PLATI

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

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

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

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

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

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

4. piezīme. Augstāka temperatūra varētu pasliktināt atdalīšanos.

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

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

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

6. SPIRTU FRAKCIJAS ATDALĪŠANA AR HPLC

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

200 µl filtrētā nepārziepjamā šķīduma ievada HPLC (3.8. punkts).

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

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

Frakcijas ietvaicē sausas un sagatavo hromatogrāfiskajai analīzei.

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

3. DAĻA

SPIRTU SAVIENOJUMU FRAKCIJU GĀZU HROMATOGRĀFISKĀ ANALĪZE

1. DARBĪBAS JOMA

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

2. PRINCIPS

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

3. APARATŪRA

Parastais laboratorijas aprīkojums, jo īpaši turpmāk nosauktais.

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

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

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

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

3.2.3. liesmas jonizācijas detektors (FID);

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

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

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

4. REAĢENTI

4.1. Bezūdens piridīns, hromatogrāfijas kvalitātes.

4.2. Heksametildisilazāns, analītiskas kvalitātes.

4.3. Trimetilhlorsilāns, analītiskas kvalitātes.

- 4.4. Sterīnu trimetilsililēteru parauga šķīdumi. Pagatavo lietošanas gaitā no sterīniem un eritrodiola, kas iegūti no sterīnus un eritrodiolu saturošām eļļām.
- 4.5. C20 līdz C28 alifātisko spirtu trimetilsililēteru standartšķīdumi. Vajadzības gadījumā tos var pagatavot no tīru spirtu maisījumiem.
- 4.6. Nesējgāze: ūdeņradis vai hēlijs, gāzu hromatogrāfijas tīrības.
- 4.7. Palīgģāzes: ūdeņradis, hēlijs, slāpeklis un gaiss, gāzu hromatogrāfijas tīrības.
- 4.8. Sililēšanas reaģents, kas ir piridīna/heksametildisilazāna/trimetilhlorsilāna maisījums 9:3:1 (tilp./tilp./tilp.).
- 4.9. n-heksāns, hromatogrāfijas kvalitātes.

5. TRIMETILSILILĒTERU IEGŪŠANA

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

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

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

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

6. GĀZU HROMATOGRĀFISKĀ ANALĪZE

6.1. Sagatavošanas operācijas, kapilārās kolonnas kondicionēšana

Kolonnu (3.3. punkts) iemontē gāzu hromatogrāfā, tās ieeju pievienojot inžektoram ar plūsmas sadalītāju, bet izeju – detektoram.

Izdara gāzu hromatogrāfijas iekārtas vispārējo pārbaudi (noplūdes no gāzu kontūriem, detektora, plūsmas sadalīšanas un reģistrējošās sistēmas efektivitāte utt.).

Ja kolonnu lieto pirmoreiz, to ieteicams kondicionēt. Lēnu gāzes plūsmu laiž cauri kolonnai, pēc tam ieslēdz gāzu hromatogrāfu un pakāpeniski uzsilda līdz temperatūrai, kas ir vismaz 20 °C virs darba temperatūras (8. piezīme). Šo temperatūru uztur vismaz divas stundas, pēc tam iekārtu noregulē darba režīmā (noregulē gāzu plūsmas un sadali, liesmas aizdedzi, savienojumu ar datēšanas sistēmu, kā arī noregulē kolonnas, detektora un inžektora temperatūru utt.), pēc tam reģistrē signālu, izvēloties jutību, kas ir vismaz divas reizes augstāka par analīzei paredzēto jutību. Nulles līnijai ir jābūt lineārai, bez smailēm, un tā nedrīkst nobīdīties. Negatīva taisnvirziena nobīde norāda uz noplūdēm kolonnas savienojumu vietās; pozitīva nobīde norāda uz nepareizu kolonnas kondicionēšanu.

8. *piezīme.* Kondicionēšanas temperatūrai vienmēr jābūt vismaz par 20 °C zemākai nekā maksimālā temperatūra, kas norādīta lietojamajai stacionārajai fāzei.

6.2. Darba apstākļi

Optimizē temperatūras programmu un nesējgāzes plūsmu, lai iegūtu hromatogrammas, kas ir līdzīgas 3.–6. attēlā redzamajām.

Turpinājumā norādītie parametri ir testēti un atzīti par lietderīgiem.

