KOMISJONI RAKENDUSMÄÄRUS (EL) 2019/1604,

27. september 2019,

millega muudetakse määrust (EMÜ) nr 2568/91 oliiviõlide ja pressimisjääkide omaduste ja asjakohaste analüüsimeetodite kohta

EUROOPA KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut,

võttes arvesse Euroopa Parlamendi ja nõukogu 17. detsembri 2013. aasta määrust (EL) nr 1308/2013, millega kehtestatakse põllumajandustoodete ühine turukorraldus ning millega tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrused (EMÜ) nr 922/72, (EMÜ) nr 234/79, (EÜ) nr 1037/2001 ja (EÜ) nr 1234/2007, ([1]) eriti selle artikli 91 esimese lõigu punkti d,

ning arvestades järgmist:

(1) Komisjoni määruses (EMÜ) nr 2568/91 ([2]) on määratud kindlaks oliiviõli ja oliivijääkõli füüsikalis-keemilised ja organoleptilised omadused ning nende hindamise meetodid.

(2) Neid meetodeid ning õlide omaduste piirtasemeid ajakohastatakse korrapäraselt vastavalt keemiaekspertide seisukohtadele ning lähtudes rahvusvahelises oliiviõlinõukogus tehtud uuringutest.

(3) Selleks et tagada rahvusvahelise oliivinõukogu kehtestatud uusimate rahvusvaheliste standardite rakendamine liidu tasandil, tuleks määruses (EMÜ) nr 2568/91 sätestatud teatavaid analüüsimeetodeid ajakohastada.

(4) Rahvusvahelise oliivinõukogu kaubandusstandardis on muudetud vaba happesuse, peroksiidarvu, organoleptilise hindamise (puuduse mediaan ja puuviljalisuse mediaan) näitajaid ning ECN42 (HPLC) ja ECN42 (teoreetiline arvutus) erinevuse näitajaid, et tagada kooskõla analüüsimeetodi täpsusnäitajatega.

(5) Vastavalt määruse (EMÜ) nr 2568/91 artikli 2a lõikele 5 peavad liikmesriigid kindlaks tegema, kas oliiviõli proov vastab deklareeritud kategooriale, kontrollides kõnealuse määruse I lisas sätestatud omadusi mis tahes järjekorras või kõnealuse määruse Ib lisas sätestatud otsustamisskeemil sätestatud järjekorras.

(6) Võttes arvesse hiljutisi arenguid, on asjakohane ajakohastada eespool esitatust lähtuvalt määruse (EMÜ) nr 2568/91 Ib lisas esitatud tabeleid ja lisa liiteid. Samuti näib, et Ib lisa kontekstis on mõiste „vooskeem“ sobivam kui mõiste „otsustamisskeem“.

(7) Määruse (EMÜ) nr 2568/91 XII lisa punktis 9.4 käsitletakse puuduste mediaani suurima intensiivsusega tajutud puuduse mediaanina. Võttes arvesse kontrollhindamisi ja seda, et õli vastavust peavad hindama eri degusteerimiskomisjonid, tuleks selgitada, et otsus õli omaduste vastavuse kohta deklareeritud kategooriale on seotud üksnes põhipuuduse mediaani väärtusega, olenemata selle laadist.

(8) Seepärast tuleks määrust (EMÜ) nr 2568/91 vastavalt muuta.

(9) Käesoleva määrusega ette nähtud meetmed on kooskõlas põllumajandusturgude ühise korralduse komitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Määrust (EMÜ) nr 2568/91 muudetakse järgmiselt.

1) Artiklit 2 muudetakse järgmiselt:

a) lõike 1 punkt l asendatakse järgmisega:

„l) steroolide koostis ja sisaldus ning alkohoolsed ühendid määratakse kapillaargaasikromatograafiliselt XIX lisas sätestatud meetodiga“;

([1]) ELT L 347, 20.12.2013, lk 671.

([2]) Komisjoni 11. juuli 1991. aasta määrus (EMÜ) nr 2568/91 oliiviõlide ja pressimisjääkide omaduste ja asjakohaste analüüsimeetodite kohta (EÜT L 248, 5.9.1991, lk 1).

b) lõike 2 kolmas lõik asendatakse järgmisega:

„Kui degusteerimiskomisjon organoleptiliste omaduste põhjal ei kinnita deklareeritud kategooriat, korraldavad ametiasutused või nende esindajad huvitatud isiku palvel viivitamata kaks kontrollhindamist, mille teevad teised heakskiidetud degusteerimiskomisjonid. Vähemalt ühel degusteerimiskomisjonil peab olema asjaomase tootja liikmesriigi heakskiit. Asjaomaseid omadusi peetakse vastavaks deklareeritud omadustele, kui neil kahel kontrollhindamisel kinnitatakse deklareeritud klassifikatsioon. Vastupidisel juhul, olenemata kontrollhindamiste käigus tuvastatud puuduste liigist, ei loeta klassifikatsiooni omadustele vastavaks ning kontrollhindamise kulud kannab huvitatud osaline.“

2) Artikli 2a lõike 5 punkt b asendatakse järgmisega:

„b) Ib lisa vooskeemil sätestatud järjekorras, kuni saavutatakse mõni vooskeemil nimetatud otsustest.“

3) Tabel „LISAD Kokkuvõte“ asendatakse käesoleva määruse I lisas esitatud tabeliga.

4) I lisa asendatakse käesoleva määruse II lisa tekstiga.

5) Ia lisa punkt 2.1 asendatakse järgmisega:

„2.1. Iga üksikproov tuleb jagada laboriproovideks vastavalt standardi EN ISO 5555 punktile 2.5 ja analüüsida vastavalt Ib lisa vooskeemis näidatud järjekorrale või muus juhuslikus järjekorras.“

6) Ib lisa asendatakse käesoleva määruse III lisa tekstiga.

7) V lisa jäetakse välja.

8) VII lisa punkt 4.2 asendatakse järgmisega:

„4.2. n-heksaan (kromatograafiaks sobiva puhtusastmega). Heksaani võib asendada isooktaaniga (2,2,4-trimetüülpentaan, kromatograafiaks sobiva puhtusastmega), kui saavutatakse võrreldavad täpsusnäitajad.“

9) XII lisa muudetakse vastavalt käesoleva määruse IV lisale.

10) XVII lisa muudetakse vastavalt käesoleva määruse V lisale.

11) XVIII lisa muudetakse vastavalt käesoleva määruse VI lisale.

12) XIX lisa asendatakse käesoleva määruse VII lisa tekstiga.

13) XX lisa punkt 4.2 asendatakse järgmisega:

„4.2. N-heksaan, kromatograafiaks sobiva puhtusastmega või jäägivaba. Heksaani võib asendada isooktaaniga (2,2,4-trimetüülpentaan kromatograafiaks sobiva puhtusastmega), kui saavutatakse võrreldavad täpsusnäitajad. Lahustid, mille keemispunkt on kõrgem kui n-heksaanil, aurustuvad kauem, kuid, kuna heksaan on toksiline, on need eelistatud. Puhtus peab olema kontrollitud; näiteks võib kontrollida jääki pärast 100 ml lahusti aurustamist.

ETTEVAATUST! Aur on süttimisohtlik! Hoidke eemal soojusallikatest, sädemetest ja lahtisest leegist. Jälgige, et pudel oleks alati kindlalt suletud. Kasutamise ajal peab ruumis olema korralik ventilatsioon. Vältige aurude kogunemist ja eemaldage kõik tuleohu allikad, nagu soojendusriistad või elektriaparaadid, mis ei ole süttimisohutust materjalist. Sissehingamisel kahjulik, kuna võib kahjustada närvirakke. Vältige aurude sissehingamist. Vajaduse korral kasutage sobivat respiraatorit. Vältige sattumist nahale või silma.

Isooktaan on süttiv vedelik ja seega tuleohtlik. Selle plahvatuspiir õhus on 1,1 % kuni 6,0 % (mahuosa). See on mürgine allaneelamisel ja sissehingamisel. Selle lahustiga töötamiseks tuleb kasutada hästi toimivat ventileeritavat tõmbekappi.“

Artikkel 2

Käesolev määrus jõustub kahekümnendal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 27. september 2019

Komisjoni nimel
president
Jean-Claude JUNCKER

I LISA

„*LISAD*

ÜLEVAADE

I lisa	Oliiviõli omadused
Ia lisa	Proovide võtmine oliiviõlist või oliivijääkõlist, mis on tarnitud esmapakendis
Ib lisa	Vooskeem, mille järgi kontrollitakse, kas oliiviõli proov on kooskõlas deklareeritud kategooriaga
II lisa	Vabade rasvhapete määramine külmmeetodil
III lisa	Peroksiidiarvu määramine
IV lisa	Vahade sisalduse gaasikromatograafiline määramine kapillaarkolonniga
VII lisa	2-glütserüülmonopalmitaadi protsendilise sisalduse määramine
IX lisa	Spektrofotomeetriline analüüs ultraviolettpiirkonnas
X lisa	Rasvhapete metüülestrite gaasikromatograafiline määramine
XI lisa	Oliiviõli halogeenitud lenduvate lahustite määramine
XII lisa	Rahvusvahelise oliiviõlinõukogu meetod külmpressitud oliiviõlide organoleptiliseks hindamiseks
XV lisa	Oliivijääkõli õlisisaldus
XVI lisa	Joodiarvu määramine
XVII lisa	Meetod stigmastadieenide määramiseks taimeõlides
XVIII lisa	ECN 42-triatsüülglütseroolide tegeliku ja teoreetiliselt arvutatud sisalduse vahe määramine
XIX lisa	Steroolse koostise ja sisalduse ning alkoholiühendite määramine kapillaargaasikromatograafiaga
XX lisa	Meetod vahade, rasvhapete metüülestrite ja etüülestrite sisalduse määramiseks kapillaargaasikromatograafiaga
XXI lisa	Oliiviõlide vastavuse artikli 8 lõikes 2 osutatud kontrollimise tulemused“

II LISA

„*I LISA*

OLIIVIÕLI OMADUSED

Kvaliteediomadused

Kategooria	Happesus (%) (*)	Peroksiidiarv (mekv O_2/kg)	K_{232}	K_{268} või K_{270}	Δ-K	Organoleptiline hinnang		Rasvhapete etüülestrid (mg/kg)
						Puuduse mediaan (Md)	Puuviljalisuse mediaan (Mf)	
1. Esimese külmpressi oliiviõli	≤ 0,80	≤ 20,0	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0,0	Mf > 0,0	≤ 35
2. Külmpressitud oliiviõli	≤ 2,0	≤ 20,0	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0,0	—
3. Lambiõli	> 2,0	—	—	—	—	Md > 3,5 (1)	—	—
4. Rafineeritud oliiviõli	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 1,25	≤ 0,16		—	—
5. Rafineeritud oliiviõlist ja külmpressitud oliiviõlist koosnev oliiviõli	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,15	≤ 0,15		—	—
6. Töötlemata oliivijääkõli	—	—	—	—	—		—	—
7. Rafineeritud oliivijääkõli	≤ 0,30	≤ 5,0	—	≤ 2,00	≤ 0,20		—	—
8. Oliivijääkõli	≤ 1,00	≤ 15,0	—	≤ 1,70	≤ 0,18		—	—

(1) Puuduse mediaan võib olla kuni 3,5, kui puuviljalisuse mediaan on 0,0.

Puhtus

Kategooria	Rasvhappeline koostis (1)						Oleiinhappe transisomeeride kogusumma (%)	Linool- ja linoleenhappe transisomeeride summa (%)	Stigmastadieenid (mg/kg (2))	Vahe: ECN42 (HPLC) ja ECN42 (teoreetiline arvutus)	2-glütserüülmonopalmitaat (%)
	Müristiinhape (%)	Linoleenhape (%)	Arahhiinhape (%)	Eikoseenhape (%)	Beheenhape (%)	inhape (%)					
1. Esimese külmpressi oliiviõli	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9, kui palmitiinhappe üldsisaldus ≤ 14,00 % ≤ 1,0, kui palmitiinhappe üldsisaldus > 14,00 %
2. Külmpressitud oliiviõli	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ |0,20|	≤ 0,9, kui palmitiinhappe üldsisaldus ≤ 14,00 % ≤ 1,0, kui palmitiinhappe üldsisaldus > 14,00 %
3. Lambiõli	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ |0,30|	≤ 0,9, kui palmitiinhappe üldsisaldus ≤ 14,00 % ≤ 1,1, kui palmitiinhappe üldsisaldus > 14,00 %
4. Rafineeritud oliiviõli	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9, kui palmitiinhappe üldsisaldus ≤ 14,00 % ≤ 1,1, kui palmitiinhappe üldsisaldus > 14,00 %
5. Rafineeritud oliiviõlist ja külmpressitud oliiviõlist koosnev oliiviõli	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,30	—	≤ |0,30|	≤ 0,9, kui palmitiinhappe üldsisaldus ≤ 14,00 % ≤ 1,0, kui palmitiinhappe üldsisaldus > 14,00 %
6. Töötlemata oliivijääkõli	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,10	—	≤ |0,60|	≤ 1,4
7. Rafineeritud oliivijääkõli	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,4
8. Oliivijääkõli	≤ 0,03	≤ 1,00	≤ 0,60	≤ 0,50	≤ 0,30	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,35	—	≤ |0,50|	≤ 1,2

(1) Muude rasvhapete sisaldus (%): palmitiinhape: 7,50–20,00; palmitoleiinhape: 0,30–3,50; heptadekaanhape: ≤ 0,40; heptadetseenhape ≤ 0,60; steariinhape: 0,50–5,00; oleiinhape: 55,00–83,00; linoolhape: 2,50–21,00.

(2) Kokku isomeere, mis õnnestus (mida ei õnnestunud) lahutada kapillaarkolonniga.

Kategooria	Steroolne koostis						Steroolid kokku (mg/kg)	Erütrodiool ja uvaool (%) (**)	Vahad (mg/kg) (**)
	Kolesterool (%)	Brassikasterool (%)	Kampesterool (1) (%)	Stigmasterool (%)	Näiline β–sitosterool (2) (%)	Δ-7-stigmastenool (1) (%)			
1. Esimese külmpressi oliiviõli	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
2. Külmpressitud oliiviõli	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< kamp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5	$C_{42} + C_{44} + C_{46} \leq 150$
3. Lambiõli	≤ 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. Rafineeritud oliiviõli	≤ 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. Rafineeritud oliiviõlist ja külmpressitud oliiviõlist koosnev oliiviõli	≤ 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. Töötlemata oliivijääkõli	≤ 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. Rafineeritud oliivijääkõli	≤ 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. Oliivijääkõli	≤ 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) Vt käesoleva lisa juurde kuuluv liide.

(2) Näiline β-sitosterool: Δ-5,23-stigmastadienool + klerosterool + β-sitosterool + sitostanool + Δ-5-avenasterool + Δ-5,24-stigmastadienool.

(3) Õlisid vahasisaldusega 300–350 mg/kg käsitatakse lambiõlidena, kui alifaatsete alkoholide üldsisaldus on kuni 350 mg/kg või kui erütrodiooli ja uvaooli sisaldus on kuni 3,5 %.

(4) Õlisid vahasisaldusega 300–350 mg/kg käsitatakse töötlemata oliivijääkõlidena, kui alifaatsete alkoholide üldsisaldus on üle 350 mg/kg ning kui erütrodiooli ja uvaooli sisaldus on suurem kui 3,5 %.

Märkused

a) Analüüside tulemused peavad olema väljendatud sama arvu kümnendkohtadega kui iga omaduse puhul on ette nähtud. Viimast numbrit tuleb suurendada ühe ühiku võrra, kui järgmine number on suurem kui 4.

b) Õli kategooriat võib muuta või deklareerida õli käesoleva määruse nõuetele mittevastavaks, kui ainult üks omadus ei vasta märgitud väärtusele.

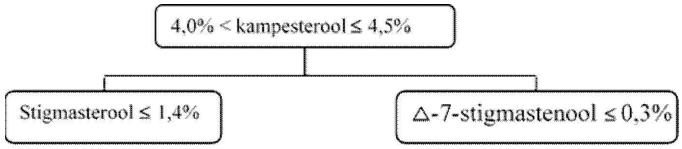
c) Lambiõli puhul võivad mõlemad tärniga (*) märgistatud kvaliteediomadused korraga erineda kõnealuse kategooria jaoks ette nähtud piirmääradest.

d) Kui omadus on tähistatud kahe tärniga (**), osutab see, et töötlemata oliivijääkõli puhul võivad mõlemad asjaomased näitajad korraga erineda märgitud väärtustest. Töötlemata oliivijääkõli ja rafineeritud oliivijääkõli puhul võib üks asjakohastest piirmääradest erineda märgitud väärtustest.

Liide

Vooskeemid

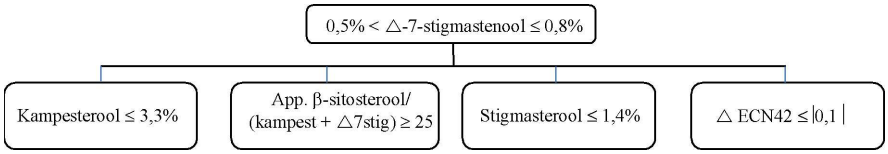
Kampesterooli vooskeem külmpressitud oliiviõli ja esimese külmpressi oliiviõli kohta:



Muud näitajad peavad vastama käesoleva määrusega kehtestatud piirmääradele.

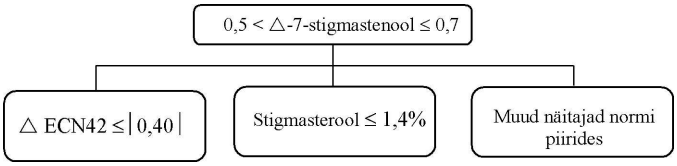
Δ-7-stigmastenooli vooskeem

— Esimese külmpressi oliiviõli ja külmpressitud oliiviõli kohta



Muud näitajad peavad vastama käesoleva määrusega kehtestatud piirmääradele.

— Oliivijääkõlid (toor- ja rafineeritud)



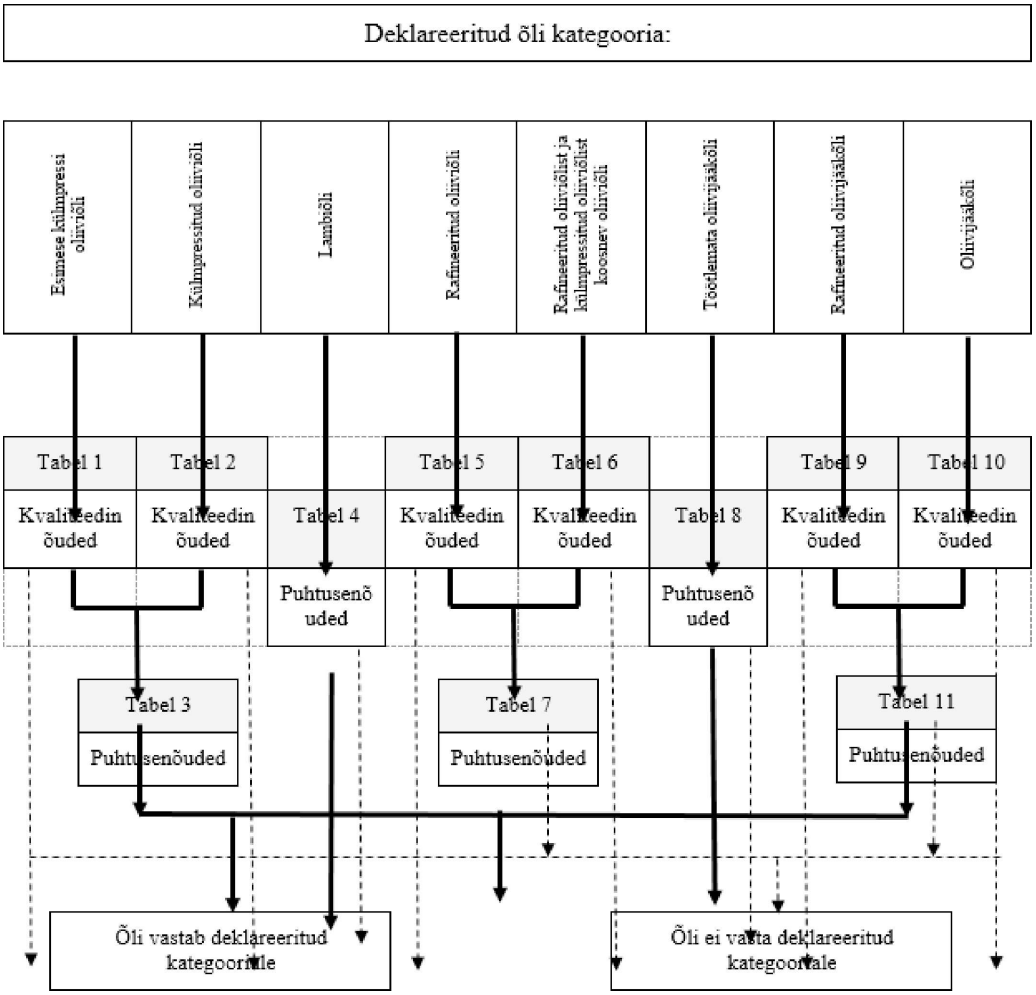
Muud näitajad peavad vastama käesoleva määrusega kehtestatud piirmääradele.“