6.2.1. Alifātiskie spirti

Žāvēšanas skapja programma	180 °C (8 min) → 260 °C (ar kāpumu 5 °C/min) → 260 °C (15 min)
Inžektora temperatūra	280 °C
Detektora temperatūra	290 °C
Nesējgāzes lineārais ātrums	Hēlijs (20–30 cm/s); ūdeņradis (30–50 cm/s)
Dalījuma attiecība	1:50 līdz 1:100
Ievadītais tilpums	0,5 līdz 1 µl TMSE šķīduma

6.2.2. Sterīni un triterpēndioli

Žāvēšanas skapja programma	260 ± 5 °C, izotermiska
Inžektora temperatūra	280–300 °C
Detektora temperatūra	280–300 °C
Nesējgāzes lineārais ātrums	Hēlijs (20–30 cm/s); ūdeņradis (30–50 cm/s)
Dalījuma attiecība	1:50 līdz 1:100
Ievadītais tilpums	0,5 līdz 1 µl TMSE šķīduma

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

- spirta C26 aiztures laiks ir 18 ± 5 min,
- spirta C22 smaile ir 80 ± 20 % no skalas pilnas vērtības olīveļļai un 40 ± 20 % no skalas pilnas vērtības olīvu izspaidu eļļai,
- β-sitosterīna smailes aiztures laikam jābūt 20 ± 5 minūtēm,
- kampesterīna smailei jābūt: olīveļļai (vidējais saturs 3 %) 20 ± 5 % no pilnas skalas,
- visiem klātesošajiem sterīniem jābūt atdalītiem. Turklāt atdalītajām smailēm ir jābūt arī pilnībā nošķirtām, t. i., smailes līnijai ir jāatgriežas uz nulles līnijas, pirms sāk veidoties jauna smaile. Tomēr nepilnīga nošķiršana ir pieņemama, ja smailes ar relatīvo aiztures laiku RRT 1,02 (sitostanols) var kvantitatīvi noteikt, izmantojot perpendikulu.

6.3. Analītiskā procedūra.

10 µl mikrošļircē (3.4. punkts) vispirms ieviek 1 µl heksāna, tad 0,5 µl gaisa un pēc tam 0,5–1 µl parauga šķīduma. Pavelk šļircēs virzuli, lai iztukšotu adatu. Adatu izdur cauri inžektora membrānai un pēc vienas vai divām sekundēm strauji ievada šļircēs saturu, tad aptuveni pēc piecām sekundēm lēnām izvelk adatu. Var izmantot arī automātisku inžektoru.

Turpina reģistrēt, līdz atbilstošo klātesošo spirtu savienojumu TMSE ir pilnībā eluēti. Nulles līnijai visu laiku ir jāatbilst attiecīgo darba apstākļu prasībām (6.2.1. vai 6.2.2. punkts).

6.4. Smaiļu identificēšana

Atsevišķās smailes identificē pēc aiztures laikiem, salīdzinot ar alifātisko spirtu un triterpēnspirtu vai sterīnu un triterpēndiolu TMSE maisījumiem, kas analizēti tādos pašos apstākļos. Alifātisko spirtu un triterpēnspirtu frakcijas hromatogramma ir redzama 3. attēlā, un attiecīgās sterīnu un triterpēndiolu hromatogrammas ir redzamas 2. attēlā.

Alifātiskie spirti eluējas šādā secībā: C20-ols (I.S.), C22-ols, C23-ols, C24-ols, C25-ols, C26-ols, C27-ols un C28-ols.

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

6.5. Kvantitatīvā novērtēšana

Alifātisko spirtu C22, C24, C26 un C28 un 1-eikozanola smaiļu laukumus aprēķina datu ieguves sistēmā. Uzkata, ka 1-eikozanola atbildes koeficients ir vienāds ar 1.

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

Katra atsevišķā spirtu savienojuma koncentrāciju, kas izteikta mg/kg taukvielas, aprēķina šādi:

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

kur:

A_x = spirtu savienojuma x smailes laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās;

A_s = 1-eikozanola/ α -holestanola smailes laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās;

m_s = pievienotā 1-eikozanola/ α -holestanola masa miligramos;

m = noteikšanai ņemtā parauga masa gramos.

7. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

Atsevišķo alifātisko spirtu un triterpēnspirtu koncentrāciju izsaka mg/kg taukvielas, un to summu norāda kā "kopējo alifātisko spirtu saturu". Kopējais saturs ir C22, C24, C26 un C28 summa.

Katra atsevišķā spirtu savienojuma sastāvu izsaka ar skaitli līdz vienai zīmei aiz komata.

Kopējā sterīnu koncentrācija ir jāizsaka veselā skaitlī.