III LISA

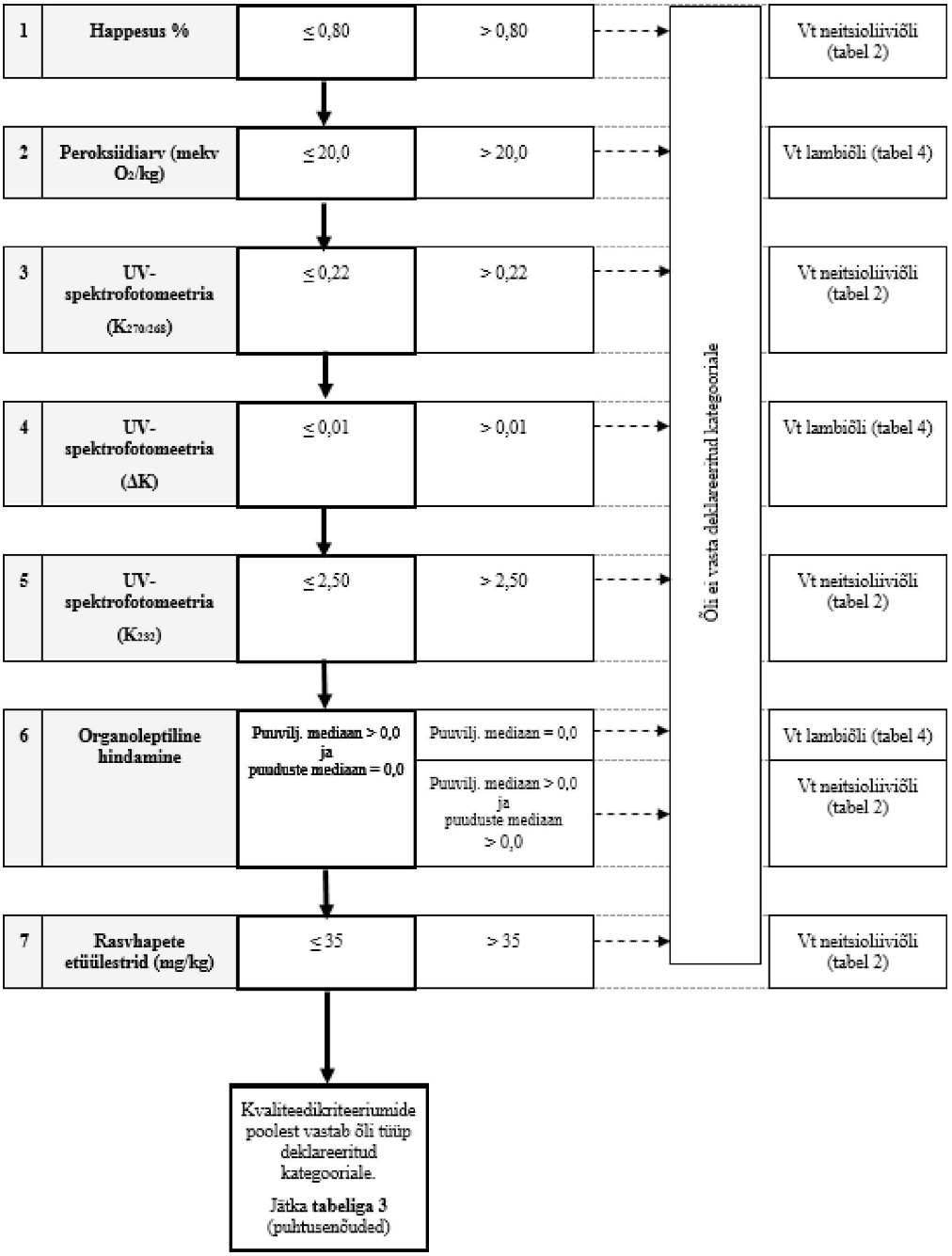
„Ib LISA

VOOSKEEM, MILLE JÄRGI KONTROLLITAKSE, KAS OLIIVIÕLI PROOV ON KOOSKÕLAS DEKLAREERITUD KATEGOORIAGA

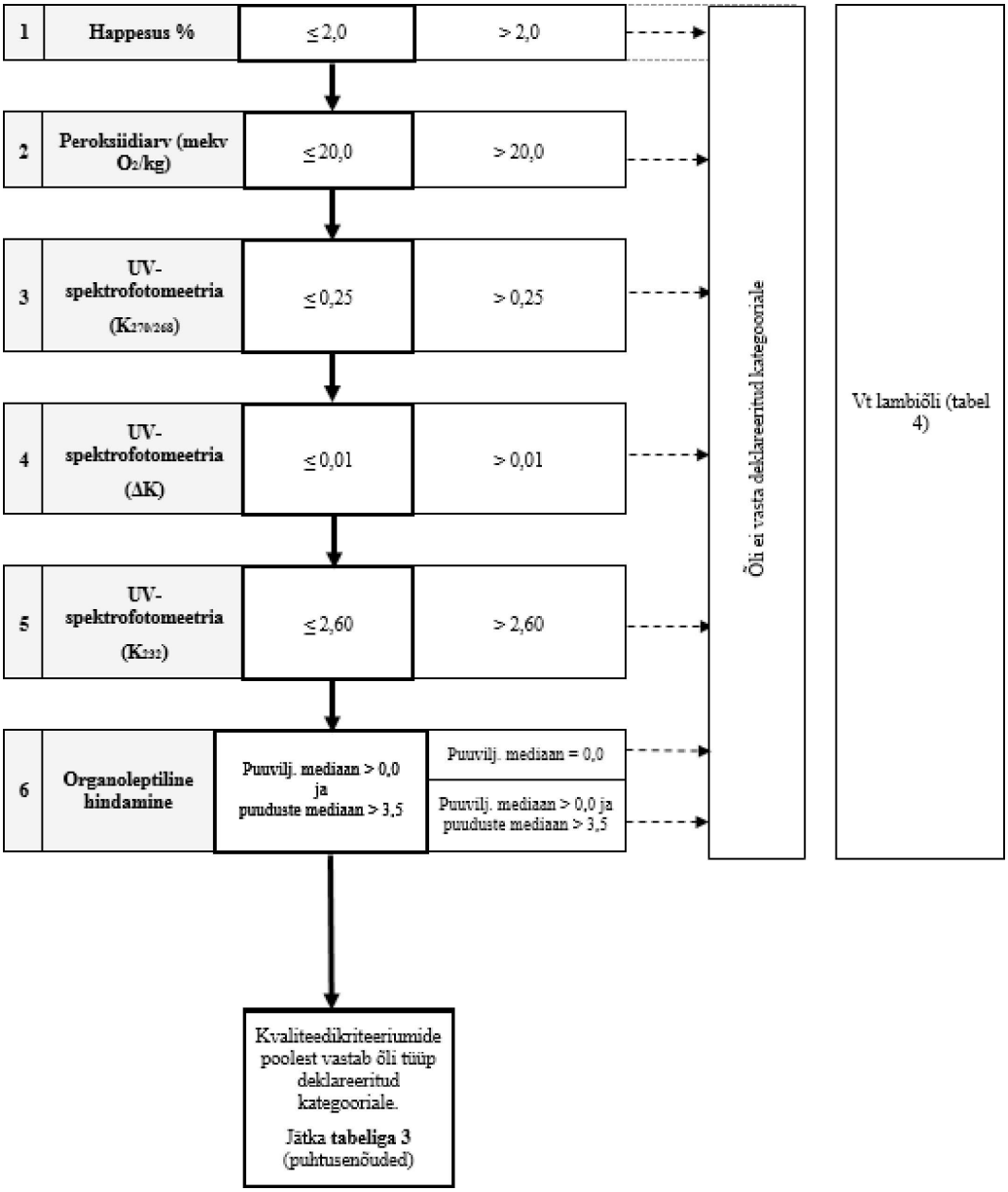
Üldine tabel



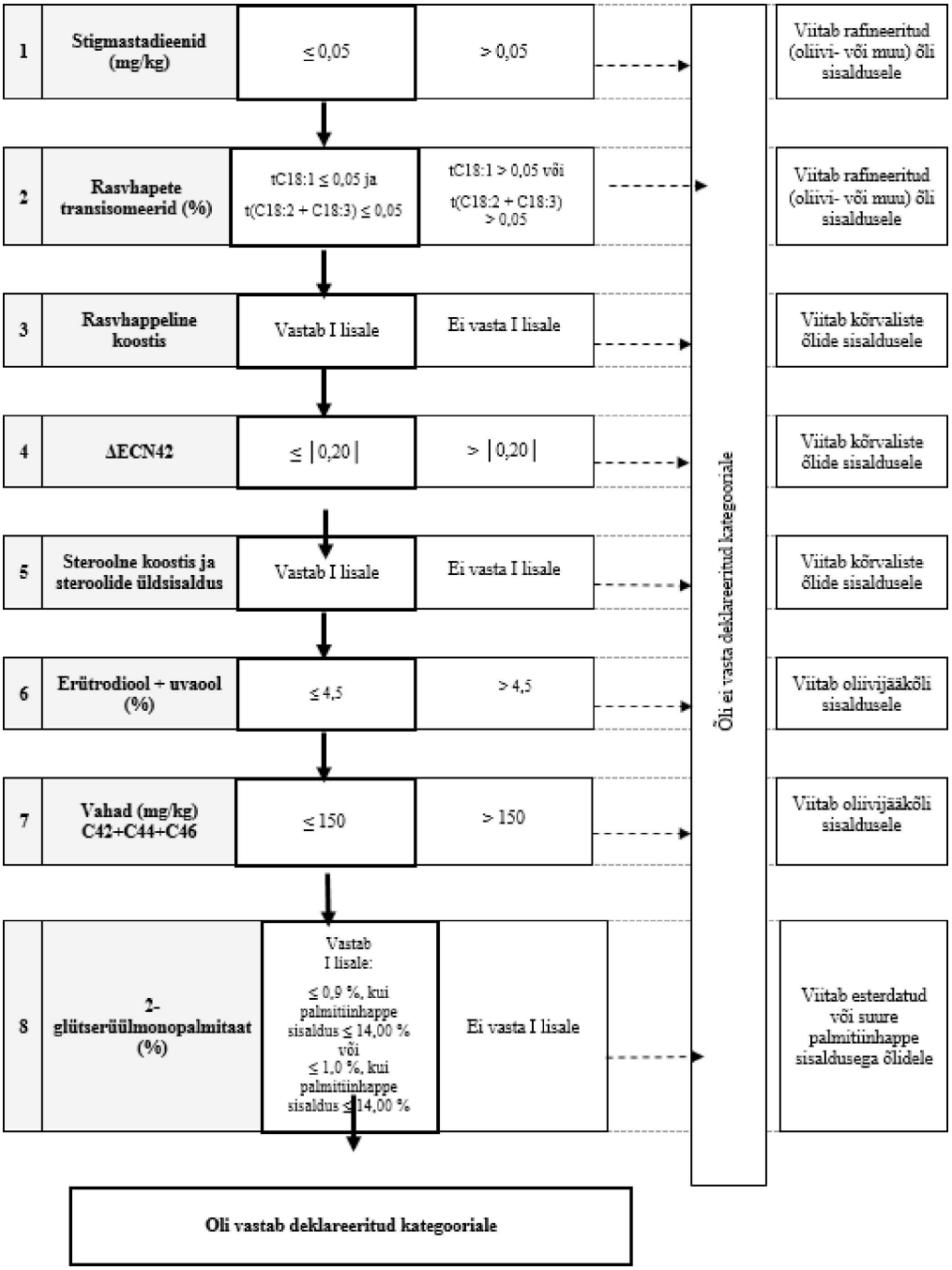
Tabel 1. Esimese külmpressi oliiviõli – kvaliteedinõuded



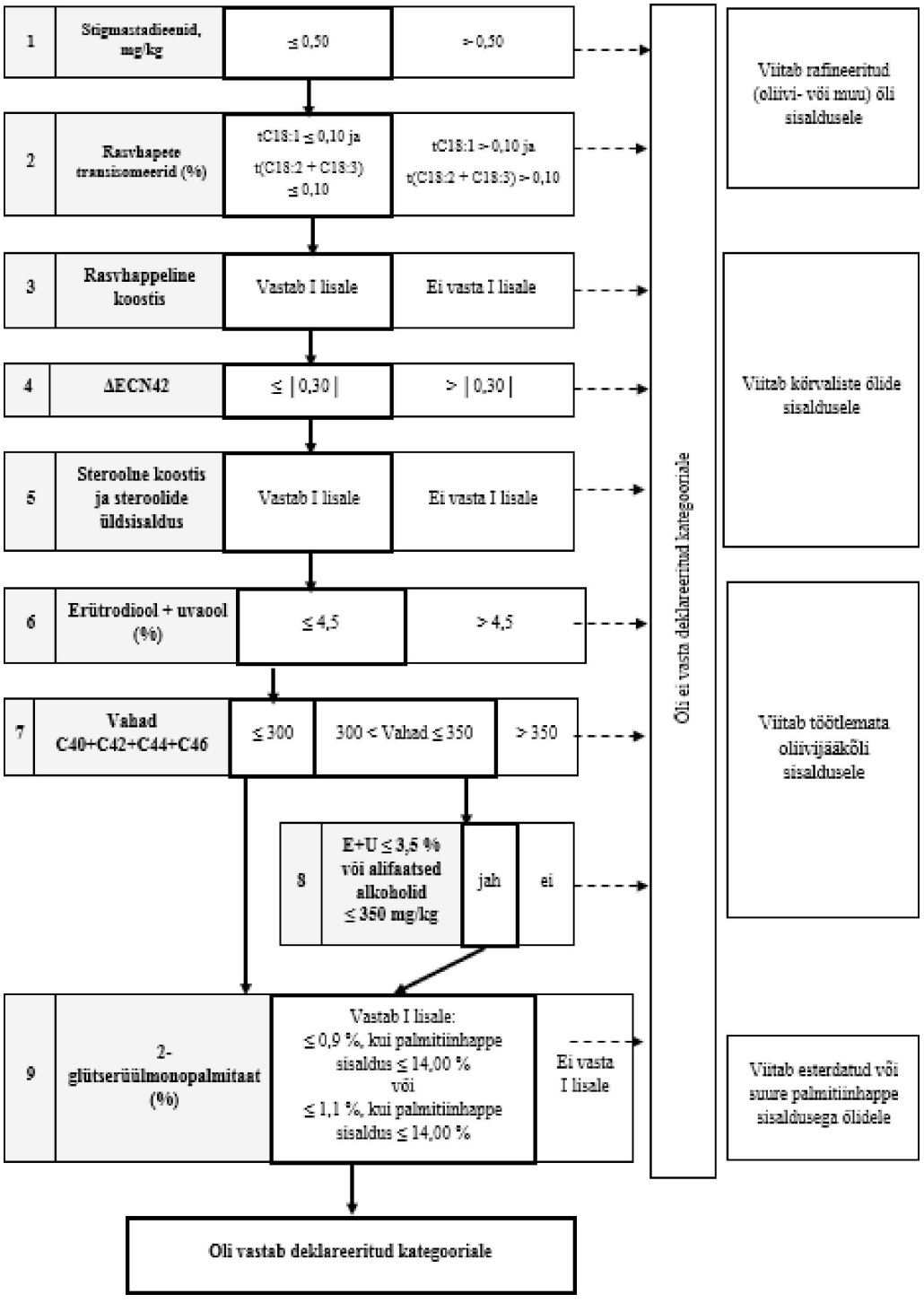
Tabel 2. Külmpressitud oliiviõli – kvaliteedinõuded



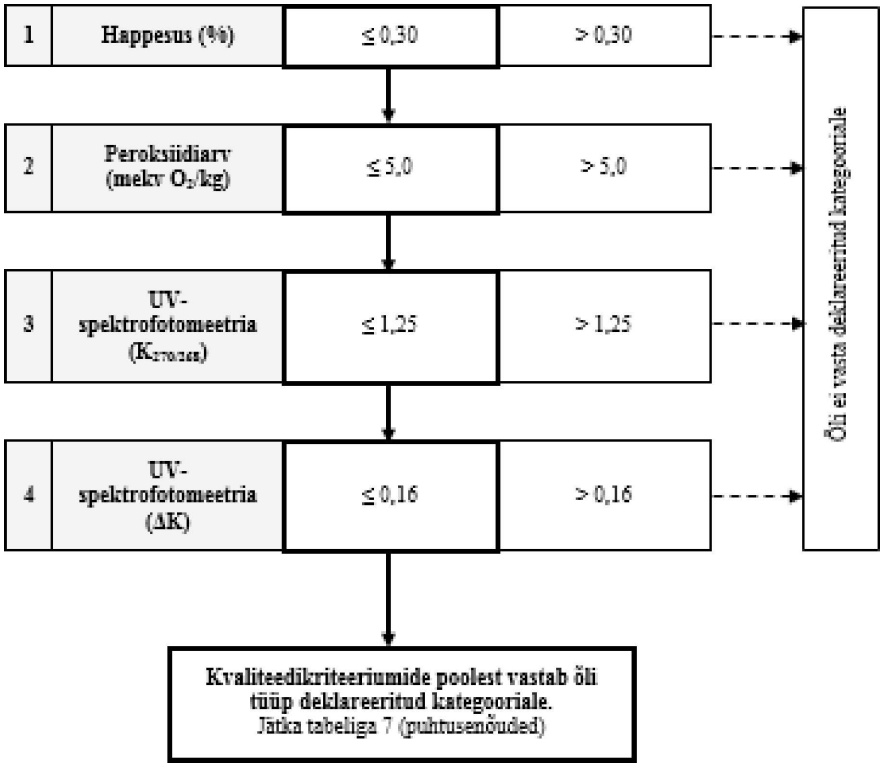
Tabel 3. Esimese külmpressi oliiviõli ja külmpressitud oliiviõli – puhtusenõuded



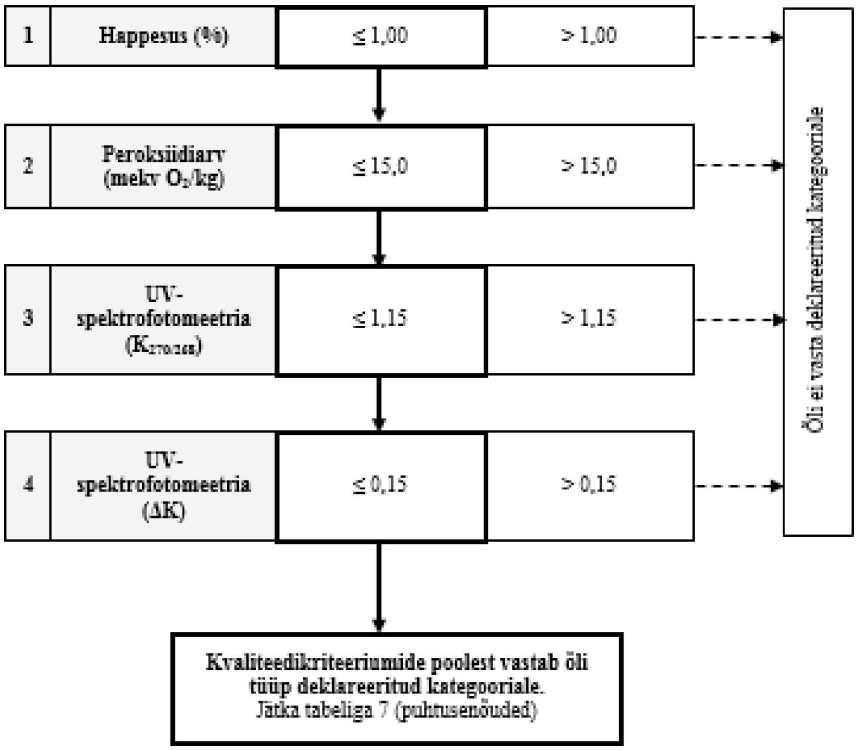
Tabel 4. Lambiõli – puhtusenõuded



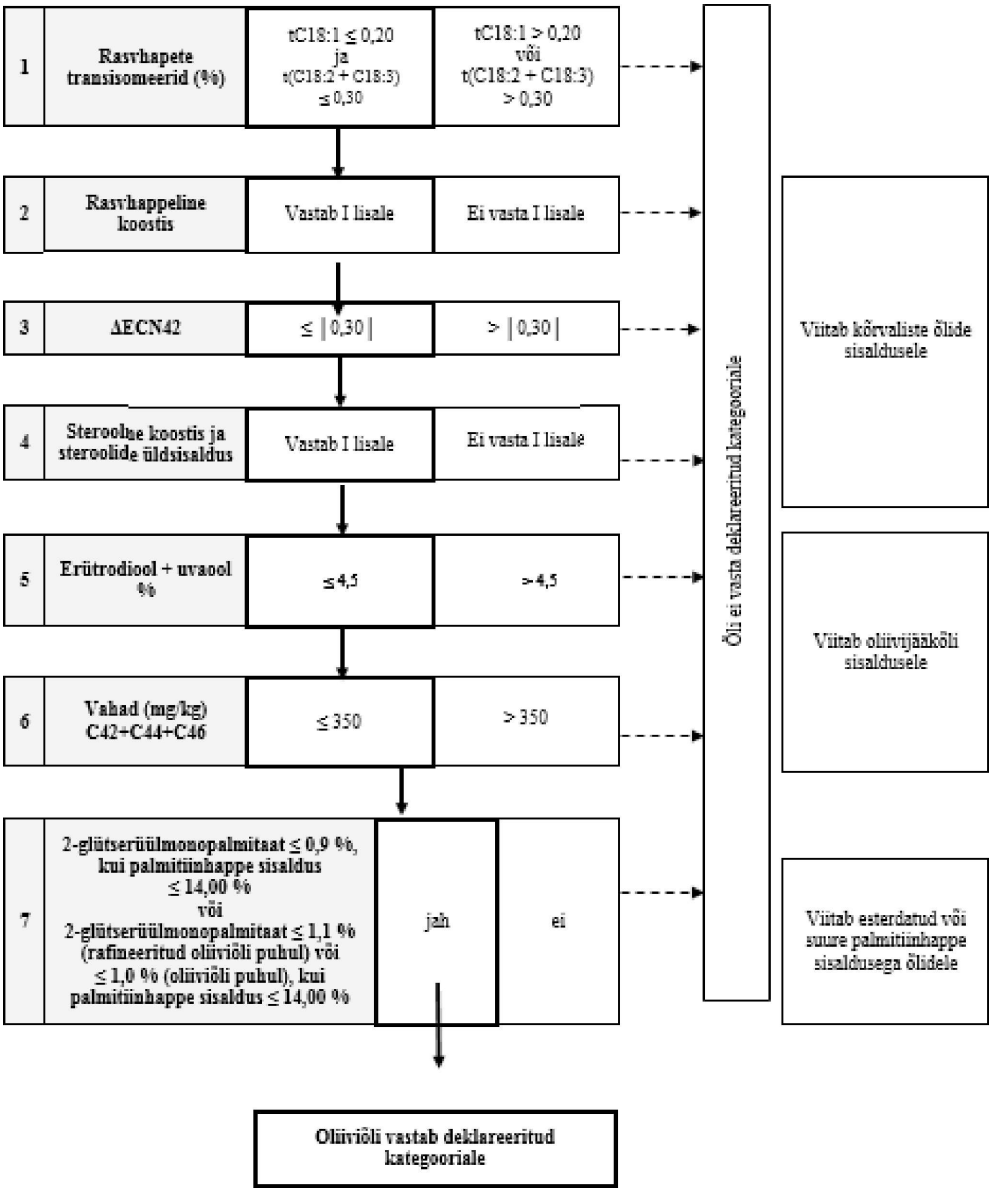
Tabel 5. Rafineeritud oliiviõli – kvaliteedinõuded



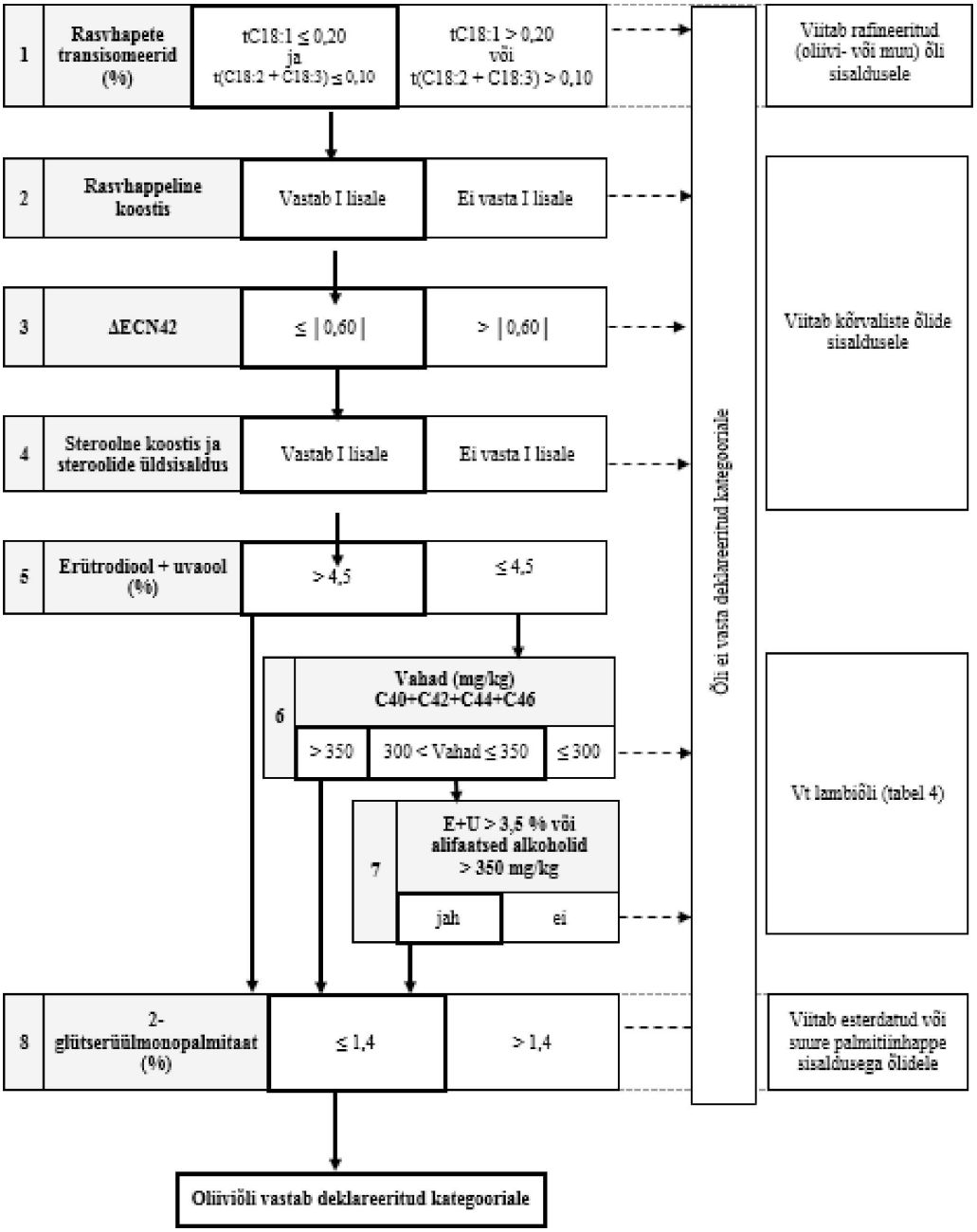
Tabel 6. Oliiviõli (rafineeritud oliiviõlist ja külmpressitud oliiviõlidest koosnev oliiviõli) – kvaliteedinõuded



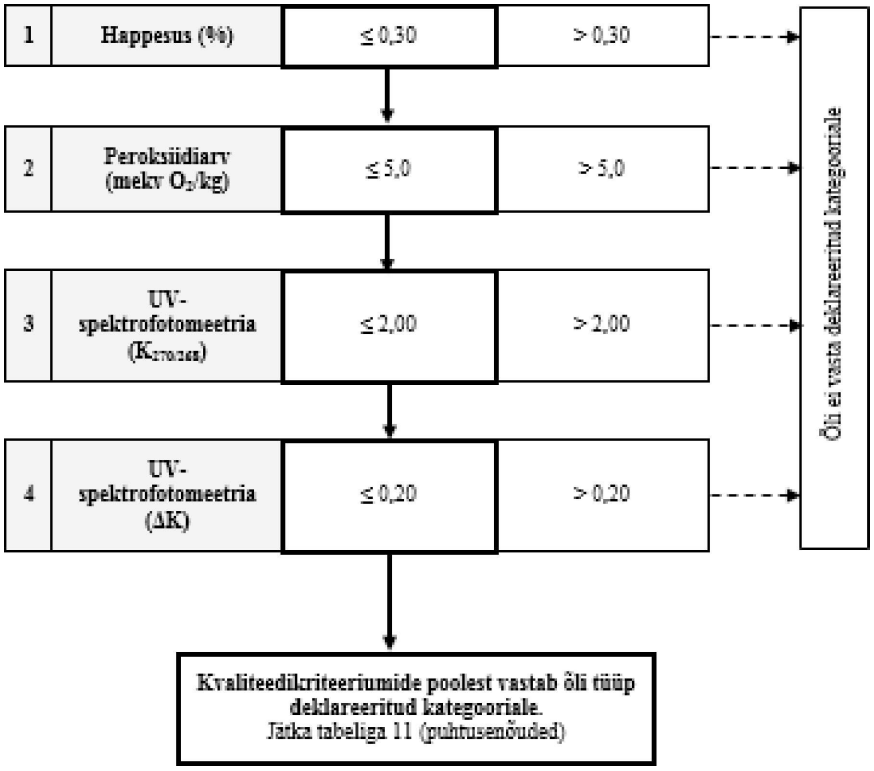
Tabel 7. Oliiviõli (rafineeritud oliiviõlist ja külmpressitud oliiviõlidest koosnev oliiviõli) – puhtusenõuded



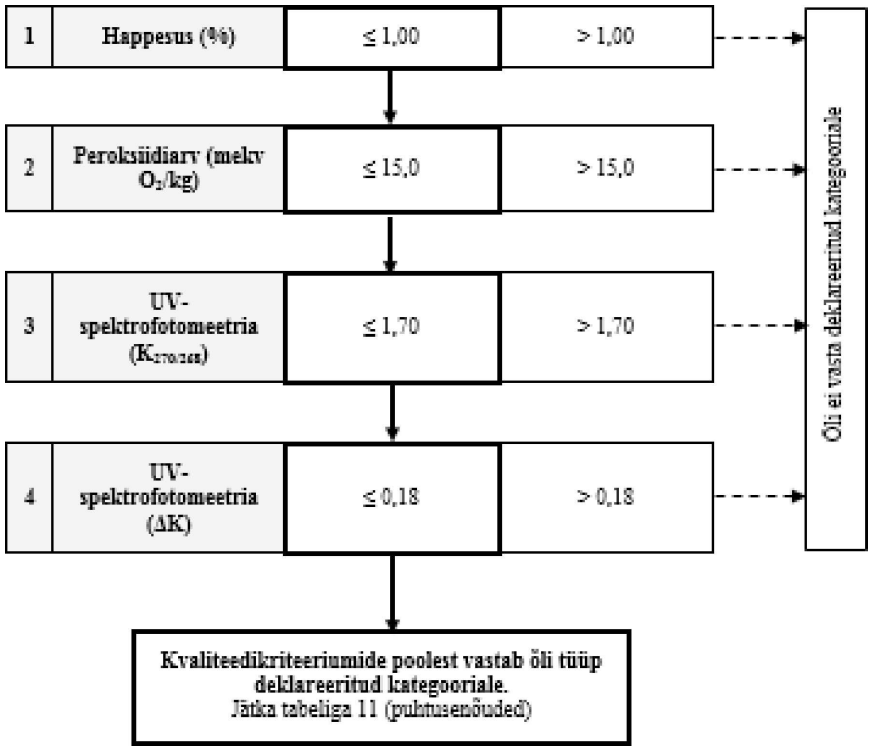
Tabel 8. Töötlemata oliivijääkõli – puhtusenõuded



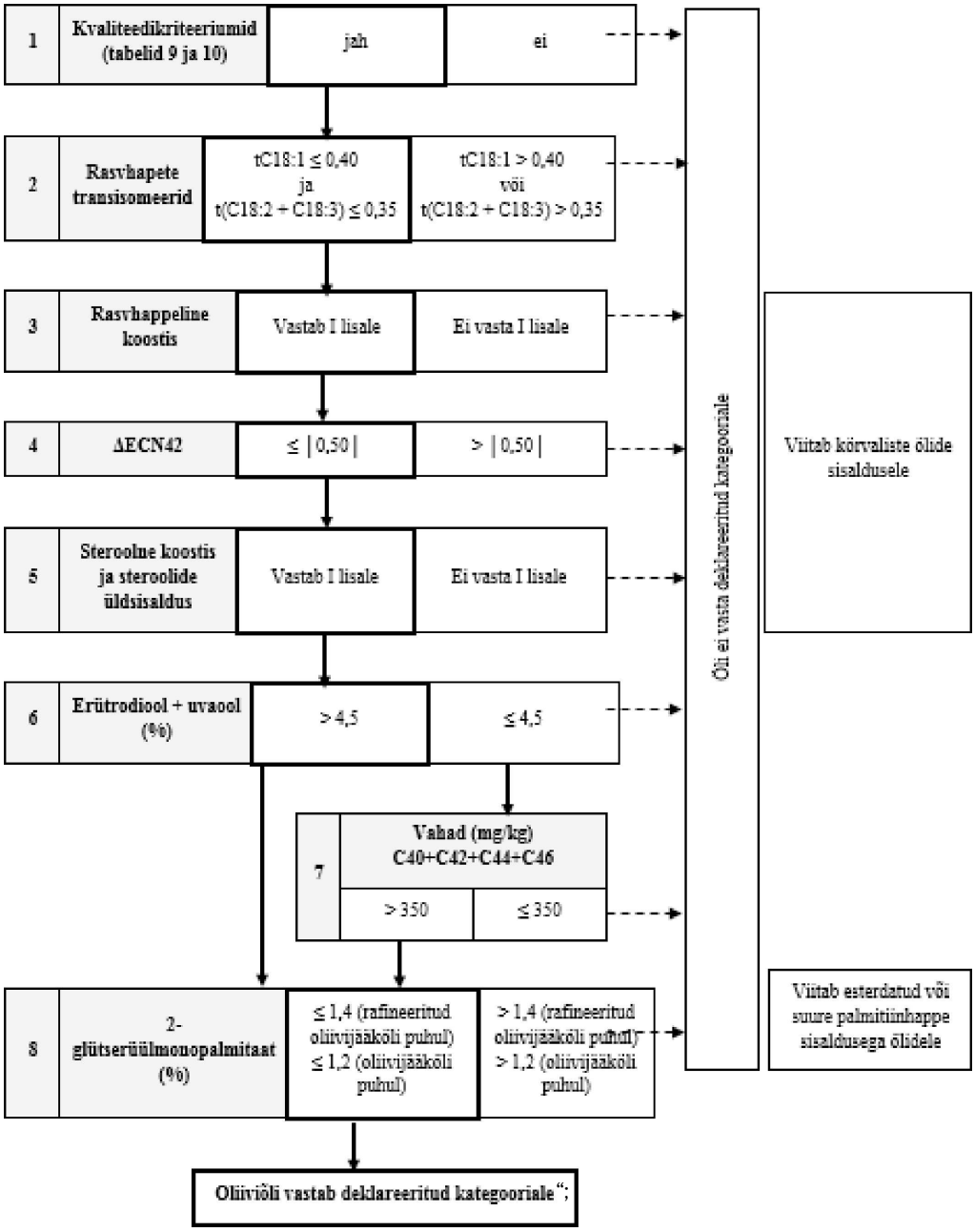
Tabel 9. Rafineeritud oliivijääkõli – kvaliteedinõuded



Tabel 10. Oliivijääkõli – kvaliteedinõuded



Tabel 11. Rafineeritud oliivijääkõli ja oliivijääkõli – puhtusenõuded



IV LISA

XII lisa muudetakse järgmiselt:

1) punkt 3.3 asendatakse järgmisega:

„3.3. **Märgistamiseks vajalik valikuline terminoloogia**

Taotluse korral võib hindamiskomisjoni esimees tõendada, et hinnatud õlid vastavad mõistetele ja väljendites esitatud vahemikele ning tunnuste intensiivsuste ja nende tajumist märkivatele omadussõnadele.