Katra atsevišķā sterīna procentus aprēķina pēc attiecīgā smailes laukuma attiecības pret sterīnu smaiļu kopējo laukumu:

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

kur:

A_x = sterīna x smailes laukums;

ΣA = sterīnu smaiļu kopējais laukums.

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

Aprēķina eritrodiola un uvaola procentus:

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

kur:

A_{Er} = eritrodiola laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās;

A_{Uv} = uvaola laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās;

ΣA_T = sterīna + eritrodiola + uvaola kopējais laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās.

Līdztekus atsevišķu sterīnu un triterpēndiolu relatīvajiem procentiem un sterīnu kopējai koncentrācijai ir jāaprēķina eritrodiola un uvaola koncentrācija un to summa mg/kg taukvielas, izmantojot šādas formulas:

$$\text{Eritrodiols} = \frac{A_{Er} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

$$\text{Uvaols} = \frac{A_{Uv} \times m_s}{A_s \times m} \times 1\,000$$

kur:

A_{Er} = eritrodiola smailes laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās;

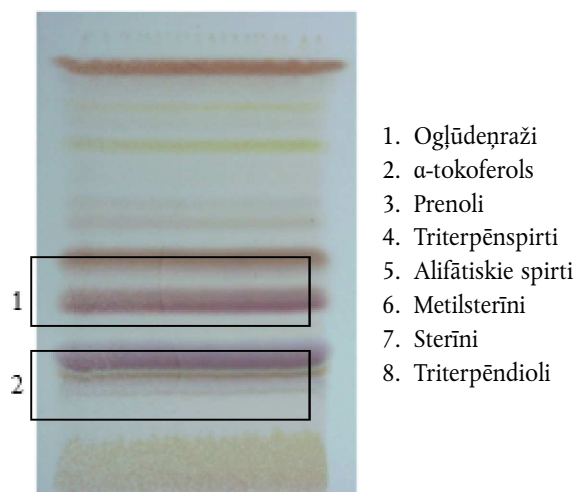
A_{Uv} = uvaola laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās;

A_s = α -holestanola smailes laukums datošanas sistēmas uzskaites vienībās;

m_s = pievienotā α -holestanola masa miligramos;

m = noteikšanai ņemtā parauga masa gramos.

Papildinājums

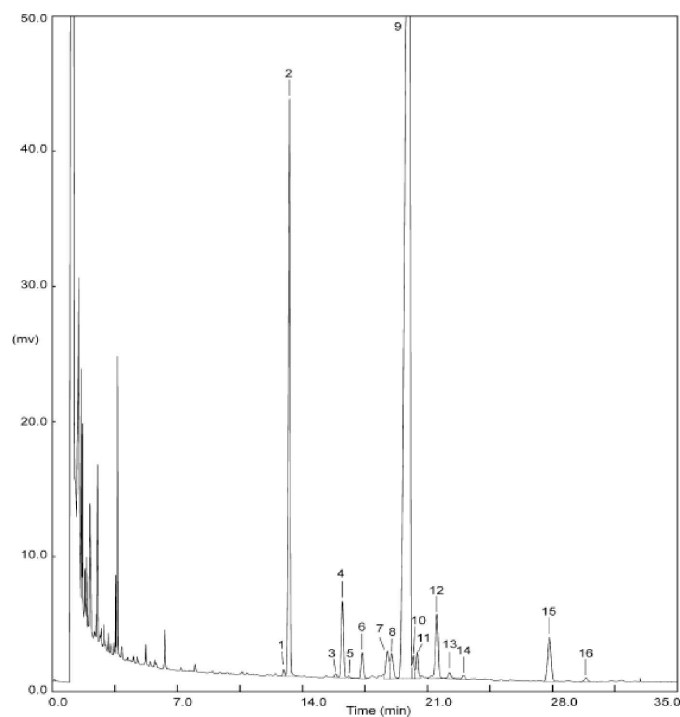


1. attēls. TLC, kas iegūta no olīvu izspaidu eļļas nepārziepjamās frakcijas, kura divreiz elutēta ar heksānu:dietilēteri (65:35), attīstīta ar SO_4H_2 (50 %) un karsēta. Noskrāpējamās joslas atrodas taisnstūrī, 1. taisnstūrī ir alifātisko spirtu joslas, bet 2. taisnstūrī sterīnu un triterpēndiolu joslas.