Positiivsed tunnused (puuviljaline, mõru ja terav): Vastavalt tajumise intensiivsusele:

— *tugev*, kui tunnuse mediaan on suurem kui 6,0;

— *keskmine*, kui tunnuse mediaan on rohkem kui 3,0, kuid mitte üle 6,0;

— *õrn*, kui tunnuse mediaan on kuni 3,0.

Puuviljalisus	Õlile iseloomulik haistmisaistingute kogum, mis sõltub oliivisordist ja tekib, kui oliivid on olnud veatud ja värsked, ja milles ei domineeri ei roheline ega küps puuviljalisus. Seda tuntakse otse ja/või retronasaalselt.
Roheline puuviljalisus	Õlile iseloomulik haistmisaistingute kogum, meenutab rohelisi puuvilju, sõltub oliivisordist ja tekib, kui oliivid on olnud rohelised, veatud ja värsked. Seda tuntakse otse ja/või retronasaalselt.
Küps puuviljalisus	Õlile iseloomulik haistmisaistingute kogum, meenutab küpseid puuvilju, sõltub oliivisordist ja tekib, kui oliivid on olnud veatud ja värsked. Seda tuntakse otse ja/või retronasaalselt.
Hästi tasakaalus	Õli, mis ei ole tasakaalust väljas; selle all mõistetakse haistmis-, maitse- ja puuteaistingut, mille puhul mõru tunnuse mediaan ja terava tunnuse mediaan ei ole kõrgemad kui 2,0 punkti üle puuviljalisuse mediaani.
Mahe õli	Õli, mille puhul mõru ja terava tunnuse mediaan on kuni 2,0.

Omaduste loetelu vastavalt tajumise intensiivsusele:

Omadused, mille kohta antakse välja organoleptilise määramise sertifikaat.	Tunnuse mediaan
Puuviljalisus	—
Küps puuviljalisus	—
Roheline puuviljalisus	—
Õrn puuviljalisus	$\leq 3,0$
Keskmine puuviljalisus	$3,0 < Me < 6,0$
Tugev puuviljalisus	$> 6,0$
Õrn küps puuviljalisus	$\leq 3,0$
Keskmine küps puuviljalisus	$3,0 < Me < 6,0$
Tugev küps puuviljalisus	$> 6,0$
Õrn roheline puuviljalisus	$\leq 3,0$
Keskmine roheline puuviljalisus	$3,0 < Me < 6,0$
Tugev roheline puuviljalisus	$> 6,0$

Omadused, mille kohta antakse välja organoleptilise määramise sertifikaat.	Tunnuse mediaan
Õrn mõrudus	≤ 3,0
Keskmine mõrudus	3,0 < Me < 6,0
Tugev mõrudus	> 6,0
Õrn teravus	≤ 3,0
Keskmine teravus	3,0 < Me < 6,0
Tugev teravus	> 6,0
Hästi tasakaalus olev õli	Mõruduse tunnuse mediaan ja teravuse tunnuse mediaan ei ole kõrgemad kui 2,0 punkti üle puuviljalisuse mediaani.
Mahe õli	Mõruduse tunnuse mediaan ja teravuse tunnuse mediaan on kuni 2,0.“;

2) punkt 9.4 asendatakse järgmisega:

„9.4. **Õli klassifitseerimine**

Õli klassifitseeritakse puuduste mediaani ja puuviljalisuse mediaani põhjal järgnevalt esitatud kategooriatesse. Puuduste mediaani käsitatakse suurima intensiivsusega tajutud puuduse mediaanina. Puuduste mediaan ja puuviljalisuse mediaan väljendatakse ühe kümnendkoha täpsusega.

Õli klassifitseerimisel võrreldakse puuduste mediaani ja puuviljalisuse mediaani väärtust järgmiste osutatud etalonvahemike suhtes. Kõnealuste vahemike piirid on kindlaks määratud meetodi viga arvesse võttes ning neid loetakse seepärast absoluutseteks. Arvutitarkvara võimaldab klassifikatsiooni esitada statistikaandmete tabelina või graafiliselt.

a) Esimese külmpressi oliiviõli: puuduste mediaan on 0,0 ja puuviljalisuse mediaan on suurem kui 0,0.

b) Külmpressitud oliiviõli: puuduste mediaan on suurem kui 0,0, kuid mitte üle 3,5, ja puuviljalisuse mediaan on suurem kui 0,0.

c) Lambiõli: puuduste mediaan on üle 3,5 või puuduste mediaan on kuni 3,5 ning puuviljalisuse mediaan on 0,0.

Märkus 1. Kui mõruduse ja/või teravuse mediaan on suurem kui 5,0, märgib hindamiskomisjoni juhataja seda degusteerimise kohta antavas sertifikaadis.

Vastavuse kontrollimiseks tehtud hindamiste puhul tehakse proov. Vasturääkivustega hindamiste puhul tuleb analüüse hinnata kaks korda erinevate hindamisseansside jooksul. Korduvanalüüsi tulemused peavad olema statistiliselt homogeensed. (Vt punkt 9.5.) Kui see nii ei ole, tuleb proovi uuesti kaks korda analüüsida. Tunnuste mediaani lõplik väärtus arvutatakse mõlema mediaani keskmise alusel.“

V LISA

XVII lisa muudetakse järgmiselt:

1) punkt 5.1 asendatakse järgmisega:

„5.1. Heksaan või alkaanide segu keemisvahemikuga 65–70 °C, destilleeritud läbi rektifitseerimiskolonni. Heksaani võib asendada isooktaaniga (kromatograafiliselt puhas 2,2,4-trimetüülpentaan), kui sellega saavutatakse võrreldav täpsus. Pärast 100 ml lahuse aurustumist võib jääki kontrollida. N-heksaanist kõrgema keemispunktiga lahustid aurustuvad aeglasemalt. Need on heksaani mürgisuse tõttu siiski eelistatavad.“;

2) punkti 6.3.3 lisatakse järgmine tekst:

„Märkus 10. Kui stigmastadieene esineb 4 mg/kg ületavas kontsentratsioonis, tuleb kvantifitseerimise vajaduse korral kasutada rahvusvahelise oliivinõukogu rafineeritud õlis stereenide määramise meetodit.“

VI LISA

XVIII lisa muudetakse järgmiselt:

1) punkt 4.2.1 asendatakse järgmisega:

„4.2.1. Kromatograafiliselt puhas petrooleeter keemistemperatuuriga 40–60 °C või heksaan. Heksaani võib asendada isooktaaniga (kromatograafiliselt puhas 2,2,4-trimetüülpentaan), kui sellega saavutatakse võrreldav täpsus. N-heksaanist kõrgema keemispunktiga lahustid aurustuvad aeglasemalt. Need on heksaani mürgisuse tõttu siiski eelistatavad.“;

2) Lisatakse järgmine punkt 4.2.12:

„4.2.12. Heptaan, kromatograafiliselt puhas. Heptaani võib asendada isooktaaniga (kromatograafiliselt puhas 2,2,4-trimetüülpentaan).“

VII LISA

„*XIX LISA*

STEROOLSE KOOSTISE JA SISALDUSE NING ALKOHOLIÜHENDITE MÄÄRAMINE KAPILLAARGAASIKROMATOGRAAFIAGA

1. KOHALDAMISALA

Meetod kirjeldab alkoholiühendite individuaalse ja üldsisalduse määramise menetlust oliiviõlides ja oliivijääkõlides ning nende kahe õli segudes.

Oliiviõlides ja oliivijääkõlides sisalduvate alkoholiühendite hulka kuuluvad alifaatsed alkoholid, steroolid ja triterpeendialkoholid.

2. PÕHIMÕTE

Õli, millele on sisestandardina lisatud α-kolestanooli ja 1-eikosanooli, seebistatakse kaaliumhüdroksiidiga etanoolilahuses ja seebistumatud komponendid ekstraheeritakse etüüleetriga.

Erinevate alkoholiühendite fraktsioonid eraldatakse seebistumatust ainest kas õhekihikromatograafia abil silikageeli plaadil (baasmeetod) või silikageeli kolonniga kõrgrõhuvedelikkromatograafia abil. Silikageelist saadud fraktsioon viiakse üle trimetüülsilüüleetriteks ja analüüsitakse gaasikromatograafiliselt kapillaarkolonniga.

1. OSA

SEEBISTUMATU AINE VALMISTAMINE

1. KOHALDAMISALA

Käesolevas osas kirjeldatakse seebistumatu aine valmistamist ja eraldamist. See hõlmab seebistumatu aine valmistamist ja eraldamist oliivi- ning oliivijääkõlidest.

2. PÕHIMÕTE

Katsekogus seebistatakse kaaliumhüdroksiidi etanoolilahuses püstjahutiga kolvis keetmise teel. Seebistumatu aine eraldatakse dietüüleetriga.

3. SEADMED

Kasutatakse tavalisi laboriseadmeid, eelkõige järgmisi:

3.1. ümarapõhjaline püstjahutiga varustatud lihvühendustega 250 ml kolb;

3.2. 500 ml jaotuslehter;

3.3. 250 ml kolvid;

3.4. 100 µl ja 500 µl mikrosüstlad;

3.5. silindriline poorse G3-filtriga (poori läbimõõt 15–40 µm) filterlehter, läbimõõduga ligikaudu 2 cm ja sügavusega 5 cm, mis sobib vaakumfiltrimiseks ja millel on lihvkern;

3.6. 50 ml kooniline kolb klaaslihvmuhviga, mille saab ühendada filterlehtriga (punkt 3.5);

3.7. 10 ml katseklaas koonusekujulise põhja ja tihedalt sulguva klaaskorgiga;

3.8. kaltsiumdikloriidiga eksikaator.

4. REAGENDID

4.1. Kaaliumhüdroksiid, miinimumtiiter 85 %.

4.2. Kaaliumhüdroksiidi umbes 2 M etanoollahus.

130 g kaaliumhüdroksiidi (punkt 4.1) lahustatakse samal ajal seda jahutades 200 ml destilleeritud vees, mille järel lisatakse sellele etanooli (punkt 4.7) kuni ühe liitri märgini. Lahust hoitakse õhukindlalt suletud tumedast klaasist pudelites ja säilitatakse kuni kaks päeva.

4.3. Etüüleeter, analüütiliselt puhas.

4.4. Veevaba naatriumsulfaat, analüütiliselt puhas.

4.5. Atsetoon, kromatograafiliselt puhas.

4.6. Etüüleeter, kromatograafiliselt puhas.

4.7. Etanool, analüütiliselt puhas.

4.8. Etüülatsetaat, analüütiliselt puhas.

4.9. Sisestandardi α-kolestanool puhtusega üle 99 % (puhtust tuleb kontrollida gaasikromatograafilise analüüsiga).

4.10. Sisestandardi kolestanooli 0,2 % lahus (mass/ruumala) etüülatsetaadis (4.8).

4.11. Fenoolftaleiini lahus etanoolis (punkt 4.7), 10 g/l.

4.12. 1-eikosanooli 0,1 % (mass/maht) lahus etüülatsetaadis (sisestandard).

5. MENETLUS

500 µl mikrosüstlaga (punkt 3.4) viiakse 250 ml kolbi (3.1) selline kogus α-kolestanooli sisestandardi lahust (punkt 4.10) ja selline kogus 1-eikosanooli (4.12), mis sisaldab sellise koguse kolestanooli ja eikosanooli, mis vastab umbes 10 %-le proovis olevast steroolide ja alkoholi kogusest. Näiteks 5 g oliiviõli proovi puhul lisatakse 500 µl α-kolestanooli lahust (4.10) ja 250 µl 1-eikosanooli lahust (4.12). Oliivijääkõlide puhul lisatakse nii α-kolestanooli lahust (4.10) kui ka 1-eikosanooli lahust (4.12) 1 500 µl. Aurutatakse nõrga lämmastikuvoolu juures soojal vesivannil kuivaks. Pärast kolvi jahutamist kaalutakse samasse kolbi 5,00 ± 0,01 g kuiva filtritud proovi.

Märkus 1. Rohkesti kolesterooli sisaldavate loomsete või taimsete õlide puhul võib ilmuda piik, mille retentsiooniaeg on samasugune kui kolestanooli retentsiooniaeg. Sellisel juhul tuleb steroolifraktsiooni analüüsida kaks korda, sisestandardiga ja ilma.

Lisatakse 50 ml 2 M kaaliumhüdroksiidi etanoolilahust (punkt 4.2) ja veidi pimsitükikesi, paigaldatakse püstjahuti ja kuumutatakse tasasel keemisel kuni seebistumiseni (lahus muutub selgeks). Kuumutatakse veel 20 minutit, seejärel lisatakse kondensaatori ülaosa kaudu 50 ml destilleeritud vett, eemaldatakse püstjahuti ning kolb jahutatakse ligikaudu temperatuurini 30 °C.

Kolvi sisu kantakse kvantitatiivselt 500 ml jaotuslehtrisse (punkt 3.2), kasutades mitut portsjonit destilleeritud vett (50 ml). Lisatakse ligikaudu 80 ml dietüüleetrit (punkt 4.6), loksutatakse tugevasti umbes 60 sekundi jooksul, vähendades tekkivat ülerõhku korrapäraselt jaotuslehtri ümberpööramisega (kraan ülespoole) ja kraani avamisega. Lastakse seista, kuni kaks faasi on täielikult eraldunud (märkus 2). Seejärel lastakse seebilahus võimalikult täielikult teise jaotuslehtrisse. Vee-alkoholi faasi ekstraheeritakse samal viisil veel kaks korda, kasutades selleks mõlemal korral 60–70 ml dietüüleetrit (4.6).

Märkus 2. Võimalikku emulsiooni saab lõhkuda väikse koguse etanooli (punkt 4.7) lisamisega.

Etüüleetri kolm ekstrakti valatakse kokku ühte jaotuslehtrisse, milles on 50 ml vett. Jätkatakse pesemist veega (50 ml), kuni pesuvesi ei muutu enam roosaks, kui sellele lisatakse üks tilk fenoolftaleiini lahust (4.11). Kui pesuvesi on eemaldatud, filtritakse läbi veevaba naatriumsulfaadi (4.4) eelnevalt kaalutud 250 ml kolbi, lehtrit ja filtrit pestakse väikeste dietüüleetri (punkt 4.6) kogustega.

Lahusti eemaldatakse vaakumdestillatsiooniga rotaatoril 30 °C juures. Lisatakse 5 ml atsetooni (4.5) ja kõrvaldatakse lenduv lahusti täielikult nõrga lämmastikuvooluga. Jääki kuivatatakse kuivatuskapis temperatuuril 103 ± 2 °C juures 15 minutit. Jahutatakse eksikaatoris ja kaalutakse 0,1 mg täpsusega.

2. OSA

ALKOHOLIÜHENDITE FRAKTSIOONIDE ERALDAMINE

1. KOHALDAMISALA

1. osas valmistatud seebistumatu aine eraldatakse erinevateks alkoholiühenditeks, alifaatseteks alkoholideks, steroolideks ja triterpeendialkoholideks (erütrodiool ja uvaool).

2. PÕHIMÕTE

Seebistumatu aine eraldamiseks võib kasutada aluselist õhekihikromatograafiat (standardmeetod) ning kraapida ja eraldada vastavad ribad. Alternatiivse eraldamise meetodina võib kasutada silikageeli kolonni ja UV detektoriga kõrgrõhuvedelikkromatograafiat, kogudes erinevad fraktsioonid. Alifaatsed ja triterpeenalkoholid ning steroolid ja triterpeendialkoholid eraldatakse koos.

3. SEADMED

Kasutatakse tavalisi laboriseadmeid, eelkõige järgmisi:

3.1. kõik seadmed õhekihikromatograafia tegemiseks 20 × 20 cm klaasplaatidel;

3.2. ultraviolettlamp lainepikkusega 366 või 254 nm;

3.3. 100 µl ja 500 µl mikrosüstlad;

3.4. silindriline poorse G3-filtriga (poori läbimõõt 15–40 µm) filterlehter, läbimõõduga ligikaudu 2 cm ja sügavusega 5 cm, mis sobib vaakumfiltrimiseks ja millel on lihvkern;

3.5. 50 ml kooniline kolb klaaslihvmuhviga, mille saab ühendada filterlehtriga (punkt 3.4);

3.6. 10 ml katseklaas koonusekujulise põhja ja tihedalt sulguva klaaskorgiga;

3.7. kaltsiumdikloriidiga eksikaator;

3.8. kõrgrõhuvedelikkromatograafia süsteem, millesse kuuluvad:

3.8.1. binaarne pump;

3.8.2. 200 µL injektsioonisilmusega varustatud käsi- või automaatpihusti;

3.8.3. integreeritud degaseerija;

3.8.4. UV-Vis või IR detektor;

3.9. kõrgrõhuvedelikkromatograafia kolonn (25 cm × 4 mm i.d.) silikageeliga 60 (osakese suurus 5 µm);

3.10. süstlafilter 0,45 µm;

3.11. 25 mL kooniline kolb.

4. REAGENDID

4.1. Kaaliumhüdroksiid, miinimumtiiter 85 %.

4.2. Kaaliumhüdroksiidi umbes 2 M etanoollahus.

130 g kaaliumhüdroksiidi (punkt 4.1) lahustatakse samal ajal seda jahutades 200 ml destilleeritud vees, mille järel lisatakse sellele etanooli (punkt 4.9) kuni ühe liitri märgini. Lahust hoitakse õhukindlalt suletud tumedast klaasist pudelites ja säilitatakse kuni kaks päeva.

4.3. Etüüleeter, analüütiliselt puhas.

4.4. Kaaliumhüdroksiidi umbes 0,2 M etanoollahus.

13 g kaaliumhüdroksiidi (4.1) lahustatakse 20 ml destilleeritud vees ning täiendatakse etanooliga (4.9) kuni ühe liitri märgini.

4.5. 0,25 mm silikageelikihiga klaasplaadid (20 × 20 cm), fluorestsentsindikaatorita (müügil kasutusvalmina).

4.6. Atsetoon, kromatograafiliselt puhas.

4.7. N-heksaan, kromatograafiliselt puhas.

4.8. Etüüleeter, kromatograafiliselt puhas.

4.9. Etanool, analüütiliselt puhas.

4.10. Etüülatsetaat, analüütiliselt puhas.

4.11. Õhekihikromatograafia võrdluslahus: kolesterool, fütosteroolid, alkoholid ja erütrodiooli 5 % lahus etüülatsetaadis (4.10).

4.12. 2,7-diklorofluorestseiini 0,2 % lahus etanoolis. Muudetakse kergelt aluseliseks mõne tilga kaaliumhüdroksiidi 2 M alkohollahuse lisamisega (4.2).

4.13. N-heksaani (4.7)/dietüüleetri (4.8) segu 65:35 (maht/maht).

4.14. Kõrgrõhuvedelikkromatograafia liikuva faasi n-heksaani (4.7)/dietüüleetri (4.8) segu 1:1 (maht/maht).

5. STANDARDMEETOD: ALKOHOLIÜHENDITE ERALDAMINE ALUSELISE ÕHEKIHIKROMATOGRAAFIA PLAADIGA

Aluseliste õhekihikromatograafia plaatide valmistamine Silikageeliplaadid (4.5) kastetakse umbes 4 cm ulatuses 10 sekundiks 0,2 M kaaliumhüdroksiidi etanoolilahusesse (4.4), lastakse kaks tundi tõmbekapis kuivada ning lõpuks asetatakse üheks tunniks kuivatuskappi temperatuurile 100 °C.

Silikageeliplaadid võetakse kuivatuskapist välja ja hoitakse kuni kasutamiseni kaltsiumkloriidi kohal eksikaatoris (3.7) (selliselt töödeldud plaatide kõlblikkusaeg on 15 päeva).

Heksaani-dietüüleetri segu (punkt 4.13) (märkus 3) pannakse ilmutusnõusse, nii et kihi sügavus oleks ligikaudu 1 cm. Nõu suletakse sobiva kaanega ning jäetakse umbes pooleks tunniks jahedasse kohta seisma, et tekiks vedeliku ja auru tasakaal. Ilmutusnõu siseseintele võib kinnitada filterpaberi ribad, mis ulatuvad eluendini. See vähendab ilmutusaega ligikaudu kolmandiku võrra ning komponentide elueerumine on ühtlasem ja korrapärasem.

Märkus 3. Täielikult korratavate elueerimistingimuste saavutamiseks tuleb igaks katseks võtta uus ilmutussegu. Alternatiivse lahustina võib kasutada n-heksaani-dietüüleetri segu 50:50 (maht/maht).

Valmistatakse 1. osas valmistatud seebistumatute ainete ligikaudu 5 % lahus etüülatsetaadis (punkt 4.10) ja kantakse 100-mikroliitrise mikrosüstlaga (3.3) 0,3 ml seda lahust kitsa ja ühtlase ribana kromatograafiaplaadile (4.5) alumisest servast 2 cm kõrgemale. Selle ribaga samale joonele kantakse 2–3 µl materjali võrdluslahust (4.11), et sterooli ja triterpeendialkoholide vööndit oleks võimalik pärast ilmutamist identifitseerida.

Plaat pannakse ilmutusnõusse (3.1). Ruumitemperatuur tuleks hoida vahemikus 15–20 °C (märkus 4). Ilmutusnõu suletakse kohe kaanega ning plaadil lastakse elueeruda, kuni lahusti jõuab umbes 1 cm kaugusele plaadi ülemisest servast. Plaat võetakse ilmutusnõust välja ning lahusti aurustatakse kuuma õhu voolus või jättes selle lühikeseks ajaks tõmbekappi.

Märkus 4. Kõrgem temperatuur võib eraldumist halvendada.

Plaadile pihustatakse kergelt ja ühtlaselt 2,7-diklorofluorestseiini lahust (punkt 4.12) ja lastakse kuivada. Kui plaati vaadeldakse ultraviolettvalguses (3.2), on steroolide, triterpeendialkoholide ja alkoholide vööndid võimalik ära tunda nende asukoha võrdlemisest võrdluslahuse (punkt 4.11) puhul saadud laikudega. Vööndite piirid märgitakse musta pliiatsiga mööda fluorestsentsi servi (vt õhekihikromatograafia plaat joonisel 1).

Metallspaatliga kraabitakse märgistatud alalt maha silikageel. Kraapimisega saadud peenestatud materjal pannakse filterlehtrisse (3.4). Lisatakse 10 ml kuuma etüülatsetaati (4.10), segatakse hoolikalt metallspaatliga ja filtritakse (vajadusel vaakumis), seejärel kogutakse filtraat filterlehtriga ühendatud koonilisse kolbi (3.5).

Jääki pestakse kolm korda dietüüleetriga (4.3) (iga kord umbes 10 ml) ning filtraat kogutakse samasse lehtriga ühendatud kolbi; filtraat aurustatakse kokku ligikaudu 4–5 milliliitrini; jääklahus kantakse eelnevalt kaalutud 10 ml katseklaasi (3.6), aurustatakse ettevaatliku soojendamisega nõrga lämmastikuvoolu all kuivaks, lahustatakse uuesti mõne tilga atsetooniga (4.6) ning aurustatakse uuesti kuivaks. Katseklaasis olev jääk koosneb steroolide ja triterpeendialkoholide või alkoholide ja triterpeenalkoholide fraktsioonist.

6. ALKOHOLIFRAKTSIOONI ERALDAMINE KÕRGRÕHUVEDELIKKROMATOGRAAFIA ABIL

1. osas saadud seebistumatu aine lahustatakse 3 milliliitris liikuvas faasis (4.14), lahus filtritakse süstlafiltriga (3.10) ja hoitakse alles.

200 µl filtritud seebistumatu aine lahust sisestatakse kõrgrõhuvedelikkromatograafi (3.8).

Tehakse kõrgrõhuvedelikkromatograafiline eraldamine kiirusega 0,8 ml/min, jäetakse kõrvale esimesed 5 minutit ning kogutakse saadust 25 ml koonilistesse kolbidesse (3.11) alifaatsete alkoholide ja triterpeenalkoholide jaoks 5.–10. minutil ning steroolide ja erütrodiooli ja uvaooli jaoks 11.–25. minutil (märkus 5).

Eraldamist saab jälgida UV detektoriga 210 nm lainepikkustel või murdumisnäitajadetektoriga (vt joonis 6).

Fraktsioonid aurutatakse kuivaks ning valmistatakse ette kromatograafiliseks analüüsiks.

Märkus 5. Kõrgrõhuvedelikromatograafia pumba rõhku tuleb hoolikalt kontrollida, sest etüüleeter võib rõhku suurendada; kohandage voolu, et hoida rõhk kontrolli all.

3. OSA

ALKOHOLIÜHENDITE FRAKTSIOONIDE GAASIKROMATOGRAAFILINE ANALÜÜS

1. KOHALDAMISALA

Selles osas antakse üldiseid suuniseid kapillaarkolonniga gaasikromatograafia tegemiseks käesoleva meetodi 2. osa kirjeldatud meetodil eraldatud alkoholiühendite kvalitatiivse ja kvantitatiivse koostise määramiseks.

2. PÕHIMÕTE

Seebistumatust ainest õhekihikromatograafia või kõrgrõhuvedelikkromatograafia teel kogutud fraktsioonid viiakse üle trimetüülsilüüleetriteks ja neid analüüsitakse kromatograafiliselt jaotatud voolu ja leekionisatsioondetektoriga kapillaarkolonni abil.

3. SEADMED

Kasutatakse tavalisi laboriseadmeid, eelkõige järgmisi:

3.1. 10 ml katseklaas koonusekujulise põhja ja tihedalt sulguva klaaskorgiga;

3.2. gaasikromatograaf, millel saab töötada kapillaarkolonniga ja millel on jaotatud vooluga injektorseade, mis koosneb järgmistest seadistest:

3.2.1. termostateeritav kolonnikamber, mis hoiab nõutavat temperatuuri täpsusega ± 1 °C;

3.2.2. reguleeritava temperatuuriga injektorseade persilaniseeritud klaasist aurustiga ja jaotatud voolu süsteemiga;

3.2.3. leekionisatsioondetektor;

3.2.4. andmekogumissüsteem, mis sobib kasutamiseks koos leekionisatsioondetektoriga (3.10.3), millel on käsitsi integreerimise võimalus;

3.3. sulatatud ränidioksiidist kapillaarkolonn, mille pikkus on 20–30 m, sisediameeter 0,25–0,32 mm, üleni kaetud ühtlase 0,10–0,30 µm paksuse 5 % difenüül- ja 95 % dimetüülpolüsiloksaani kihiga (statsionaarne faas SE-52 või SE-54 või samaväärne).