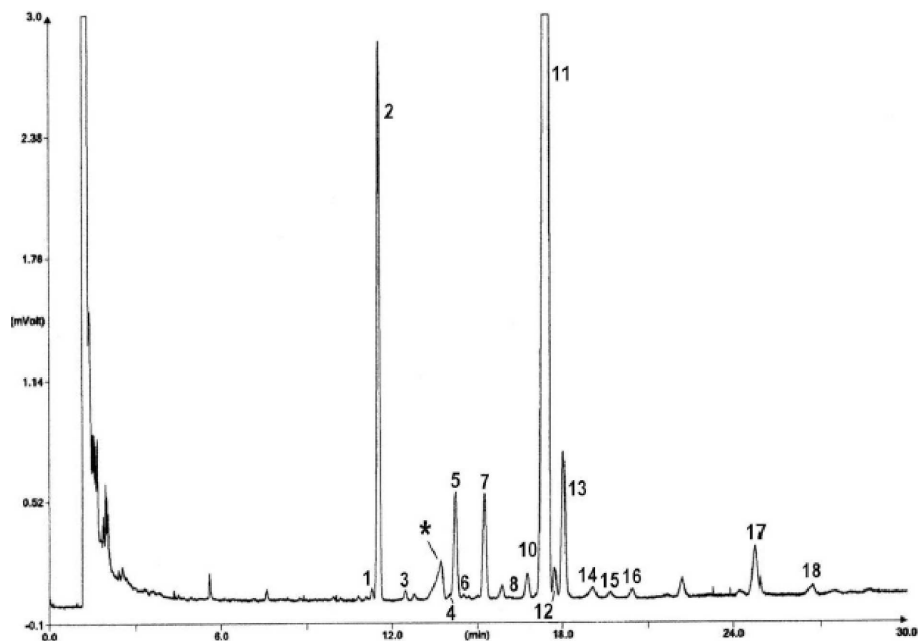
I tabula. Sterīnu relatīvie aiztures laiki

Smaile	Identifikācija		Relatīvie aiztures laiki	
			SE 54 kolonna	SE 52 kolonna
1.	Holesterīns	Δ -5-holesten-3 β -ols	0,67	0,63
2.	Holestanols	5 α -holestan-3 β -ols	0,68	0,64
3.	Brasikasterīns	[24S]-24-metil- Δ -5,22-holestadien-3 β -ols	0,73	0,71
*	Ergosterīns	[24S]-24-metil- Δ -5,7,22 holestatrien-3 β -ols	0,78	0,76
4.	24-metilēnholesterīns	24-metilēn- Δ -5,24-holestadien-3 β -ols	0,82	0,80
5.	Kampesterīns	(24R)-24-metil- Δ -5-holesten-3 β -ols	0,83	0,81
6.	Kampestanols	(24R)-24-metil-holestan-3 β -ols	0,85	0,82
7.	Stigmasterīns	[24S]-24-etil- Δ -5,22-holestadien-3 β -ols	0,88	0,87
8.	Δ -7-kampesterīns	(24R)-24-metil- Δ -7-holesten-3 β -ols	0,93	0,92
9.	Δ -5,23-stigmastadienols	(24R)-24-etil- Δ -5,23-holestadien-3 β -ols	0,95	0,95
10.	Klerosterīns	[24S]-24-etil- Δ -5,25-holestadien-3 β -ols	0,96	0,96