3.4. Mikrosüstal (maht 10 µl) gaasikromatograafia jaoks, liimitud nõelaga, mis sobib jaotatud voolu süstideks.

4. REAGENDID

4.1. Veevaba püridiin kromatograafiliselt puhas.

4.2. Heksametüüldisilasaan, analüütiliselt puhas.

4.3. Trimetüülklorosilaan, analüütiliselt puhas.

4.4. Sterooltrimetüülsilüüleetrite võrdluslahused. Valmistatakse kasutamise ajal steroolidest ja erütrodioolist, mis on saadud neid sisaldavatest õlidest.

4.5. Alifaatsete C20- kuni C28-alkoholide trimetüülsilüüleetrite standardlahused. Need võib valmistada puhaste alkoholide segudest vahetult enne kasutamist.

4.6. Kandegaas: gaasikromatograafiliselt puhas vesinik või heelium.

4.7. Abigaasid: vesinik, heelium, lämmastik ja õhk, gaasikromatograafiliselt puhtad.

4.8. Silüülimisreaktiiv, mis kujutab endast püridiini-heksametüüldisilasaani-trimetüülklorosilaani segu vahekorras 9:3:1 (maht/maht/maht).

4.9. N-heksaan, kromatograafiliselt puhas.

5. TRIMETÜÜLSILÜÜLEETRITE VALMISTAMINE

Katseklaasi (3.1), mis sisaldab alkoholiühendi fraktsiooni, lisatakse silüülivat reagenti (4.8) (märkus 6) vahekorras 50 µl iga alkoholiühendi milligrammi kohta, vältides niiskuse tekkimist (märkus 7).

Märkus 6. Kasutusvalmis lahused on kaubanduslikult kättesaadavad. Müügil on ka muud silüülivad reagendid, näiteks bistrimetüülsilüültrifluoratsetamiid + 1 % trimetüülklorosilaani, mida tuleb lahjendada sama mahu veevaba püridiiniga. Püridiini võib asendada sama koguse atsetonitriiliga.

Märkus 7. Tekkida võiv kerge opalestents on normaalne ja ei sega määramist. Valge helbe tekkimine või roosa värvuse ilmumine näitab niiskuse esinemist või reagendi riknemist. Kui see juhtub, tuleb katset korrata (ainult juhul, kui kasutatakse heksametüüldisilasaan/trimetüülklorosilaani).

Katseklaas suletakse korgiga (3.1) ning loksutatakse ettevaatlikult (ilma ümber pööramata), kuni ühendid on täielikult lahustunud. Lastakse toatemperatuuril seista vähemalt 15 minutit ning seejärel tsentrifuugitakse paar minutit. Selge lahus on valmis gaasikromatograafiliseks analüüsiks.

6. GAASIKROMATOGRAAFILINE ANALÜÜS

6.1. Ettevalmistused, kapillaarkolonni konditsioneerimine.

Gaasikromatograafi kolonni (3.3) algus ühendatakse jaotatud vooluga injektorseadmega ja lõpp detektoriga.

Tehakse gaasikromatograafi üldine kontroll (lekked gaasiliidetes, detektori, jaotussüsteemi ja registreerimissüsteemi toimimine jne).

Kui kolonni kasutatakse esimest korda, on vaja see töörežiimi viia: kolonni ennast voolutatakse nõrga gaasivooluga, siis lülitatakse sisse gaasikromatograafia plokk ja hakatakse järk-järgult tõstma temperatuuri, kuni see on vähemalt 20 °C üle töötemperatuuri (märkus 8). Seda temperatuuri hoitakse vähemalt kaks tundi, mille järel pannakse terve seade töörežiimi (gaasi juurdevoolu ja jaotuse reguleerimine, leegi süütamine, arvutussüsteemiga ühendamine, kolonni, detektori ja injektori temperatuuri kohandamine jne) ning signaali tundlikkus reguleeritakse vähemalt kaks korda suuremaks, kui analüüsi tegemiseks kavandatud. Nulljoon peab olema lineaarne, ilma igasuguste piikideta, ja see ei tohi triivida. Negatiivne sirgjooneline triiv osutab lekkele kolonniühendustes; positiivne triiv osutab kolonni puudulikule ettevalmistamisele.

Märkus 8. Kolonni konditsioneerimisel on temperatuur kasutatava vedelfaasi maksimaalsest temperatuurist vähemalt 20 °C madalam.

6.2. Katsetingimused

Temperatuuriprogramm ja kandegaasi vool optimeeritakse nii, et saadakse joonistel 3 kuni 6 esitatuga sarnased kromatogrammid.

Järgmisi parameetreid on katsetatud ja leiti, et need on kasulikud.

6.2.1. Alifaatsed alkoholid

Ahjuprogramm	180 °C (8 min.) → 260 °C (kiirusega 5 °C/min) → 260 °C (15 min)
Injektori temperatuur	280 °C
Detektori temperatuur	290 °C
Kandegaasi voolu lineaarkiirus	heelium 20–30 cm/s, vesinik 30–50 cm/s
Jaotatud voolu suhe	1:50 kuni 1:100
Injekteeritud maht	0,5–1 µl trimetüülsilüüleetrite lahust

6.2.2. Sterool ja triterpeendialkoholid

Ahjuprogramm	260 ± 5 °C isotermiline
Injektori temperatuur	280–300 °C
Detektori temperatuur	280–300 °C
Kandegaasi voolu lineaarkiirus	heelium 20–30 cm/s, vesinik 30–50 cm/s
Jaotatud voolu suhe	1:50 kuni 1:100
Injekteeritud maht	0,5–1 µl trimetüülsilüüleetrite lahust

Olenevalt kolonni ja gaasikromatograafi omadustest võib neid tingimusi muuta, nii et kromatogrammid vastaksid järgmistele nõuetele:

— C26-alkoholi retentsiooniaeg on 18 ± 5 minutit,

— C22-alkoholi piik on oliiviõli puhul 80 ± 20 % ja oliivijääkõli puhul 40 ± 20 % skaala täisskaalast,

— ß-sitosterooli piigi retentsiooniaeg peaks olema 20 ± 5 minutit,

— kampesterooli piik peaks olema: oliiviõli puhul (keskmine sisaldus 3 %) 20 ± 5 % täisskaalast;

— kõik proovis sisalduvad steroolid peavad olema eraldatud. Lisaks sellele peavad piigid olema ka täielikult eraldunud – see tähendab, et piigi jälg peab enne järgmise piigi juurde liikumist minema tagasi piigi nulljoonele. Puudulik lahutus on siiski lubatud tingimusel, et piiki suhtelise retentsiooniaja 1,02 juures (sitostanool) on võimalik mõõta risti.

6.3. Analüüsi käik

10 µl mikrosüstlasse (3.4) tõmmatakse 1 µl heksaani, seejärel 0,5 µl õhku ning lõpuks 0,5–1 µl proovilahust. Süstla kolbi tõmmatakse tagasi, nii et nõel oleks tühi. Nõel surutakse läbi injektorseadme membraani ning ühe või kahe sekundi pärast süstitakse kiiresti, seejärel tõmmatakse nõel umbes viie sekundi pärast aeglaselt välja. Võib kasutada ka automaatset injektorit.

Registreerimist jätkatakse, kuni kõik proovis sisalduvad triterpeendialkoholide trimetüülsilüüleetrid on täielikult elueeritud. Nulljoon peab kogu aeg vastama töötingimuste nõuetele (6.2.1 või 6.2.2).

6.4. Piikide määramine

Piigid määratakse retentsiooniaja põhjal ning samadel tingimusel analüüsitud alifaatsete alkoholide ja triterpeenalkoholide segu või steroolide ja triterpeendialkoholide trimetüülsilüüleetrite segu piikidega võrdlemise teel. Üks alifaatsete ja triterpeenalkoholide fraktsiooni kromatogramm on esitatud joonisel 3 ning vastavad steroolide ja triterpeendialkoholide kromatogrammid on esitatud joonisel 2.

Alifaatsed alkoholid väljuvad kolonnist järgmises järjekorras: C20-ool (I.S.), C22-ool, C23-ool, C24-ool, C25-ool, C26-ool, C27-ool ja C28-ool.

Steroolid ja triterpeendialkoholid väljuvad kolonnist järgmises järjekorras: kolesterool, brassikasterool, ergosterool, 24-metüleen-kolesterool, kampesterool, kampestanool, stigmasterool, Δ7-kampesterool, Δ5,23-stigmastadienool, klerosterool, ß-sitosterool, sitostanool, Δ5-avenasterool, Δ5,24-stigmastadienool, Δ7-stigmastenool, Δ7-avenasterool, erütrodiool ja uvaool.

6.5. Kvantitatiivne hindamine

1-eikosanooli ja alifaatsete alkoholide C22, C24, C26, C28 piikide pindalad arvutab andmekogumissüsteem. 1-eikosanooli kalibreerimistegur võetakse võrdseks 1-ga.

Arvutatakse α-kolestanooli ja sterooli ning triterpeendialkoholide piikide pindalad, kasutades arvutussüsteemi. Arvestamata jäetakse nende ühendite piigid, mida ei ole tabelis 1 loetletud (ergosterooli ei tohi arvestada). α-kolestanooli kalibreerimistegur võetakse võrdseks 1-ga.

Iga alkoholiühendi kontsentratsioon milligrammides kilogrammi rasvaine kohta arvutatakse järgmiselt:

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

kus:

A_x = alkoholiühendi x piigi pindala arvutamissüsteemi ühikutes;

A_s = 1-eikosanooli/α-kolestanooli piigi pindala arvutamissüsteemi ühikutes;

m_s = lisatud 1-eikosanooli/α-kolestanooli mass milligrammides;

m = määramisel kasutatud proovi mass grammides.

7. TULEMUSTE ESITAMINE

Üksikute alifaatsete alkoholide ja triterpeenalkoholide kontsentratsioonid esitatakse milligrammides kilogrammi rasvaine kohta ning nende summa esitatakse alifaatsete alkoholide üldsisaldusena. Üldsisaldus on C22, C24, C26 ja C28 summa.

Iga üksiku alkoholiühendi sisaldus tuleks väljendada ühe kümnendkoha täpsusega.

Steroolide üldsisaldus väljendatakse ilma komakohtadeta.

Iga sterooli protsent arvutakse vastava piigi pindala ja steroolide piikide kogupindala suhtena.

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

kus:

A_x = sterooli x piigi pindala;

ΣA = steroolide piikide kogupindala.

Näiline β-sitosterool: Δ5,23-stigmastadienool + klerosterool + β-sitosterool + sitostanool + Δ5-avenasterool + Δ5,24-stigmastadienool.

Arvutatakse erütrodiooli ja uvaooli protsendiline sisaldus:

$$erütrodiool + \ uvaool = \frac{A_{Er} + A_{Uv}}{\Sigma A_T} \times 100$$

kus:

A_{Er} = erütrodiooli piigi pindala arvutamissüsteemi ühikutes;

A_{Uv} = uvaooli piigi pindala arvutamissüsteemi ühikutes;

Σ_{AT} = sterooli + erütrodiooli + uvaooli summa arvutamissüsteemi ühikutes.

Lisaks üksikute steroolide ja triterpeendialkoholide suhtelise sisalduse ning steroolide üldsisalduse arvutamisele tuleb arvutada erütrodiooli ja uvaooli sisaldus ning nende summa milligrammides rasvaine kilogrammi kohta, esitades need järgmise kohaselt:

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

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

kus:

A_{Er} = erütrodiooli piigi pindala arvutamissüsteemi ühikutes;

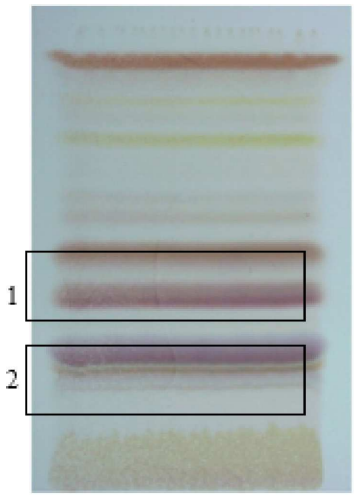
A_{Uv} = uvaooli piigi pindala arvutamissüsteemi ühikutes;

A_s = α-kolestanooli piigi pindala arvutamissüsteemi ühikutes;

m_s = lisatud α-kolestanooli mass milligrammides;

m = määramisel kasutatud proovi mass grammides.

Liide



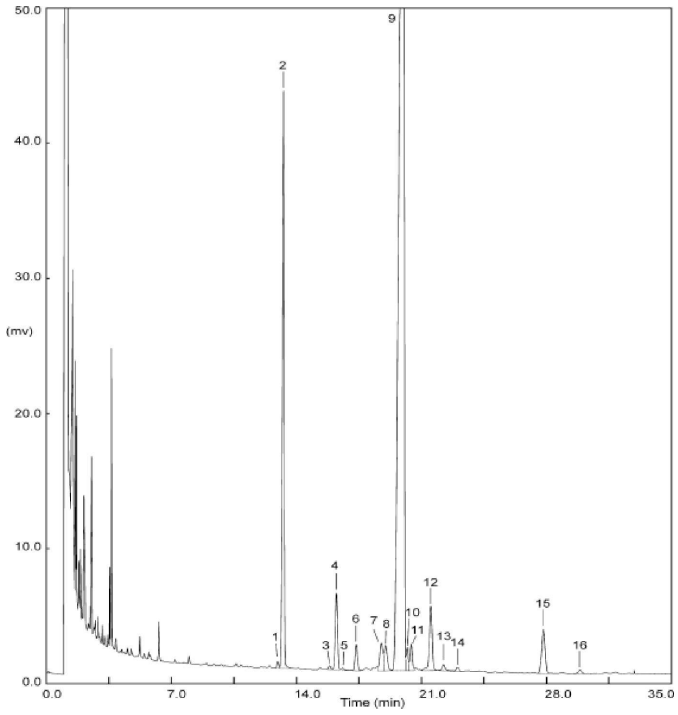
1 Süsivesinikud
2 α-tokoferool
3 Prenoolid
4 Triterpeenalkoholid
5 Alifaatsed alkoholid
6 Metüülsteroolid
7 Steroolid
8 Triterpeendialkoholid

Joonis 1 – oliivijääkõlist saadud seebistumatu fraktsiooni õhekihikromatogramm, mida on elueeritud kaks korda heksaani/dietüüleetriga (65:35), ilmutatud SO4H2-ga (50 %) ning kuumutatud. Kraabitavad ribad on ristküliku piires, 1 on alifaatsete alkoholide ribad ning 2 steroolide ja triterpeendialkoholide ribad.

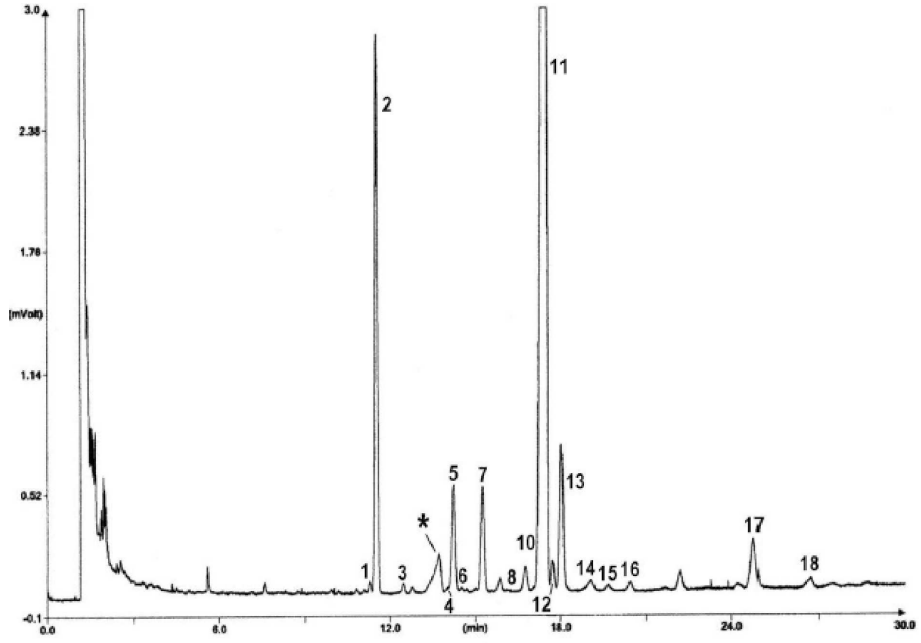
I tabel. Steroolide suhtelised retentsiooniajad

Piik	Identifitseerimisandmed		Suhteline retentsiooniaeg	
			SE 54 kolonn	SE 52 kolonn
1	Kolesterool	Δ-5-kolesteen-3ß-ool	0,67	0,63
2	Kolestanool	5α-kolestan-3ß-ool	0,68	0,64
3	Brassikasterool	[24S]-24-metüül-Δ-5,22-kolestadieen-3β-ol	0,73	0,71
*	Ergosterool	[24S]-24-metüül-Δ-5,7,22 kolestadieen-3β-ol	0,78	0,76
4	24-metüleen-kolesterool	24-metüleen-Δ-5,24-kolestadieen-3ß-oo1	0,82	0,80
5	Kampesterool	(24R)-24-metüül-Δ-5-kolesteen-3ß-ool	0,83	0,81
6	Kampestanool	(24R)-24-metüül-kolestaan-3ß-ool	0,85	0,82
7	Stigmasterool	(24S)-24-etüül-Δ-5,22-kolestadieen-3ß-ool	0,88	0,87
8	Δ-7-kampesterool	(24R)-24-metüül-Δ-7-kolesteen-3ß-ool	0,93	0,92
9	Δ-5,23-stigmastadienool	(24R,S)-24-etüül-Δ-5,23-kolestadieen-3ß-ool	0,95	0,95
10	Klerosterool	(24S)-24-etüül-Δ-5,25-kolestadien-3ß-ool	0,96	0,96

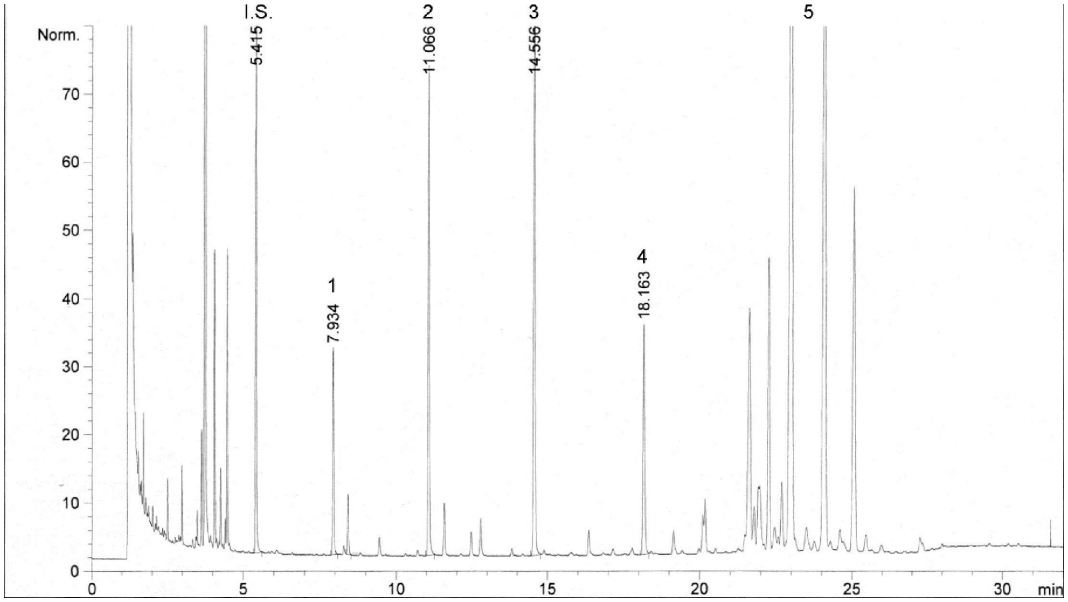
Piik	Identifitseerimisandmed		Suhteline retentsiooniaeg	
			SE 54 kolonn	SE 52 kolonn
11	ß-sitosterool	(24R)-24-etüül-Δ-5-kolesteen-3ß-ool	1,00	1,00
12	Sitostanool	24-etüül-kolestaan-3ß-ool	1,02	1,02
13	Δ-5-avenasterool	(24Z)-24-etülideen-Δ-kolesteen-3ß-ool	1,03	1,03
14	Δ-5,24-stigmastadienool	(24R,S)-24-etüül-Δ-5,24-kolestadieen-3ß-ool	1,08	1,08
15	Δ-7-stigmastenool	(24R,S)-24-etüül-Δ-7-kolesteen-3ß-ool	1,12	1,12
16	Δ-7-avenasterool	(24Z)-24-etülideen-Δ-7-kolesteen-3ß-ool	1,16	1,16
17	Erütrodiool	5α-olean-12-en-3β,28-diool	1,41	1,41
18	Uvaool	Δ12-urseen-3β, 28-diool	1,52	1,52



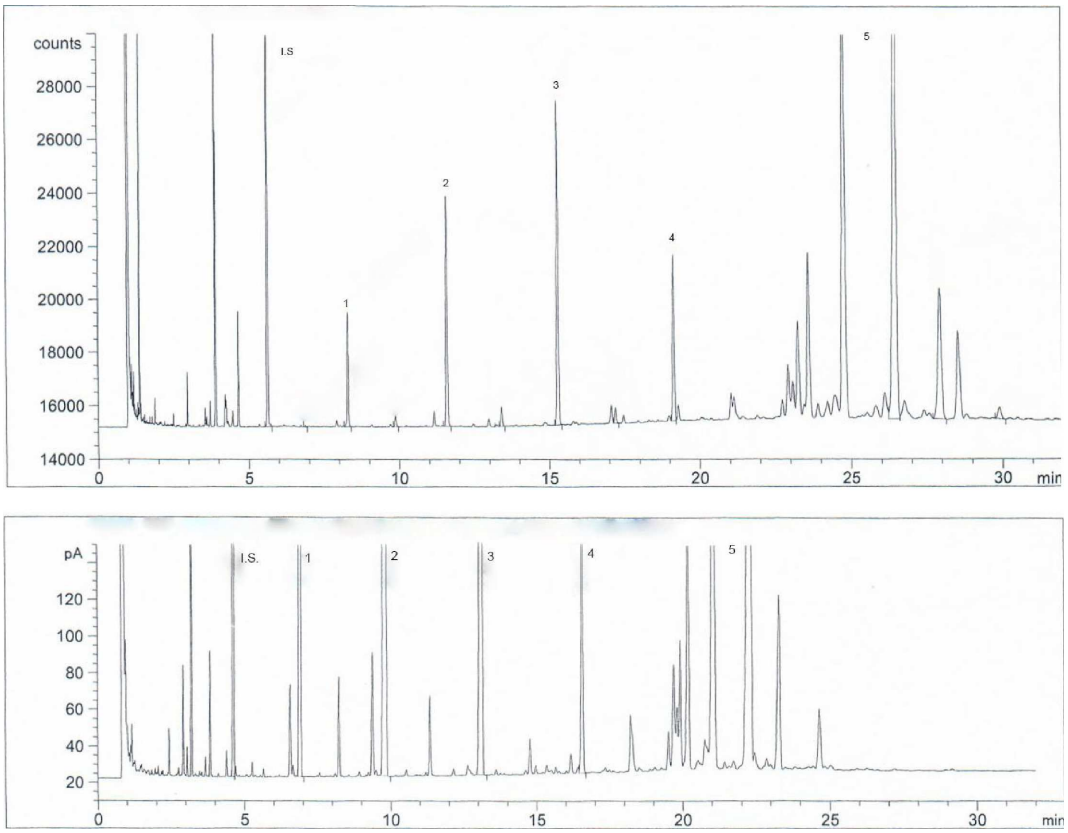
Joonis 2 – rafineeritud oliiviõli sterooli ja triterpeendialkoholide leekionisatsioon-gaasikromatograafiline profiil. (1) Kolesterool, (2) α-kolestanool (I.S.), (3) 24-metüleenkolesterool, (4) kampesterool, (5) kampestanool, (6) stigmasterool, (7) Δ5,23-stigmastadienool, (8) klerosterool, (9) β-sitosterool, (10) sitostanool, (11) Δ5-avenasterool, (12) Δ5,24-stigmastadienool, (13) Δ7-stigmastenool, (14) Δ7-avenasterool, (15) erütrodiool, (16) uvaool.



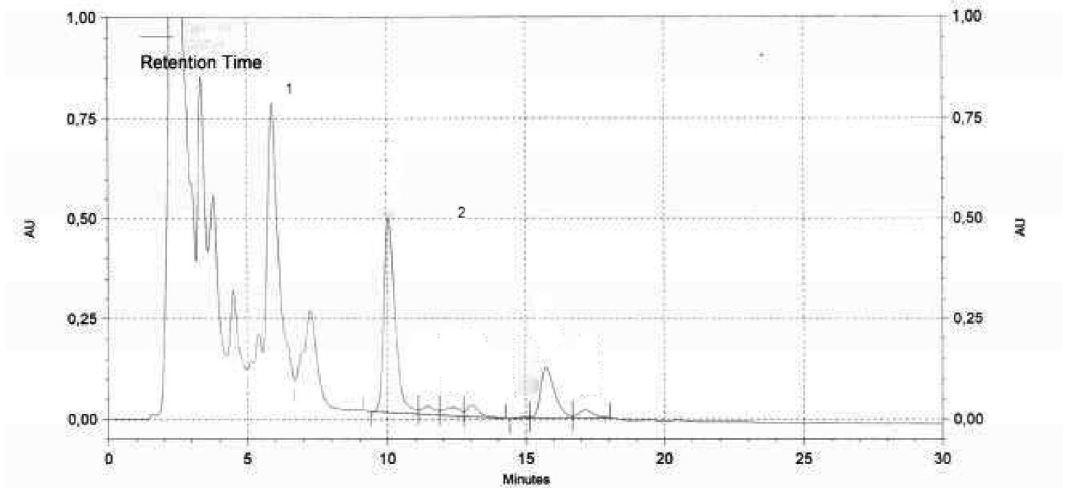
Joonis 3 – lambiõli sterooli ja triterpeendialkoholide leekionisatsioon-gaasikromatograafiline profiil. (1) Kolesterool, (2) α-kolestanool (I.S.), (3) brassikasterool, (4) 24-metüleenkolesterool, (5) kampesterool, (6) kampestanool, (7) stigmasterool, (8) Δ7-kampesterool, (9) Δ5,23-stigmastadienool, (10) klerosterool, (11) β-sitosterool, (12) sitostanool, (13) Δ5-avenasterool, (14) Δ5,24-stigmastadienool, (15) Δ7-stigmastenool, (16) Δ7-avenasterool, (17) erütrodiool, (18) uvaool.



Joonis 4 – oliiviõli alifaatsete alkoholide ja triterpeenalkoholide leekionisatsioon-gaasikromatograafiline profiil. (I.S.) C20-ool, (1) C22-ool, (2) C24-ool, (3) C26-ool, (4) C28-ool, (5) triterpeenalkoholid.



Joonis 5 – rafineeritud oliiviõli ja teistkordselt tsentrifuugitud oliiviõli alifaatsete alkoholide ja triterpeenalkoholide leekionisatsioon-gaasikromatograafiline profiil. (I.S.) C20-ool, (1) C22-ool, (2) C24-ool, (3) C26-ool, (4) C28-ool, (5) triterpeenalkoholid.



Joonis 6 – kõrgrõhuvedelikkromatograafiliselt UV detektori abil eraldatud oliiviõli seebistumatu aine kõrgrõhuvedelik-kromatogramm. (1) Alifaatsed ja triterpeenalkoholid; (2) steroolid ja triterpeendialkoholid.“