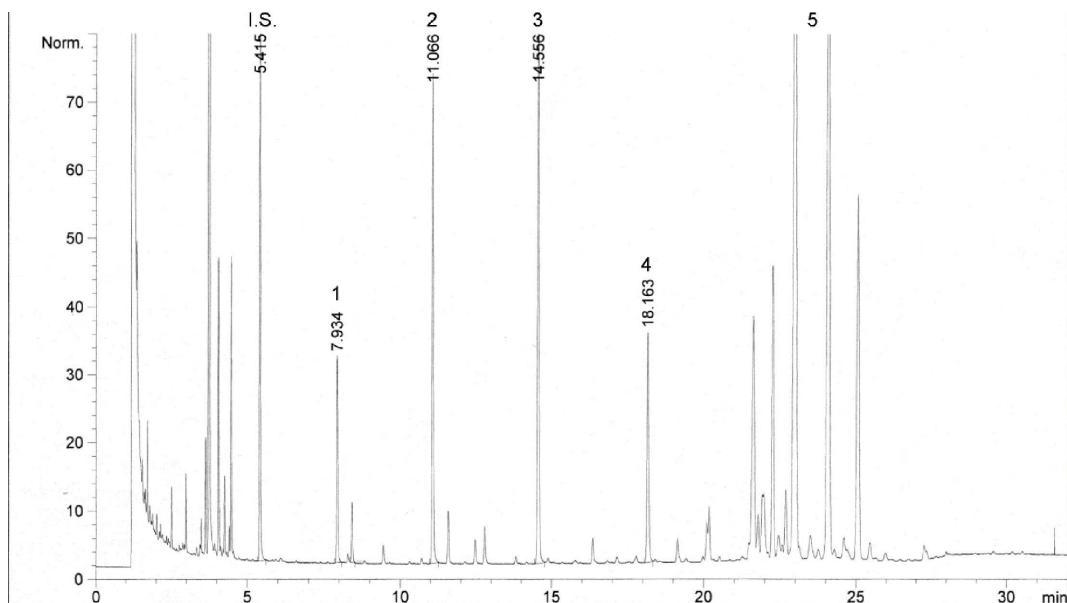
Smaile	Identifikācija		Relatīvie aiztures laiki	
			SE 54 kolonna	SE 52 kolonna
11.	Betasitosterīns	(24R)-24-etil- Δ -5-holesten-3 β -ols	1,00	1,00
12.	Sitostanols	24-etil-holestan-3 β -ols	1,02	1,02
13.	Δ -5-avenasterīns	(24Z)-24-etiliden- Δ -holesten-3 β -ols	1,03	1,03
14.	Δ -5,24-stigmastadienols	(24R,S)-24-etil- Δ -5,24-holestadien-3 β -ols	1,08	1,08
15.	Δ -7-stigmastenols	(24R,S)-24-etil- Δ -7-holesten-3 β -ols	1,12	1,12
16.	Δ -7-avenasterīns	(24Z)-24-etiliden- Δ -7-holesten-3 β -ols	1,16	1,16
17.	Eritrodiols	5 α -olean-12-en-3 β ,28-diols	1,41	1,41
18.	Uvaols	Δ 12-ursen-3 β ,28-diols	1,52	1,52



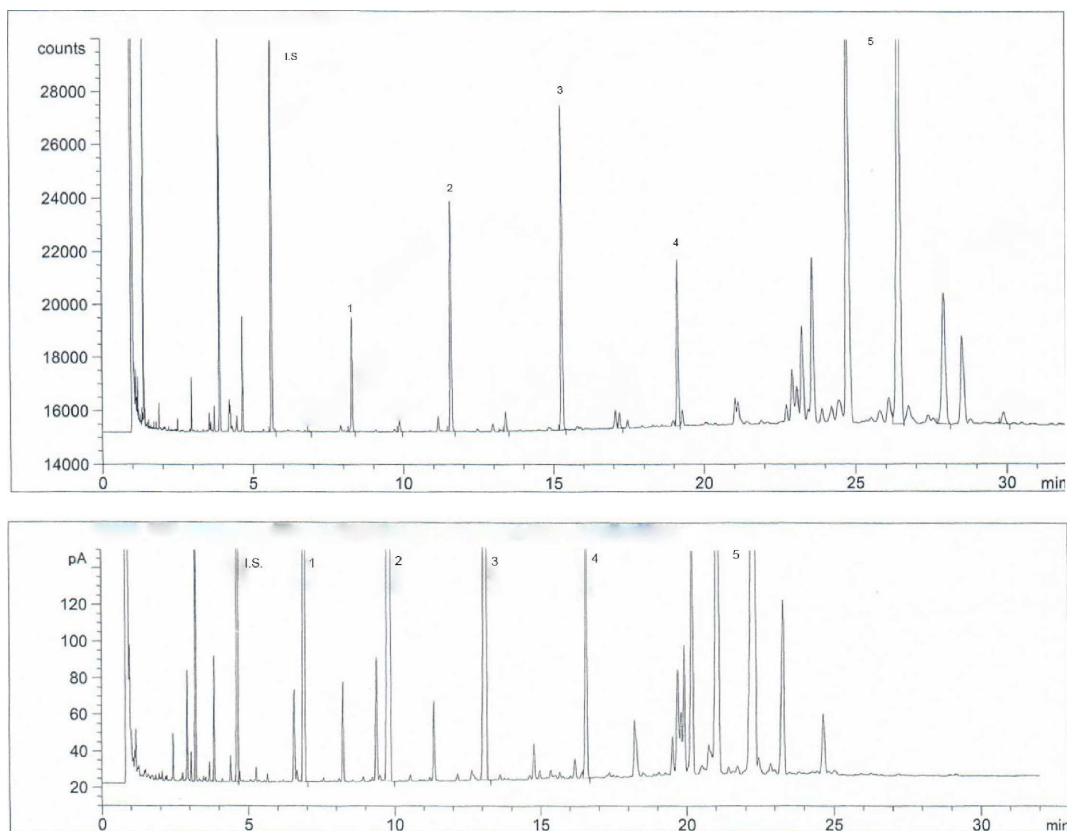
2. attēls. Rafinētas olīveļļas sterīnu un triterpēndiolu GC-FID hromatogrāfiskais profils. (1) Holesterīns, (2) α -holestanols (I.S.), (3) 24-metilēnholesterīns, (4) kampesterīns, (5) kampestanols, (6) stigmasterīns, (7) Δ 5,23-stigmastadienols, (8) klerosterīns, (9) betasitosterīns, (10) sitostanols, (11) Δ 5-avenasterīns, (12) Δ 5,24-stigmastadienols, (13) Δ 7-stigmastenols, (14) Δ 7-avenasterīns, (15) eritrodiols, (16) uvaols.



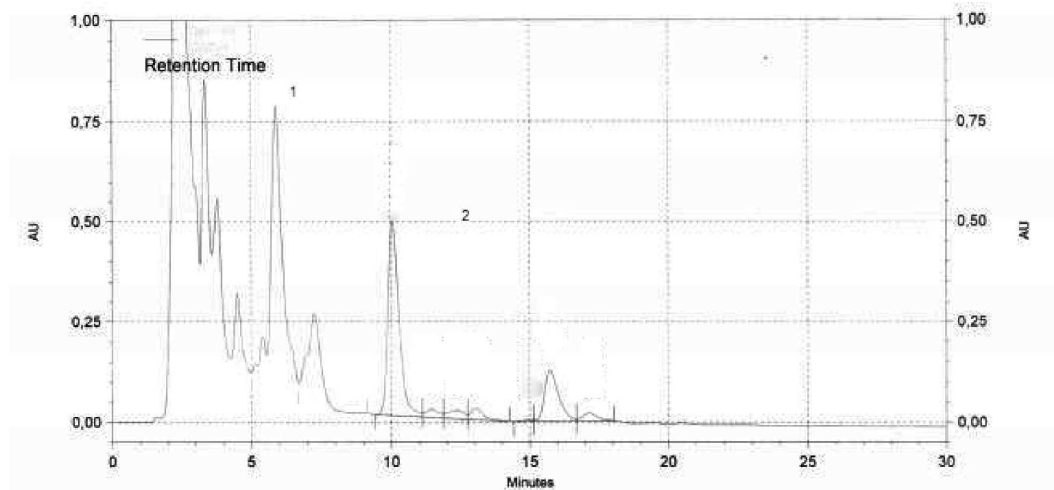
3. attēls. Spīdīgās olīveļļas sterīnu un triterpēndiolu GC-FID hromatogrāfiskais profils. (1) Holesterīns, (2) α -holestanols, (3) brasikasterīns, (4) 24-metilēnholesterīns, (5) kampesterīns, (6) kampestanols, (7) stigmasterīns, (8) Δ^7 -kampesterīns, (9) $\Delta^{5,23}$ -stigmastadienols, (10) klerosterīns, (11) betasitosterīns, (12) sitostanols, (13) Δ^5 -avenasterīns, (14) $\Delta^{5,24}$ -stigmastadienols, (15) Δ^7 -stigmastenols, (16) Δ^7 -avenasterīns, (17) eritrodīols, (18) uvaols.



4. attēls. Olīveļļas alifātisko spirtu un triterpēnspirtu GC-FID hromatogrāfiskais profils. (I.S.) C20-ols, (1) C22-ols, (2) C24-ols, (3) C26-ols, (4) C28-ols, (5) triterpēnspirti.



5. attēls. Rafinētas olīveļļas un otrās centrifugēšanas olīveļļas alifātisko spirtu un triterpēnspirtu GC-FID hromatogrāfiskais profils. (I.S.) C20-ols, (1) C22-ols, (2) C24-ols, (3) C26-ols, (4) C28-ols, (5) triterpēnspirti.



6. attēls. HPLC hromatogramma, kas iegūta no olīveļļas nepārziepjojamās vielas, kura atdalīta ar HPLC, izmantojot UV detektoru. (1) Alifātiskie spirti un triterpēnspirti; (2) sterīni un triterpēndioli.”